

RESUMEN

Las parasitosis en peces constituyen un indicador del estado ambiental de los ecosistemas y permiten establecer pautas de salud pública para el control de zoonosis. Con el objeto de evaluar la presencia de tremátodos en hígado de lisa (*Mugil incilis*), 250 especímenes fueron colectados en la bahía de Cartagena entre Septiembre de 2007 y Abril de 2008. Para cada pescado le fueron registrados varios índices morfométricos, y el hígado fue aislado para la cuantificación de quistes de tremátodos, extraídos mediante macerado y varios lavados por centrifugación. Los rasgos morfológicos de las metacercarias permitieron identificarla como *Ascocotyle (Phagicola) longa*. El valor promedio para el factor de condición fue de 0.715 ± 0.009 , bajo en comparación con anteriores reportes. La prevalencia parasitaria media fue del 93,6%, siendo casi uniforme durante el periodo de muestreo. Los valores generales de intensidad y abundancia media parasitaria para este estudio son 9122.611 ± 141.6 y 8502.273 ± 139.6 quistes de *A. longa* por gramo de hígado respectivamente, Los máximos valores de intensidad y abundancia media parasitaria ocurrieron en el mes de enero (19339.8 ± 3873.8 y 18050.5 ± 3720.5 quistes por gramo de hígado, respectivamente) durante la estación seca. El análisis de correlación reveló una asociación negativa significativa entre la intensidad parasitaria y el factor de condición ($R=-0.352$) al igual que con el índice hepatosomático ($R=-0.372$), y el peso ($R=-0.295$). La histopatología más frecuente mostró quistes metacercariales de *A. longa* rodeados por tejido conectivo y lesiones no específicas como agregados de melanomacrofagos y focos necróticos. Los resultados de este estudio sugieren que el estado fisiológico de las lisas y las condiciones ambientales de la bahía de Cartagena están relacionados con el grado de parasitación de las mismas.

1. INTRODUCCIÓN

La bahía de Cartagena está localizada en la parte central del caribe colombiano y es el centro industrial costero más importante de Colombia. Al recibir aguas del canal del Dique funciona como un estuario, en el cual la pesca constituye un elemento importante de supervivencia para muchas familias. La bahía de Cartagena recibe varias fuentes de contaminación, entre las que se incluyen los vertimientos de aguas negras provenientes del alcantarillado de la ciudad, el aporte de sedimentos por parte del canal del Dique, desechos líquidos industriales y derrames de residuos petrolíferos provenientes de buques y muelles (Garay *et al.*, 2001).

A pesar de la contribución hecha por la bahía en términos de recursos pesqueros, muy poco ha sido llevado a cabo para evaluar la calidad de los mismos. Entre los problemas biológicos asociados con los peces en la bahía, los microorganismos patógenos y los parásitos han sido poco estudiados (Olivero, *et al.*, 2005; Urbina, 2004). Estos últimos, en particular, pueden ser útiles como bioindicadores en monitoreos de contaminación antropogénica (Sures, 2004); la contaminación puede acrecentar el parasitismo de dos maneras; la primera afecta negativamente los mecanismos de defensa del huésped generando un aumento en la susceptibilidad a la infección, la segunda incrementando las densidades poblacionales del huésped intermedio o final apropiado para el ciclo vital del parásito (Lafferty y Kuris, 1999).

Los estudios sobre la presencia y efectos de los parásitos en peces han sido considerables, sin embargo, algunos reportes demuestran que su aparición puede estar influenciada no sólo por contaminantes (hidrocarburos aromáticos polinucleares, metales pesados y dioxinas), que pueden generar supresión progresiva del sistema inmune de los peces (Koponen *et al.*, 2001), sino por otros factores tales como el enriquecimiento orgánico de sedimentos por el alcantarillado doméstico (Marcogliese y Cone, 2001), el ciclo de vida de los

parásitos y el tamaño de la población de peces (Criscione y Blouin, 2004; Bagge *et al.*, 2004), entre otros.

Entre los peces más abundantes de la bahía de Cartagena está la lisa (*Mugil incilis*), perteneciente a la familia Mugilidae. Esta especie es típicamente encontrada en estuarios de aguas tropicales y subtropicales, y aparece con frecuencia en zonas litorales poco profundas de la bahía de Cartagena y en general en toda la región caribe colombiana. La lisa actúa como huésped intermediario-paraténico de nemátodos de la familia Anisakidae (Olivero *et al.*, 2005) y tremátodos Heterophyidae (Manjarrez *et al.*, 2005), más específicamente *Ascocotyle (Phagicola) longa*, un parásito que comúnmente incluye en su ciclo vital a los Mugílidos como su segundo huésped intermediario.

Ascocotyle longa es un agente potencial de zoonosis; en Brasil, fue confirmado en la ciudad de Cananéia que de 102 personas que consumieron lisas crudas (*Mugil platanus*), el 82.82% estaban infectadas por las formas adultas del parásito (Chieffi *et al.*, 1992; Almeida Díaz y Woiciechowski, 1994). En la bahía de Cartagena ha sido hallada la presencia de este parásito en lisas con una alta prevalencia e intensidad en diferentes épocas del año.

Con el ánimo de iniciar la exploración de la posible problemática ambiental derivada de la presencia de estos parásitos en Lisas de la bahía de Cartagena, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar los parámetros de infección parasitaria y las alteraciones histopatológicas en hígado de *Mugil incilis*, generadas por la presencia del tremátodo *Ascocotyle longa*.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección son referidas inicialmente algunas generalidades sobre la lisa, posteriormente es descrito el parásito objeto de estudio y por último son citados reportes relacionados con la presencia de este parásito en varias especies de peces y otros huéspedes.

2.1. *Mugil incilis* (HAKOOK, 1930) (PERCIFORMES: MUGILIDAE), LISA.

Este pez posee cuerpo alargado, comprimido lateralmente, presenta una coloración gris-verdoso en el dorso y los flancos, así como la zona ventral plateada. La aleta caudal posee en su borde posterior un color negruzco con fondo amarillo oscuro. Una serie de líneas oscuras le recorren el cuerpo longitudinalmente, las aletas ventrales son pálidas y transparentes, las aletas pectorales pálidas con puntuaciones negras (figura 1). Habita en ciénagas y aguas salobres y es una de las especies dominantes en los ecosistemas estuarinos del Caribe colombiano (Arrieta y De La Rosa, 2003; Rueda, 2001). La lisa vive sobre fondos arenosos poco profundos, a veces a unos pocos metros de la línea de rompimiento de las olas, su dieta consiste principalmente en detritus, también consume algas, huevos de peces y plancton (Osorio, 1988). Generalmente viajan en cardúmenes que contienen varios cientos de peces y es común encontrarlas cerca de la superficie, donde pueden ser atrapadas con redes, siendo empleada por los pescadores como carnada para atrapar peces más grandes. Sin embargo, tienen a su vez una considerable importancia pesquera y son apreciadas como alimento para consumo humano en muchas localidades de la costa Caribe colombiana.



Figura 1. *Mugil incilis*, (Hakook, 1930) (Perciformes: Mugilidae), Lisa.

La Lisa es reconocida por su capacidad de albergar diferentes especies de parásitos, incluyendo nemátodos de la familia Anisakidae (Olivero, *et al.*, 2005) como *Contracaecum sp.* y *Anisakis sp.*; (Bandes *et al.*, 2005) y *Ascocotyle longa* (Scholz *et al.*, 2001). Los aspectos más sobresalientes de esta última especie aparecen a continuación.

2.2. *Ascocotyle longa* (RANSON, 1920) (DIGENEA: HETEROPHYIDAE).

El genero *Ascocotyle* comprende cerca de 30 especies diferentes, las cuáles en su mayor parte, tienen pequeñas diferencias morfológicas, tales como el número y formación de las espinas y la posición y tamaño de los órganos. También varían en la forma y el espesor del quiste metacercarial, localización de la infección dentro del segundo huésped intermediario y el tipo específico del huésped.

Morfológicamente *Ascocotyle longa* es piriforme y posee 16 espinas circunmolares. Sus huevos miden entre 15-20 x 8-12 micras (Scholz, 1999). Las larvas de *A. longa* presentan estructuras altamente especializadas, tales como glándulas de penetración y órganos sensores que sirven de guía para infectar un determinado tejido, teniendo sus quistes la propiedad de resistir el tratamiento con ácido clorhídrico (Mark y Armitage, 1998). Las metacercarias tienen cuerpo piriforme de entre 323 - 554 micras de largo y 115 - 202 de ancho, poseen una ventosa oral

rodeada por una fila de 16 espinas circunmolares, faringe muscular fuerte, esófago relativamente corto y un lóbulo preoral moderadamente desarrollado. La ventosa oral tiene un apéndice posterior bien desarrollado, a veces sinuosa, en muy pocas ocasiones llega a la faringe. El caecum intestinal es estrecho y largo en torno a la ventosa ventral y el ovario primordial, está curvado medialmente a nivel de la rama anterior de la vejiga excretora, llena de corpúsculos esféricos. La ventosa ventral es esférica y bien desarrollada. Los testículos son simétricos y están cerca del extremo posterior, la vesícula seminal es de dos cámaras posacetabulares. El saco genital es anterosinistral al acetábulo, que contiene el gonótilo bipartito compuesto por dos lóbulos. La vejiga excretora en forma de X está llena de numerosos gránulos oscuros (Scholz *et al.*, 2001) (figura 2).

