

Técnicas de bandeo C y G en nematodos parásitos

CUTILLAS, C.; MORENO, J.; GUEVARA, D.C.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla. Sor Gregoria de Santa Teresa, s/n.
41012-Sevilla. España.

Summary

C and G banding chromosome techniques have been performed in order to use such techniques in nematode parasites as a tool to realize a correct karyotype to apply it for systematic purposes.

Key Words: C and G chromosome banding, nematode parasites.

Resumen

Se ha llevado a cabo la aplicación de diversas técnicas de bandeo C y G, en orden a estandarizar el uso de éstas en nematodos parásitos como base para la realización de un correcto cariotipo con fines sistemáticos.

Palabras Clave: Bando cromosómico C y G, nematodos parásitos.

Introducción

Desde el punto de vista taxonómico, el número y morfología de los cromosomas parece tener bastante uniformidad en especies pertenecientes a un mismo género, incluso entre especies de géneros estrechamente relacionados. La cariología aporta innumerables ejemplos de diferencias claras entre los cariotipos de especies morfológicamente tan similares que pueden o no ser totalmente diferenciadas por los métodos taxonómicos clásicos (Hirai y col.¹⁶; Huettel y Dickson¹⁷; Valero y col.²⁹).

Para comprender los procesos relacionados con la diferenciación de las poblaciones, especies y categorías superiores, es importante comprender que es lo que ocurre a nivel del cariotipo.

Los primeros trabajos cariológicos de nematodos parásitos se basaban en la determinación de los cromosomas sexuales en distintas especies (Boveri², Edwards¹⁰...). Walton³⁰ dió una lista de cincuenta especies de nematodos con su número cromosómico haploide. Los trabajos posteriores de muchos autores citan los cariotipos y número diploi-

de de los nematodos parásitos (Gonzales y Malmann¹³, Dmitrieva⁹, Cutillas y col.⁷).

No obstante, desde el desarrollo de las técnicas citológicas se han encontrado muchas especies (*Dictyocaulus filaria*, *Drosophila virilis*) que presentaban los cromosomas en metafase con poca diferenciación morfológica en preparaciones teñidas convencionalmente. Es en tales casos donde se hace más necesario el uso de las técnicas de bandeo como base a realizar el cariotipo correcto. Estas técnicas se basan en el bandeo diferencial de los cromosomas metafásicos somáticos, permitiendo la identificación individual de los cromosomas; con estos métodos se han identificado todos los cromosomas del hombre, del ratón y otros muchos géneros.

En Parasitología, algunos autores (Grossman y col.¹⁴; Short y Grossman²⁷; Hirai y col.¹⁵) han estudiado los cariotipos de algunas especies de trematodos de acuerdo al patrón de bandas C observado.

El presente trabajo intenta demostrar la utilidad de las técnicas de bandeo en el estudio cromosómico de los nematodos parásitos.

Material y Métodos

Las técnicas de bandeo cromosómico ensayadas se han llevado a cabo en ejemplares de *Dictyocaulus filaria* procedentes de *Ovis aries* sacrificados en distintos mataderos de la provincia de Sevilla.

1.—Técnica de tinción convencional.

Un paso previo a la aplicación de las técnicas de bandeo fue la realización de una tinción convencional para la localización de las placas cromosómicas objeto de estudio. La técnica utilizada fue la de Slizynski (González y Malmann¹³). Una vez localizadas las placas más interesantes se procede a destañirlas, antes de la ejecución de la técnica de bandeo correspondiente. Para ello se utilizó la técnica de McKenzie y Lubs²⁰.

2.—Técnicas de bandeo propiamente dichas.

A.—Técnica de Sumner²⁸ propiamente dicha:

A.1.—Técnica de Sumner modificada y consistente en:

Incubación de las preparaciones en Ba(OH)₂·8 H₂O al 5%, recientemente preparado, a 37°C durante 1 hora y media. El resto del proceso se mantiene igual que en la técnica original.

A.2.—2ª modificación a la técnica original de Sumner y consistente en:

Fijación con metanol-acético (3:1) durante 15 minutos. Incubación con Ba(OH)₂·8 H₂O al 5%, durante 5 minutos a 50°C. Tinción con Giemsa al 2% durante 30 minutos.

