



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Contribución al conocimiento
de determinados aspectos de la bionomía de
Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu 1985
(Trematoda: Brachylaimidae)**

Mercedes Gracenea Zugarramurdi



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD
DE
BARCELONA



FACULTAD
DE
FARMACIA

TESIS DOCTORAL

REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD
DE BARCELONA (Dir.: Prof. Dr. JAIME GALLEGO BERENGUER)



CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE
DETERMINADOS ASPECTOS DE LA BIONOMIA DE
BRACHYLAIMA RUMINAE MAS-COMA ET MONTOLIU,
1985 (TREMATODA: BRACHYLAIMIDAE)

- I. CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION CERCARIANA
- II. MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO
- III. CULTIVO IN VITRO DEL ESTADIO ADULTO A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE

por

MERCEDES GRACENEA ZUGARRAMURDI

Directores

Prof. Dr. SANTIAGO MAS COMA

CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

y

Prof. Dr. FRANCISCO JAVIER BERENGUER PUVIA
PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Barcelona, Febrero de 1986

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084031

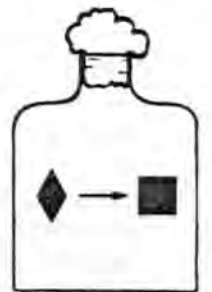
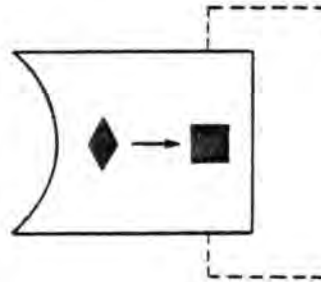
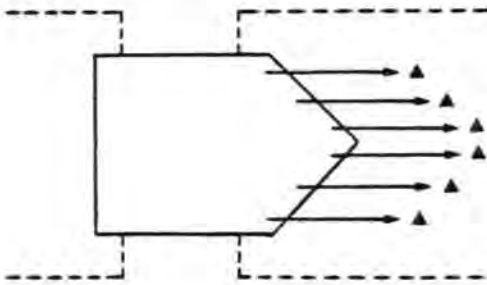
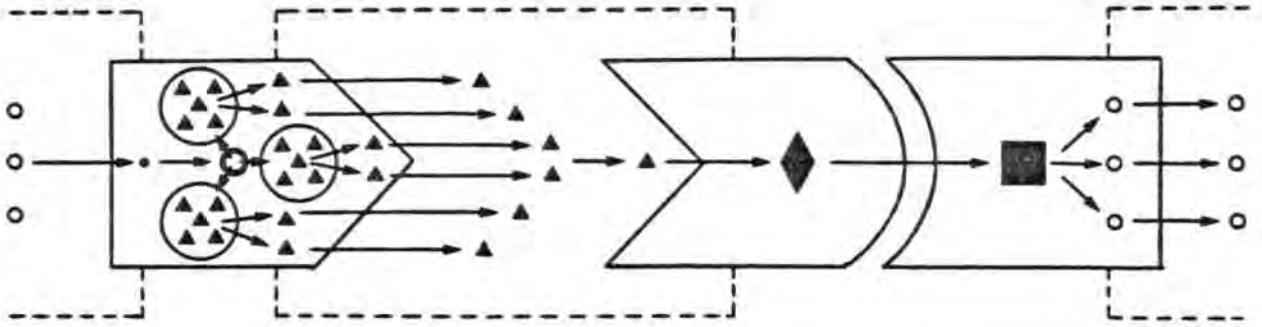
GRACENA (M.), 1986.- *CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE DETERMINADOS ASPECTOS DE LA BIONOMIA DE BRACHYLAIMA RUMINAE MAS-COMA ET MONTOLIU, 1985 (TREMATODA: BRACHYLAIMIDAE). I. CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION CERCARIANA. II. MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO. III. CULTIVO IN VITRO DEL ESTADIO ADULTO A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE.* TESIS DOCTORAL (DIR. S. MAS-COMA & F.J. BERENGUER), FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD CENTRAL DE BARCELONA, BARCELONA, p.

ABSTRACT

The species *Brachylaima ruminæ* presents an emergence of cercariae from its specific terrestrial snail host, *Rumina decollata*, which follows a hitherto in Digenea never detected chronobiological pattern, depending mainly from the external disposal of water. The influences of abiotic factors, such as temperature, light and time, on the cercarial emergence were experimentally tested. The morphoanatomic and histological characteristics of the different parts of the oogenotop and of the terminal female and male ducts are completely elucidated. The chronological sequence of functional starting of all the genital structures is followed in the step from mature metacercaria to gravid adult. Different monophasic, biphasic and semi-solid media were tested in order to obtain the *in vitro* culture of the adult stage from the mature metacercarial stage. The results are compared to the *in vivo* development of the adult in experimentally infested mice.

KEY WORDS

Trematoda, Digenea, Brachylaimoidea, Brachylaimidae, *Brachylaima ruminæ*. Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora, Subulinidae, *Rumina decollata*, first and second intermediate host. Cercarial emergence, experimental chronobiology, influences of temperature, light and time. Male and female genital apparatus, functional morphology, mature metacercaria to gravid adult. General development, mature metacercaria to gravid adult, *in vitro* culture, experimental *in vivo* infestation, *Mus musculus*, definitive host.



BRACHYLAIMIDAE

INDICE

<u>MATERIAS</u>	Pag.
<i>PREFACIO</i>	21
 <i>CAPITULO PRIMERO: INTRODUCCION</i>	
1.- INTRODUCCION	29
1.1.- RITMOS BIOLÓGICOS Y EMERGENCIA CERCARIANA	32
1.1.1.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LA NATURALEZA	32
1.1.1.1.- RITMOS CIRCADIANOS, DIARIOS O NICTAMERALES	34
1.1.1.2.- RITMOS MENSUALES	35
1.1.1.3.- RITMOS ANUALES	36
1.1.1.4.- FINALIDAD BIOLÓGICA DE LOS RITMOS	37
1.1.2.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LOS PARASITOS	37
1.1.2.1.- RITMOS CIRCADIANOS	37
1.1.2.2.- RITMOS ANUALES	38
1.1.2.3.- RITMOS CIRCADIANOS DE PARASITOS Y RITMOS DE SU HOSPEDADOR-ENTORNO: RELACIONES EXISTENTES	39
1.1.3.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LOS TREMATODOS DIGENIDOS	40
1.1.3.1.- MODALIDADES DEL PROCESO DE EMERGENCIA	42
1.1.3.2.- RITMOS DE EMERGENCIA CERCARIANA	43
<i>A) RITMO DE EMERGENCIA CIRCADIANO</i>	44
<i>B) RITMO DE EMERGENCIA ULTRADIANO</i>	44
<i>C) RITMO DE EMERGENCIA INFRADIANO</i>	45
1.1.3.3.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO CIRCADIANO	45
1.1.3.3.1.- CERCARIAS DE DIA DE ALTERNANCIA ABSOLUTA	45
1.1.3.3.2.- CERCARIAS DE DIA DE ALTERNANCIA RELATIVA	46
1.1.3.3.3.- CERCARIAS DE NOCHE DE ALTERNANCIA ABSOLUTA	53
1.1.3.3.4.- CERCARIAS DE NOCHE DE ALTERNANCIA RELATIVA	53
1.1.3.3.5.- CERCARIAS INTERMEDIAS	55
1.1.3.4.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO ULTRADIANO	55
1.1.3.5.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO INFRADIANO	56
1.1.3.6.- SINCRONIZACION DE LOS RITMOS DE EMERGENCIA	56
1.1.3.6.1.- SINCRONIZACION POR EL FOTOPERIODO	57

1.1.3.6.2.- INVERSION DEL RITMO DE EMISION POR EL FOTOPERIODO	57
1.1.3.6.3.- DESINCRONIZACION DEL RITMO EN AUSENCIA DEL FOTOPERIODO	58
1.1.3.6.4.- SINCRONIZACION DEL RITMO DE EMISION POR EL TERMO PERIODO EN AUSENCIA DEL FOTOPERIODO	59
1.2.- CARACTERISTICAS MORFOFUNCIONALES DE LOS APARATOS REPRODUCTORES DE TREMATODOS DIGENIDOS	60
1.2.1.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS APARATOS REPRODUCTORES MASCULINO Y FEMENINO DE LOS TREMATODOS DIGENIDOS	62
1.2.1.1.- MORFOANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	62
1.2.1.1.1.- TESTICULOS	62
1.2.1.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES	62
1.2.1.2.- MORFOANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	63
1.2.1.2.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO	63
1.2.1.2.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL	64
1.2.1.3.- MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	64
1.2.1.3.1.- TESTICULOS	64
1.2.1.3.2.- CONDUCTOS TERMINALES	66
1.2.1.4.- MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	66
1.2.1.4.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO	66
1.2.1.4.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL	68
1.2.2.- CARACTERES MORFOANATOMICOS Y MORFOFUNCIONALES DE LOS APARATOS REPRODUCTORES DE ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHYLAIMIDAE	68
1.2.2.1.- APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	69
1.2.2.1.1.- TESTICULOS	69
1.2.2.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES	69
1.2.2.2.- APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	78
1.2.2.2.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO	78
1.2.2.2.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL	85
1.2.2.3.- MORFOFUNCIONALISMO DE LOS APARATOS REPRODUCTORES MASCULINO Y FEMENINO	86
1.3.- CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TREMATODOS DIGENIDOS	89
1.3.1.- CONSIDERACIONES GENERALES	89
1.3.2.- PROBLEMAS BASICOS EN EL CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TREMATODOS DIGENIDOS	90

1.3.3.- PRINCIPIOS APLICABLES AL CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TREMATODOS DIGENIDOS	91
1.3.4.- CRITERIOS ORIENTADOS A LA EVALUACION DEL MANTENIMIENTO, CRECIMIENTO, DESARROLLO Y MADURACION DE LOS VERMES <u>IN VITRO</u>	93
1.3.5.- TECNICAS DE CULTIVO	95
1.3.5.1.- ESTERILIZACION	96
1.3.5.2.- ATMOSFERA DE CULTIVO Y PH	97
1.3.6.- SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TREMATODOS DIGENIDOS	98
1.3.6.1.- FAMILIA SCHISTOSOMATIDAE	99
1.3.6.1.1.- <u>SCHISTOSOMA MANSONI</u>	99
A) HUEVOS	99
B) MIRACIDIOS	100
C) ESPOROCISTOS	100
D) CERCARIAS	101
E) ESQUISTOSOMULOS	102
F) ADULTOS	102
1.3.6.1.2.- <u>SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM</u>	103
1.3.6.1.3.- <u>SCHISTOSOMA JAPONICUM</u>	104
1.3.6.1.4.- <u>SCHISTOSOMA BOVIS</u>	105
1.3.6.1.5.- <u>TRICHOBIHARZIA OCELLATA</u>	105
1.3.6.2.- FAMILIA FASCIOLIDAE	106
1.3.6.2.1.- <u>FASCIOLA HEPATICA</u>	106
A) MIRACIDIOS, REDIAS Y CERCARIAS	106
B) METACERCARIAS	107
C) ADULTOS	108
1.3.6.2.2.- <u>FASCIOLOPSIS BUSKI</u>	109
1.3.6.2.3.- <u>FASCIOLOIDES MAGNA</u>	109
1.3.6.3.- FAMILIA STRIGEIDAE	110
1.3.6.3.1.- <u>COTYLURUS LUTZI</u>	110
1.3.6.3.2.- <u>COTYLURUS ERRATICUS</u>	111
1.3.6.3.3.- <u>COTYLURUS STRIGEOIDES</u>	111
1.3.6.4.- FAMILIA DIPLOSTOMATIDAE	112
1.3.6.4.1.- <u>DIPLOSTOMUM PHOXINI</u>	112
1.3.6.4.2.- <u>DIPLOSTOMUM SPATHACEUM</u>	113
1.3.6.4.3.- <u>POSTHODIPLOSTOMUM MINIMUM</u>	114

1.3.6.5.-	FAMILIA ECHINOSTOMATIDAE	114
1.3.6.5.1.-	<u>ECHINOPARYPHIUM SERRATUM</u>	114
1.3.6.5.2.-	<u>ECHINOSTOMA MALAYANUM</u>	114
1.3.6.6.-	FAMILIA PSILOSTOMATIDAE	115
1.3.6.6.1.-	<u>SPHAERIDIOTREMA GLOBULUS</u>	115
1.3.6.7.-	FAMILIA LEUCOCHLORIDIOMORPHIDAE	115
1.3.6.7.1.-	<u>LEUCOCHLORIDIOMORPHA CONSTANTIAE</u>	115
1.3.6.7.2.-	<u>AMBLOSOMA SUWAENSE</u>	116
1.3.6.8.-	FAMILIA GYMNOBALLIDAE	116
1.3.6.8.1.-	<u>PARVATREMA TIMONDAVIDI</u>	116
1.3.6.9.-	FAMILIA HETEROPHYIDAE	116
1.3.6.9.1.-	<u>METAGONIMUS YOKOGAWAI</u>	116
1.3.6.10.-	FAMILIA MICROPHALLIDAE	117
1.3.6.10.1.-	<u>GYNAECOTYLA ADUNCA</u>	117
1.3.6.10.2.-	<u>MICROPHALLUS PYGMAEUS</u>	117
1.3.6.10.3.-	<u>MICROPHALLUS SIMILIS</u>	117
1.3.6.10.4.-	<u>MICROPHALLOIDES JAPONICUS</u>	118
1.3.6.11.-	FAMILIA TROGLOTREMATIDAE	118
1.3.6.11.1.-	<u>PARAGONIMUS WESTERMANI</u>	118
1.3.6.12.-	FAMILIA OPISTORCHIIDAE	119
1.3.6.12.1.-	<u>CLONORCHIS SINENSIS</u>	119
1.3.6.12.2.-	<u>OPISTORCHIS VIVERRINI</u>	119
1.3.6.13.-	FAMILIA ISOPARORCHIIDAE	120
1.3.6.13.1.-	<u>ISOPARORCHIS HYPSELOBAGRI</u>	120
1.3.6.14.-	FAMILIA BUCEPHALIDAE	120
1.3.6.14.1.-	<u>BUCEPHALOIDES GRACILESCENS</u>	120
1.3.6.15.-	FAMILIA PLAGIORCHIDAE	120
1.3.6.15.1.-	<u>HAPLOMETRA CYLINDRACEA</u>	120
1.3.6.15.2.-	<u>HAEMATOLECHUS MEDIOPLEXUS</u>	121

CAPITULO SEGUNDO: MATERIAL Y METODOS

2.-	MATERIAL Y METODOS	125
2.1.-	MATERIAL	126
2.1.1.-	MATERIAL BIOLÓGICO	126
2.1.1.1.-	MATERIAL PARASITOLÓGICO: <u>BRACHYLAIMA RUMINAE</u> MAS-COMA ET MONTOLIU, 1985	127

2.1.1.1.1.-	CARACTERIZACION DEL ADULTO	127
2.1.1.1.2.-	CICLO EVOLUTIVO	129
2.1.1.1.3.-	CARACTERIZACION DE LOS ESTADIOS LARVARIOS	134
	A) <i>ESPOROCISTOS</i>	134
	B) <i>CERCARIAS</i>	134
	a) <i>Morfología y anatomía</i>	137
	b) <i>Quetotaxia</i>	138
	c) <i>Emisión y comportamiento</i>	143
	C) <i>METACERCARIAS</i>	143
2.1.1.2.-	ESPECIES HOSPEDADORAS ESTUDIADAS	144
2.1.1.2.1.-	HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS: <u>RUMINA DECOLLATA</u> (LINNAEUS, 1758)	150
2.1.1.2.2.-	HOSPEDADORES DEFINITIVOS: <u>MUS MUSCULUS</u> LINNAEUS, 1758	153
2.1.1.3.-	ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO	154
2.1.1.3.1.-	MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN CRONOBIOLOGIA	154
2.1.1.3.2.-	MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN HISTOLOGIA	155
	A) <i>METACERCARIAS</i>	155
	B) <i>ADULTOS</i>	156
2.1.1.3.3.-	MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN CULTIVO <u>IN VITRO</u>	157
2.1.2.-	MATERIALES ESPECIALES	158
2.1.2.1.-	MATERIAL CRONOBIOLOGICO	158
2.1.2.2.-	MATERIAL HISTOLOGICO	159
2.1.2.2.1.-	MEDIOS DE INCLUSION	159
	A) <i>PARAFINA</i>	160
	B) <i>RESINA</i>	160
2.1.2.2.2.-	MICROTOMO	160
2.1.2.3.-	MATERIAL DE CULTIVO <u>IN VITRO</u>	160
2.1.2.3.1.-	MEDIOS DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDOS	161
2.1.2.3.2.-	FACTORES DE CRECIMIENTO	165
2.1.2.3.3.-	SUSTANCIAS REGULADORAS DE pH	165
2.1.2.3.4.-	SOLUCIONES FISIOLÓGICAS	167
2.1.2.3.5.-	ANTIBIÓTICOS	168
2.1.2.3.6.-	INSTRUMENTAL	169
2.2.-	MÉTODOS	169
2.2.1.-	TECNICAS REFERENTES A HOSPEDADORES	170