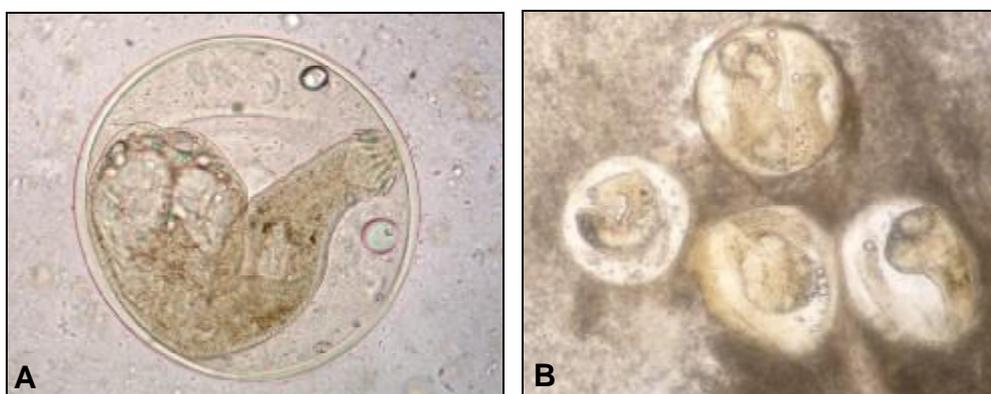


Figura 2. A: Microfotografía de una metacercaria enquistada de *Ascocotyle longa*, aislada del hígado de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena (40x). **B:** Quistes de *A. longa* en hígado (10x).

2.3. CICLO DE VIDA DE *Ascocotyle longa*

El ciclo de vida de *Ascocotyle longa* inicia en las aves y mamíferos. Estos albergan los parásitos adultos en sus intestinos. Los huevos producidos por los parásitos maduros son transportados con las heces iniciando una serie de estadios. Cuando ocurre la defecación en una ciénaga o estuario, ciertos caracoles ingieren huevos, convirtiéndose en los primeros huéspedes intermediarios, la especie de caracol involucrada depende de la región geográfica. En estas especies, los huevos se

convierten en redias. Luego las redias pasan al estado de cercarias, las cuales eventualmente abandonan el caracol. La cercaria es un estado larval libre que puede alojarse en el tracto respiratorio de los peces, el segundo huésped intermediario del parásito. A través de las branquias, las cercarias de *A. longa* entran al torrente sanguíneo, enquistándose luego en forma de metacercaria en el pez hospedero. Un gran número de metacercarias pueden alojarse en branquias, corazón, mesenterio, músculo, hígado, intestino o pared estomacal (figura 3). Estas continúan su desarrollo hasta tremátodo adulto en el intestino del huésped final, un ave piscívora o mamífero (Scholz *et al.*, 2001) (figura 3).

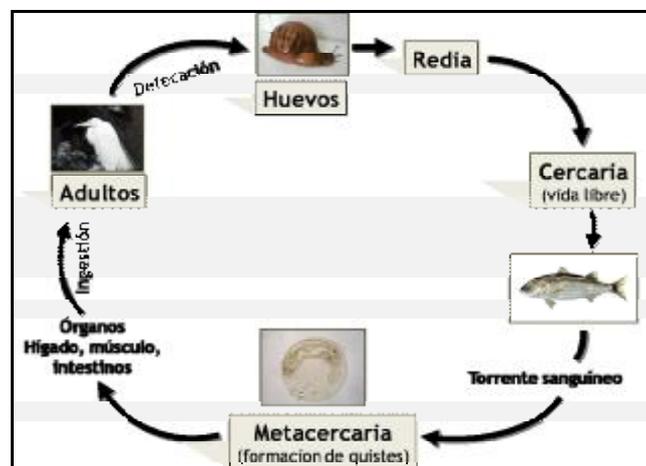


Figura 3. Esquema del ciclo de vida del trematodo *Ascocotyle longa* (Digenea: Heterophyidae).

Los sitios en los que puede enquistarse el parásito podrían estar influenciados por su patogenicidad y por los efectos que produce en la morfología del huésped (Christiansen y Feltman, 2000; Lafferty *et al.*, 2000). Estudios experimentales en renacuajos han demostrado que los quistes de metacercarias pueden alterar su desarrollo, y causar deformidades las cuales dependen precisamente del sitio en el que se enquistan (Sessions y Ruth, 1990; Stopper *et al.*, 2002). Otros factores pueden contribuir en las infecciones parasitarias, tal es el caso de los pesticidas, y otros contaminantes de los que se presume, pueden alterar el sistema inmune (Kiesecker, 2002). Otros estudios realizados por Barros y Amato (1995, 1996),

quienes infectaron experimentalmente hámsteres (*Mesocricetus auratus*) y perros domésticos (*Canis familiaris*), con metacercarias de *A. longa*, describen alteraciones clínicas como incremento en la sensibilidad abdominal, alteración en la consistencia de las heces, baja ganancia de peso y hallazgos histopatológicos característicos de enteritis y enteritis sub-aguda.

2.4. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En términos de distribución global, *Ascocotyle (Phagicola) longa* es un parásito generalizado, si no cosmopolita, reportado en el continente americano, Europa, África y Medio Oriente (Scholz, 1999), en todo tipo de huéspedes, incluyendo humanos, aunque aparece con mayor frecuencia en peces y aves piscívoras. En la tabla 1 aparecen algunos reportes recientes de *A. longa*.

Tabla 1. Diferentes huéspedes de *Ascocotyle longa* reportados en varios países.

AUTOR	PAIS	HOSPEDERO	N. COMÚN	TIPO DE HUÉSPED
Violante <i>et al.</i> , 2008	México	<i>Dormitator latifrons</i>	Popoyote	Segundo intermed
Oliveira <i>et al.</i> , 2007	Brasil	<i>Mugil platanus</i>	Taihna	Segundo intermed
Eira <i>et al.</i> , 2006	Portugal	<i>Vulpes vulpes</i>	Zorro Rojo	Definitivo
Carnevia <i>et al.</i> , 2005	Uruguay	<i>Mugil platanus</i>	Lisa	Segundo intermed
Carnevia <i>et al.</i> , 2004	Uruguay	<i>Heleobia australis</i>	Caracol	Primer intermed
Pinto <i>et al.</i> , 2004	Brasil	<i>Ardea cocoi</i>	Garza Morena	Definitivo
Scholz <i>et al.</i> , 2001	México	<i>Ardea herodias</i>	Garza ceniza	Definitivo
Scholz <i>et al.</i> , 2001	México	<i>Gobiesox fluviatilis</i>	Cucharita	Segundo intermed
Manfredi y Oneto, 1997	Chile	<i>Canis familiaris</i>	Perro	Accidental
Chieffi <i>et al.</i> , 1992	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Accidental
Aguilar De Torrealba, 1992	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	Segundo intermed
Armas de Conroy, 1986	Venezuela	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	Segundo intermed
Ransom, 1920	EE.UU	<i>Vulpes lagopus</i>	Zorro de Alaska	Definitivo

Ascocotyle (Phagicola) longa fue descrito por primera vez del intestino del zorro de Alaska (*Vulpes lagopus*) del parque Zoológico Nacional de Washington, DC, EE.UU. por Ransom en 1920. Desde entonces ha sido reportado en mamíferos naturalmente infectados, como gatos y perros, lobos y nutrias, también en aves piscívoras, tales como *Egretta alba*, *Leucophyx thula*, *Pelecanus occidentalis*,

Phalacrocorax carbo y *Sula leucogaster*; además, diversas aves y mamíferos, como patos, garzas, pelícanos, zarigüeyas, ratas blancas, visones y hámsteres, han servido como hospedadores experimentales definitivos después de haber sido alimentados con metacercarias de lisas *Mugil cephalus*, *M. curema* y *M. trichodon* infectadas naturalmente (Price, 1936; Hutton y Sogandares - Bernal, 1959; Reimer, 1969; Yamaguti, 1971, 1975; Rietschel y Werding, 1978).

Ascocotyle longa, es particularmente abundante en el continente americano como parásito de mamíferos y aves predadoras de peces (Scholz, 1999; Mark y Armitage, 1998). Otros autores que han estudiado este organismo son Travassos (1929), Burton (1958) y Sogandares-Bernal y Lumsden (1963) quienes realizaron estudios taxonómicos y revisiones del género y Sogandares-Bernal y Bridgman (1960) hicieron reportes en peces.

Entre los huéspedes intermediarios de *Ascocotyle longa*, los Mugílidos, especialmente las lisas (*Mugil spp*), son los principales peces que utilizan como segundo hospedador intermediario, existen reportes similares en Venezuela (Aguilar De Torrealba, 1992) y México (Nieto *et al.*, 1998) para *Mugil curema*. Otros autores como Hutton (1964), Conroy y Conroy (1984); y Armas de Conroy (1986), han señalado un significativo nivel de infección (72.5 - 92.5%) en lisas parasitadas con metacercarias de *A. longa*. Este tremátodo también ha sido reportado en el intestino delgado de aves piscívoras, como la garza morena (*Ardea coco*), en estudios realizados en Brasil (Pinto *et al.*, 2004).

En cuanto a huéspedes accidentales, existen reportes de la presencia de *A. longa* en el intestino de perros domésticos en Chile (Manfredi y Oneto, 1997), donde los autores asumen una infección proveniente de Mugílidos de los cuerpos de agua circundantes. En Brasil son conocidos estudios de fagicolosis en humanos (Chieffi *et al.*, 1990; 1992; Almeida Díaz y Woiciechovski, 1994) asociados al consumo de Mugílidos *in natura*, la ausencia de una sintomatología característica y el

desconocimiento general respecto al parásito ciertamente contribuyen a que la prevalencia de fagicolosis en humanos sea subestimada (Oliveira *et al.*, 2007).

En huéspedes naturalmente infectados por *Ascocotyle longa*, han sido reportadas lesiones hemorrágicas a nivel de la mucosa intestinal, infiltrado leucocitario con predominio de neutrófilos, y a nivel histopatológico, plasmocitos y eosinófilos (Snyder *et al.*, 1989; Chieffi *et al.*, 1992). Barros y Amato (1995, 1996), que infectaron experimentalmente hámsteres (*Mesocricetus auratus*) y perros domésticos (*Canis familiaris*), con metacercarias de *A. longa*, describen alteraciones clínicas como incremento en la sensibilidad abdominal, alteración en la consistencia de las heces, baja ganancia de peso y hallazgos histopatológicos característicos de enteritis y enteritis sub-aguda.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la hipótesis evaluada en esta tesis fue la siguiente: “La presencia de *Ascocotyle longa* en *Mugil incilis* (Lisa) de la bahía de Cartagena genera alteraciones histopatológicas en el hígado y cambios en índices morfométricos asociados con el estado de salud de esta especie”.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Describir los parámetros de infección parasitaria y las alteraciones histopatológicas en hígado de *Mugil incilis*, generadas por la presencia del tremátodo *Ascocotyle longa*.