B.—Técnica de Luciani y col.¹⁸.

B.1.—Modificación a esta técnica consistente en la incubación en 2xSSC a 60°C durante 3 horas.

B.2.—2ª modificación, consistente en la incubación en 2xSSC a 60°C durante 3 horas y prolongación del tratamiento con tripsina a 20 segundos.

C.—Técnica de bandeo G de Schnedl²⁵.

D.—Técnica de bandeo G de Gallimore y Richardson¹².

E.—Técnica de bandeo G de Comings y Avelino⁶.

3.—Obtención de resultados.

Para la obtención de las microfotografías, que reflejan y materializan los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha usado un fotomicroscopio BH-2 marca Olympus.

Por otro lado, las películas fotográficas empleadas han sido Kodalith y Panatomic (8 y 32 ASA respectivamente), ambas de la casa Kodak. En su revelado se han utilizado los reveladores Rodinal S y Rodinal N y Valca Universal siendo fijados con Valca Fival.

Por último el papel fotográfico para la positivación de los negativos es marca Negra NBN 11P normal politenizado blanco brillante.

Resultados

1.—Técnicas de bandeo C.

Cuando se aplica la técnica de bandeo C aparecen dos tipos de bandas: las bandas C positivas (más teñidas que las regiones eucromáticas) y otras denominadas bandas C negativas porque aparecen menos teñidas que las restantes regiones del cromosoma.

Las bandas C positivas son clasificadas, de acuerdo a su localización a nivel del cromosoma, como bandas paracentroméricas (localizadas en el centrómero o próximas a él), bandas terminales (cuando ocupan regiones teloméricas) y bandas intersticiales (Santos y col.²⁴).

Este método de bandeo C detecta la presencia de heterocromatina centromérica (constitutiva) (Okada y Comings²²) que corresponde a las bandas C positivas. Estas bandas se correlacionan con heterocromatina constitutiva rica en ADN satélite, por eso se piensa que estas bandas C positivas representan áreas de reasociación de ADN altamente repetitivo (Comings⁵; Chuprevich y col.⁸ y Arrighi y Hsu¹).

Hoy día se llega a la conclusión que la aparición de bandas C es el resultado de varias causas (Caragna y Redi⁴):

1.—Gran contenido de ADN repetitivo fácilmente reasociable.

2.—Grado diferencial de empaquetamiento local.

3.—Abundancia de citosina metilada.

4.—Relación particular entre ADN y proteínas histonas o no histonas en las bandas C.

5.—Envolvimiento del complemento proteínico como sustrato del bandeo.

6.—Extracción diferencial del ADN de regiones eu y heterocromáticas a lo largo de los brazos cromosómicos.

Como se indica en Material y Métodos, para el estudio del bandeo C se ha utilizado la técnica de Sumner²⁸ (A), considerada de referencia por estar perfectamente contrastada su eficacia en el estudio cromosómico de diversos grupos de seres vivos. Por otra parte, a fin de adaptar dicha técnica de referencia a la problemática cromosómica en nematodos parásitos, se han ensayado diversas modificaciones de la técnica original de Sumner²⁸ (A.1, A.2) y de la de Luciani y col.¹⁸ (B.1, B.2).

Los resultados se han valorado en placas en paquitene, profase y metafase mitótica (Fig. 1) ya que en paquitene y profase mitótica se puede distinguir entre eu y heterocromatina, observar los cromómeros y la presencia del nucléolo asociado a los denominados cromosomas organizadores del nucléolo. La metafase mitótica es la etapa del ciclo celular en la que el cromosoma es más fácilmente distinguible e identificable (Schulz y Schaeffer²⁶).

TECNICA A. (Técnica original de Sumner).

Se ha podido comprobar la eficacia de la técnica de Sumner en nuestro material parasitológico, pues se pone de manifiesto un bloque heterocromático más intensamente teñido que el resto del cromosoma (Fig. 1A), y los centrómeros, que aparecen como una constricción débilmente teñida (constricción primaria) entre dos pequeñas zonas de heterocromatina paracentromérica, que se tiñen más intensamente al aplicar esta téc-

nica. Sin embargo, los resultados obtenidos son aleatorios, pues la observación del centrómero es a veces difícil en algunos pares cromosómicos y en fases de mayor condensación cromosómica, se produce una sobreteñición no siempre deseable. En una misma preparación se presentan placas con alteraciones morfológicas de los cromosomas.