2.2.1.1.-	TECNICAS MALACOLOGICAS	170
2.2.1.1.1.-	RECOLECCION DE GASTEROPODOS TERRESTRES	170
2.2.1.1.2.-	MANTENIMIENTO DE GASTEROPODOS EN EL LABORATORIO	171
2.2.1.2.-	TECNICAS MASTOZOLOGICAS	172
2.2.1.2.1.-	MANTENIMIENTO DE MICROMAMIFEROS EN EL LABORATORIO	172
2.2.2.-	TECNICAS HELMINTOLOGICAS	173
2.2.2.1.-	TECNICAS DE DETERMINACION ESPECIFICA	173
2.2.2.1.1.-	DETECCION DE PULMONADOS ALBERGANTES DE ESPOROCISTOS EMISORES DE CERCARIAS	174
2.2.2.1.2.-	DETERMINACION DE CERCARIAS POR QUETOTAXIA	174
2.2.2.2.-	TECNICAS MICROSCOPICAS GENERALES	177
2.2.2.2.1.-	FIJACION Y CONSERVACION	177
2.2.2.2.2.-	COLORACION DEL MATERIAL FIJADO	178
2.2.2.2.3.-	MONTAJE	179
2.2.2.2.4.-	ESTUDIO AL MICROSCOPIO	180
2.2.2.3.-	TECNICAS MORFOMETRICAS	180
2.2.3.-	TECNICAS EXPERIMENTALES DE INFESTACION	183
2.2.3.1.-	INFESTACION DEL SEGUNDO HOSPEDADOR INTERMEDIARIO CON CERCARIAS	184
2.2.3.2.-	INFESTACION DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO CON METACERCARIAS	185
2.2.4.-	TECNICAS CRONOBIOLOGICAS	186
2.2.4.1.-	FRACCIONAMIENTO DE LA EMISION CERCARIANA EN FUNCION DEL TIEMPO	186
2.2.4.2.-	AISLAMIENTO Y CONTAJE DE CERCARIAS	187
2.2.4.3.-	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ILUMINACION	188
2.2.4.4.-	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	189
2.2.5.-	TECNICAS HISTOLOGICAS	190
2.2.5.1.-	DISECCION DE LOS SEGUNDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS Y HOSPEDADORES DEFINITIVOS EXPERIMENTALES	191
2.2.5.2.-	FIJACION DE METACERCARIAS Y ADULTOS EXPERIMENTALES PARA SU ESTUDIO HISTOLOGICO	193
2.2.5.3.-	INCLUSION EN PARAFINA	194
2.2.5.3.1.-	DESHIDRATACION DEL MATERIAL FIJADO PREVIA A SU INCLUSION EN PARAFINA	194
	A) DESHIDRATACION EN ALCOHOL ETILICO	195
	B) DESHIDRATACION EN ALCOHOL ISOPROPILICO	196

2.2.5.3.2.-	IMPREGNACION EN PARAFINA Y CONFECCION DE BLOQUES	196
2.2.5.3.3.-	OBTENCION DE CORTES AL MICROTOMO Y CONFECCION DE PREPARACIONES	199
2.2.5.3.4.-	TINCIONES UTILIZADAS SOBRE CORTES HISTOLOGICOS DE MATERIAL INCLUIDO EN PARAFINA	200
	A) DOBLE TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA	202
	B) TINCION CON HEMATOXILINA-PICROFUCSINA	203
	C) TINCION DE MALLORY	204
	C) TINCION CON HEMATOXILINA FERRICA SEGUN HEINDENHEIN	205
2.2.5.3.5.-	MONTAJE	207
2.2.5.4.-	INCLUSION EN RESINA	207
2.2.5.4.1.-	DESHIDRATACION DEL MATERIAL FIJADO PREVIA A LA INCLUSION EN RESINA	207
2.2.5.4.2.-	INCLUSION EN RESINA Y CONFECCION DE BLOQUES	207
2.2.5.4.3.-	OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS Y CONFECCION DE PREPARACIONES	208
2.2.5.4.4.-	TINCION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS SEMIFINOS	208
2.2.5.4.5.-	MONTAJE	208
2.2.6.-	TECNICAS DE CULTIVO <u>IN VITRO</u>	209
2.2.6.1.-	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	209
2.2.6.1.1.-	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS	209
2.2.6.1.2.-	PREPARACION DE LA SOLUCION FISIOLOGICA SALINA HANKS	211
2.2.6.1.3.-	CONDICIONES DE MANIPULACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	211
	A) SUERO BOVINO FETAL (FCS) (GIBCO EUROPE)	211
	B) SUERO BOVINO NEONATAL (NBBS) (FLOW LABORATORIES)	212
	C) EXTRACTO DE EMBRION BOVINO (BEE ₅₀) (FLOW LABORATORIES)	212
	D) YEMA Y ALBUMINA DE HUEVO DE GALLINA	212
2.2.6.1.4.-	ELABORACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS	213
	A) MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS	213
	B) MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS	214
	C) MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS	215
2.2.6.1.5.-	ENUMERACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS	216
	A) MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS	216

B) MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS	217
C) MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS	218
2.2.6.2.- CONDICIONES FISICAS DE CULTIVO	219
2.2.6.3.- DISECCION DE LOS SEGUNDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS EXPERIMENTALES	220
2.2.6.4.- DIGESTION EN PEPSINA Y LAVADO DE LAS METACERCARIAS	221
2.2.6.5.- CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE LAS METACERCARIAS	222
2.2.6.6.- FIJACION DEL MATERIAL PROCEDENTE DE CULTIVO	223
2.2.6.7.- TINCCIONES ESPECIALES REALIZADAS SOBRE MATERIAL DE CULTIVO	224
A) TINCCION CON ACETO-ORCEINA	224
B) TINCCION CON RED FAST B SALT	225
C) TINCCION CON CARMIN ACIDO DE GOWER	226

CAPITULO TERCERO: CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION DE CERCARIAS
DE BRACHYLAIMA RUMINAE

3.- CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION DE CERCARIAS DE <u>BRACHYLAIMA RUMINAE</u>	229
3.1.- EMISIONES CERCARIANAS	229
3.1.1.- EXPERIENCIAS CRONOBIOLOGICAS REALIZADAS	229
3.1.2.- DATOS NUMERICOS	232
3.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	234
3.2.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON EL FOTOPERIODO	238
3.2.1.- EMISION DE CERCARIAS EN FOTOPERIODO NORMAL	239
3.2.1.1.- EXPERIENCIA A	242
3.2.1.1.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	242
3.2.1.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	244
3.2.1.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	245
3.2.1.2.- EXPERIENCIA B	246
3.2.1.2.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	246
3.2.1.2.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	248
3.2.1.2.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	250
3.2.1.3.- EXPERIENCIA C	251
3.2.1.3.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	251
3.2.1.3.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	253
3.2.1.3.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	254

3.2.1.4.- EXPERIENCIA D	256
3.2.1.4.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	256
3.2.1.4.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	258
3.2.1.4.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	259
3.2.1.5.- EXPERIENCIA E	260
3.2.1.5.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	260
3.2.1.5.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	262
3.2.1.5.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	264
3.2.1.6.- EXPERIENCIA F	264
3.2.1.6.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	266
3.2.1.6.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	267
3.2.1.6.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	268
3.2.1.7.- EXPERIENCIA M(I)	269
3.2.1.7.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	269
3.2.1.7.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	270
3.2.1.7.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	272
3.2.1.8.- EXPERIENCIA M(II)	273
3.2.1.8.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	273
3.2.1.8.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	275
3.2.1.8.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	276
3.2.1.9.- EXPERIENCIA M(III)	277
3.2.1.9.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	277
3.2.1.9.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	279
3.2.1.9.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	280
3.2.1.10.- EXPERIENCIA M(IV)	281
3.2.1.10.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	281
3.2.1.10.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	282
3.2.1.10.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	283
3.2.1.11.- EXPERIENCIA M(V)	284
3.2.1.11.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	285
3.2.1.11.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	286
3.2.1.11.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	287
3.2.2.- EMISION DE CERCARIAS EN FOTOPERIODO INVERTIDO	288
3.2.2.1.- EXPERIENCIA G	289
3.2.2.1.1.- ANALISIS DE VALORES INDIVIDUALES	289

3.2.2.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	291
3.2.2.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	292
3.2.3.- EMISION DE CERCARIAS EN ILUMINACION CONTINUA	293
3.2.3.1.- EXPERIENCIA H	293
3.2.3.1.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	295
3.2.3.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	296
3.2.3.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	297
3.2.4.- EMISION DE CERCARIAS EN OSCURIDAD CONTINUA	298
3.2.4.1.- EXPERIENCIA J	298
3.2.4.1.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	300
3.2.4.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	301
3.2.4.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	302
3.3.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON EL TERMOPERIODO	303
3.3.1.- EMISION DE CERCARIAS A TEMPERATURA CONSTANTE	304
3.3.2.- EMISION DE CERCARIAS A TEMPERATURA VARIABLE	305
3.3.2.1.- EXPERIENCIA K	305
3.3.2.1.1.- ANALISIS DE VALORES INDIVIDUALES	305
3.3.2.1.2.- ANALISIS DE VALORES HORARIOS	308
3.3.2.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	309
3.3.2.2.- EXPERIENCIA L	310
3.3.2.2.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	310
3.3.2.2.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	312
3.3.2.2.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	313
3.4.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON EL TIEMPO	314
3.4.1.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON LA DURACION DE LA EMISION	315
3.4.1.1.- EXPERIENCIA M	316
3.4.1.1.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES	316
3.4.1.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS	319
3.4.1.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS	320
3.4.2.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON LA DURACION DEL INTERVALO PREVIO DE NO EMISION Y DEL INTERVALO PREVIO DE EMISION	321
3.4.2.1.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON LA DURACION DEL INTERVALO PREVIO DE NO EMISION	322
3.4.2.2.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON LA DURACION DEL INTERVALO PREVIO DE EMISION	325

CAPITULO CUARTO: MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO

4.- MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO	421
4.1.- DILUCIDACION DEL OOGENOTOPO	422
4.1.1.- OVIDUCTO	423
4.1.1.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	423
4.1.1.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	424
4.1.2.- RECEPTACULO SEMINAL	425
4.1.2.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	425
4.1.2.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	426
4.1.3.- CANAL DE LAURER	426
4.1.3.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	427
4.1.3.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	427
4.1.4.- CONFLUENCIA DEL RECEPTACULO SEMINAL CON EL OVIDUCTO	428
4.1.4.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	428
4.1.4.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	429
4.1.5.- VITELODUCTOS, RESERVORIO VITELINO Y CONDUCTO VITELINO COMUN	430
4.1.5.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	430
4.1.5.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	432
4.1.6.- CONFLUENCIA DEL CONDUCTO VITELINO COMUN CON EL CONDUCTO PROVENIENTE DE LA CONFLUENCIA OVIDUCTO-RECEPTACULO SEMINAL	433
4.1.6.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	433
4.1.6.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	434
4.1.7.- OOTIPO Y GLANDULA DE MEHLIS	434
4.1.7.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	435
4.1.7.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	435
4.2.- CONDUCTOS TERMINALES DE LOS APARATOS GENITALES MASCULINO Y FEMENINO	437
4.2.1.- CONDUCTOS TERMINALES DEL APARATO GENITAL MASCULINO	437
4.2.1.1.- CONDUCTOS EFERENTES Y CONFLUENCIA DE LOS MISMOS	437
4.2.1.1.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	438
4.2.1.1.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	438
4.2.1.2.- CONDUCTO DEFERENTE	439
4.2.1.2.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	439
4.2.1.2.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	440

4.2.1.3.- PREBOLSA	440
4.2.1.3.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	441
4.2.1.3.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	441
4.2.1.4.- BOLSA DEL CIRRO	442
4.2.1.4.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	443
4.2.1.4.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	443
4.2.1.5.- CIRRO	443
4.2.1.5.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	444
4.2.1.5.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	444
4.2.2.- CONDUCTO TERMINAL DEL APARATO GENITAL FEMENINO	445
4.2.2.1.- METRATERMO	446
4.2.2.1.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	446
4.2.2.1.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	446
4.2.3.- PORO GENITAL	447
4.2.3.1.- OBSERVACION EN ESPECIMENES <u>IN TOTO</u>	447
4.2.3.2.- OBSERVACION EN CORTES HISTOLOGICOS	448
4.3.- CRONOLOGIA DE LA MORFOFUNCIONALIDAD DE LAS ESTRUCTURAS GENITALES	448
4.3.1.- SECUENCIA MORFOFUNCIONAL DEL APARATO GENITAL MASCULINO	449
4.3.1.1.- TESTICULOS	449
4.3.1.2.- CONDUCTO DEFERENTE	453
4.3.1.3.- PREBOLSA	454
4.3.2.- SECUENCIA MORFOFUNCIONAL DEL APARATO GENITAL FEMENINO	456
4.3.2.1.- OVARIO	456
4.3.2.2.- GLANDULAS VITELOGENAS	459
4.3.2.3.- RECEPTACULO SEMINAL Y CANAL DE LAURER	460

CAPITULO QUINTO: CULTIVO IN VITRO DE BRACHYLAIMA RUMINAE A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE

5.- <u>CULTIVO IN VITRO DE BRACHYLAIMA RUMINAE A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE</u>	531
5.1.- MATERIAL PARASITOLOGICO UTILIZADO PARA EL <u>CULTIVO IN VITRO</u>	531
5.2.- MATERIAL PARASITOLOGICO UTILIZADO COMO CONTROL	532
5.2.1.- METACERCARIAS EXPERIMENTALES DE <u>BRACHYLAIMA RUMINAE</u> UTILIZADAS COMO CONTROL	532
5.2.2.- ADULTOS EXPERIMENTALES DE <u>BRACHYLAIMA RUMINAE</u> UTILIZADOS COMO CONTROL	533

5.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS	534
5.3.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS	540
5.3.1.1.- MEDIO A + MACERADO TIPO 1	540
5.3.1.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	540
5.3.1.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	540
5.3.1.2.- MEDIO B	541
5.3.1.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	542
5.3.1.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	542
5.3.1.2.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	542
A) <i>TEGUMENTO</i>	543
B) <i>PARENQUIMA</i>	543
C) <i>VENTOSAS</i>	544
D) <i>APARATO DIGESTIVO</i>	544
E) <i>APARATO REPRODUCTOR MASCULINO</i>	544
F) <i>APARATO REPRODUCTOR FEMENINO</i>	544
5.3.1.2.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	545
A) <i>ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL</i>	545
B) <i>ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL</i>	548
5.3.1.3.- MEDIO B + MACERADO TIPO 2	548
5.3.1.3.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	548
5.3.1.3.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	549
5.3.1.3.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	550
A) <i>TEGUMENTO</i>	550
B) <i>PARENQUIMA</i>	551
C) <i>VENTOSAS</i>	551
D) <i>APARATO DIGESTIVO</i>	551
E) <i>APARATO REPRODUCTOR MASCULINO</i>	552
F) <i>APARATO REPRODUCTOR FEMENINO</i>	552
5.3.1.3.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	553
A) <i>ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL</i>	554

B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL	554
5.3.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS	554
5.3.2.1.- FASE SOLIDA + MEDIO A	557
5.3.2.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	557
5.3.2.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	558
5.3.2.2.- FASE SOLIDA + MEDIO B	559
5.3.2.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	559
5.3.2.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	559
5.3.2.2.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	560
A) TEGUMENTO	561
B) PARENQUIMA	561
C) VENTOSAS	562
D) APARATO DIGESTIVO	562
E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	562
F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	563
5.3.2.2.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	564
A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL	564
B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL	564
5.3.2.3.- FASE SOLIDA + MEDIO B + MACERADO TIPO 1	567
5.3.2.3.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	567
5.3.2.3.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	567
5.3.2.3.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	569
A) TEGUMENTO	570
B) PARENQUIMA	571
C) VENTOSAS	571
D) APARATO DIGESTIVO	572
E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	572
F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	573
5.3.2.3.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	574
A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL	575