3.2. ESPECÍFICOS

- Describir los índices morfométricos y el estado de salud de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena.
- Establecer la estacionalidad de la infección parasitaria de acuerdo con los parámetros, prevalencia, abundancia e intensidad media, para *A. longa* en *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena.
- Establecer la relación entre la parasitación por *Ascocotyle longa* y los índices morfométricos en *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena.
- Determinar las características de las lesiones histopatológicas producidas por el enquistamiento de *Ascocotyle longa*, en hígado de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena.

4. METODOLOGÍA

4.1. ÁREA DE ESTUDIO. La bahía de Cartagena con una superficie de 82 km² y una profundidad promedio de 16 m, es el principal componente del sistema marino de la ciudad de Cartagena. Está situada al suroccidente de la ciudad, entre latitud 10° 26' - 10° 16' N y longitud 75° 30' - 75° 36'. Limita al este con la costa donde está localizada la zona industrial de Mamonal y su margen sur-este limita con las Islas de Barú y Tierra Bomba. Es considerada por definición geológica una bahía (Schaus, 1974), sin embargo, tiene un aporte significativo de aguas fluviales por medio del canal del Dique; que es una vía de comunicación fluvial de 113 km de largo, construido para facilitar la navegación entre Cartagena y el río Magdalena.

El canal del Dique convertido en un componente del sistema fluvial del río Magdalena, generó grandes cambios morfológicos en la bahía al introducir elementos sedimentológicos adicionales. Con el tiempo la sobrecarga de partículas en suspensión, producto del arrastre fluvial, ocasionó la muerte de las formaciones coralinas del interior de la bahía; el influjo de aguas de origen continental, un elemento nuevo dentro del contexto, obligó a que la bahía comenzara a comportarse como un estuario típico en donde dominan condiciones de agua de mezcla. La presencia del manglar y los amplios rangos de variación de los parámetros ambientales, son testimonios concretos del hecho (IDEADE, 1993).

4.2. RECOLECCIÓN DE *Mugil incilis*. En este trabajo fueron analizadas un total de 250 muestras en ocho meses de muestreo, abarcando desde septiembre de 2007 hasta abril de 2008, período que incluyó la época de lluvias (sep. – nov.) y la estación seca (dic. – mar.). Las lisas fueron recolectadas directamente de la bahía de Cartagena, zona de Castillogrande, con la ayuda de pescadores locales, quienes usan atarrayas en sus faenas de pesca (Resolución No. 025 del 2 de enero de 1971). Una vez capturados, los especímenes fueron transportados al laboratorio en neveras con hielo.

4.3. MEDICIÓN DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LOS PECES. Previo a la disección, los especímenes de *Mugil incilis* fueron enumerados y se midieron los siguientes parámetros: peso, longitud total y longitud estándar (boca – inicio de aleta caudal). El hígado, el bazo y las branquias fueron extraídos realizando una incisión en la línea media ventral del pez, desde el espacio íter opercular hasta el ano (Olivero *et al.*, 2006), registrando el peso total de los órganos mencionados. A partir de estas mediciones fueron calculados los siguientes parámetros morfométricos:

Factor de condición, $K = (P.T/L^3) \times 100$, donde, P.T = peso total; L = Longitud total (Lagler, 1966).

Índice hepatosomático, IHS = (Peso húmedo del hígado / peso total) x 100
(Maddock y Burton, 1998).

Índice branquio-somático, IBrS = Peso húmedo de las branquias / peso total

Índice bazo-somático. IBS = Peso húmedo del bazo / peso total (Valenzuela, *et al.*, 2002).

Una vez pesado, el hígado fue dividido en dos fracciones, una utilizada para el conteo de quistes de *A. longa* y la otra para análisis histopatológicos, las cuales fueron conservadas en solución salina (NaCl al 0.9%) a -20°C y solución tamponada de formalina al 10% respectivamente.

4.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE QUISTES DE *Ascocotyle longa* PRESENTES EN EL HÍGADO DE *Mugil incilis*. La fracción de hígado utilizada para el análisis de los quistes, fue suspendida en solución salina (NaCl al 0.9%) y mantenida a -20°C hasta el momento del análisis, en un período de tiempo no superior a 48 horas. Para el análisis cuantitativo de los quistes, la submuestra de

hígado, con un peso aproximado de 0.5 g, fue macerada con PBS estéril. El pellet obtenido fue lavado por centrifugación un mínimo de cinco veces usando PBS (9000 g por 3 minutos). Para realizar el conteo de quistes, el pellet lavado fue diluido en PBS hasta un volumen de 1 mL, y 10 µL del mismo fueron analizados usando un microscopio óptico, al menos en 10 preparaciones por muestra (Manjarrez, 2005). Las metacercarias y quistes fueron identificadas de acuerdo con las claves de Scholz *et al.* (2001).

El número promedio de quistes en los 10 µL de suspensión fue multiplicado por 100 y dividido por el peso de muestra utilizado. El número total de quistes por gramo de hígado fue cuantificado extrapolando el valor obtenido en la muestra al peso total de hígado.

$$Q/g = NL \times 100 / PH$$

Q/g = Número de quistes por gramo de hígado.

NL = Número de larvas en 10 µL.

PH = Peso de la muestra de hígado.

4.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE INFECCIÓN PARASITARIA La prevalencia, abundancia e intensidad media parasitaria fue evaluada en el total de peces recolectados, siguiendo los criterios de Bush *et al.* (1997). La prevalencia es definida como el número de huéspedes infectados con al menos un parásito dividido por el total de huéspedes revisados. El valor es expresado en porcentaje según la fórmula:

$$P = (HI/HE) \times 100$$

P = Prevalencia,

HI = Número de huéspedes infectados,

HE = Número de huéspedes revisados.

La intensidad media parasitaria hace referencia al número promedio de parásitos encontrados de una especie determinada, respecto al número de hospedadores infectados; por otra parte, la abundancia media parasitaria es el número promedio

de parásitos encontrados de una especie determinada, respecto al número total de individuos examinados.

4.6. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS EN HÍGADO DE *Mugil incilis*. Empleando la muestra de hígado almacenada en formalina buferizada, el tejido fue inicialmente sometido a deshidratación utilizando etanol absoluto y varios lavados con xileno. Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en parafina (Culling *et al.*, 1985) seccionados en 5 μm y coloreados con Hematoxilina y Eosina (H&E) (Bancroft y Stevens, 1982). El número de quistes por campo observados en objetivo de 10x fue medido con una reglilla ocular micrométrica. Por su parte, las alteraciones histopatológicas observadas fueron registradas de forma semicuantitativa de acuerdo con su porcentaje de aparición en cada campo observado. En todos los casos fue empleado un microscopio Olympus BX41 con cámara Olympus C-7070 wide zoom.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Todos los datos cuantitativos son reportados como la media \pm error estándar. Las comparaciones de promedios para variables analizadas durante los diferentes meses de muestreo fueron evaluadas utilizando ANOVA, previa revisión de normalidad y homogeneidad de varianza empleando los test de Kolmogorov-Smirnov y Barlett, respectivamente. Las relaciones cuantitativas entre los índices parasitarios y los parámetros morfométricos fueron determinadas utilizando correlación lineal y análisis de regresión. Para todos los casos, el criterio de significancia establecido fue $p < 0.05$ (Zar, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. ÍNDICES MORFOMÉTRICOS EN *Mugil incilis*.

Los índices morfométricos encontrados para *Mugil incilis* en la bahía de Cartagena, son presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Promedios generales de los parámetros biométricos de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena durante el período de muestreo.

PARÁMETRO	VALORES
Número de peces	250
Longitud (cm)	23.702 ± 0.205
Peso (g)	99.888 ± 3.183
Factor de Condición	0.715 ± 0.009
Índice Hepatosomático (%)	0.986 ± 0.032
Índice Bazosomático (%)	0.095 ± 0.006
Índice Branquiosomático (%)	5.669 ± 0.073

La relación entre el tamaño y el peso de las lisas, fue valorada mediante análisis de regresión lineal, generando los modelos descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Modelos evaluados para análisis de regresión entre el tamaño y el peso de *Mugil incilis*, siendo X longitud total (cm) y Y peso (g).

MODELOS	ECUACION	R	N
Lineal	$y = 13.2X - 214.83$	0.8746	250
Logarítmico	$y = 310.67\ln(x) - 882.59$	0.8429	250
Polinómica	$y = 0.7442x^2 - 24.123x + 243.76$	0.9101	250
Exponencial	$y = 6.348e^{0.1115x}$	0.8955	250
Potencial	$y = 0.0185x^{2.6869}$	0.8833	250

Las relaciones Peso-Longitud obtenidas con los modelos de regresión polinómico y exponencial son presentados en la figura 4.