TECNICA A.1.

En la técnica A.1 se aumenta el tiempo de tratamiento con hidróxido de bario y se reduce la temperatura de esta solución. Los resultados obtenidos son buenos, pues los cromosomas aparecen en buen estado morfológico, no presentando deformación (Fig. 1B, 1C). El bloque heterocromático aparece nítidamente teñido. La heterocromatina paracentromérica se observa en forma de bandas teñidas, lo mismo que ocurre con otras bandas C a lo largo del cromosoma.

TECNICA A.2.

Esta modificación se ha limitado a reducir el tiempo de tinción, fijación y tratamiento con hidróxido de bario originalmente empleados por Sumner. Con ella, se ha conseguido un bandeo cromosómico semejante al conseguido con la técnica A.1. La conservación de la morfología de los cromosomas es buena (Fig. 1D, 1E). El grado de tinción es adecuado, lo que permite observar las mismas estructuras que con las dos técnicas anteriores. La ausencia de algunas bandas C en los brazos cromosómicos representados en la Figura 1E, es consecuencia de una mayor condensación cromosómica.

TECNICA B. (Técnica original de Luciani y col.¹⁸)

La tinción conseguida mediante esta técnica pone de manifiesto la aparición de bloques de heterocromatina más densamente teñidos que el resto del cromosoma (Fig. 1F). El centrómero no se observa de una forma clara.

TECNICA B.1.

La simple prolongación del tiempo de incubación en 2xSSC (Comings y Avelino⁶),

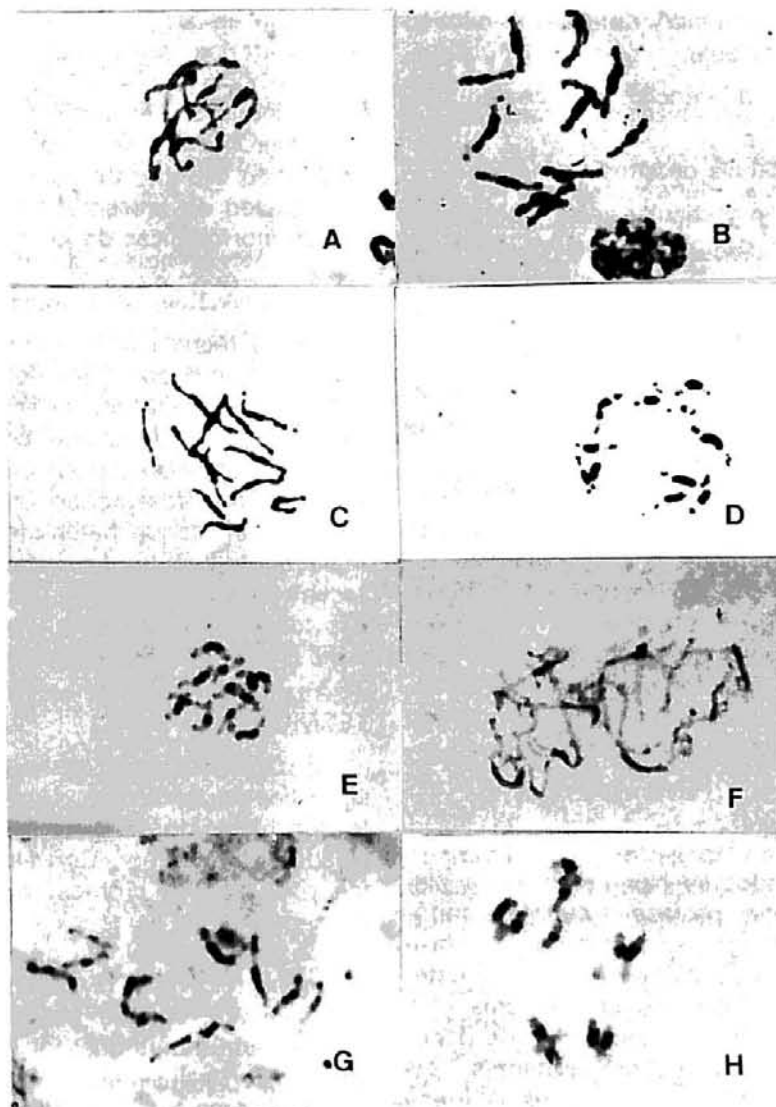


Fig. 1.: Técnicas de bandeo C:

- A.—Técnica A
(original de Sumner)
- B,C.—Técnica A.1
- D,E.—Técnica A.2
- F.—Técnica B
(original de Luciani y col.).
- G.—Técnica B.1
- H.—Técnica B.2

Escala: 10 micras.

proporciona una buena visualización del centrómero (Fig. 1G) y además pone de manifiesto en los bloques heterocromáticos, de algunos cromosomas del complemento, la existencia de varias bandas.

TECNICA B.2.

En la técnica B.2 se prolonga tanto el tiempo de incubación en 2xSSC como el tiempo de tratamiento de tripsina.

Los resultados obtenidos permiten la clara observación del bloque heterocromático y del centrómero (Fig. 1H).

2.—Técnicas de bandeo G.

Las técnicas de bandeo G proporcionan más detalle que las de bandeo C y permiten una mejor identificación de los cromosomas dentro del complemento. La naturaleza de las bandas está sujeta a discusiones, pero se ha demostrado que reflejan más fuertemente la condensación de cromatina (Ross y Gormley²³; McKay¹⁹; Yunis y Sánchez³¹).

En el bandeo G, al igual que en el bandeo Q y R juega un papel importante las proteínas cromosómicas o la interacción ADN-proteínas (Burkholder y Duczek³).

Los patrones de bandas G se corresponden exactamente con el patrón cromomérico de cromosomas meióticos (Ferguson-Smith y Page¹¹; Luciani y col.¹⁸) y el bandeo G no es nada más que un acrecentamiento de este patrón cromomérico ya existente (Comings⁵).

La razón de las bandas G positivas es clara. La cromatina que está presente, tiene el ADN libre para unirse con el colorante tiazínico del Giemsa (Comings⁵).

La heterocromatina centromérica también se presenta como un cromómero prominente en cromosomas meióticos, estas áreas en cromosomas mitóticos están pobremente teñidas, algunas veces, por bandeo G, pero muy bien por bandeo C (Merrick y col.²¹).

TECNICA C.—(Técnica original de Schnedl).

Este procedimiento de bandeo G no ofrece una homogeneidad de resultados, ya que sólo en algunos cromosomas del complemento podemos apreciar la aparición de tales bandas (Fig. 2A).

Como es característico del material empleado, los cromosomas aparecen con su bloque heterocromático intensamente teñido. En varios de los cromosomas se observa como este bloque no es homogéneo, sino que está subdividido en bandas e interbandas que aparecen algo difusas.

En general, el aspecto de las placas estudiadas con esta técnica no es bueno, destacando una tinción un poco excesiva.

TECNICA D.—(Técnica original de Gallimore y Richardson).

Antes de aplicar esta técnica, y como paso previo para la localización de las placas cromosómicas más interesantes se realiza una tinción convencional, tal como se ha indicado en el apartado de Material y Métodos. Una vez seleccionadas éstas y anotadas las coordenadas correspondientes, se procede a la aplicación de la técnica D.

Esta técnica no nos proporciona resultados homogéneos en todos los casos; así, mientras que en algunas preparaciones se observan placas con diferencias poco ostensibles con respecto a los obtenidos en la tinción convencional (Fig. 2B, 2C), en otras placas, de la misma preparación se pueden observar perfectamente las llamadas bandas G (Fig. 2E, 2F, 2H, 2I).

No obstante, hay que significar, que estas bandas se ven más acentuadas en el caso de cromosomas en el estadio de profase mitótica, debido a la menor condensación cromosómica y a la relación existente entre el patrón de bandas G y los cromómeros situados a lo largo del cromosoma (Fig. 2E).