B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL	576
5.3.2.4.- FASE SOLIDA + MEDIO B + MACERADO TIPO 2	583
5.3.2.4.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	583
5.3.2.4.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	583
5.3.2.4.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	585
A) TEGUMENTO	586
B) PARENQUIMA	586
C) VENTOSAS	587
D) APARATO DIGESTIVO	587
E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	588
F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	589
5.3.2.4.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	590
A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL	591
B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL	592
5.3.2.5.- FASE SOLIDA + MEDIO C ó MEDIO D + MACERADO TIPO 2	601
5.3.2.5.1.- COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	602
5.3.2.5.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	603
5.3.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS	603
5.3.3.1.- MEDIO E	604
5.3.3.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	604
5.3.3.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	604
5.3.3.1.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS	605
A) TEGUMENTO	605
B) PARENQUIMA	605
C) VENTOSAS	606
D) APARATO DIGESTIVO	606
E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	606
F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	607
5.3.3.1.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO	607
A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL	607

B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL	608
5.3.3.2.- MEDIO F	608
5.3.3.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	608
5.3.3.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO	608
5.4.- ESTUDIO COMPARATIVO GENERAL	611
5.4.1.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS	612
5.4.2.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS	616
5.4.3.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS	628
5.4.4.- EVALUACION GLOBAL DE LOS RESULTADOS	630

CAPITULO SEXTO: DISCUSION Y CONCLUSIONES

6.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	641
6.1.- REFERENTES A LA CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION CERCARIANA	641
6.1.1.- DISCUSION	641
6.1.1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA EMISION	644
6.1.1.2.- INFLUENCIA DE LA ILUMINACION (FOTOPERIODO)	647
6.1.1.3.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA (TERMOPERIODO)	649
6.1.1.4.- INFLUENCIA DEL TIEMPO	650
6.1.2.- CONCLUSIONES	653
6.2.- REFERENTES AL MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO	656
6.2.1.- DISCUSION	656
6.2.1.1.- OOGENOTOPO	656
6.2.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES DE LOS APARATOS GENITALES MASCULINO Y FEMENINO	658
6.2.1.3.- CRONOLOGIA DE LA MORFOFUNCIONALIDAD DE LAS ESTRUCTURAS GENITALES	662
6.2.2.- CONCLUSIONES	664
6.3.- REFERENTES AL CULTIVO <u>IN VITRO</u> A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE	668
6.3.1.- DISCUSION	669
6.3.1.1.- MEDIOS DE CULTIVO	669

6.3.1.1.1.- MEDIOS BASICOS	671
6.3.1.1.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO	673
6.3.1.2.- CONDICIONES DE CULTIVO	682
6.3.1.2.1.- ATMOSFERA DE CULTIVO	682
6.3.1.2.2.- pH Y TEMPERATURA	683
6.3.2.- CONCLUSIONES	685
BIBLIOGRAFIA	691

PREFACIO

El escrito que a continuación exponemos es el fruto de varios años de trabajo durante los cuales hemos recibido la ayuda y colaboración de numerosas personas, tanto en las etapas de estudio experimental y de campo como en las fases posteriores de elaboración y discusión de datos y ulterior de redacción final. Es un grato deber el proceder a patentizar nuestro agradecimiento a todos aquellos que con su contribución y aportaciones han permitido la elaboración de la presente obra.

Nuestra gratitud se refiere en primer lugar al Catedrático Prof. Dr. SANTIAGO MAS COMA, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, no sólo por haber aceptado

la dirección de este Tesis Doctoral, sino por ser quién un día nos introdujera en el inquietante mundo del parasitismo y más concretamente de los Trematodos Digénidos. Su experiencia y entusiasmo científicos, su constancia y sus inestimables consejos han constituido un apoyo intelectual y moral del cual hemos tenido la suerte de no carecer durante la larga duración del trabajo en ningún momento. Por todo ello queremos expresarle aquí nuestro más sincero agradecimiento y nuestro deseo de poder continuar bajo su dirección científica.

Hacemos extensible nuestro agradecimiento al Dr. FRANCISCO JAVIER BERENGUER PUVIA, Profesor Titular del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por acceder a participar en la dirección de la presente obra conjuntamente con el Prof. SANTIAGO MAS COMA. Su amplia experiencia en el campo de la Química nos ha sido de gran ayuda en nuestros trabajos relativos al cultivo in vitro. Que su inestimable colaboración, apoyo y consejos a lo largo de nuestro tiempo de trabajo reciban aquí nuestro reconocimiento más profundo.

Igual reconocimiento es extensible al Catedrático Prof. Dr. JAIME GALLEGU BERENGUER, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, a quién debemos el haber aceptado en su momento acoger en el seno del Departamento que dirige una nueva línea de investigación sobre ciclos biológicos de Trematodos Digénidos parásitos de Micromamíferos y los consecuentes problemas, tanto técnicos como económicos que ello plantea. Por su experiencia, apoyo incondicional e interés en procurarnos un lugar para nuestras investigaciones y espacio para nuestros experimentos le quedamos profundamente agradecidos.

Es nuestra obligación, y muy grata, hacer aquí especial mención del Prof. Dr. J. D. SMYTH, Director del Departamento de Zoología y Entomología Aplicadas del Imperial College of Science and Technology de Londres. En su amabilidad, no solamente nos ofreció su total colaboración en el Departamento que dirige, sino que, por añadidura, nos sugirió requerir el concurso económico del British Council de Barcelona, colaboración que nos fué otorgada y que constituyó un estímulo decisivo para nuestros proyectos. La amplia experiencia del Prof. SMYTH en el campo del cultivo in vitro y en otras áreas de la Para-

sitología, de todos conocida, no es necesario destacar aquí, pero sí su extraordinaria dedicación y entrega, su capacidad de trabajo y su gran calidad humana que le impulsan a no escatimar esfuerzos en la formación de futuros investigadores, aún a costa de incrementar sus ya sobrecargados programas de trabajo. Sus enseñanzas y consejos, así como su intervención directa en nuestras experiencias de cultivo nos proporcionó un inmejorable aprendizaje y una toma de contacto extraordinaria con este área de la Parasitología. Nuestro reconocimiento se hace extensible también a todos los miembros de su Departamento, de cuyo total apoyo dispusimos durante nuestra estancia entre ellos y queremos mencionar especialmente a la Dra. CAROLINE DAVIES y a Mrs. HELEN BARRET por su especial colaboración en nuestras investigaciones.

Es la Catedrática Prof. Dra. MERCEDES DURFOUR COLL, Directora del Departamento de Morfología Microscópica de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, quién ha hecho posible la realización de nuestros trabajos histológicos. Su actitud siempre abierta a la colaboración, su gentileza y extraordinaria accesibilidad facilitan e impulsan grandemente el requerir sus opiniones, consejos y ayuda. Que en estas breves líneas encuentre el testimonio de nuestro reconocimiento más profundo y de nuestra admiración más sincera, así como la expresión de nuestro agradecimiento por habernos dedicado su valioso tiempo. Hacemos extensivas estas palabras a todos los miembros de su Departamento y especialmente al Dr. JAIME FERRER AMOROS, Profesor Colaborador, con quién hemos compartido muchas horas de trabajo y cuya colaboración nos ha ofrecido siempre tan generosamente, no escatimando esfuerzos ni ayuda en ningún momento.

Exteriorizamos también aquí nuestro reconocimiento al Prof. CLAUDE COMBES, Director del Departamento de Biología Animal del Centro Universitario de Perpignan (Francia), quién amable y desinteresadamente ha querido poner a nuestra disposición el Departamento que dirige en las visitas que le hemos efectuado. Queremos aprovechar esta ocasión para manifestarle nuestra profunda admiración por su gran obra parasitológica y en particular en el campo de los Monogénidos y de los Digénidos.

Hemos de hacer especial mención de dos miembros del mismo Departamento, el Prof. Dr. JOSEPH JOURDANE, Maître de Recherche au CNRS, y el Dr. ANDRE THERON. Debemos al Dr. JOURDANE gran parte de nuestros conocimientos experi-

mentales sobre ciclos biológicos de Trematodos y al Dr. THERON numerosas sugerencias técnicas, experimentales y analíticas referentes a la problemática de la emisión cercariana basadas en su vastísima experiencia en el campo de los estudios cronobiológicos de la emisión de cercarias.

Queremos expresar al Dr. EDUARDO GOÑALONS SINTES, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, nuestra gratitud por su amable colaboración en las tareas de campo que llevamos a cabo en la isla de Formentera. Que estas líneas reflejen el grato recuerdo de la expedición conjunta.

No tenemos palabras para agradecer suficientemente la colaboración que la Dra. ISABEL de MONTOLIU SANLLEHY, Profesora Titular del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona nos ha prestado en todo momento, en el transcurso del largo tiempo de trabajo requerido para la consecución del presente estudio. Sus estudios experimentales sobre ciclos biológicos de Digénidos, previos al inicio de nuestras experiencias, nos facilitaron enormemente la puesta en marcha y el desarrollo de las mismas y sus consejos y ayuda han sido decisivos para conseguir llevarlas a feliz término. Siempre tendremos presente su gran capacidad de trabajo y minuciosidad en las tareas de investigación, que han supuesto para nosotros una oportunidad única para iniciarnos en este campo de la Parasitología y han constituido un estímulo y acicate continuos. Por todo ello y por compartir directamente nuestras experiencias y sufrir los problemas que de ellas se derivan queremos testimoniarle aquí nuestro agradecimiento más profundo.

Es un orgullo para nosotros agradecer al Prof. Dr. HERMAN KAHMANN, de la Universidad de München (Alemania), las enseñanzas que de él hemos recibido respecto a Micromamíferos de la isla de Formentera en las ocasiones en que hemos coincidido en dicha isla.

Agradeceremos sinceramente la amabilidad con que la Dra. YOLANDA MANGA GONZALEZ del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León ha atendido siempre nuestro requerimientos en orden a determinar los Gasterópodos terrestres recolectados en la isla de Formentera, así como su gentil disposición en atender cuantas cuestiones le hemos planteado.

Nuestro reconocimiento se dirige también hacia Dña. MARGARITA COLLS DES-VILAR y Dña. MARIA LUISA BRAVO RODRIGUEZ, otrora alumnas internas de nuestro Departamento y cuya colaboración técnica ha sido inestimable.

Hacemos extensivo este reconocimiento a todos los miembros de nuestro Departamento y especialmente al Profesor Titular Dr. CARLOS FELIU JOSE, cuyas primeras prospecciones sobre helmintos de Micromamíferos de la isla de Formentera constituyeron en su día el punto de partida de los actuales estudios que sobre ellos llevamos a cabo en el Departamento.

Nuestra gratitud se extiende también a aquellos miembros del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, de los cuales hemos recibido ayuda en la última etapa de nuestros estudios y cuyas líneas de investigación se hallan íntimamente relacionadas con la de la presente Tesis Doctoral. Cabe citar en este sentido al Prof. Adjunto Dr. JOSE GUILLERMO ESTEBAN SANCHIS con sus estudios sobre la Helmintofauna de Micromamíferos de las Baleares, Dña. MARIA ADELA VALERO ALEIXANDRE con su revisión sistemática de la familia Brachylaimidae, Dña. MARIA DOLORES BARGUES CASTELLO con sus estudios sobre estadios larvarios de la misma familia de Digénidos, y a D. FRANCISCO VALVERDE GARCIA a quién compite el estudio histopatológico de Gasterópodos terrestres parasitados por los mismos Trematodos.

Nos es grato reflejar nuestro agradecimiento a D. CARLOS FUSTE RICH, dibujante científico profesional de Barcelona, quién, con su ayuda técnica en la confección de numerosas gráficas, ha hecho posible, no sólo que este escrito vea la luz mucho más pronto, sino que ha contribuido decisivamente en la buena marcha y adecuada exposición del mismo.

A ellos, y a todos los que de una forma y de otra hayan contribuido a la elaboración de la presente obra, deseamos manifestarles nuestro profundo agradecimiento.

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

Los estudios que sobre ciclos biológicos de Trematodos Digénidos de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 se lleva a cabo desde hace ya años en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona nos condujeron, en su día, al inicio del presente trabajo destinado a prestar una pequeña contribución al conocimiento de la bionomía de una especie concreta de Trematodo perteneciente a la familia anteriormente citada: Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu, 1985. El ciclo evolutivo de esta especie de Digénido ha sido dilucidado totalmente por MAS-COMA & MONTOLIU (1978 a,b) y MONTOLIU (1984) tanto en la Naturaleza como experimentalmente en el Laboratorio de nuestro Departamento. La complejidad de este ciclo triheteroxeno terrestre nos situó ante un amplio y atractivo abanico de posibilidades de estudio e investigación, dado que cada uno de los aspectos del ciclo es merecedor en sí mismo de un estudio en profundidad.

El confusionismo taxonómico existente a nivel de la familia Brachylaimidae, originado por los repetidos intentos de establecer distinciones específicas atendiendo principalmente, cuando no exclusivamente, a los caracteres morfológicos de las formas adultas, es agravado no tanto por la variabilidad morfo-anatómica intraespecífica que cabe detectar en dichas formas, sino esencialmente por las marcadas convergencias morfológicas que muestran las distintas especies, hasta tal punto que resulta dificultoso establecer aquellos caracteres que permitan una diferenciación interespecífica aceptable. Ante esta situación, la consecución experimental del ciclo biológico de una determinada especie de Brachyláimido ha de preceder necesariamente a cualquier estudio llevado a cabo sobre la forma adulta o sobre las formas larvarias de dicha especie, al objeto de poder atribuir con un alto nivel de certeza los resultados de dichos estudios a una especie en concreto, evitando así contribuir a un incremento en el confusionismo taxonómico actualmente reinante.

Es así que los trabajos emprendidos por nosotros sobre distintos aspectos bionómicos del Digénido Brachylaima ruminæ han estado fundamentados, en todo momento, en la realización experimental del ciclo biológico de dicha especie en el Laboratorio, hecho que nos ha permitido disponer de un material parasitológico de origen experimental y por tanto perfectamente definido. Dichos trabajos contemplan, en primer lugar, la dilucidación del patrón crono-

biológico de emisión de cercarias de Brachylaima ruminæ por parte de los Moluscos Gasterópodos Pulmonados primeros hospedadores intermediarios, continuando con estudios sobre el morfofuncionalismo del aparato genital en el paso de metacercaria infestante a adulto grávido en dicha especie a nivel de hospedador definitivo, para, por último, afrontar los ensayos experimentales cuya finalidad es el cultivo in vitro de dicho Trematodo igualmente desde el estadio de metacercaria infestante hasta el de adulto grávido.

La exposición de los contenidos del presente escrito conlleva la diferenciación de los mismos dentro de seis capítulos.

En el primero de ellos, capítulo que desarrollamos a continuación, exponemos brevemente el punto de partida de nuestros trabajos, así como la finalidad de los mismos, estableciendo tres grandes apartados. El primero de dichos apartados lo destinamos a encuadrar los estudios sobre cronobiología de la emisión de cercarias dentro del contexto general de ritmos biológicos conocidos actualmente en la Naturaleza, para lo cual introducimos una serie de nociones generales sobre ritmos en primer lugar en seres vivos, luego en seres parásitos en general, y finalmente, y de un modo ya más concreto, en Trematodos Digénidos en lo que respecta al fenómeno de la emisión de cercarias por parte del Molusco primer hospedador intermediario. El segundo apartado tiene como finalidad exponer los conocimientos existentes en la actualidad sobre el morfofuncionalismo inicial del aparato genital en distintas especies de Trematodos Digénidos, como es lógico esencialmente Brachylaimidae, y la evolución que dicho saber hubiera podido sufrir a lo largo del tiempo, al objeto de situar los datos por nosotros aportados al respecto dentro del entorno que les es propio. El tercer apartado pretende exponer las investigaciones realizadas por los distintos autores en el campo de cultivo in vitro de distintos Trematodos Digénidos y analizar el indudable interés que dichas investigaciones ofrecen, tanto por lo que respecta a posteriores estudios de carácter bioquímico y fisiológico, como de carácter taxonómico y sanitario. Los resultados ya conocidos en este campo del cultivo in vitro significan el punto de partida lógico de nuestros trabajos sobre cultivo in vitro del Digénido que estudiamos.