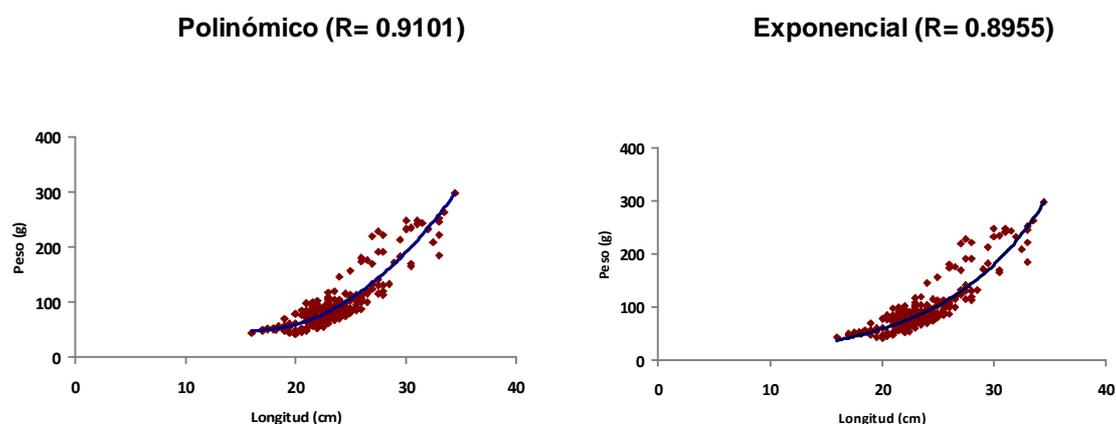


Figura 4. Modelos Polinómicos y exponencial para la relación entre el peso y la longitud de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena.

Las medias en los diferentes meses de muestreo para el factor de condición, los índices hepatosomáticos, bazosomáticos y branquiosomáticos, aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Valores promedio mensuales del factor de condición y los índices organosomáticos para *M. incilis* de la bahía de Cartagena. FC (k): Factor de condición, I.H.S.: Índice hepatosomático, I.B.S: Índice bazosomático I.Br.S: Índice Branquiosomático

Meses	FC(k)	I.H.S.	I.B.S.	I.Br.S.
Septiembre	0.91 ± 0.014	1.22 ± 0.063	0.05 ± 0.008	5.33 ± 0.209
Octubre	0.85 ± 0.019	1.37 ± 0.077	0.09 ± 0.008	4.81 ± 0.147
Noviembre	0.71 ± 0.017	1.03 ± 0.091	0.10 ± 0.012	5.34 ± 0.165
Diciembre	0.65 ± 0.015	1.27 ± 0.142	0.07 ± 0.008	6.19 ± 0.108
Enero	0.58 ± 0.014	0.55 ± 0.052	0.07 ± 0.014	6.43 ± 0.179
Febrero	0.61 ± 0.015	0.87 ± 0.054	0.14 ± 0.038	5.41 ± 0.147
Marzo	0.75 ± 0.024	0.82 ± 0.059	0.09 ± 0.006	5.03 ± 0.156
Abril	0.62 ± 0.012	0.67 ± 0.033	0.10 ± 0.017	6.97 ± 0.186

Entre los índices morfométricos hallados en este estudio, presentados en la tabla 2, cabe resaltar que el factor de condición de las lisas para este estudio tiene un valor promedio de 0.715 ± 0.009 , muy por debajo del reportado por Olivero *et al*, en 2005, que encontró para la misma zona un valor promedio de 0.99 ± 0.01 .

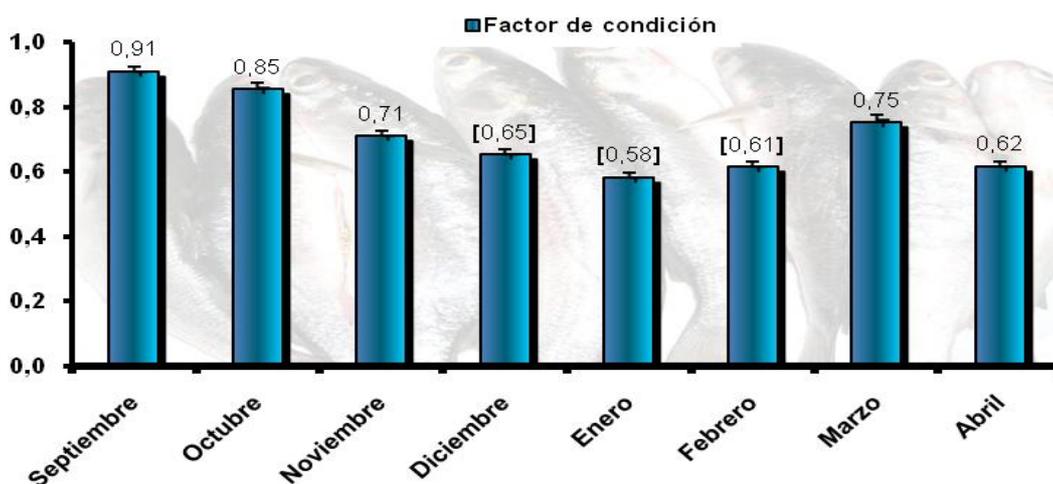


Figura 5. Promedios mensuales del factor de condición para *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena. []: Meses de la estación seca.

En los meses correspondientes a la estación seca (diciembre – febrero) puede apreciarse una caída en los valores promedio del factor de condición de *M. incilis* (figura 5).

5.2. DESCRIPCIÓN DE *Ascocotyle longa*.

En el hígado de *Mugil incilis* fue hallada la presencia del tremátodo *Ascocotyle (Phagicola) longa*, identificado según las claves de Scholz *et al.* (2001). Las metacercarias encontradas en lisas de la bahía de Cartagena, típicamente tienen la apariencia presentada en la figura 6. Los quistes aparecen redondeados y algunas veces un poco ovalados. En el interior se encuentran las metacercarias, las cuales poseen aspecto piriforme. En la cabeza siempre aparecen 16 espinas circummolares alrededor de la ventosa oral, distintivo para *A. longa* (figura 6B), También puede distinguirse en la una línea en donde está ubicada la faringe (F) y debajo de esta, el caecum intestinal (CI) (figura 6A) rodeando el ovario primordial (OP), el gonótilo (G) y la ventosa ventral (VV) (figura 6C). El caecum intestinal parece desembocar en la vejiga excretora (VE) en la que se observan corpúsculos esféricos (figura 6C).

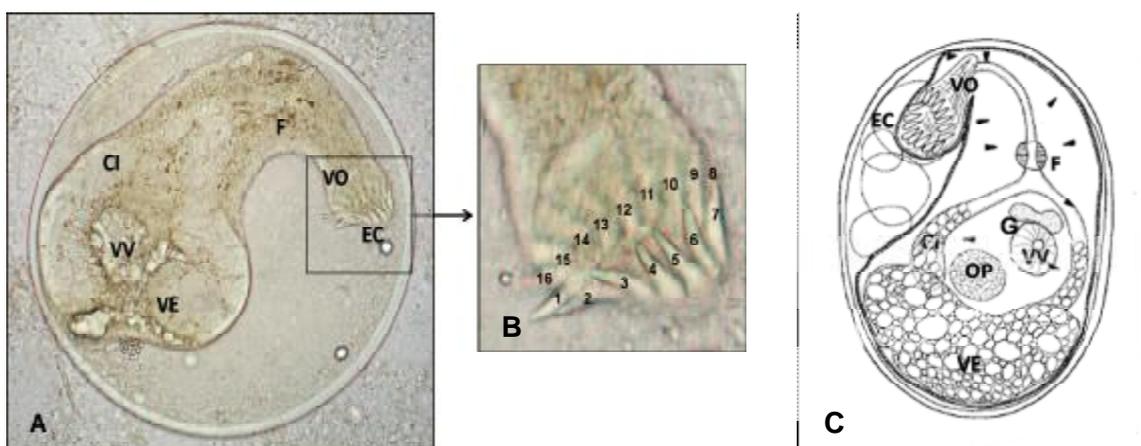


Figura 6. Fotografía de quiste de metacercaria de *Ascocotyle longa* aislado de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena (A) comparado con la descripción del mismo hecha por Scholz *et al.*, 2001 de un quiste aislado de *Mugil cephalus* (C). Detalle de la parte anterior de la metacercaria (B). EC: Espinas Circunmolares, VO: ventosa oral, F: Faringe, VV:

ventosa ventral, CI: Caecum intestinal, OP: Ovario primordial, G: Gonotilo, VE: Vegiga excretora.

5.3. MEDICIÓN DE LOS QUISTES DE *Ascocotyle longa*.

Los quistes de *Ascocotyle longa* fueron medidos en un macerado de hígado de *Mugil incilis*, obteniendo para 60 quistes una media de 153.08 ± 2.07 micras. Los tamaños de los quistes medidos oscilaron entre 110 y 200 micras como puede observarse en la figura 7. De igual forma fue medido el diámetro de 250 quistes en los diferentes cortes histológicos del hígado de las lisas colectadas en el período de muestreo; cuyo tamaño promedio fue 155.48 ± 1.87 micras, los valores obtenidos estuvieron entre 80 y 270 micras (figura 8), lo que concuerda con la descripción de Scholz *et al.*, (2001), quien reporta el tamaño de los quistes de metacercarias de *A. longa* entre 154 - 286 micras.

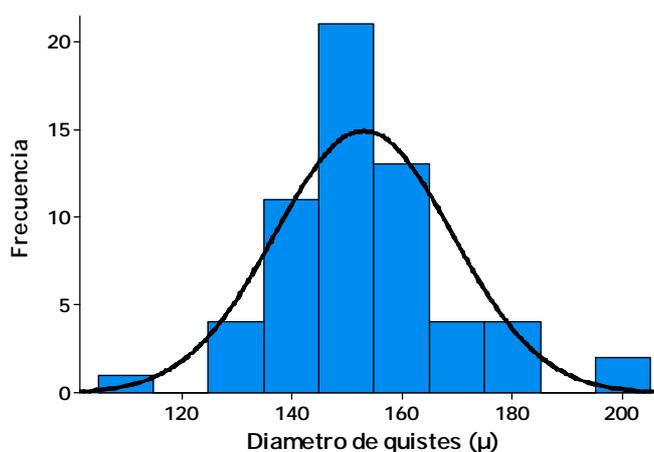


Figura 7. Frecuencia de tamaños de quistes medidos en macerado de hígado de *Mugil incilis* recolectadas en la bahía de Cartagena.