También se ve como el bloque heterocromático no se manifiesta como un bloque densamente teñido sino que aparece bandeadado (Fig. 2F).

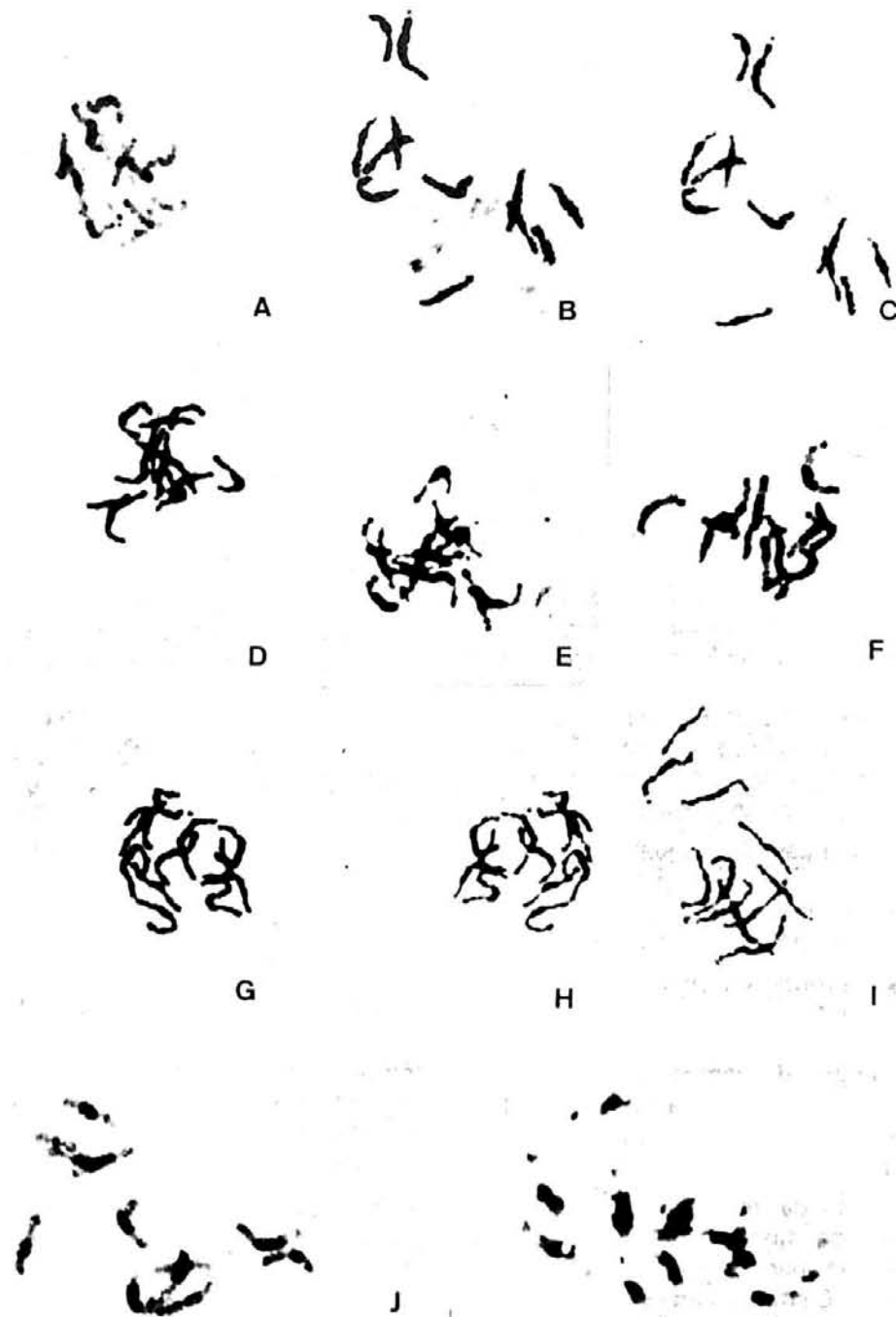


Fig. 2.: Técnicas de bandeado G:

- A.—Técnica de Schnedl
 B,D,G.—Técnica de tinción convencional
 C,E,F,H,I.—Técnica de Gallimore y Richardson
 J,K.—Técnica de Comings y Avelino.