En el segundo capítulo procedemos a detallar el material empleado en todos nuestros trabajos de investigación, tanto cronobiológicos, como histológi-

cos y de cultivo in vitro. Caracterizamos, por un lado, el material biológico en el que incluimos el material parasitológico sobre el que se ha investigado, constituido por las formas larvarias y adulta de Brachylaima ruminae, y las especies hospedadoras estudiadas, indicando también su naturaleza y procedencia. Los materiales no biológicos utilizados en cada uno de los estudios antedichos son considerados separadamente. Este segundo capítulo incluye, asimismo, las técnicas que conllevan los trabajos de investigación realizados, algunas de las cuales son de carácter general, tales como las técnicas referentes a hospedadores, técnicas helmintológicas, técnicas microscópicas y técnicas experimentales de infestación, en tanto que otras son específicas de cada uno de los distintos estudios llevados a cabo y se han descrito siguiendo este criterio bajo la denominación de técnicas cronobiológicas, técnicas histológicas y técnicas de cultivo in vitro.

El tercer capítulo recoge únicamente los resultados correspondientes a las experiencias orientadas al estudio de la cronobiología de la emisión de cercarias y en él describimos, en un primer apartado, todos los factores que concurren en dichas experiencias, analizando los resultados obtenidos en los ensayos en tres grandes apartados que incluyen respectivamente los datos correspondientes a cercarias emitidas en relación con el fotoperíodo, con el termoperíodo y con el tiempo.

Exponemos en el cuarto capítulo los estudios dirigidos a la dilucidación del oogenotopo de Brachylaima ruminae, así como a la descripción de los conductos terminales de los aparatos genitales masculino y femenino, en los que interviene el examen conjunto de preparaciones microscópicas de los vermes in toto y de cortes histológicos practicados sobre los mismos. Dentro de este capítulo desarrollamos la cronología de la funcionalidad de las distintas estructuras genitales mediante el análisis de cortes histológicos de vermes adultos, corroborado por la observación microscópica de especímenes montados in toto.

El quinto capítulo incluye exclusivamente los resultados obtenidos en los ensayos de cultivo in vitro llevados a cabo con metacercarias de Brachylaima ruminae, así como un estudio comparativo de dichos resultados en atención a una posterior valoración de los distintos medios de cultivo.

El sexto y último capítulo está destinado a la exposición de las conclusiones obtenidas en los ensayos llevados a cabo sobre emisión de cercarias, en los estudios histológicos y en las experiencias de cultivo in vitro.

1.1.- RITMOS BIOLÓGICOS Y EMERGENCIA CERCARIANA

1.1.1.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LA NATURALEZA

Todo ecosistema manifiesta una periodicidad múltiple y compleja (MARGALEF, 1974). Los períodos se reflejan sobre la vida de los organismos según la relación existente entre la longitud de los mismos y la duración de la vida de las especies. Así, si la vida individual es breve respecto a la duración de los períodos cósmicos, el resultado se manifiesta como oscilaciones o fluctuaciones de la población y, por el contrario, si la vida es larga el resultado es un cambio de actividad. Algunos autores implican, en la existencia de un ritmo, un dispositivo fisiológico marcador o regulador del tiempo que opera como anticipándose a los acontecimientos. Sin embargo, en un concepto más amplio consideraremos como ritmos todos los cambios periódicos que no consisten solamente en cambios demográficos.

Los ritmos biológicos pueden clasificarse según diversos criterios. Cabe distinguir inicialmente los siguientes:

- según su origen:
 - endógenos;
 - exógenos;
- según su periodicidad:
 - circadianos;
 - mensuales;
 - anuales;
 - otros períodos.

En el estudio de los ritmos biológicos se ha intentado siempre dilucidar si el comportamiento rítmico de un organismo es endógeno y debido al propio organismo o si es exógeno, constituyendo únicamente una respuesta directa al estímulo rítmico del medio ambiente.

Los organismos reaccionan ante los cambios externos y si se trata de un cambio que ocurre frecuentemente, la respuesta adquiere un carácter adaptati-

vo en virtud de una selección natural, pudiendo dicha respuesta guardar o no una relación ecológica con la naturaleza del estímulo. Cierta modalidad de respuesta puede ser recogida por la evolución si el estímulo fisiológicamente eficaz y el cambio respecto al cual tiene sentido la respuesta están suficientemente asociados. Así se establece un ritmo exógeno.

Los ritmos endógenos, originados por marcadores de ritmo o relojes biológicos internos, constituyen actualmente un tema de gran interés. Estos relojes presentan osciladores de período definido y pueden anticiparse a los cambios externos periódicos siempre que consigan un adecuado sincronismo con ellos. Son el resultado de la interacción de distintos elementos del sistema biológico cuyo conjunto tiene las propiedades de un oscilador. Los ritmos verdaderamente endógenos se evidencian sustrayendo al organismo de la acción del factor respecto al cual ocurre la actividad rítmica y observando si esta actividad continúa algún tiempo, aún en ausencia del factor ecológicamente importante. Esencialmente, los mecanismos rítmicos endógenos presentan un marcador de tiempo aproximado y un mecanismo de sincronización entre todos los individuos. El mayor valor de los ritmos endógenos es, según MARGALEF (1974), el de la anticipación, pues determinan comportamientos periódicos absolutamente coherentes y adaptados a la organización del ecosistema, de gran valor dentro de la problemática de la supervivencia individual dentro del mismo. Esta es la razón de su evolución.

La única posibilidad de separación entre ritmos endógenos y exógenos descansa sobre la imprecisión de los primeros. En este sentido, BROWN (1959) y BROWN et al. (1955, 1970) han llevado a cabo diversos estudios, demostrando la existencia de ritmos cósmicos muy regulares en la respiración de distintos organismos, persistentes y relacionados con los movimientos astrales en condiciones de luz, temperatura y presión controladas independientemente. Estos ritmos tan generalizados presentan mecanismos muy simples y afectan a la materia en general pero ocupan un lugar secundario en la organización temporal del ecosistema respecto a los verdaderamente biológicos.

La importancia relativa de los distintos tipos de ritmos es el resultado de la estrategia seguida por la Naturaleza. Así, la ventaja de la anticipación presentada por los mecanismos endógenos implica un universo previsible y ordenado, siendo absolutamente inservibles en condiciones imprevistas. En estas

condiciones variables importan las respuestas directas de los agentes externos, sobreviviendo aquellas especies que siguen ritmos exógenos y por tanto menos especializados.

El carácter endógeno o exógeno de los ritmos está relacionado con su periodicidad. Aquellos ritmos de período corto pueden presentar con mayor facilidad un carácter endógeno. En cambio, en los ritmos de período largo es más dificultoso evidenciar características endógenas.

La importancia relativa de los distintos períodos en los ritmos se relaciona con la duración de la vida del organismo. Resulta evidente que será poco posible un ritmo anual en un organismo con pocas horas de vida, salvo en aquellos casos en que la tal periodicidad sea seguida por una comunidad o población de tales organismos de vida corta. Desde un punto de vista periódico presentan una mayor importancia, según MARGALEF (1974), los siguientes ritmos:

- ritmos circadianos, diarios o nictamerales;
- ritmos mensuales;
- ritmos anuales;
- ritmos con otros períodos.

1.1.1.1.- RITMOS CIRCADIANOS, DIARIOS O NICTAMERALES

Son aquellos ritmos cuyo período es de aproximadamente 24 horas (circa = aproximado, diano = diario).

La sucesión de días y noches implica una oscilación en una gran número de factores de interés ecológico (luz, temperatura, humedad, etc.). La mayor constancia en la duración del día y la noche en países tropicales ha llevado a un mayor rigor en la efectividad de los ritmos, siendo estos ritmos diarios menos acusados en los polos (TISCHLER, 1955).

En las plantas existen innumerables ejemplos de ritmos diarios. La primera mención de ritmo endógeno se debe a HACRAN, quién, en 1729, observó que las hojas de la sensitiva mantienen un ritmo aunque la planta permanezca en condiciones de iluminación constante. La actividad fotosintética sigue un ritmo endógeno observado claramente en Hydrodictyon y otras algas,

así como es también endógeno el fototactismo de Euglena gracilis y la producción de luz por dinoflageladas luminosas.

Los animales presentan una adaptación a un ritmo diario de actividad. Los animales diurnos poseen ojos de visión cromática que conceden valor a los recursos defensivos de cripsis, aposemasis y mimetismo óptico, de gran importancia en el condicionamiento de medios defensivos de caza y orientación. Los animales nocturnos requieren protección contra excesos de radiación o evaporación, adaptación en su visión a la luz poco intensa y recursos defensivos especiales. Un 61-64% de las especies de mamíferos promediados sobre distintas comunidades son nocturnos. Otras especies son crepusculares, mientras que en algunos casos, como pobladores de cuevas de grandes profundidades, especies sociales y algunos insectos, son arrítmicos.

La periodicidad diaria afecta a todos los elementos de una comunidad. La actividad no coincidente de los mismos induce una organización del ecosistema con segregación o alternancia de actividades. La rigidez de los ritmos permite la coexistencia, dentro de un ecosistema, de un gran número de especies que se comportarían como antagonistas si su actividad fuera dispersa.

1.1.1.2.- RITMOS MENSUALES

Los ritmos de período aproximadamente mensual pueden estar relacionados con diferentes fenómenos astronómicos. En su mayor parte son utilizados por los organismos para la sincronización de actividades dentro de una especie mas que como respuesta a un cambio ambiental, ya que el mes tiene poca importancia en lo concerniente a inducir cambios periódicos en las propiedades físicas ambientales.

La relación entre los movimientos lunares y las mareas implica que muchos organismos marinos de aguas costeras presenten ritmos lunares. En los animales terrestres hay menos ejemplos de ritmos lunares. Sin embargo, salamandras (Plethodon cinereus) y venados presentan influencias lunares inhibitoras o estimuladoras de la actividad.

Los ritmos indicados son ritmos endógenos "circalunares", pero existen ritmos lunares con un componente que se aproxima al mes, manifiestos en la respiración de las plantas y otros organismos y en la intensidad de produc-

ción primaria de muchas plantas. No ha sido determinado el factor que rige este ritmo pero se piensa en cambios magnéticos o gravitatorios difíciles de detectar con las técnicas actuales.

1.1.1.3.- RITMOS ANUALES

El estudio de la periodicidad anual revela aspectos interesantes de la ritmicidad (MARGALEF, 1974). Sólomente pueden existir ritmos endógenos anuales en organismos de vida larga y con posibilidades de organización suficientes para construir osciladores a esta escala. Generalmente el ritmo afecta a todo el año, existiendo dentro de este tiempo un mecanismo anticipador bien organizado. El principal factor en la elección del ritmo es la luz antes que la temperatura, por lo que los ritmos anuales equivalen en cierta manera a mecanismos de fotoperiodicidad. Adaptando como referencia la longitud del día se obtiene una gran fijeza del ritmo, pero al mismo tiempo admite una gran variabilidad pues importa la longitud precisa del día y también la tendencia a alargarse o a acortarse.

La fotoperiodicidad es conocida principalmente en las plantas, ya que el crecimiento, la floración y ciertas adaptaciones a la estación desfavorable están relacionados con la luz, aunque presentan variaciones interespecíficas. En los animales existen fenómenos comparables pues la reproducción, muda, migración y los cambios metabólicos asociados están regulados por fotoperiodicidad.

Además de estos ritmos indicados, ocurren en los organismos suspensiones periódicas de la actividad que facilitan la resistencia en condiciones ambientales adversas, anticipándose el organismo a las mismas, pudiendo dicha inactividad periódica no ser siempre de un ritmo anual, sino más corta o más larga. La deshidratación en protozoos, rotíferos, tardígrados y en algunos crustáceos es una respuesta directa. En algunas especies la anabiosis o vida latente es un fenómeno regular que se ha acoplado evolutivamente a un ritmo endógeno gobernado por fotoperíodo o termoperíodo. La diapausa (en el sentido de HENNEGUY, 1904) de los insectos consiste en una suspensión genética del desarrollo inducible e interrumpible por una combinación de ritmos endógenos y factores ambientales. La hibernación de los homotermos es un ritmo endógeno.

Las migraciones horizontales reposan en un ritmo endógeno y afectan a aves, insectos y animales marinos.

1.1.1.4.- FINALIDAD BIOLÓGICA DE LOS RITMOS

El estudio de los distintos ritmos biológicos conocidos evidencia indudablemente la existencia de una finalidad. Los ritmos en modo alguno son consecuencia del azar.

Los ritmos exógenos o respuestas directas a factores rítmicos ambientales favorecen la situación de los organismos respecto a estos factores ambientales. En el curso de una evolución darwiniana y como consecuencia de una selección natural, estas respuestas directas han favorecido la supervivencia de ciertas especies en detrimento de otras, pudiendo llegar a constituir algunas de ellas ritmos endógenos al repetirse regularmente. La finalidad ulterior y fundamental de los ritmos es siempre asegurar la supervivencia y reproducción de la especie.

1.1.2.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LOS PARASITOS

La primera observación realizada sobre ritmos biológicos en los parásitos se debe a HIPOCRATES, quién detectó los accesos febriles actualmente conocidos como fiebres tercianas y fiebres cuartanas, si bien por aquél entonces no se conocía su origen parasitario. PATRICK MASON, en 1879, descubrió que la microfilaria de periodicidad nocturna de Wuchereria bancrofti aparece en la sangre humana durante la noche y desaparece durante el día, pero sus observaciones fueron recibidas con incredulidad. Actualmente, el estudio de los ritmos biológicos en los parásitos presenta un gran interés.

1.1.2.1.- RITMOS CIRCADIANOS

Los ritmos circadianos de los parásitos pueden ser divididos, según HAWKING (1975), en:

- ritmos dependientes de la división sincrónica de las células de los parásitos según un período de 24, 48 o 72 horas (malaria);
- descarga sincrónica de formas infectivas a partir del hospedador en un momento determinado del día o de la noche (ooquistes de coccidios; huevos de Schistosoma haematobium; etc.);
- migración rítmica de los mismos individuos hacia la periferia e interior del cuerpo del hospedador según un período circadiano (microfilarias; tripanosoma de la rana);
- migración de parásitos intestinales como Hymenolepis diminuta a lo largo del intestino.

El ritmo más común y de mayor importancia biológica es el ritmo de 24 horas correspondiente al día y a la noche. Este ritmo se denomina circadiano o circadiario. Anteriormente se ha aludido a su importancia por afectar a la casi totalidad de los organismos vivos tanto animales como plantas.

Considerando únicamente el endoparasitismo, es decir, los parásitos cuyo hábitat se encuentra en el interior de su hospedador, es lógico suponer que un ritmo seguido por dicho hospedador afectará al parásito, estableciéndose así un ritmo exógeno en el parásito como respuesta a un cambio rítmico de condiciones en su medio ambiente que, en este caso, es el hospedador. Pueden existir, asimismo, ritmos endógenos en el parásito que no responden a estímulos externos del mismo, sino que son debidos al organismo en sí mismo.

1.1.2.2.- RITMOS ANUALES

Se ha evidenciado también ritmos anuales en los parásitos. Como ejemplos ilustrativos cabe citar los siguientes:

- Dirofilaria immitis (Nematoda: Onchocercidae) presenta un número de microfilarias en la sangre de su hospedador, el perro, que alcanza su máximo en los meses de Agosto y Septiembre, período anual en que su vector, el mosquito Anopheles maculipennis, es más común;

- Onchocerca gutterosa (Nematoda: Onchocercidae), parásito de caballos, comienza a aparecer en la piel superficial en Mayo, llegando al máximo en Agosto, época coincidente con la de mayor difusión de su vector, el simúlido Simulium ornatum;
- Plasmodium vivax presenta en hospedadores humanos una reactivación de las formas exoeritrocíticas del hígado después de nueve meses de quiescencia; se trata de un ritmo fuertemente endógeno dependiente únicamente de la fecha de infestación, de la temperatura externa ni de la fisiología humana; la finalidad biológica es clara, pues la infección ocurre, naturalmente, en Septiembre y permanece latente hasta Junio, momento en que reaparecen los mosquitos vectores.

Actualmente no son conocidos ritmos biológicos de parásitos relacionados con las mareas ni ritmos lunares aunque ésto no excluye antagónicamente la posibilidad de su existencia.