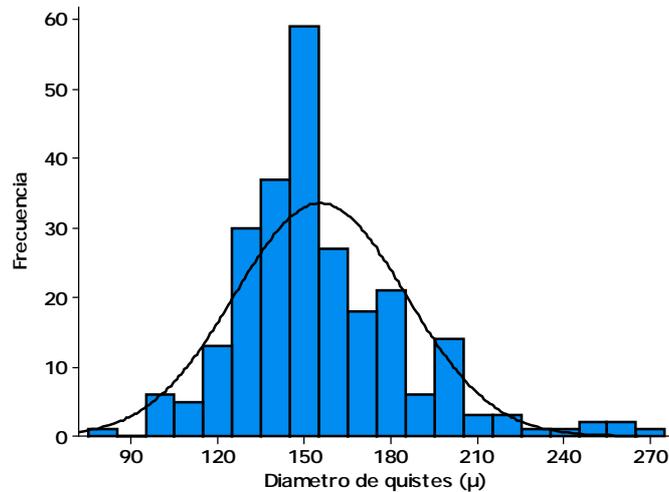


Figura 8. Frecuencia de tamaños de quistes medidos en cortes histológicos de hígados de *Mugil incilis* recolectadas en la bahía de Cartagena.

5.4. VARIACIÓN MENSUAL DEL NÚMERO DE QUISTES *Ascocotyle longa* POR GRAMO DE HÍGADO EN *Mugil Incilis*.

En la figura 9, pueden observarse los promedios mensuales del número de quistes de *Ascocotyle longa* por gramo de hígado cuantificados en lisas de la bahía de Cartagena. Los mayores valores de infección por *A. Longa* ocurrieron en los meses de diciembre de 2007 y enero de 2008, los cuales coinciden con la temporada seca.

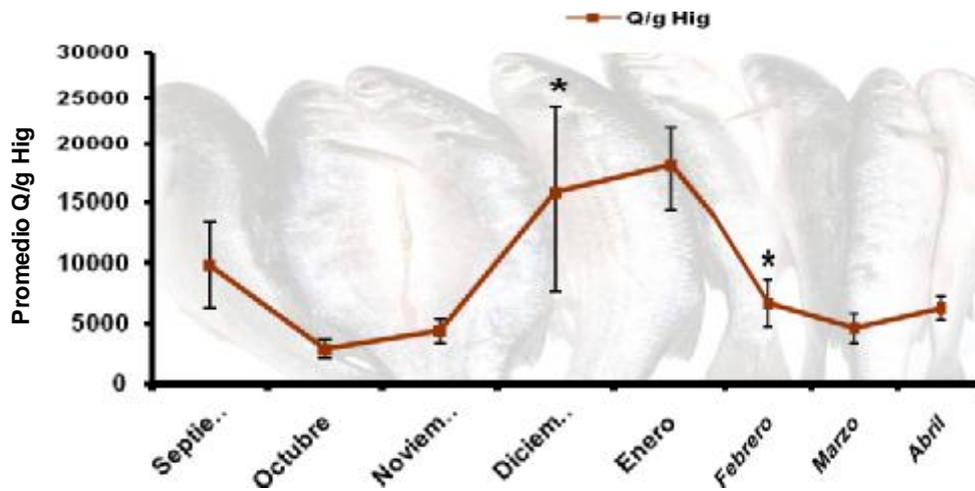


Figura 9. Variación mensual de la infestación por *A. longa* en lisas de la bahía de Cartagena. Q/g Hig: Quistes de *A. longa* por gramo de hígado de *Mugil incilis*. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al mes anterior.

Las siguientes secciones muestran los parámetros de infección parasitaria y las relaciones encontradas entre la parasitación por *A. longa* y los índices biométricos, así como las alteraciones histopatológicas generadas por la presencia del tremátodo a nivel hepático.

5.5. PREVALENCIA, INTENSIDAD Y ABUNDANCIA PARASITARIA.

Los valores promedio mensuales correspondientes a la prevalencia, intensidad y abundancia parasitaria de tremátodos aislados de *Mugil incilis*, son mostrados en las figuras 10 y 11.

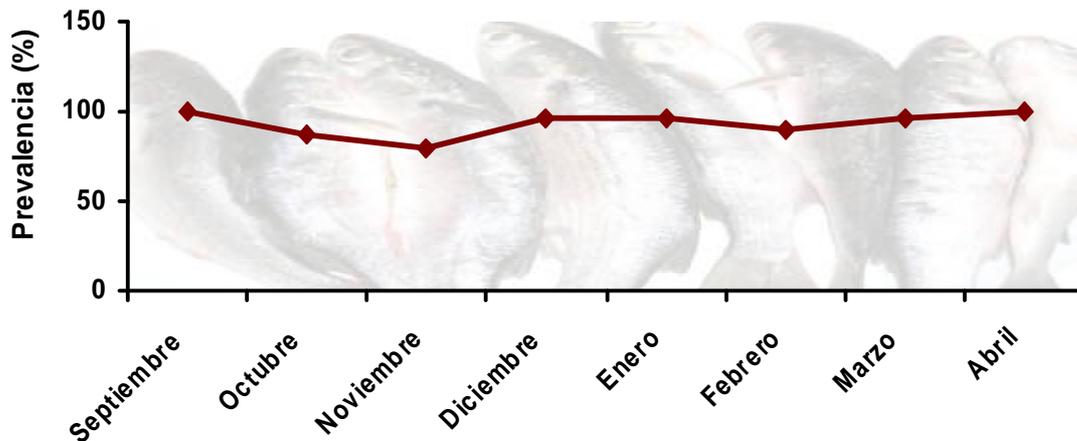


Figura 10. Prevalencia parasitaria de tremátodos en *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena colectados entre los meses de septiembre de 2007 y abril de 2008.

De los 250 individuos de *Mugil incilis* evaluados en este estudio el 93.6% resultaron infectados por quistes de metacercarias de *Ascocotyle longa*. Los meses de septiembre y abril donde la prevalencia de *A. longa* es de 100%, (figura 10), coinciden con el comienzo de las temporadas lluviosas, mientras que octubre y noviembre, los meses mas lluviosos del año, presentan las prevalencias mas bajas (87.8 y 79.4% respectivamente).

Las variaciones mensuales correspondientes a la abundancia e intensidad media parasitaria de *Ascocotyle longa* en hígado de *Mugil incilis* pueden observarse en la figura 11. Los valores generales de intensidad y abundancia media parasitaria para este estudio fueron 9122.611 ± 141.6 y 8502.273 ± 139.6 quistes de *A. longa* por gramo de hígado respectivamente. Enero fue el mes en el cual estos parámetros alcanzaron sus máximos valores (intensidad= 19339.8 ± 3873.8 y abundancia= 18050.5 ± 3720.5 quistes de *A. longa* por gramo de hígado).

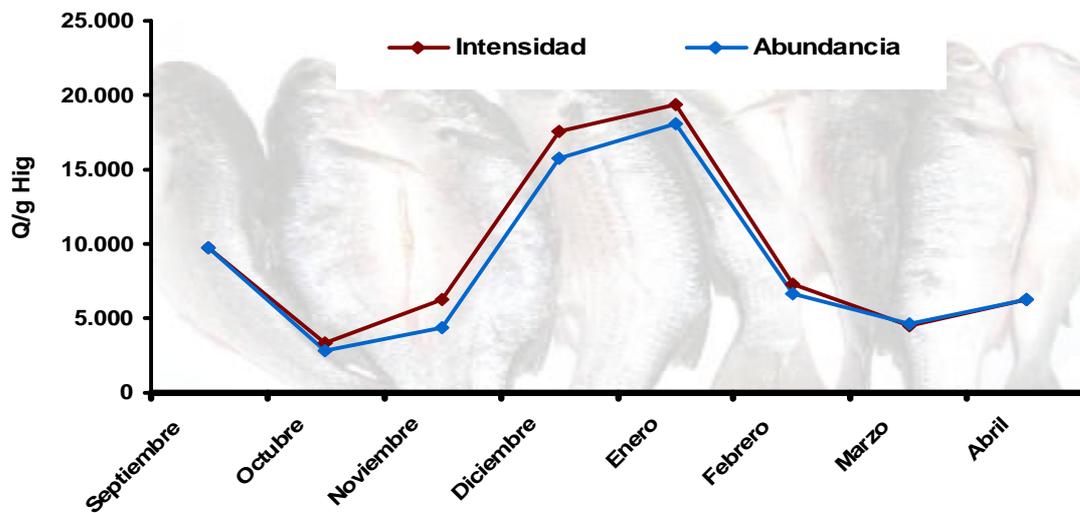


Figura 11. Intensidad y abundancia media parasitaria de tremátodos en *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena colectados durante los meses de septiembre de 2007- abril de 2008. Q/g Hig: Quistes de *A. longa* por gramo de hígado.

5.6. CORRELACIONES ENTRE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE *Mugil incilis* E INTENSIDAD PARASITARIA.

La longitud, peso, factor de condición, índices somáticos e intensidad parasitaria, fueron correlacionados entre sí. Los resultados pueden observarse en la tabla 5.

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre los parámetros morfométricos y la intensidad parasitaria en *Mugil incilis*. F.C: Factor de condición, I.H.S: Índice hepatosomático, I.B.S: Índice bazosomático, I.Br.S: Índice branquiosomático, Intens: Intensidad media parasitaria (Número de quistes por gramo de hígado).

	Intens.	Peso	Longitud	F. C.	I.H.S.	I.B.S.	I.Br.S
Intens.	1						
Peso	-0.295 P<0.0001	1					
Longitud	-0.195 P=0.002	0.813 P<0.0001	1				
F. C.	-0.304 P<0.0001	0.265 P<0.001	-0.241 P<0.0001	1			
I.H.S.	-0.403 P<0.0001	0.234 P=0.0002	-0.035 P=0.578	0.516 P<0.0001	1		
I.B.S.	-0.150 P=0.037	0.165 P=0.021	0.083 P=0.248	0.096 P=0.179	0.224 P=0.001	1	
I.Br.S	0.409 P<0.0001	-0.593 P<0.0001	-0.337 P<0.0001	-0.501 P<0.0001	-0.273 P=0.0001	-0.089 P=0.214	1

En la tabla 5, puede notarse una correlación negativa significativa entre el número de quistes de *A. longa* por gramo de hígado y el índice hepatosomático ($r=-0.403$, $p<0.0001$), a su vez, la correlación con el factor de condición ($r=-0.304$, $p<0.0001$) y con el peso, ($r=-0.295$, $p<0.0001$) también es negativa y significativa.