Escala: 10 micras.

TECNICA E.—(Técnica original de Comings y Avelino).

Esta técnica se ha llevado a cabo tomando como referencia las coordenadas ya conocidas de las preparaciones a las que se ha aplicado anteriormente la técnica D.

La técnica de Comings y Avelino no se muestra en todos los casos como la más idónea, ya que, como se puede observar en la Figura 2J, el estado de los cromosomas aparece afectado notablemente, apreciándose un ligero hinchamiento de los mismos. Aunque sí aparezcan los mismos, bandeados y su bloque heterocromático con bandas e interbandas más claras.

En otros casos (Fig. 2K) el estudio de los cromosomas individuales no se puede llevar a cabo debido al estado de deterioro de la placa cromosómica.

Discusión

BANDEO C.

Con el fin de estandarizar una técnica de bandeado C aplicable a los nematodos parásitos, se han ensayado varios procedimientos destinados a poder hacer una comparación, lo más completa posible, que nos haga inclinarnos por la aceptación de una u otra como técnica de rutina en el Laboratorio de Parasitología.

El primer paso a llevar a cabo antes de la aplicación de este proceso de bandeado es la fijación de los cromosomas. Atendiendo a Comings⁵ quien destaca la necesidad de una fijación con metanol: acético (3:1) para poder obtener un patrón de bandas C, se ha considerado oportuno la utilización de este fijador y no de otros (como podría ser formaldehído) como fijador estándar en cualquiera de las técnicas aplicadas. No obstante, ha sido considerado oportuno ensayar distintos tiempos de fijación.

Comings y Avelino⁶ concluyen que para poder obtener bandeado C es necesario el previo tratamiento ácido, a fin de extraer las

histonas. McKenzie y Lubs²⁰ indican que "solamente el tratamiento con ácido clorhídrico 0.2N durante 15-30 minutos da bandas C satisfactorias". Por ello se ha considerado oportuno incluir este paso en todas las técnicas A de bandeado C, respetando el tiempo dado por Sumner²⁸.

El paso más crítico de esta técnica (según Sumner²⁸) es el tratamiento con hidróxido de bario al 5%, debido que a 60°C requiere tiempos muy breves de exposición, lo cual hace muy difícil un control exacto.

Por contra, un tratamiento a 37°C permite una mayor maniobrabilidad obteniendo resultados equiparables. Por ello han sido ensayadas ambas temperaturas.

Las preparaciones han sido finalmente sometidas a una solución salina (2xSSC).

Con respecto a la tinción con colorante se han ensayado distintos tiempos.

A la vista de los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica A y sus modificaciones (A.1, A.2) no podemos inclinarnos a favor de ninguna de ellas, pues el patrón de bandas que se observa es similar y equiparable en todos los casos.

La supresión, tanto del tratamiento con ácido clorhídrico como de la incubación con hidróxido de bario, considerados como pasos importantes para la obtención de bandas C, y su sustitución por un tratamiento con tripsina no varía en nada las estructuras observadas con las técnicas derivadas de la de Sumner. Siguiendo la técnica de Luciani y col.¹⁸ el patrón de bandas obtenido es comparable al conseguido con las técnicas A, pero es de destacar como esta técnica, ejecutada por su autor para la obtención de bandas G, pone de relieve en los cromosomas de *Dictyocaulus filaria* bandas C. Para asegurar la aparición de bandas C introducimos una modificación (B.2.) basada en el trabajo publicado por Merrick y col.²¹, los cuales obtienen un patrón de bandas C en cromosomas humanos, mediante la prolongación del tratamiento con tripsina, se puede observar la presencia de bandas G en algunos cromosomas del complemento (Fig. 1H) en tanto que en otros sí se observan bandas C.

En función de los resultados obtenidos mediante la aplicación de las distintas técnicas de bandeado, podemos afirmar que el patrón de bandas C obtenido en los cromosomas de *D. filaria* es muy semejante en todos los casos.