1.1.2.3.- RITMOS CIRCADIANOS DE PARASITOS Y RITMOS DE SU HOSPEDADOR- ENTORNO: RELACIONES EXISTENTES

La determinación del carácter exógeno o endógeno de un ritmo se consigue situando el organismo bajo condiciones ambientales constantes de iluminación y temperatura y observando la interrupción o continuación del mismo.

La aplicación de estos conceptos a los parásitos conlleva graves dificultades, ya que los ritmos de muchos parásitos, tales como las migraciones de las microfilarias, no pueden manifestarse fuera de sus hospedadores. Técnica-mente es casi imposible mantener muchos parásitos en condiciones ambientales constantes y aptas para el desarrollo de su ritmo. Únicamente se puede conseguir determinar, en algunos casos, cuál es el factor del hospedador que predomina en el establecimiento y mantenimiento del ritmo en el parásito. Ahora bien, HAWKING (1975) indica una imposibilidad absoluta de generalización en este sentido ya que hospedadores aparentemente similares pueden manifestar ritmos muy distintos. Como consecuencia, los parásitos situados en estos hospedadores reciben señales o estímulos muy distintos. Los binomios parásito-

hospedador requieren un estudio detallado en ambos componentes y en cada caso específico, quedando invalidado todo intento de aplicación de una misma teoría a varios casos aunque sus características sean a priori similares.

En algunas investigaciones se ha situado al hospedador bajo condiciones ambientales invertidas, es decir, manteniéndolo en oscuridad durante el día y a la luz durante la noche, invirtiendo así su ritmo. Frecuentemente ocurre, sin embargo, que el ritmo del parásito se presenta también invertido pero no se obtiene ninguna información válida pues, la relación entre el parásito y su hospedador permanece inalterada. El descubrimiento del factor del hospedador que induce un ritmo en el parásito requiere la alternación experimental del ritmo de este factor en dicho hospedador. Así, es posible conseguir una alteración en la temperatura del cuerpo del hospedador sin afectar al ritmo de otros factores o bien alterar la tensión de oxígeno del hospedador variando la concentración de oxígeno del aire inspirado. Esta alteración de uno de los ritmos del hospedador tiene que mantenerse durante varios ciclos antes de obtener algún resultado.

En aquellos parásitos que presentan estadios larvarios de evolución libre, fuera de su hospedador definitivo, sus ciclos vendrán inducidos por estímulos ambientales. Así, todo posible ciclo en las formas infectivas de Nippostrongylus (Nematoda: Heligmosomidae) estará originado por algún estímulo proveniente del medio donde se desarrollan. En el caso de cercarias emergentes de caracoles el estímulo ha de ser la luz o bien la temperatura pero no todas las cercarias responden de igual forma ya que existe también la posibilidad de alguna influencia por parte de algún ritmo propio del caracol.

1.1.3.- RITMOS BIOLÓGICOS EN LOS TREMATODOS DIGENIDOS

Establecida ya la existencia de ritmos biológicos fuertemente arraigados en una gran mayoría de organismos y evidenciada la existencia de numerosos ritmos en los parásitos, pasamos a ocuparnos concretamente ya del estudio de los Trematodos Digénidos.

Estos presentan un ciclo biológico complejo, comprendiendo un hospedador definitivo que alberga el parásito adulto cuyos huevos son eliminados al exte-

rior liberándose el miracidio bien en el medio externo, en el caso de los ciclos biológicos acuáticos, o en el interior del Molusco primer hospedador intermediario en los ciclos terrestres. En dicho Molusco se originarán las fases larvarias de esporocistos y, en algunos casos redías, cuyo objetivo final es la producción de cercarias que, en general son emitidas.

Las cercarias pueden seguir diferentes vías en su evolución, de las que las más frecuentes son las siguientes:

- acceso directo al hospedador definitivo sin formación de metacercarias (Schistosomatidae);
- transformación en metacercaria libre que accederá vía oral al hospedador definitivo (Fasciolidae);
- evolución en un segundo hospedador intermediario hasta metacercaria infestante, que accederá por depredación al hospedador definitivo (Brachylaimidae);
- evolución en un segundo hospedador intermediario hasta mesocercaria, que por depredación accederá a un tercer intermediario en el que dará la metacercaria, que ya infesta al hospedador definitivo vía depredación (Hemiuridae).

De entre las formas larvarias de un ciclo evolutivo de Digénido, sólo las siguientes pueden seguir una vida libre no parásita en determinados casos:

- miracidio: forma larvaria de diseminación e infestante, procedente del huevo, que infestará al primer hospedador intermediario; el miracidio sólo es de vida libre en ciclos de evolución acuática, pero nunca en los terrestres;
- cercaria: estadio larvario subsiguiente a esporocisto o redia que emergerá del Molusco primer hospedador intermediario; pasará a originar el estadio de metacercaria, bien libre en el medio externo tras enquistarse, bien parásita tras infestar a un segundo hospedador intermediario;
- metacercaria: forma larvaria metacíclica infestante para el hospedador definitivo que puede ser de vida libre en aquellos

casos en que su desarrollo ocurre dentro de una cubierta quística y sobre distintos sustratos u objetos acuáticos; la infestación del hospedador definitivo por ella es siempre pasiva (vía oral) y por tanto no se considerará en cuanto a un comportamiento rítmico.

La presencia de estos estadios de vida libre en los ciclos biológicos de los Trematodos Digénidos hace que estos helmintos sean susceptibles de estudios sobre comportamiento adaptativo. Se ha demostrado la importancia de los estadios inmaduros y su morfología en la taxonomía de los Trematodos desde órdenes a especies. Actualmente, el comportamiento de estos estadios puede constituir un factor de distinción a estos niveles. Sin embargo, el comportamiento de los Digénidos interesa, más que por su contribución a la taxonomía, por su importancia en la transmisión.

Los estadios de vida libre han de adaptarse, tanto en su salida del hospedador donde se encuentran, como en su comportamiento en el exterior, al comportamiento de los potenciales hospedadores que permitirán la continuación del ciclo. Dado que estos hospedadores están sometidos a diferentes ritmos biológicos, principalmente circadianos y anuales, es evidente la importancia de un sincronismo perfecto entre el ritmo biológico del parásito y el ritmo biológico del futuro hospedador, a fin de conseguir el máximo nivel posible de encuentros entre la forma infestante del parásito y el hospedador a infestar.

El miracidio ha recibido gran atención en cuanto a su comportamiento, pero el comportamiento de la cercaria es más diverso y, obviamente, mejor adaptado a la búsqueda del hospedador. El presente estudio versará únicamente sobre emergencias cercarianas a partir del primer hospedador intermediario y sobre su posible ritmicidad.

1.1.3.1.- MODALIDADES DEL PROCESO DE EMERGENCIA DE CERCARIAS

Se reconoce cuatro tipos de emergencia de cercarias, a través de los tegumentos del Molusco hospedador (SMYTH, 1966):

- escape activo desde los vasos sanguíneos a través de abertu-

ras fijas en el tegumento (Alaria canis, Alaria arisaemoides, Strigea elegans, Neodiplostomum intermedium, Apatemon sp., algunos esquistosomas y algunos equinostomas);

- escape activo a través del tegumento intacto (Schistosoma mansoni);
- extrusión pasiva de masas de cercarias (Fasciola hepatica);
- escape activo de esporocistos hijos conteniendo cercarias, que serán ingeridos por el hospedador intermediario (Dicrocoelium dendriticum).

Las cercarias objeto de nuestra atención presentan un escape activo, lo cual implica un movimiento de las mismas a través del Molusco, antes de emerger por un poro "de escape".

1.1.3.2.- RITMOS DE EMERGENCIA CERCARIANA

Existe un gran número de factores físicoquímicos del medio ambiente que ejercen una gran influencia sobre la emisión cercariana: temperatura, luz, humedad, pH, tensión de oxígeno, etc. Estos factores externos presentan una variación rítmica siguiendo ritmos de período corto, largo o ambos simultáneamente. Así, la luz, por ejemplo, varía según un ritmo diario pero sigue también un ritmo anual en la duración del día o en su intensidad.

El ritmo de estos factores cuya influencia sobre la actividad fisiológica de los organismos presenta mayor importancia es el ritmo circadiano o de alternancia del día y de la noche. Consideramos como factores de mayor importancia, entre los anteriormente citados, la iluminación y la temperatura. Enfocaremos nuestro estudio sobre la emisión cercariana considerando la influencia de estos dos factores y un ritmo circadiano de oscilación de los mismos.

El mantenimiento de una temperatura constante, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, revela que la emisión cercariana puede seguir, como todo fenómeno biológico, diferentes tipos de ritmos. Cabe distinguir, de acuerdo con HALBERG & REINBERG (1967) los ritmos siguientes:

- ritmos de emergencia circadianos;
- ritmos de emergencia ultradianos;
- ritmos de emergencia infradianos.

A) RITMO DE EMERGENCIA CIRCADIANO

Este ritmo de emergencia se caracteriza por la presencia de un pico (o acrofase) de emisión cada 24 horas.

Todos los ritmos circadianos poseen un único pico de emisión en 24 horas pero pueden diferir entre sí por la situación en el tiempo de la acrofase, proponiendo THERON (1975) las siguientes denominaciones:

- cercarias de día: cercarias cuya emisión presenta la acrofase en el período de iluminación del nictámero;
- cercarias de noche: cercarias cuya emisión presenta la acrofase en el período oscuro del nictámero;
- cercarias intermedias: cercarias cuya acrofase emisora se sitúa en el límite entre los períodos de luz y de oscuridad del nictámero.

La curva de emisión, independientemente de su posición en el nictámero, presenta formas distintas en las diferentes especies de Trematodos, pudiendo distinguirse:

- cercarias de alternancia absoluta: su emisión se sitúa totalmente en uno de los períodos del nictámero, bien sea el de iluminación o el de oscuridad;
- cercarias de alternancia relativa: su emisión dominante puede ser diurna o nocturna pero existe una cierta emisión en el período opuesto a aquél en que se presenta la acrofase.

B) RITMO DE EMERGENCIA ULTRADIANO

Este tipo de ritmo, poco frecuente, se caracteriza por la existencia de

dos máximos de emisión cercariana en 24 horas.

C) RITMO DE EMERGENCIA INFRADIANO

Este tipo de ritmo incluye aquellas emisiones cercarianas cuya acrofase sigue una periodicidad superior a 24 horas. Estos ritmos pueden superponerse a los anteriores y podrían estar relacionados con las estaciones del año o estar sometidos a influencias lunares. En todo caso, son poco conocidos actualmente.

Se ha de admitir también la posibilidad de emisiones totalmente independientes del nictámero.

1.1.3.3.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO CIRCADIANO

Son conocidos los ritmos de emisión de un gran número de cercarias entre las cuales citamos aquí aquellas cuya emisión sigue un ritmo circadiano, es decir, presenta una única acrofase o pico de emisión cada 24 horas. Hemos de distinguir, además, entre cercarias de día de alternancia absoluta y de alternancia relativa, así como entre cercarias de noche de alternancia absoluta y de alternancia relativa.

1.1.3.3.1.- CERCARIAS DE DIA DE ALTERNANCIA ABSOLUTA

Son sujeto de esta denominación aquellas cercarias cuya emisión ocurre únicamente durante las horas de luz del nictámero, no presentándose ningún tipo de emisión en horas de oscuridad. THERON (1975) no cita ninguna especie de cercaria conocida cuyo ritmo de emisión se ajuste a los límites anteriormente indicados, y hasta el momento no conocemos que haya ocurrido variación alguna en esta situación.

1.1.3.3.2.- CERCARIAS DE DIA DE ALTERNANCIA RELATIVA

Son numerosas las especies de Trematodos Digénidos cuyas cercarias son emitidas predominantemente durante las horas de luz pero su emisión continúa durante las horas de oscuridad del nictámero aunque débilmente.

Entre estas cercarias merece especial mención la cercaria de Schistosoma mansoni acerca de cuyo patrón de emergencia han trabajado un considerable número de autores. Así, FAUST & HOFFMAN (1934) estudian la emisión diaria de cercarias entre las 9:00 horas y las 14:00 horas. GORDON et al. (1934) destacan el efecto que un cambio brusco de temperatura ejerce sobre la emisión de estas cercarias incluso en ausencia de luz. GIOVANNOLA (1936 a) lleva a cabo estudios sobre la emisión de cercarias de Schistosoma mansoni por Australorbis glabratus experimentalmente infestados, presentando resultados comparables con los anteriores. Asimismo, KUNTZ (1947) estudia el efecto de la luz y de la temperatura sobre la emisión de S. mansoni por A. glabratus forzando la emisión de cercarias a las 8:00 horas mediante la exposición de sus hospedadores a una temperatura de 36-37°C y a una luz muy intensa, emisión seguida por una nueva emergencia desde las 10:00 a las 12:00 horas y a las 17:00 horas del mismo día.

SCHREIBER & SCHUBERT (1949) en sus trabajos sobre este tema indican que el mantenimiento de una temperatura alta y la exposición a una luz muy intensa producen, conjuntamente, un incremento en el número de cercarias emitidas que se muestra superior al conseguido bajo la influencia de uno sólo de estos estímulos, y sitúan el inicio de la emisión a las 9:00 continuando hasta las 15:00, sosteniendo que los hospedadores producen más cercarias/caracol durante la mañana que por la tarde. BARBOSA et al. (1954) estudian la emisión de S. mansoni por A. glabratus mantenidos en condiciones naturales en Brasil e indican que la duración de la emisión es de 10 horas ocurriendo ésta principalmente entre las 11:00 y las 17:00 horas. LUTTERMOSER (1955) estudia experimentalmente el efecto de la inversión de los períodos de luz y de oscuridad sobre la emergencia de S. mansoni a partir de A. glabratus, llevando a cabo sus estudios con hospedadores experimentalmente infestados que son mantenidos bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a una temperatura constante de 30 °C. La inversión del fotoperíodo al mantener 48 horas de oscuridad continua y, tras 4 días, 36 horas de oscuridad continua indu-

ce una reversión total del patrón de emergencia de cercarias, indicando, además, este autor, que la emisión de cercarias a partir de individuos aislados puede ser cíclica con un pico de emisión cada segundo o tercer día. ROWAN (1958) determina la periodicidad diurna de las cercarias de S. mansoni en aguas naturales de Puerto Rico, observando dicho autor que en aguas no estancadas las densidades máximas de cercarias se obtienen durante un período corto del nictámero, entre las 10:00 y las 14:00 con un pico de emergencia situado entre las 12:00 y las 13:00 horas, en tanto que en aguas estancadas las cercarias están presentes durante todo el día con densidades máximas entre las 10:00 y las 20:00 horas. MALDONADO (1959) confirma las observaciones de ROWAN (loc. cit.) y ambos autores indican que las cercarias son más abundantes en el agua en días nublados que en días soleados. STURROCK (1965) describe una emisión diaria de S. mansoni por B. angulosa cuyo nivel es alto durante aproximadamente 5 horas, iniciándose dicha emisión 2 horas después de la aplicación de luz y calor en hospedadores mantenidos bajo iluminación durante las horas 8:30 a 17:30 ó 18:30.

PELLEGRINO & DE MARIA (1966) señalan, en Brasil, una emisión máxima de S. mansoni por A. glabratus entre las 15:30 y las 17:30 horas. MC CLELLAND (1967) estudia la emisión de S. mansoni a partir de Biomphalaria glabrata en Tanzania en condiciones experimentales bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a una temperatura de 23-26 °C, encontrando que la emisión cercariana se inicia rápidamente tras la aplicación de luz y temperatura y alcanza su máximo en la segunda o tercera hora para finalizar prácticamente cuando han transcurrido 5 horas desde su inicio. VALLE, PELLEGRINO & ALVARENGA (1971, 1973) estudian la influencia de la temperatura sobre la emisión de S. mansoni por B. glabrata. ASCH (1972) trabaja con S. mansoni procedente de Puerto Rico y mantenido experimentalmente en Biomphalaria glabrata y mediante aplicación de luz entre 6:00 y 18:00 horas y a temperatura constante de 25 °C observa un ritmo de emisión diurno con elevados números de cercarias que emergen en horas de luz y pocas o ninguna cercaria emergiendo en horas de oscuridad. La inversión del fotoperíodo causa una inversión drástica del ritmo de emergencia. Este mismo autor estudia la influencia de la iluminación sobre la temperatura y concluye que la emergencia cercariana es iniciada por la luz y no por ningún cambio en la temperatura del caracol. GLAUDEL & ETGES (1973) infestan experimentalmente Biomphalaria glabrata criados

en laboratorio con S. mansoni procedente de Puerto Rico y los someten a una temperatura de 26,5-28,0 °C y a un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad en el que las horas iluminadas son de 6:00 a 18:00, observando que la emisión ocurre fundamentalmente desde las 12:00 hasta las 24:00 horas. La inversión del fotoperíodo causa una inversión drástica del ciclo de emergencia.