Por otra parte, existe correlación positiva entre el índice branquiosomático y el número de quistes de *A. longa* por gramo de hígado ($r=0.4099$, $p<0.0001$).

5.7. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS EN HÍGADO DE *Mugil incilis*

Los resultados del análisis histopatológico realizado en los cortes de hígado de *Ascocotyle longa* son presentados en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de lesiones histopatológicas halladas en las muestras de hígado analizadas de *Mugil incilis*, de la bahía de Cartagena entre los meses de septiembre de 2007 y abril de 2008. C.M.M: Centros de melanomacrofagos, Quistes/C10X: Quistes observados en un campo con el objetivo 10x.

Meses.	N	Peso del Hígado (g)	Quistes /C10X (Promedio)	C.M.M.	Necrosis	Congestión vascular
Septiembre	33	0.91 ± 0.07	2.87 ± 0.90	42.42%	--	--
Octubre	9	2.51 ± 0.20	3.88 ± 0.65	100.00%	11.11%	44.44%
Noviembre	7	0.95 ± 0.08	9.57 ± 1.21	100.00%	--	14.28%
Diciembre	7	0.97 ± 0.11	8.57 ± 2.03	100.00%	--	14.28%
Enero	7	0.43 ± 0.06	18.42 ± 3.27	100.00%	85.71%	--
Febrero	7	0.96 ± 0.08	13.00 ± 1.41	100.00%	57.14%	14.28%
Marzo	7	0.94 ± 0.10	9.00 ± 2.28	85.70%	--	20.57%
Abril	7	0.50 ± 0.02	14.00 ± 3.10	100.00%	42.85%	--

Los cortes histológicos de hígado de *Mugil incilis* evidenciaron la presencia de numerosos quistes cuyo tamaño promedio es 155.48 ± 1.87 micras y una media de aparición por campo (10x) de 7.61 ± 0.80 . La condición histopatológica predominante en el hígado de los peces fue de quistes rodeados por una cápsula de tejido fibroso (figura 12). Las lesiones histopatológicas halladas en los hígados de las lisas infectadas con *A. longa* son presencia de centros de melanomacrofagos (figura 13), y en menor proporción la aparición de focos de necrosis (figura 14) principalmente en los meses de enero y febrero de 2008 (tabla 6). Las lesiones histopatológicas halladas en el hígado fueron asignadas a la categoría de lesiones no específicas, según lo recomendado por Feist *et al.*, 2004.

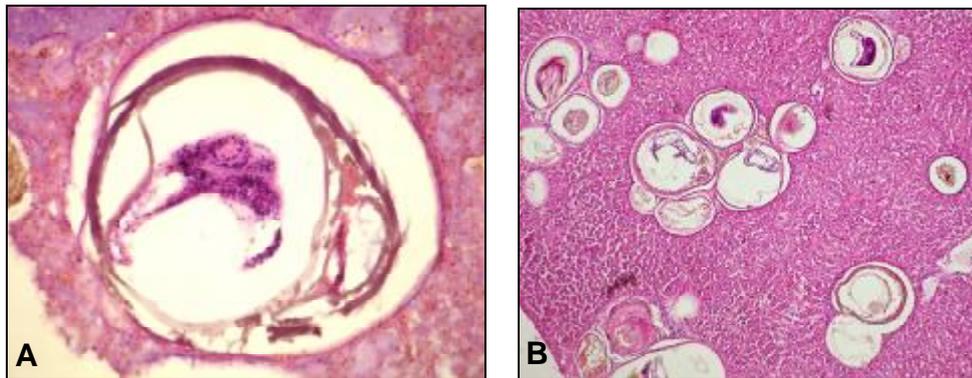


Figura 12. **A:** Capsula de tejido conectivo alrededor de un quiste de *Ascocotyle longa* en el hígado de *Mugil incilis* (40x). **B:** quistes de *A. longa* en tejido hepático de *M. incilis* (10x).

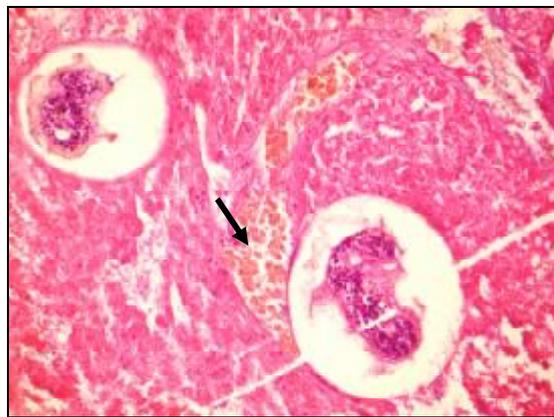


Figura 13. Centros de melanomacrofagos alrededor de los quistes de *Ascocotyle longa* hallados en el hígado de *Mugil incilis* (40x).

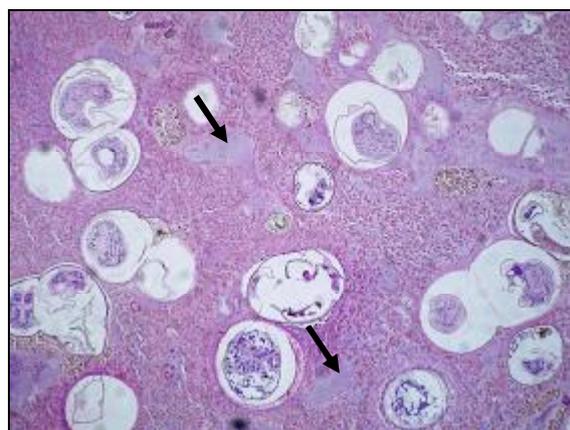


Figura 14. Focos de necrosis en el tejido hepático de *Mugil incilis* (10x).

6. DISCUSION

La relación entre la longitud y el peso proporciona información sobre el estado fisiológico del pez y es un reflejo de las condiciones ecológicas del hábitat (Ricker, 1975). De acuerdo con Schmidt *et al.*, (1999), un pez con buen estado nutricional posee factor de condición igual o mayor a 1. Los valores tan bajos encontrados (0.715 ± 0.009) podrían sugerir un impacto directo del pobre estado ambiental de la bahía de Cartagena sobre esta especie. Una disminución en el factor de condición, en el índice hepatosomático o en ambos puede considerarse reflejo una disminución en las reservas de energía (Barton *et al.*, 1987; Goede y Barton, 1990), dado que estos índices están relacionados positivamente con el contenido total de lípidos y carbohidratos en músculo e hígado (Lambert y Dutil, 1997). En los meses correspondientes a la estación seca disminuyen los valores promedio del factor de condición de *M. incilis*; esta circunstancia, sumada a la contaminación a la que está expuesta la bahía de Cartagena podría tener efectos sobre la salud de las poblaciones de lisas.

La elevada prevalencia parasitaria presentada en este estudio coincide con lo reportado por Oliveira *et al.*, 2007, que encontró una prevalencia del 100% en *Mugil platanus* adultas en Brasil; también coincide con los resultados de Armas De Conroy (1986) en Venezuela. En cuanto a huéspedes finales, Eira, *et al.* (2006) encontró una prevalencia de 24.19% en el intestino del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en Dunas de Mira (Portugal) y Pinto, *et al.* (2004) de 11.1% en la garza morena (*Ardea cocoi*) en Brasil. La prevalencia parasitaria mensual no varía substancialmente, es decir, que es casi uniforme a lo largo del período de muestreo, permaneciendo por encima del 80%. Olivero, *et al.*, (2005) describe esta misma tendencia la uniformidad para la prevalencia parasitaria de nemátodos en lisas de la bahía de Cartagena.

En el período de muestreo, los valores mas altos para la intensidad y abundancia media parasitaria ocurrieron en el mes de enero, en este mes no hubo

precipitaciones en la ciudad de Cartagena y tuvo un registro de 312.8 horas totales de brillo solar (el más alto en el período de muestreo) (CIOH, 2008); estas condiciones ocasionan un aumento en la salinidad, dado que la misma, varía de acuerdo con los cambios estacionales en las precipitaciones (Rueda, 2001). Autores tales como Kirk *et al.* (2000) y Bergmann y Motta (2004) han reportado variación en los niveles de infecciones parasitarias en peces con respecto a la salinidad, así mismo, Olivero *et al.* (2005), reportó un incremento en la prevalencia y la abundancia media parasitaria de nemátodos en lisa para la estación seca.

La correlación inversa entre la intensidad parasitaria de *Ascocotyle longa* en lisas y el índice hepatosomático, el factor de condición y el peso, podría sugerir que los parásitos pueden estar impactando la fisiología del pez, incluso, es conocido que los tremátodos heterophyidae pueden afectar la dinámica poblacional causando descenso en la tasa de supervivencia y disminución en el tamaño de los peces (Coleman y Travis, 1998).

La correlación positiva hallada entre la intensidad parasitaria de *Ascocotyle longa* en lisas y el índice branquiosomático, podría ser explicada mediante dos hipótesis, por una parte, las metacercarias en las branquias han sido asociadas con la proliferación de cartílago generando hiperplasia del epitelio branquial (Olson y Pierce, 1997); por otra parte, la penetración de las cercarías en el pez conduce a un incremento en la frecuencia del cambio de sentido del flujo respiratorio (Paller y Uga, 2008), lo cual eventualmente podría generar un aumento en el tamaño de la branquias.