Nosotros consideramos que ninguna de las técnicas ensayadas presenta grandes ventajas en cuanto al manejo en el laboratorio, pues si bien, la técnica A.2 supone un ahorro relativo en el tiempo de realización de la misma, la técnica B.2 requiere menos pasos en su ejecución, pero posee el inconveniente de lo costoso del reactivo, poco margen de maniobrabilidad y mayor consumo de tiempo.

BANDEO G.

Las técnicas de bandeado G ensayadas han sido las de Schnedl²⁵ (técnica C), Gallimore y Richardson¹² (técnica D) y Comings y Avelino⁶ (técnica E).

La técnica C (Schnedl) fue elegida en un principio debido a su sencillez ya que se basa en el tratamiento con hidróxido de sodio 0.07N e incubación en buffer Sorensen; a la vista de los resultados obtenidos con esta técnica (Fig. 2A) no parece ser la más indicada para la obtención de un buen patrón de bandas G en *D. filaria*, ya que como se puede observar, algunos cromosomas del complemento presentan zonas teñidas equiparables con las obtenidas tras la aplicación de las técnicas de bandeado C.

Gallimore y Richardson¹² probaron las distintas técnicas de bandeado Giemsa existentes sobre *Rattus norvegicus*, obteniendo resultados poco satisfactorios debido a la pérdida de la morfología cromosómica o a la ausencia de bandas claras (distintas); por ello, desarrollaron una técnica basada en la exposición de las preparaciones a 2xSSC y tripsina, que es la utilizada por nosotros.

El paso previo a la ejecución de las técnicas de bandeado G es la realización de una tinción convencional con Giemsa al 1% durante 15-20 minutos, ya que parece estar comprobado que cromosomas tratados con soluciones muy diluidas de Giemsa durante

un tiempo prolongado, presentan bandas G (McKay¹⁹). Nosotros tomamos las coordenadas más interesantes, así obtenidas, para aplicarles la técnica D, siendo previamente desteñidas las preparaciones según se indica en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos con la técnica D no se presentan homogéneos, pues en algunos casos el patrón de bandas G es muy similar al de la tinción convencional por lo que cabría decir que no ofrece muchas ventajas; no obstante, en otros casos se pueden visualizar verdaderas bandas G en los cromosomas de *D. filaria*. Los factores más importantes a tener en cuenta en esta técnica son la concentración de la solución de tripsina y la temperatura de incubación de la misma. Así, parece ser, que los mejores resultados de bandeado G se obtienen a una concentración de tripsina del 1% a 10°C de temperatura. Esto quizás sea la causa que al aplicar la técnica de Luciani y col.¹⁸ (Tripsina 0.25%, 18°C) a los cromosomas de *D. filaria* se observará bandeado C en algunos de ellos.

Posteriormente a la aplicación de esta técnica las preparaciones son desteñidas para aplicarles la técnica E (Comings y Avelino⁶), en la que se introduce un tratamiento previo con ácido clorhídrico 0.2N. Las placas observadas posteriormente a este tratamiento, muestran los cromosomas, en algunos casos, hinchados e incluso, en muchos casos, se llega a la desaparición de los cromosomas.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido subvencionado por un proyecto de la CAICYT n.º 2895/83.

Referencias

1. Arrighi, T.E.; Hsu, T.C.—Localisation of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10, 1971, 81-86.
2. Boveri, T.—Über das Verhalten der geschlechtschromosomen bei hermaphroditismus. *Verh. Phys. Med. Ges. Wurzburg*, 41, 1911, 83-97.