Autores como THERON (1975, 1982) y COMBES & THERON (1977) estudian experimentalmente la emisión de S. mansoni por B. glabrata de Guadalupe a una temperatura constante de 27 °C y bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, indicando que la emisión se inicia tres horas después del inicio del período claro y que presenta una acrofase entre las 13:00 y las 14:00, continuando la emisión hasta las primeras horas de oscuridad. NOJIMA & SATO (1978) estudian en Kenya la emisión de S. mansoni por Biomphalaria pfeifferi en condiciones naturales de luz (7:00 a 19:00 aprox.) y temperatura (22-30°C) evidenciando una emisión de periodicidad diaria cuya acrofase ocurre entre las 11:00 y las 13:00 horas. El inicio del período iluminado a las 10:00, 12:00, 14:00 ó 17:00 disminuye la emisión esperada hasta ese momento y provoca la aparición inmediata de un primer pico de emisión tras el inicio de la iluminación y un segundo pico 4-5 horas después. En condiciones experimentales (iluminación 8:00 a 20:00 horas) el patrón de emergencia es irregular durante el primer día de los ensayos pero se regulariza en los días siguientes. Temperaturas de 30 °C, 27 °C, 25 °C, 20 °C y 17 °C inducen la aparición de un pico de emergencia en las horas cuarta, cuarta, quinta, sexta y sexta, respectivamente, del período de luz, según los antedichos autores. Posteriormente, estos mismos autores (1982) llevan a cabo un interesante estudio experimental sobre la influencia de la oscuridad en la emisión de cercarias de S. mansoni por Biomphalaria glabrata procedentes ambos de Puerto Rico. Dichos autores establecen que se requiere un período de oscuridad de 10-14 horas de duración para mantener un patrón de emergencia regular, siendo requeridas 4-6 horas de luz para una emisión máxima. Estas observaciones sugieren a los autores que la maduración final de las cercarias para ser emitidas se inicia en cualquier momento durante el fotoperíodo siguiente. Sin embargo, otros autores (VALLE et al., 1971, 1973) muestran que estas cercarias son emitidas en condiciones de iluminación u oscuridad continuas por lo que la oscuridad no es un requisito necesario para la maduración de las cercarias a emitir, si bien la duración de dicha oscuridad juega un importante papel en la ampli-

tud de la ritmicidad de la emergencia diaria de las cercarias. Así, NOJIMA & SATO (loc. cit.) concluyen indicando que la maduración de las cercarias puede ser debida a algún tipo de activación enzimática.

Posteriormente WILLIAMS & GILBERTSON (1983) intentan esclarecer los factores que controlan la emergencia diaria de las cercarias de S. mansoni a partir de B. glabrata ya que algunos autores opinan que este ritmo está controlado por el hospedador. Para ello provocan alteraciones en la actividad locomotora y en la actividad cardíaca de los caracoles y los someten a iluminación continua, observando que no existe una correlación entre la emergencia cercariana y la actividad locomotora de los caracoles ni aquella es afectada por la actividad cardíaca de los hospedadores, por lo que concluyen que las fluctuaciones diarias observadas en la emisión pueden estar originadas por algún factor propio de esquistosoma más que por un efecto del caracol sobre el esquistosoma. Recientemente, WILLIAMS, WESSELS & GILBERTSON (1984) estudian la emisión de cercarias de S. mansoni por B. glabrata bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y bajo iluminación continua a una temperatura constante de 25 °C, observando que la emisión diaria presente en condiciones de alternancia de luz y oscuridad es abolida en iluminación continua por lo que sugieren que este aspecto del ritmo no está controlado probablemente por un oscilador endógeno.

Otras cercarias de día de alternancia relativa han sido también objeto de estudio por parte de diversos autores. Entre ellas y continuando con los esquistomas podemos citar la cercaria de Schistosoma haematobium sobre cuyo patrón de emergencia GORDON et al. (1934) llevan a cabo trabajos experimentales acerca de su emisión conjuntamente con otros realizados sobre la emisión de S. mansoni, pero sus resultados son confusos ya que no indican exactamente la especie de cercaria a que en cada momento se refieren. Sin embargo, cabe indicar que destacan la presencia de una emisión mayoritaria durante las horas de luz y cuya duración es de 6 horas aproximadamente e indican la importancia de un aumento brusco de la temperatura sobre la emisión así como el efecto estimulante de la luz sobre la misma.

MC CLELLAND (1967) lleva a cabo un extenso estudio sobre la emisión de S. haematobium por Bulinus (Physopsis) nasutus en Tanzania y observa que la emisión ocurre durante los períodos de luz independientemente de que éstos ocurran durante el día o durante la noche a una temperatura aproximada de

25 °C y bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad. El mantenimiento de los hospedadores en oscuridad continua durante 9 días consecutivamente muestra que las cercarias son acumuladas durante un tiempo y emergen para ser nuevamente acumuladas emergiendo nuevamente 24-72 horas después. Un aumento brusco de temperatura produce una fuerte emisión en hospedadores mantenidos en oscuridad continua pero no consigue la sincronización continuada de la emisión. Los autores observan que la emisión diaria de cercarias muestra un pico en la cuarta hora de luz prolongándose dicha emisión hasta la séptima hora. PITCHFORD et al. (1969) estudian en Sudáfrica, en condiciones naturales, la emisión de cercarias de S. haematobium a partir de Bulinus (Physopsis) sp., ambas especies procedentes de Transvaal, así como la emisión de cercarias de aquella especie por Bulinus truncatus, en este caso procedentes de Irán, siendo experimentalmente infestados los Moluscos en ambos casos. Los autores indican la existencia de una emisión cercariana diaria que presenta una acrofase entre las 10:00 y 12:00 y ocasionalmente entre las 10:00 y 14:00 horas a temperaturas superiores a 25 °C, en tanto que a temperaturas inferiores la emisión ocurre entre las 12:00 y 16:00 horas. Los autores destacan que la emisión de S. haematobium desciende rápidamente al bajar la temperatura y sufre un rápido incremento al aumentar la misma. Detectan, asimismo, variaciones estacionales en la emisión con un descenso muy importante en la misma durante el invierno. PITCHFORD & DU TOIT (1976) confirman los resultados anteriores, habiendo estudiado la emisión de S. haematobium por Sacrostomum campestris y por Bulinus (Physopsis) sp.

NOJIMA & SATO (1978) estudian la emisión de S. haematobium por Bulinus globosus en Kenya en condiciones naturales y en condiciones experimentales (12 h. luz - 12 h. oscuridad) mostrando una emisión diurna cuya acrofase se sitúa entre las 11:00 y las 13:00 horas, indicando dichos autores que la emisión es suprimida hasta las 14:00 en condiciones de oscuridad continua hasta dicho momento. Los autores indican que la introducción de oscuridad durante el período iluminado estimula la inmediata emisión de un elevado número de cercarias. Posteriormente estos mismos autores (1982) cuantifican la influencia de la duración de la oscuridad sobre la emisión de cercarias de la especie citada indicando la necesidad de un período de oscuridad de 10-14 horas para el mantenimiento de una emisión cercariana normal, así como la conveniencia de 4-6 horas de luz para conseguir una emisión máxima.

Otras especies de esquistosomas presentan cercarias de día de alternancia relativa. ISOBE (1923) notifica la emisión de Schistosoma japonicum por Oncomelania formosana y otros autores como OSAKA (1938), KOMIYA & ISHII (1954) y GUMBLE et al. (1957) estudian su emisión por O. nesophora pero estos estudios no detectan una periodicidad clara en la emisión. MAO et al. (1949) indican que la emisión es diurna por O. hupensis en tanto que BAUMAN et al. (1948) y PESIGAN et al. (1958) indican que la emisión por O. quadrasi es nocturna. Posteriormente NOJIMA et al. (1980) estudian la emisión de S. japonicum por O. quadrasi en Filipinas, sometiendo a los hospedadores a la luz natural bajo una temperatura de 24-26 °C. Dichos autores evidencian una periodicidad diaria en la emisión de cercarias tras 12 horas de inmersión de los hospedadores en agua, presentándose la emisión máxima entre las 14:00 y las 16:00 horas y prolongándose dicha emisión hasta las primeras horas de oscuridad y ocurriendo una reducción o acumulación de la emisión cada 3 ó 4 días. Recientemente, autores como KAWASHIMA, BLAS & SANTOS (1985) indican que la emisión de cercarias de S. japonicum por O. quadrasi es esencialmente nocturna en Filipinas bajo condiciones ambientales de luz y de temperatura, presentando un pico de emisión entre las 18:00 y las 20:00 horas.

Asimismo, son conocidos los patrones de emisión que siguen las cercarias de otras especies de esquistosomas. PITCHFORD et al. (1969) estudian la emisión de varias especies de cercarias además de las de S. mansoni y S. haematobium cuyos patrones de emisión hemos descrito anteriormente. Así, los citados autores indican que la emisión de cercarias de Schistosoma mattheei por Bulinus (Physopsis) sp. de Sudáfrica infestados experimentalmente bajo condiciones naturales de luz y de temperatura presenta un pico máximo entre las 12:00 y 14:00 horas en invierno para ocurrir entre las 6:00 y las 8:00 horas en el verano, hecho relacionado con la temperatura ambiente según los autores. PITCHFORD & DU TOIT (1976) describen los patrones de emisión de las cercarias de Schistosoma intercalatum por Praomys (Mastomys) natalensis y por Bulinus (Physopsis) sp. y de las cercarias de Schistosoma leiperi por P. (M.) natalensis, Sacrostomum campestris y Bulinus truncatus en Sudáfrica bajo condiciones naturales de luz y de temperatura, indicando que las cercarias de las dos especies mencionadas presentan una periodicidad diaria. S. intercalatum presenta una emisión máxima entre las 14:00 y las 20:00 horas y una emisión mínima en horas de oscuridad. S. leiperi muestra una emisión máxima des-

de las 16:00 horas hasta las 20:00 horas y una emisión mínima durante las horas de oscuridad. LOHACHIT, SRITABUTRA & BUTRCHAM (1980) indican que la emisión de Schistosoma mekongi por L. aperta presenta un ritmo circadiano con una acrofase entre las 6:00 y las 8:00 horas.

Otras especies de Digénidos, además de las anteriormente citadas, presentan cercarias de día de alternancia relativa. CORT (1922) estudia la emisión de Cercaria elephantis por su hospedador Planorbis trivolvia, indicando que la emisión presenta máximos cada 24 horas y que dicha emisión ocurre únicamente durante una parte de dicho período, si bien añade que la situación de dichos máximos varía según los individuos emisores, ocurriendo en algunos durante el día y en otros durante la noche. REES (1931) presenta extensos estudios acerca de la emisión de Cercaria limbifera (Seifert, 1926) por Lymnaea palustris (Müll.) y de la emisión de Cercaria "Z" por L. peregra (Müll.), indicando que C. limbifera es emitida principalmente entre las 9:00 y las 21:00 horas, en tanto que la autora expresa la existencia de dos máximos de emisión para Cercaria "Z" situados entre las 11:00 y las 16:00 horas con emisiones muy débiles en período oscuro, manteniendo en ambos casos a los hospedadores sometidos a un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad. GIOVANNOLA (1936 b) indica que la emisión de Cercaria brevifurca por Helisoma trivolvis y la emisión de Diplostomum flexicaudum por Stagnicola emarginada angulata ocurren durante las horas de luz principalmente, mostrando una periodicidad diaria. REES (1948) estudia experimentalmente la emisión de Cercaria purpurea Lebour por Nucella lapillus (L.), sometiendo a los hospedadores a un fotoperíodo de 12 horas luz (9:00 a 21:00 horas) y 12 horas oscuridad y a una temperatura de 15-18 °C y observa que la emisión ocurre principalmente en horas de luz, con una emergencia muy débil en horas de oscuridad.

Recientemente, MARTIN & VAZQUEZ (1984) estudian experimentalmente la emergencia de la cercaria de Sanguinicola sp. parásito de Ancylus fluviatilis a una temperatura constante de 19±1 °C y bajo un fotoperíodo de 14 horas de luz (7:30 a 21:30 horas) y 10 horas de oscuridad (21:30 a 7:30 horas). Dichos autores indican que la emisión de cercarias ocurre durante un corto período de tiempo (4-6 horas), iniciándose a las 15:00-16:00 horas para cesar a las 20:00-21:00 horas, repitiéndose diariamente dicha emisión. Durante las horas de oscuridad del nictámero la emisión es débil pero existe (com. pers.).

1.1.3.3.3.- CERCARIAS DE NOCHE DE ALTERNANCIA ABSOLUTA

THERON (1975) y COMBES & THERON (1977) estudian la emisión de Ribeiroia marini por Biomphalaria glabrata naturalmente infestados y describe para dicha cercaria una emisión circadiana que tiene lugar únicamente en horas de oscuridad, estando sometidos los hospedadores a un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a una temperatura constante de 27°C. La emisión de cercarias se inicia inmediatamente tras el paso de luz a oscuridad y la acrofase se sitúa en la primera hora de oscuridad tras la cual el número de cercarias emitidas disminuye progresivamente para ser nulo antes del inicio del período iluminado. El autor consigue una drástica inversión del ritmo de emisión por inversión del fotoperíodo.

1.1.3.3.4.- CERCARIAS DE NOCHE DE ALTERNANCIA RELATIVA

Numerosas especies de Digénidos presentan cercarias cuya emisión ocurre fundamentalmente en horas de oscuridad, si bien existe una cierta emisión en horas de luz. REES (1931) presenta el ritmo de emisión de Cercaria cambrensis I (Wright, 1928) por Lymnaea truncatula manteniendo sometidos estos hospedadores a un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, e indica que la emisión ocurre preferentemente durante las 21:00 a 9:00 horas, siendo muy débil en horas de luz. OLIVIER (1951) estudia el ritmo de emisión de cercarias de Schistosomium douthitti por Lymnaea stagnalis y L. palustris, indicando dicho autor que la emisión ocurre preferentemente en horas de oscuridad y que una inversión del fotoperíodo provoca una inversión del ritmo de emisión. MACY (1960) lleva a cabo estudios experimentales sobre la emisión de cercarias de Plagiorchis vespertilionis por Lymnaea stagnalis naturalmente infestados y describe una emisión diaria cuyo máximo tiene lugar entre las 21:00 y la 1:00 horas, manteniendo los hospedadores bajo un fotoperíodo de 12 horas luz (18:00 a 6:00) y 12 horas oscuridad. PITCHFORD et al. (1969) estudian la emisión en condiciones naturales en Sudáfrica de Schistosoma rodhaini por Biomphalaria salinarum experimentalmente infestados, observando dichos autores que la emisión ocurre preferentemente en horas de oscuridad, siendo máxima entre las 19:00 y las 21:00 horas. WAGENBACH & ALLDREDGE (1974) llevan a ca-

bo estudios experimentales sobre la emisión de la cercaria de Plagiorchis micracanthos por Stagnicola exilis naturalmente infestados y sometidos a un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a una temperatura de 20-22°C, cuyos resultados indican que la emisión de dichas cercarias tiene lugar preferentemente en horas de oscuridad. THERON (1975) describe el ritmo de emisión de varias especies de cercarias de noche de alternancia relativa, tales como las cercarias de Apatemon sp. emitidas por Biomphalaria glabrata naturalmente infestados que presentan una emisión máxima a las 22:00 horas, prolongándose posteriormente hasta las 7:00 horas (hospedadores mantenidos bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 7:00 a 19:00 horas - 12 horas oscuridad y a una temperatura constante de 27 °C). El autor estudia, asimismo, el ritmo de emisión de las cercarias de Opisthioglyphe rastellus por Radix limosa naturalmente infestados en los cuales la emisión se inicia en la primera hora de oscuridad, situándose la acrofase en las 21:00 horas, tras la cual la emisión decrece rápidamente concluyendo hacia las 4:00 horas. A partir de los mismos hospedadores, R. limosa, THERON (loc. cit.) estudia experimentalmente la emisión de cercarias de Plagiorchis neomydis, P. muris y P. cf. lacertae que tiene lugar en todos los casos principalmente en horas de oscuridad con acrofases situadas en las horas 12:00, 22:00-23:00 y 22:00 respectivamente (hospedadores mantenidos bajo un fotoperíodo de 14 horas luz - 6:00 a 20:00 horas - 10 horas oscuridad y a una temperatura constante de 12°C). BLANKESPOOR (1977) indica una acrofase en horas nocturnas para las cercarias de Plagiorchis noslei. Posteriormente MITCHELL, LEES & MASON (1983) estudian la emisión de cercarias de Gorgoderina vitelliloba por Pisidium spp. en condiciones naturales e indican que dicha emisión es fundamentalmente nocturna, teniendo lugar la acrofase entre las 24:00 y las 3:00 horas. Dichos autores observan que dicha periodicidad se mantiene sometiendo a los hospedadores a iluminación continua y a una temperatura constante de 20°C. WALLET, THERON & LAMBERT (1985) estudian la emisión de cercarias de Bucephalus polymorphus por el lamelibranquio Dreissena polymorpha en condiciones experimentales e indican la presencia de un ritmo de emisión circadiano con una acrofase entre las 23:00 y las 5:00 horas para un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad (escotofase de 22:00 a 6:00 horas).