En los cortes histológicos del hígado de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena pueden apreciarse cápsulas de tejido conectivo que aíslan los quistes, este hecho fue reportado para la misma especie de trematodo en *Mugil platanus* por Oliveira *et al.*, 2007 y por Hicks y Steele, 2003, para *Ascocotyle tenuicollis* en el corazón del pez *Fundulus heteroclitus*. La presencia de una cápsula fibrosa alrededor de los quistes es una respuesta del organismo frente a la infestación por el trematodo.

Es notable la presencia de centros de melanomacrófagos en el tejido hepático y alrededor de los quistes. El incremento en la densidad de centros de melanomacrófaos es generalmente relacionado con lesiones hepáticas importantes (Pacheco y Santos, 2002), como procesos degenerativos. Este fue relacionado en *Pleuronectes americanus*, con la contaminación con PAHs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) y pesticidas en las áreas urbanas en la costa de Estados Unidos (Chang *et al.*, 1998); estudios realizados sedimentos y bilis de peces en la bahía de Cartagena indican contaminación con PAHs en este cuerpo de agua (Johnson *et al.*, 2008). Algunos estudios han sugerido la función de los melanomacrófagos en el hígado de los peces está ligada con la destrucción, desintoxicación o reciclaje de compuestos endógenos y exógenos (Haaparanta *et al.*, 1996), aunque también esta asociada con enfermedades infecciosas o infestación parasitaria (Agius, 1979; Vogelbein *et al.*, 1987)

Las lesiones como focos de necrosis encontrados en el hígado de *Mugil incilis* de la bahía de Cartagena han sido asociadas con la exposición de los peces a contaminación por metales, como cobre (Paris-Palacios *et al.*, 2000) y mercurio (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 1996), este último ha sido reportado en concentraciones importantes en sedimentos de la bahía de Cartagena y en muestras biológicas como peces y cangrejos (Alonso *et al.*, 2000; Olivero *et al.*, 2008).

7. CONCLUSIONES

De un total de 250 especímenes de (*Mugil incilis*) de la bahía de Cartagena analizados entre los meses de septiembre de 2007 y abril de 2008, lo primero que resalta es el bajo factor de condición que presentan las lisas de la bahía de Cartagena lo que muestra una deficiencia en el estado nutricional y fisiológico de esta especie

Mugil incilis es parasitada por el tremátodo *Ascocotyle longa*, el cual forma quistes en el hígado, Los dos métodos de conteo de quistes empleados (en macerado de hígado y en placas histológicas) muestran altos niveles de infección entre los meses de diciembre, enero y febrero durante la estación seca.

La prevalencia de *Ascocotyle longa* es alta y bastante uniforme a lo largo del período de muestreo. los mayores valores de los índices de intensidad y abundancia parasitaria fueron hallados en los meses de diciembre y enero durante la estación seca probablemente influenciado por la disminución en la condición física de los peces.

La correlación negativa entre la intensidad media parasitaria de *A. longa* en *M. incilis* con el peso, el índice hepatosomático y el factor de condición de la especie, expresa una asociación entre el nivel de infección por este tremátodo con el estado de fisiológico y/o nutricional de las lisas.

En los cortes histológicos de hígado de *M. incilis* es común la observación de quistes aislados por cápsulas de tejido conectivo, como respuesta del organismo del pez a la parasitación, las lesiones histopatológicas encontradas parecen no estar relacionadas con la presencia de parásitos.

8. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones es recomendable:

Hacer una caracterización inmunológica del huésped parasitado por *Ascocotyle longa* para conocer los efectos producidos a este nivel.

Realizar un estudio comparativo de los parámetros de infección parasitaria de *A. longa* entre la bahía de Cartagena y otra zona poco contaminada.

Examinar la presencia del tremátodo *A. longa* en el intestino de aves piscívoras y mamíferos asociados a cuerpos de agua de la región, así como en exámenes coprológicos realizados en personas que consuman mugílicos frecuentemente.

Indagar sobre el primer huésped intermediario de *A. longa* en la región Caribe colombiana.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agius, C. (1979). The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Disease*. **2**: 337–43.
- Aguilar De Torrealba, L. (1992), Aspectos morfológicos de los sistemas gastro-intestinales, bazo, circulatorio, respiratorio, renal y muscular esquelético de mugilidos (*Mugil curema valeciennes*), Tesis. Universidad central de Venezuela, Facultad de ciencias veterinarias.
- Almeida Díaz, E. Woiciechowski, E. (1994). Ocorrência da *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos e no homem, em Registro e Cananéia, SP. *Higiene Alimentaria*. **8**(31): 43-46.
- Alonso, D., Pineda, P., Olivero, J., González, H., Campos N. (2000). Mercury levels in muscle of two fish species and sediments from the Cartagena Bay and the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Environmental pollution*. **109**(1):157-63.
- Arrieta, L., De La Rosa, J. (2003). Estructura de la comunidad íctica de la ciénaga de Mallorquín, Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. **32**: 231-242.
- Armas De Conroy, G. (1986). Investigacions sobre la fagicolosis en lisas (Mugilidae) de águas americanas. I Estúdios taxonômicos de *Phagicola sp.* (Tremátoda: Heterophyidae) em mugillídeos sudamericanos. *Revista Ibérica de Parasitología*. **46**(1):39-46.
- Bagge, A., Poulin, R., Valtonen, E. (2004). Fish population size, and not density, as the determining factor of parasite infection: a case study. *Parasitology*. **128**(3):305-313.
- Bancroft, J. y Stevens, A. (1982). Theory and Practice of Histological Techniques. 2nd. Londres: Churchill Livingstone.
- Banded, A., Selgrad, S., Ríos, M., Salas, H. (2005) Nemátodos de la familia Anisakidae en el pescado fresco que se expende para el consumo humano en Caracas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*. **36**(2):21-29.
- Barros, L., Amato, S. (1995). Aspectos patológicos observados em hámsteres (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com metacercarias de *Phagicola longus* (Ranson, 1920) Price, 1932 (Digenea, Heterophidae).
- Barros, L., Amato, S. (1996). Infecções experimentais de caes com metacercarias de *Phagicola Longa* (Ranson, 1920) Price, 1932. *Revista Brasileira de Parasitología*. **5**(2): 61-64.
- Barton, B., Schreck, C., Barton, L. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological condition, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*. **2**:173-185.
- Bergmann, G., y Motta, P. (2004). Infection by anisakid nematodes *Contracaecum* spp. in the Mayan cichlid fish *Cichlasoma (Nandopsis) urophthalmus* (Gunther 1862). *Journal of Parasitology*. **90**: 405–407.
- Bush, A., Lafferty, K., Lotz, J., Shostak, A. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, **83**: 575–583.
- Burton, P. (1958). A Review of the Trematode Genera *Ascocotyle* (Looss) and *Phagicola* (Faust) of the family Heterophyidae. *Proceedings of the helmintological Society of Washington*. **25**: 117-122.
- Carnevia, D.; Perretta, A.; Venzal, J., Castro, O. (2004) *Helobia australis* (Mollusca, Hydrobiidae) y *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae), primer y segundo hospedador intermediario de *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea, Heterophyidae) en Uruguay. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinária* **13** (1): 283.
- Carnevia, D., Castro, O., Perretta, A., Venzal, J. (2005) Identificación en Uruguay de metacercarias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* Digenea:Heterophyidae parasitando lisas, *Mugil platanus* Pisces:Mugilidae y evaluación del riesgo de zoonosis y afecciones en

- mascotas. *Veterinaria (Montevideo)* **40** (159-160): 19-23.
- Centro de Investigaciones Oceanograficas e Hidrograficas. (2008). Boletín meteomarinero mensual del Caribe Colombiano. Enero -2008. *CIOH*. **150**:6-8
 - Chang, S., Zdanowicz, V., Murchelano, R. (1998). Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. *Journal of Marine Sciences*, **55**: 954-969.
 - Chieffi, P., Gorla, M., Torees, D., Dias, R., Mangini, A., Monteiro, A., Woiciechowski, E. (1992). Human infection by *Phagicola* sp (Trematoda – Heterophyidae) in the municipality of registro, Sao Paulo, Brazil. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **95**: 345-348
 - Christiansen, J., Feltman, H. (2000). A relationship between trematode metacercariae and bullfrog limb abnormalities. *Proceedings of the Iowa Academy of Science* **107**:79–85.
 - Conroy, G. (1986). Investigaciones sobre Fagicolose en (Mugilidae) de aguas americanas. I. estudios taxonomicos de Phagicola sp. (Trematoda- Heterophyidae) en mugilideos sudamericanas. *Revista Iberoamericana de Parasitologia*. **46**: 39-46.
 - Conroy, G., Conroy, D. (1984). Diseases and parasites detected grey mullets (Mugilidae) Brasil. I. Adult silver Mulletts (*Mugil curema* Val.1836) *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*. **4**: 154-55.
 - Criscione, C., Blouin, M. (2004). Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution Int J Org Evolution*. **58**(1):198-202
 - Culling, C. (1985). *Cellular pathology technique*. 4ed. London: Butterworthe Co.
 - Coleman, F., Travis, J. (1998). Phenology of recruitment and infection patterns of *Ascocotyle pachycystis*, a digenean parasite in the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Environmental Biology of Fishes*. **51**: 87–96
 - Eira, C., Vingada, J., Torres, J. y Miquel, J. (2006) The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildlife Biology*, **2**(1): 26-36.
 - Feist, S., Lang, T., Stentiford, G., Kolhler, A. (2004). Biological effects of contaminants: use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. **38**, ICES, Copenhagen.
 - Garay, J., Marín, B., Vélez, A. (2001). Contaminación marino-costera en Colombia. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2001. *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR*.
 - Goede, R., y Barton, B. (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessments indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society Symposium*. **8**:145-166.
 - Haaparanta, A., Valtonen, E., Hoffaman, R., Colmes, J. (1996). Do macrophages centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality ? *Aquatic Toxicology*, **34**: 253-272.
 - Hicks, T., Steele, E. (2003). Histological effect of *Ascocotyle tenuicollis* (digenea: heterophyidae) metacercarial infection on the heart of *Fundulus heteroclitus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Journal of the South Carolina Academy of Science*, **1**:10–18.
 - Hutton, R. (1964), A second list of parasites from marine and coastal animals of Florida, *Transactions of the American Microscopical Society*, **83**, 439± 447.
 - Hutton, R., Sogandares-Bernal, F., (1959), Further notes on Trematoda encysted in Florida mullets, *Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences*, **21**: 329-334.
 - Instituto de Estudios Ambientales para el Desarrollo -IDEADE, (1993) Cartagena, ambiente y desarrollo. Consideraciones para una gestión integral. *Pontificia Universidad Javeriana* 130pp.
 - Johnson, B., Olivero, J., Lu, S., Guette, J., Baldiris, R., O'Byrne, I., Aldous, K., Addink, R., Kannan, K. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites

- in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. *Environmental Pollution*. **151**(3):452-9.
- Kiescker, J. (2002). Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?. *National Academy Science Letters*. **99**: 9900-9904.
 - Kirk, R., Kennedy, C., Lewis, J. (2000). Effect of salinity on hatching, survival and infectivity of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) larvae. *Disease of Aquatic Organisms*, **40**: 211–218.
 - Koponen, K., Myers, M., Ritola, O., Huuskonen, S., Lindström-Seppä, P. (2001). Histopathology of feral fish from a PCB-contaminated freshwater lake. *Ambio*. **30**(3):122-126.
 - Lafferty, K., Kuris, A. (1999). How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography*. **44**: 925–931.
 - Lafferty, K., Thomas, F., Poulin, R. (2000). Evolution of host phenotype manipulation by parasites and its consequences. In *Evolutionary biology of host – parasite relationships; theory meets reality*. Elsevier Science. R. Poulin, S. Morand, and A. Skorping (eds.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, p. 117–127pp.
 - Lagler, K. (1966). *Freshwater fishery biology*. W.M.C. Brown Co, 421 pp.
 - Lambert, Y., Dutil, J., (1997). Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)?. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**(1):104–112
 - Maddock, D., Burton, M. (1998). Gross and histological of ovarian development and related condition changes in American plaice. *Journal of Fish Biology* **53**: 928-944.
 - Manjarrez, G. Arroyo, B., Olivero, J. (2005). Infestación por anisákidos y lesiones histopatológicas asociadas, durante el desarrollo de *mugil incilis*. Tesis de Maestría en Microbiología, Universidad de cartagena.
 - Manfredi, M., Oneto, M. (1997). *Phagicola longa* (Heterophyidae) in dogs from Chile: morphological findings and taxonomical problems. *Parassitologia*. **39**(1):9-11.
 - Marcogliese, D., Cone, D. (2001). Myxozoan communities parasitizing *Notropis hudsonius* (Cyprinidae) at selected localities on the St. Lawrence River, Quebec: possible effects of urban effluents. *Journal of Parasitology*. **87**(5):951-956.
 - Mark, H., Armitage, M. (1998). Complex life cycles in heterophyid trematodes: structural and developmental design in the *Ascocotyle* complex of species. Presented at the Fourth International Conference on Creationism Pittsburgh, PA, August 3-8.
 - Nieto, P., Paez, R., Barrera, B. (1998). Fauna helmintológica de la lebrancha *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) de la laguna de la Mancha, Municipio de Actopan, Veracruz, México. *Res. VI Congreso Nacional de Ictiología*. 21-24 de Octubre, Tuxpam.
 - Oliveira, S., Hernandez, F., Araújo, S., Mendez, A. (2007) Metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae), em *Mugil platanus*, no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Ciencia Rural*, **37**: 4.
 - Oliveira-Ribeiro, C., Fanta, E., Turcatti, N., Cardoso, R., Carvalho, C. (1996). Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). *Biocell*, **20**: 171-178.
 - Olivero, J., Baldiris, R., Arroyo, B. (2005). Nematode infection in *Mugil incilis* (lisa) from Cartagena Bay and Totumo Marsh, north of Colombia. *Journal of Parasitology*. **91**(5): 1109-1112.
 - Olivero, J., Baldiris, R., Guette, J., Benavides, A., Mercado, J., Arroyo, B. (2006). Nematode infection in *Hoplías malabaricus* (moncholo) from rivers and marshes of Colombia. *Veterinary Parasitology*. **140**(1-2): 90-97.
 - Olivero, J., Johnson, B., Baldiris, R., Güette, J., Magallanes, E., Vanegas, L., Kunihiro, N. (2008). Human and crab exposure to mercury in the Caribbean coastal shoreline of

- Colombia: Impact from an abandoned chlor-alkali plant. *Environment International*. **34**(4):476-82.
- Olson, R., Pierce, J., 1997. A trematode metacercaria causing gill cartilage proliferation in steelhead trout from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*. **33**: 886-890.
 - Osorio, D. (1988). Ecología trófica de *Mugil curema*, *M. incilis* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae) en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe colombiano: Análisis cualitativo y cuantitativo. *Anales del Instituto de Investigaciones Marinas Punta Betín*, **18**:113–126.
 - Pacheco, M., Santos, M. (2002). Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**: 331-347.
 - Paller, V., Uga, S., 2008. Attachment and penetration of *Centrocestus armatus* (Digenea: Heterophyidae) cercariae to gills of secondary intermediate fish hosts. *Journal of Parasitology*. **94**: 578-583.
 - Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. (2000). Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachyodanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of cooper sulfate. *Aquatic Toxicology*, **50**: 109-124.
 - Pinto, R., Barros, L., Tortelly, L., Teixeira, R., Gomes, D. (2004). Prevalence and pathology of helminths of ciconiiform birds from the Brazilian swamplands. *Journal of Helminthology*. **78**: 259–264.
 - Price, E. (1936), A new heterophyid trematode of the genus *Ascocotyle* (Centrocestinae), *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **3**: 31- 32.
 - Reimer, L. (1970). Digene Trematoden und Cestoden der Ostseefische als natürliche Fischmarken. *Parasitologische Schriftenreihe*, **20**:1–144.
 - Ricker, W. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Department of environment Fisheries and Marine service. *Bulletin of Fish Resources*. **191**: 382.
 - Rietschel, G., Werding, B., (1978), Trematodes of birds from northern Colombia, *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, **57**: 57- 82.
 - Rueda, M. (2001). Spatial distribution of fish species in a tropical estuarine lagoon: a geostatistical appraisal. *Marine Ecology Progress Series*. **222**: 217–226.
 - Schaus, R. (1974). Circulación y transporte de aguas en la Bahía de Cartagena de Indias, mediante su presentación por medio hidrodinámico numérico de circulación. *DIMAR. DC. 20*: pp. 1-49. Tesis Biol. Mar., Univ. Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.
 - Schmidt, D., Kumke, M., Seibel, F., Frimmel, F. (1999). The Influence of Natural Organic Matter (NOM) on the Desorption Kinetics of Pyrene and Naphthalene from Quartz. *Chemosphere*. **38** (12): 2807-2824.
 - Scholz, T. (1999). Taxonomic study of *Ascocotyle* (Phagicola) *longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae) and related taxa. *Systematic Parasitology*. **43**(2): 147-158.
 - Scholz, T., Aguirre-Macedo, M., Salgado-Maldonado, G. (2001). Trematodes of the family Heterophyidae (Digenea) in Mexico: a review of species and new host and geographical records. *Journal of Natural History*. **35**(12): 1733- 1772.
 - Sessions, S., Ruth, S. (1990). Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*. **254**: 38-47.
 - Sogandares-Bernal, F., Bridgman, J.F. (1960). Three *Ascocotyle* Complex Trematodes (Heterophyidae), encysted in fishes from Louisiana including the description of a new genus. *Tulane Studies in Zoology*. **8**(2): 31-39.
 - Sogandares-Bernal, F., Lumsden, R. (1963). The generic status of the heterophyid trematodes of the *Ascocotyle* complex, including notes on the systematics and biology of the *Ascocotyle angrense* Travassos, 1916. *Journal of Parasitology*. **49**: 264-274

- Snyder, D., Hamir, A., Nalón, C., Rupprecht, C. (1989). *Phagicola angrense* (Digenea: Heterophyidae) as cause of enteritis in Raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases*. **25**: 23-275.
- Stopper, G., Hecker, L., Franssen, R., Sessions, S. (2002). How trematodes cause limb deformities in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*. **294**: 252-263.
- Stunkard, H.W., Uzman, R.J. (1955). The Killifish, *Fundulus heteroclitus*, Second Intermediate Host of the Trematode, *Ascocotyle* (*Phagicola*) *diminuta*. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory*. **109**: 475-483.
- Sures, B. (2004). Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. **20**(4):170-177
- Travassos, L. (1929). Revisao de Genero *Ascocotyle* Looss, 1899 (Trematoda, Heterophyidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **23**: 61-79.
- Urbina, D. (2004). Diversidad genética de los rotavirus y su implicación en la prevención de la diarrea. *Revista MVZ Córdoba*. **2**(9): 474-472.
- Valenzuela, A., Alveal, K., Tarifeno, E. (2002) Respuestas hematológicas de Truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) a estres hipoxico agudo: serie roja. *Gayana*. **66**(2): 255-261.
- Violante-González, J., Aguirre-Macedo, M., Vidal-Martínez, V. (2008). Temporal variation in the helminth parasite communities of the Pacific fat sleeper, *Dormitator latifrons*, from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *The Journal of parasitology*. **94**(2):326-34.
- Vogelbein, W., Fournie, J., Overstreet, R. (1987). Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melanomacrophage centres in *Rivulus marmoratus*. *Journal of Fish Biology*. **31**: 145-53.
- Yamaguti, S., (1971). Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Parts I, II (Tokyo: Keigaku Publishing Co.), 1074 pp.
- Yamaguti, S., (1975). A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates (Tokyo: Keigaku Publishing Co.), 590 pp.
- Zar, J. (1996). Biostatistical analysis. 3ra ed.: Prentice-Hall Inc. New Jersey, 662pp.