3. Burkholder, G.D.; Duczek, L.L.—The effect of the chromosome banding techniques on the histone and non histone proteins of isolated chromatin. *Can. J. Biochem.*, 60, 1982, 328-337.
4. Caragna, S.; Redi, C.A.—Influence of the C-banding procedure on DNA and proteins of mouse chromosomes: I. A microdensitometric study. *Bas. Appl. Histochem.*, 28, 1984, 67-80.
5. Comings, D.E.—Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.*, 12, 1978, 25-46.
6. Comings, D.E.; Avelino, E.—Mechanisms of chromosome banding II. Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell. Res.*, 86, 1974, 202-206.
7. Cutillas, C.; Valero, A.; González-Castro, J.; Guevara, D.C.—The spermatogenesis of *Dictyocaulus filaria* (Nematoda, Trichostrongyloidea). *J. Parasitol.*, 71, 1985, 500-503.
8. Chuprevich, T.W.; Meisner, L.F.; Inhorn, S.L.—Mechanism of Trypsin chromosome banding. *The Lancet*, 1, 1973, 484.
9. Dmitrieva, T.I.—The chromosomes in mitosis and gametogenesis of 2 nematodes from the genus *Dictyocaulus*. *Ped. Inst. im. m. Gor'kogo*, 1977, 33-40.
10. Edwards, C.L.—The sex chromosomes in *Ascaris felis*. *Arch. f. Zell-forsch.*, 7, 1911, 309-313.
11. Ferguson-Smith, M.A.; Page, B.M.—Pachytene analysis in human reciprocal translocation. *J. Med. Genet.*, 10, 1973, 283-286.
12. Gallimore, P.H.; Richardson, C.R.—An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strain of rats. *Chromosoma*, 41, 1973, 259.
13. Gonzales, J.C.; Malmann, M.C.—Cromosomas de algunas especies de nematodos parásitos de ovinos y bovinos de Rio Grande do Sul Brasil. *Rev. Med. Vet. Sao Paulo*, 6, 1970, 132-139.
14. Grossman, A.I.; McKenzie, R.; Cain, G.D.—Sex heterochromatin in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 66, 1980, 368-370.
15. Hirai, H.; Sakaguchi, Y.; Imai, H.T.—C-band polymorphism in a Japanese lung fluke *Paragonimus ohirai* (Trematoda; Platyhelminthes). *Heredity*, 47, 1981, 249-252.
16. Hirai, H.; Sakaguchi, Y.; Tada, I.—Chromosomes of *Onchocerca volvulus* and *O. gutturosa*. *Zeits. f. Parasiten.*, 71, 1985, 135-139.
17. Huettel, R.N.; Dickson, D.W.—Karyology and oogenesis of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *J. Nematol.*, 13, 1981, 16-20.
18. Luciani, J.M.; Morazzani, M.R.; Stahl, A.—Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma*, 52, 1975, 275-282.
19. McKay, R.D.G.—The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 44, 1973, 1-114.
20. McKenzie, W.H.; Lubs, M.A.—An analysis of the technical variables in the production of C-bands. *Chromosoma*, 41, 1973, 175-182.
21. Merrick, S.; Ledley, R.S.; Lubs, M.A.—Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. *Pediatr. Res.*, 7, 1973, 39-44.
22. Okada, T.A.; Comings, D.E.—Mechanisms of chromosome banding III. Similarity between C-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of mitotic chromosomes. *Chromosoma*, 48, 1974, 65-71.
23. Ross, A.; Gormley, I.P.—Examination of surface topography of Giemsa banded human chromosomes by light and electron microscopy. *Exp. Cell. Res.*, 81, 1973, 79-86.
24. Santos, J.L.; Arana, P.; Giraldez, R.—Chromosome C-banding patterns in Spanish acridoidea. *Genetica*, 61, 1983, 65-74.
25. Schnedl, W.—Banding patterns in chromosomes. *Int. Rev. Cytol.*, 4, 1974, 237-272.
26. Schulz, J.; Schaeffer, R.—Gross morphology of chromosomes. In "Cytogenetics". Springer Verlag, pp. 33-51.
27. Short, R.B.; Grossman, A.I.—Conventional Giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma rodhaini*. *J. Parasitol.*, 67, 1981, 661-671.
28. Sumner, A.T.—A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.*, 75, 1972, 304-306.
29. Valero, A.; Pretel, A.; Romero, J.—Estudio citogenético de *Trichuris suis* (Schrank, 1788) y *Trichuris ovis* (Abildgaard, 1795) (Nematoda). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 43, 1983, 51-59.
30. Walton, A.C.—Some parasites and their chromosomes. *J. Parasitol.*, 45, 1959, 1-20.
31. Yunis, J.J.; Sanchez, O.—G-banding and chromosome structure. *Chromosoma*, 44, 1973, 15-23.

(Recibido el 4 de febrero de 1987; aceptado el 11 de mayo de 1987).