1.1.3.3.5.- CERCARIAS INTERMEDIAS

THERON (1975) describe el ritmo de emergencia de la única cercaria de tipo intermedio que se conoce en la actualidad. Se trata de la cercaria de Stephanoprora sp. emitida por Biomphalaria glabrata en Guadalupe, que en condiciones experimentales de 12 horas luz (7:00 a 19:00 horas) - 12 horas oscuridad y a una temperatura constante de 27°C inicia su emisión a las 3:00 horas y presenta la acrofase a las 6:00 horas (una hora antes del inicio del periodo iluminado) tras la cual la emisión decrece rápidamente no ocurriendo ninguna emisión entre las 19:00 y las 3:00 horas.

1.1.3.4.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO ULTRADIANO

La descripción de un ritmo de emisión ultradiano ha sido realizada por primera vez por THERON (1975) para una cercaria de Clinostomum sp. emitida por Biomphalaria glabrata de Guadalupe. La emisión de dichas cercarias presenta un primer pico de emisión en periodo iluminado y un segundo pico en periodo oscuro en condiciones experimentales bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a temperatura constante de 27°C. PITCHFORD & DU TOIT (1976) describen el patrón de emisión de Schistosoma margrebowiei por Bulinus tropicus y B. depressus infestados experimentalmente en Sudáfrica. En condiciones naturales de luz y temperatura los autores indican que las cercarias de dicha especie presentan un ritmo de emisión diario caracterizado por la presencia de un pico de emisión máxima a las 18:00 horas y un nuevo pico a las 6:00 horas aproximadamente. Posteriormente, APLETON (1983) indica que la emisión de Australobilharzia terrigalensis por Velacumantus australis presenta un ritmo ultradiano, iniciándose dicha emisión entre las 4:00 y las 6:00 horas e incrementándose rápidamente para alcanzar un primer máximo de emisión entre las 8:00 y las 10:00 horas tras el cual la emisión disminuye y presenta un segundo máximo entre las 16:00 y 18:00 horas. El autor indica que no tiene lugar emisión alguna entre las 22:00 y las 4:00 horas. Las condiciones experimentales establecidas por el autor son un fotoperíodo de 12 horas luz (6:00 a 18:00 horas) - 12 horas oscuridad y una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

RAISHITE (1982) encuentra un ritmo ultradiano para la emisión de cercarias de Trichobilharzia ocellata por Lymnaea stagnalis. Asimismo, ROJO-VAZQUEZ & SIMON-MARTIN (1985) detectan un ritmo ultradiano en la emisión de cercarias de Trichobilharzia sp. con un primer pico de emisión a las 12:00 horas y un segundo pico a las 20:00 horas, por su hospedador Radix peregra naturalmente infestado, y en condiciones experimentales (fotoperíodo de 10 horas luz - 14 horas oscuridad y una temperatura de 24°C).

1.1.3.5.- CERCARIAS CUYA EMISION SIGUE UN RITMO INFRADIANO

Los ritmos de emergencia infradianos pueden superponerse a los anteriores y su existencia es demostrable, principalmente en aquellos relacionados con las estaciones del año. Sin embargo, estos ritmos requieren un mayor estudio ya que actualmente no se conoce exactamente si algunas cercarias tienen una cronobiología realmente independiente del nictámero. LENGY (1962) afirma que las cercarias de Schistosoma bovis emergen regularmente a cualquier hora del día y de la noche, si bien dicho autor apunta que aunque la luz no es esencial para la emisión de dichas cercarias su presencia causa la emisión de un número de cercarias superior al obtenido en oscuridad total o bajo luz difusa. El autor indica que la emisión de cercarias presenta uno, dos o tres picos durante un período de 72 horas aunque esta periodicidad no está asociada al día ni a la noche y varía de uno a otro de los individuos emisores. BARTOLI (1974) muestra que las cercarias de varios Gymnophallus tienen ritmos de emisión muy irregulares pero que pueden presentar alguna influencia lunar. THERON (1975) indica que la emisión de cercarias de Tylodelphis sp. por Biomphalaria glabrata ocurre de una manera continua durante 24 horas, no destacándose ningún pico de emisión por lo que podría seguir un ritmo infradiano.

1.1.3.6.- SINCRONIZACION DE LOS RITMOS DE EMERGENCIA

Las experiencias realizadas hasta la época actual han venido a demostrar la capacidad de dos factores del medio ambiente, fotoperíodo y termoperíodo,

para influir sobre los ritmos de emergencia cercarianos. Estos dos factores han sido denominados sincronizadores de los ritmos.

1.1.3.6.1.- SINCRONIZACION POR EL FOTOPERIODO

En condiciones experimentales con mantenimiento constante de la temperatura, la sola existencia de una alternancia de iluminación y oscuridad cada 12 horas puede ser suficiente para sincronizar el ritmo de emisión. Así lo indican diversos autores tales como LUTTERMOSER (1955), ASCH (1972), GLAUDEL & ETGES (1973), THERON (1975), NOJIMA & SATO (1978, 1982) y WILLIAMS, WESSELS & GILBERTSON (1983) para la emisión de Schistosoma mansoni por distintos hospedadores. La emisión de las cercarias de S. haematobium en condiciones de temperatura constante muestra también una ritmicidad diaria según MC CLELLAND (1967) y NOJIMA & SATO (1978, 1982). NOJIMA *et al.* (1980) observan el mismo efecto del fotoperíodo sobre la emisión de S. japonicum en condiciones de temperatura aproximadamente constantes (24-26°C). La sincronización de la emisión de Cercaria purpurea por el fotoperíodo es observada por REES (1948) en condiciones de temperatura aproximadamente constante (15-18°C). WAGENBACH & ALLDREDGE (1974) indican, asimismo, una periodicidad diaria en la emisión de cercarias de Plagiorchis micracanthos bajo un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a una temperatura aproximadamente constante (20-22°C). THERON (1975) muestra una sincronización del ritmo de emisión por el fotoperíodo a temperatura constante (27°C) para las cercarias de Ribeiroia marini, Apatemon sp., Stephanoprora sp., Clinostomum sp., Opisthioglyphe rastellus, Plagiorchis muris, P. cf. lacertae y P. neomydis. Últimamente, APPLETON (1983) presenta el mismo fenómeno en la emisión de Australobilharzia terri-galensis a temperatura constante (23±1°C) y MARTIN & VAZQUEZ (1984) en sus estudios experimentales sobre la emisión de una cercaria de Sanguinicola sp. también lo observan.

1.1.3.6.2.- INVERSION DEL RITMO DE EMISION POR EL FOTOPERIODO

Un gran número de autores ha demostrado experimentalmente que la inversión del fotoperíodo induce una inversión drástica en el ritmo de emisión de

cercarias de Schistosoma mansoni. Entre estos autores podemos citar a LUTTER-MOSER (1955), ASCH (1972) y GLAUDEL & EDGES (1973).

El efecto que ejerce la inversión del fotoperíodo sobre la emisión de otras especies de cercarias ha sido también estudiado, aunque no tan exhaustivamente como ha ocurrido en el caso de S. mansoni. Así, podemos indicar que GIOVANNOLA (1936 b) constata la inversión de la emisión de Cercaria purpurea. Asimismo, OLIVIER (1951) consigue invertir el ritmo de emisión de las cercarias de Schistosomatium douthitti, mediante la inversión del fotoperíodo. WAGENBACH & ALLDREDGE (1974) exponen esta misma situación referida a la emisión de cercarias de Plagiorchis micracanthos. THERON (1975) consigue invertir drásticamente el ritmo de emisión de las cercarias de Ribeiroia marini por inversión del fotoperíodo.

1.1.3.6.3.- DESINCRONIZACION DEL RITMO EN AUSENCIA DEL FOTOPERIODO

REES (1931) mantiene Lymnaea truncatula infestados por Cercaria cambrensis en oscuridad continua o bien en oscuridad continua, ocurriendo en ambos casos una desincronización del ritmo de emisión. Esta autora demuestra también posteriormente (1948) que el ritmo de emisión de Cercaria purpurae sufre una desincronización cuando los hospedadores son sometidos a oscuridad continua. VALLE, PELLEGRINO & ALVARENGA (1973) presentan una desincronización del ritmo de emisión de S. mansoni al mantener a sus hospedadores en oscuridad continua o en iluminación continua. WAGENBACH & ALLDREDGE (1974) consiguen la desincronización del ritmo de emisión de Plagiorchis micracanthos, manteniendo a sus hospedadores en iluminación continua, si bien la ritmicidad se mantiene en oscuridad continua. THERON (1975) induce la desaparición del ritmo de emisión de Ribeiroia marini en iluminación continua, aunque la oscuridad continua de emisión. NOJIMA & SATO (1978, 1982) consiguen alterar el ritmo de emisión de Schistosoma mansoni y de S. haematobium mediante la introducción de modificaciones en el fotoperíodo. WILLIAMS & GILBERTSON (1983) desincronizan el ritmo de emisión de S. mansoni en iluminación continua. Recientemente WILLIAMS, WESSELS & GILBERTSON (1984) desincronizan el ritmo de emisión de S. mansoni mediante el mantenimiento de iluminación continua.

1.1.3.6.4.- SINCRONIZACION DEL RITMO DE EMISION POR EL TERMOPERIODO EN
AUSENCIA DEL FOTOPERIODO

En ausencia del fotoperíodo, es decir, en oscuridad continua o en iluminación continua el establecimiento de un termoperíodo parece ser capaz de sincronizar el ritmo de emisión. REES (1931) indica que la ritmicidad de la emisión de Cercaria limbifera se mantiene en oscuridad continua bajo un termoperíodo natural (17-23°C), si bien durante las primeras 36 horas de oscuridad no hay emisión de cercarias. La autora presenta el mismo fenómeno en la emisión de Cercaria "Z" en oscuridad continua, si bien en este caso la ritmicidad de la emisión queda algo alterada. VALLE, PELLEGRINO & ALVARENGA (1973) demuestran que la emisión rítmica de cercarias de S. mansoni se mantiene en oscuridad continua mediante una variación nictameral de la temperatura de 5°C. WAGENBACH & ALLDREDGE (1974) constatan que la emisión de cercarias de Plagiorchis micracanthos mantiene una cierta ritmicidad en oscuridad continua bajo una fluctuación de temperatura de tan sólo 2°C, si bien los picos máximos de emisión tienen lugar antes de lo esperado. THERON (1975) constata la existencia de un pico termoperiódico en la emisión de Opisthioglyphe rastellus que es evidenciado mediante una variación nictameral de temperatura de 10°C en iluminación continua.

1.2.- CARACTERISTICAS MORFOFUNCIONALES DE LOS APARATOS REPRODUCTORES DE TREMATODOS DIGENIDOS

El estudio de las características morfológicas más generales de los aparatos reproductores masculino y femenino de los adultos de los Trematodos Digénidos ha sido objeto de atención por parte de numerosísimos autores, por cuanto que dichas características han constituido tradicionalmente, y sin menoscabo de otros hechos morfológicos propios de los vermes en cuestión, uno de los puntales sobre los que ha descansado la sistemática y taxonomía de este grupo de Platelminos (YAMAGUTI, 1958, 1971), si bien las tendencias actuales en este sentido contemplan, además, otros aspectos de los vermes, tales como las características morfológicas de los estadios larvarios, naturaleza de los ciclos evolutivos, etc. (ODENING, 1974; BAYSSADE-DUFOUR, 1979; BROOKS, O'GRADY & GLEN, 1985). Como consecuencia, existe un ingente número de trabajos en los que se hace referencia a los aparatos reproductores de los Digénidos, principalmente desde el punto de vista puramente descriptivo, por lo que una recopilación exhaustiva de los mismos excedería largamente los límites del presente escrito. En este sentido cabe destacar las grandes recopilaciones llevadas a cabo por autores como SKRJABIN (1947 - 1964), YAMAGUTI (1958, 1971), BAER & JOYEUX (1961) en el tratado de GRASSE, etc., así como las continuas revisiones de los grandes grupos de Trematodos Digénidos que han sido realizadas por incontables investigadores, cuya enumeración sería fatigosa. En estas circunstancias y dada la amplitud de la bibliografía contemporánea en la que es posible recoger datos referentes a los aparatos reproductores de los Digénidos, cabe hacer hincapié en la conveniencia de efectuar trabajos actualizados sobre pequeños grupos, reduciéndose así las omisiones frecuentes en los intentos de revisión efectuados por los sistemáticos.

Así, pues, la gran dispersión de datos referentes a aspectos morfo-anatómicos de los aparatos reproductores de Digénidos, juntamente con la total ausencia de trabajos comparativos relativos a los antedichos aspectos, configuran una compleja situación en la actualidad, principalmente en orden a la consecución de estudios orientados hacia la dilucidación de los aparatos reproductores del mencionado grupo de Platelminos, ya que resulta extremadamente laborioso establecer comparaciones individualizadas entre nuevos materiales y los ya conocidos. En muchos casos esta actividad se ve dificultada

por la inexactitud de las observaciones ya publicadas o por la ausencia de estudios pormenorizados sobre los aspectos ya mencionados.

En lo que se refiere a estudios morfofuncionales sobre los aparatos reproductores masculino y femenino de los Digénidos, es de destacar la amplia literatura existente al respecto y referida esencialmente a los procesos de espermatogénesis (GRESSON, 1965) y ovogénesis (GRESSON, 1964), así como a la fisiología de aquellas estructuras que intervienen directamente en la formación del huevo, tales como glándulas vitelógenas, ootipo y glándula de Mehlis principalmente, trabajos todos ellos recopilados por autores como ERASMUS (1972) y más recientemente por SMYTH & HALTON (1983). Ahora bien, cabe destacar la escasez de datos referentes a la secuencia cronológica funcional seguida por las distintas especies de Digénidos en lo que se refiere a las estructuras mencionadas, así como a otras asimismo integrantes de los aparatos reproductores masculino y femenino. Estos estudios se encuentran dispersos en la bibliografía y algunos autores los incluyen en los trabajos relativos a dilucidaciones experimentales de ciclos evolutivos de algunas especies, ocupándose en escasas ocasiones explícitamente de estos aspectos de los Digénidos.

Ante esta situación resulta punto menos que imposible conseguir una recopilación completa de los estudios existentes sobre morfoanatomía y morfofuncionalismo de los aparatos reproductores de los Trematodos Digénidos, aunque es abordable la tarea de destacar estos aspectos en grupos de vermes más reducidos. Así, es nuestro objetivo, en los apartados siguientes, establecer una caracterización general de los aspectos morfoanatómicos y funcionales de los aparatos reproductores de los Digénidos en general, para, posteriormente, ocuparnos de estos mismos aspectos pero referidos concretamente a individuos incluidos en la familia Brachylaimidae. Aludiremos brevemente, en este sentido, a aquellas especies sobre las que disponemos de información suficiente, sin intentar que nuestra exposición resulte exhaustiva, sino únicamente que permita encuadrar los resultados por nosotros obtenidos, en nuestros estudios sobre los citados aspectos, referidos concretamente a la especie Brachylaima ruminiae, incluida en la familia en cuestión, dentro del contexto general de conocimientos actuales sobre el tema.

1.2.1.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS APARATOS REPRODUCTORES MASCULINO Y FEMENINO DE LOS TREMATODOS DIGENIDOS

Con la importante excepción de las especies de la familia Schistosomati-
dae, los Trematodos Digénidos son organismos hermafroditas. Los sistemas re-
productores masculino y femenino se encuentran extensamente desarrollados y,
si bien presentan grandes variaciones, siguen fundamentalmente un mismo pa-
trón. Sus características generales son expuestas por autores como BAER &
JOYEUX (1961) en el tratado de GRASSE, CHENG (1973), SMYTH (1976) y SCHMIDT
& ROBERTS (1985).

1.2.1.1.- MORFOANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

1.2.1.1.1.- TESTICULOS

El aparato reproductor masculino presenta usualmente dos testículos en
la mayoría de las especies, aunque en algunos casos puede presentar uno solo
o hasta varias docenas de ellos. El tamaño de estos órganos es muy variable
según las especies y su forma externa varía también ampliamente, desde redon-
deada a totalmente dendrítica. La situación de los testículos respecto a los
restantes órganos presenta, asimismo, una gran variación dentro de las dis-
tintas especies.

1.2.1.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES

Cada testículo posee un conducto eferente y la confluencia de los mis-
mos origina el conducto deferente. Este conducto deferente se dirige hacia
el poro genital que usualmente se sitúa en un atrio genital localizado gene-
ralmente en la superficie medioventral y en situación anterior al acetábulo,
si bien esta localización es muy variable, pudiendo encontrarse a niveles
muy distintos tales como el extremo posterior del verme, en las proximidades
de la boca e incluso en la región dorsal.

El conducto deferente, antes de alcanzar el poro genital, entra generalmente en una bolsa del cirro donde se dilata para constituir una estructura denominada vesícula seminal interna. Posteriormente sufre una constricción y constituye un fino conducto eyaculador que se extiende a lo largo del resto de la bolsa del cirro, diferenciándose en su extremo distal para formar un cirro u órgano copulador masculino muscular. Este órgano está normalmente invaginado en el interior de la bolsa del cirro y puede evaginarse para transferir espermatozoides al sistema femenino. El cirro puede ser inerte o poseer espinas de distintos tamaños. El conducto eyaculador puede estar rodeado por células glandulares prostáticas y la presencia, en ocasiones, de una dilatación muscular en este punto puede constituir la denominada pars prostática.

Han sido determinadas un gran número de variaciones en la disposición de los órganos citados, así como la ausencia de algunos de ellos. La bolsa del cirro y las glándulas prostáticas pueden faltar y el conducto deferente puede dilatarse poderosamente constituyendo una vesícula seminal que comunique directamente con el poro genital o bien el conducto deferente puede constituir una vesícula seminal externa antes de entrar en la bolsa del cirro.

Para una información más profunda sobre las distintas modificaciones que las estructuras masculinas antedichas presentan en Digénidos, cabe referirse a las obras de YAMAGUTI (1971) y BROOKS, O'GRADY & GLEN (1985).

1.2.1.2.- MORFOANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

1.2.1.2.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO

El único ovario del aparato genital femenino es frecuentemente redondeado u oval, pero en ocasiones puede ser lobulado e incluso ramificado. Del ovario emerge un conducto denominado oviducto, habitualmente separado del antedicho órgano por un esfínter denominado oviscapto cuya función es regular el paso de oocitos. En este oviducto desemboca un conducto denominado canal de Laurer que comunica, por su otro extremo, con el exterior, abriéndose en un orificio situado en la región dorsal del verme, o bien es ciego en algunas ocasiones. Se abre también en el oviducto la desembocadura del receptácu-

lo seminal, estructura a modo de bolsillo que almacena espermatozoides en su interior.

La sustancia vitelina es sintetizada en las glándulas vitelógenas dispuestas generalmente en dos campos laterales del cuerpo del verme y de carácter folicular, reuniéndose los pequeños conductos foliculares en dos grandes conductos vitelinos principales o viteloductos, cuya confluencia determina la aparición de un reservorio vitelino, del cual emerge un conducto vitelino común que se abre en el oviducto.

Tras la confluencia con el conducto vitelino común, el oviducto se dilata ligeramente para constituir el ootipo, rodeado por numerosas células glandulares cuyo conjunto se denomina glándula de Mehlis, que se abren en el ootipo mediante finos conductos independientes.

El conjunto de estas estructuras, exceptuándose el ovario y con la adición del inicio del útero, recibe el nombre de oogenotopo o aparato formador de huevos.

1.2.1.2.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL

Tras el ootipo se inicia el útero que se extiende hasta el poro genital. Este conducto puede ser corto o largo y puede describir una trayectoria más o menos sinuosa. Su extremo distal puede estar modificado y presentar un fuerte engrosamiento de naturaleza muscular denominado metratermo, que ejerce las funciones de ovoyector y vagina.

1.2.1.3.- MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

1.2.1.3.1.- TESTICULOS

Son muy numerosos los autores que se han ocupado del estudio de la principal función ejercida por los testículos que es la producción de espermatozoides. Esta producción viene originada por la ocurrencia de una serie de

procesos en el interior del testículo cuyo conjunto se denomina espermatogénesis. En general, la espermatogénesis sigue un patrón bien establecido en los Trematodos Digénidos, iniciándose con la división mitótica de un espermatogonio primario, el cual origina dos espermatogonios secundarios que se dividen a su vez para originar cuatro espermatogonios terciarios. Tanto los espermatogonios primarios, como los secundarios y los terciarios, presentan unas dimensiones y unas características morfológicas muy similares, tratándose de células redondeadas con un núcleo muy evidente en el que destaca la presencia de uno o dos prominentes nucleolos acompañados por gránulos de cromatina irregularmente dispersos por el nucleoplasma. Los espermatogonios terciarios no llegan a separarse totalmente en muchas especies y presentan conexiones citoplasmáticas que los mantienen unidos, si bien en muchas ocasiones son casi imperceptibles.

A partir de los espermatogonios terciarios, y por división mitótica, se originan rosetas de ocho espermatocitos primarios, cuyo aspecto es ya muy distinto a las células espermatogónicas. Se trata, pues, de células de mayor tamaño, decididamente piriformes, con un extremo redondeado y el opuesto alargado para constituir una conexión citoplasmática con las células vecinas. El núcleo está situado en el extremo redondeado de la célula y su aspecto varía enormemente pues estas células sufren la primera división meiótica y originan grupos de dieciseis células unidas entre sí formando una roseta, que se denominan espermatocitos secundarios. Su tamaño es inferior al de los espermatocitos primarios y su núcleo es haploide. Estos espermatocitos secundarios sufren la segunda división mitótica de la meiosis y originan rosetas de treinta y dos espermatidas cuyos citoplasmas se mantienen parcialmente fusionados en muchas especies. A partir de estas espermatidas haploides se originarán los espermatozoides por un proceso denominado espermiogénesis, que incluye una elongación y condensación progresiva del núcleo de las mismas. GRESSON (1965) lleva a cabo una revisión de la literatura referente a estos procesos y correspondiente a distintas especies de Digénidos. Anteriormente, podemos referirnos a las revisiones de FRANZEN (1956) y HENDELBERG (1962).

Existen pocos datos en la bibliografía acerca de la secuencia cronológica de la funcionalidad de los testículos en las distintas especies de Digénidos, ya que los estudios sobre espermatogénesis son usualmente realizados sobre individuos grávidos. Es frecuente encontrar, sin embargo, alusiones al

fenómeno denominado protandria que, según BAER & JOYEUX (1961), consiste en que la entrada en funcionamiento del aparato reproductor masculino es anterior a la del femenino. Este mecanismo parece estar dirigido a evitar la autofecundación y puede ser considerado típico de los Turbellarios.

1.2.1.3.2.- CONDUCTOS TERMINALES

La función primordial de los conductos eferentes y del conducto deferente parece ser la conducción de espermatozoides hacia el poro genital. La vesícula seminal, tanto externa como interna, actúa como un reservorio de espermatozoides, consiguiendo la acumulación de los mismos en grandes cantidades. La posible actividad fisiológica de las glándulas que rodean al conducto eyaculador permanece, por ahora, desconocida (SMYTH & HALTON, 1983).

1.2.1.4.- MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

1.2.1.4.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO

GRESSON (1964) lleva a cabo una excelente revisión de los datos bibliográficos existentes hasta el momento, relativos a los procesos de oogénesis que tienen lugar en el ovario de Digénidos hermafroditas. Estos procesos siguen un patrón considerablemente constante en las especies estudiadas, iniciándose con divisiones mitóticas de los oogonios que se multiplican, manteniendo su forma redondeada y un gran núcleo en el que destacan grandes acúmulos de cromatina en reposo. La división reduccional a meiosis se inicia en los oocitos primarios, células en las que la relación núcleo/citoplasma es inferior a la propia de los oogonios y que presentan en su núcleo uno o dos nucleolos bien diferenciados. Estos oocitos primarios inician la división de maduración y se detienen en el estado de paquiteno de la profase inicial. Posteriormente, incrementan su tamaño, disminuye la relación núcleo/citoplasma y el núcleo presenta material cromatínico difuso. Finalmente adquieren el estadio maduro constituyendo las células más grandes del ovario, de forma poligonal, y en ellos se observa un núcleo con uno o dos nucleolos bien

patentes acompañados por material cromatínico difuso o en finos gránulos. En su citoplasma se detecta grandes gránulos de fosfolípidos y lípidos neutros, así como pequeños gránulos de lípidos neutros y principalmente acúmulos de material, cuya naturaleza nucleolar está en discusión (GUPTA et al., 1984).

Estos autores se ocupan de la secuencia cronológica de funcionalidad del ovario en la especie Paramphistomum cervi, pero son prácticamente inexistentes los estudios en este sentido.

El morfofuncionalismo del oogenotopo o aparato productor de huevos ha merecido la atención de numerosos autores, ya que muchos de ellos opinan que la fecundación tiene lugar en el inicio del útero, en el oviducto o en el ootipo (41, 5 y 4 especies según GRESSON, 1964), y es aquí donde tienen lugar los complicados y hasta ahora no totalmente conocidos procesos que culminan con la formación del huevo.

Estos procesos se inician con la entrada de espermatozoides en el aparato reproductor femenino, que puede tener lugar vía poro genital o vía canal de Laurer (ERASMUS, 1972). Los oocitos maduros son liberados por el ovario y progresan por el oviducto recibiendo una descarga de espermatozoides y fluido en la desembocadura del receptáculo seminal. El movimiento del oocito y de los espermatozoides continúa y en la confluencia del oviducto con el conducto vitelino común son liberadas células vitelinas procedentes del reservorio vitelino, que liberan sustancia vitelina en el ootipo. Esta secuencia es indicada por GUILDFORD (1961) para Halipegus eccentricus, pero es bastante representativa de estos procesos en los Digénidos. El lugar exacto en que ocurre la penetración del oocito por el espermatozoide está en discusión (GRESSON, 1964) y se indica que puede tener lugar en algún punto del oviducto o en el primer tramo uterino.

La función del ootipo, glándula de Mehlis y glándulas vitelógenas en la formación de la cubierta del huevo es un tema muy estudiado y sobre el que no parece existir, por el momento, conclusiones definitivas. Las células de la glándula de Mehlis secretan productos que son vertidos en la luz del ootipo y su función, según distintos autores, podría ser lubricatoria (KOURI & NAUSS, 1938), de activación de los espermatozoides (STEPHENSON, 1947 a), de activación de la eliminación de glóbulos vitelinos por las células vitelinas (UJIIE, 1936) y de control o iniciación de los procesos de reducción de qui-

nonas (UJIIE, loc. cit.) DAWES (1940) sugiere que la secreción de la glándula de Mehlis puede formar una membrana sobre cuya superficie interior tendría lugar la coalescencia de los glóbulos vitelinos, aunque esta teoría no ha podido ser afirmada por estudios ultraestructurales recientes (BURTON, 1967). SMYTH & HALTON (1983) efectúan una revisión de la bibliografía existente a este respecto.

1.2.1.4.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL

La función del útero no ha sido extensivamente estudiada, aunque COIL (1965, 1966) distingue en los Notocotylidos un tramo inicial con un borde en cepillo en la superficie interna de su pared, una región central con células glandulares y una región distal aparentemente no glandular. Su actividad fisiológica ha sido mostrada por HALTON (1967).

El metratermo ha sido poco estudiado en su fisiología y, cuando está bien diferenciado, se compone de capas musculares, de una lámina basal muy patente, estando presentes células de apariencia glandular en su entorno (BAER & JOYEUX, 1961).

1.2.2.- CARACTERES MORFOANATOMICOS Y MORFOFUNCIONALES DE LOS APARATOS REPRODUCTORES DE ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHYLAIMIDAE

El elevado número de especies de Digénidos conocidas en la familia Brachylaimidae dificulta notablemente la realización de una recopilación ni tan sólo aproximada de las mismas, por lo que nos limitaremos aquí a citar brevemente aquellas especies de las cuales conocemos sus características morfoanatómicas referentes a sus aparatos reproductores, sin pretender lograr una enumeración exhaustiva, aunque sí amplia, de las mismas, en orden a proporcionar una visión de conjunto de la situación actual. Teniendo en cuenta el confucionismo reinante a nivel taxonómico en la citada familia (la revisión sistemática de la familia Brachylaimidae se halla actualmente en curso de realización por M.A. VALERO de Valencia), mantenemos la nomenclatura original de las distintas especies según la cual los autores correspondientes las citan.

Las especies de Brachyláimidos se caracterizan por presentar las gónadas siempre en la región posterior del cuerpo, ostentando el ovario típicamente una posición intertesticular, y las glándulas vitelógenas dispuestas en dos campos laterales, de extensión variable según especies. El poro genital se halla en la región gonádica.

1.2.2.1.- APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

1.2.2.1.1.- TESTICULOS

GUBERLET (1923), en su descripción de Harmostomum (Postharmostomum) hawaiiensis, destaca que esta especie posee el testículo posterior claramente lobulado. ROBINSON (1949) describe la presencia de indentaciones en los bordes de los dos testículos de Postharmostomum helicis y así lo indica también ULMER (1951) en sus estudios sobre esta misma especie. GROSCHAFT et al. (1969), en su descripción de Postharmostomum gallinum, indican la presencia de testículos con bordes irregulares y lo mismo ocurre con la descripción de BARUS et al. (1969) para esta misma especie. KAMIYA & MACHIDA (1977) describen testículos de borde irregular en Brachylaima ishigakiense.

En las restantes especies los testículos muestran una forma ovoide, con bordes irregulares.

1.2.2.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES

JOHNSTON (1912) describe la especie Harmostomum dasyuri, indicando que los conductos eferentes emergen del centro de la superficie anterior de cada testículo y el conducto posterior rodea el borde lateral del ovario y del primer testículo, , presentándose la confluencia con el conducto deferente anterior justo cuando éste emerge del testículo anterior. El conducto resultante constituye rápidamente una vesícula seminal tubular enrollada de considerable longitud, no incluida en la bolsa del cirro sino libre en el parénquima. La bolsa del cirro, muscular y moderadamente desarrollada rodea

al cirro y al conducto eyaculador y no se extiende posteriormente más allá de la unión del conducto eyaculador con la vesícula seminal. Las células prostáticas se encuentran libres en el parénquima. El poro genital se halla en la superficie ventral, en la zona central y enfrente del testículo anterior. Este mismo autor, en su descripción de Harmostomum simile, indica la presencia de un cirro muscular bien desarrollado y de una bolsa del cirro poco desarrollada. El poro genital se sitúa cercano al borde anterior del primer testículo.

GUBERLET (1928) indica, en Harmostomum (Postharmostomum) hawaiiensis, la existencia de una bolsa del cirro en la región central del verme e inmediatamente anterior y ligeramente a la derecha del primer testículo. Este es un órgano muscular que contiene un largo cirro o conducto eyaculador cubierto por células glandulares prostáticas. Existe una vesícula seminal por encima y a la derecha de la bolsa del cirro, constituida por un ensanchamiento del conducto deferente y que continúa hasta el final del cirro o conducto eyaculador. El poro genital se abre en la línea media del verme y a nivel del borde anterior del primer testículo. GROSCHAFT, VALLE & HERNANDEZ (1969) describen asimismo esta especie bajo el binomio Postharmostomum gallinum que los autores consideran sinónimo.

WERBY (1928) describe en la especie Harmostomum (Harmostomum) pellucidum la existencia de dos conductos eferentes que emergen del lado izquierdo de sus respectivos testículos, recorriendo, el conducto del testículo posterior, el borde anterior del primer testículo, para confluir con el conducto eferente anterior al nivel anterior del primer testículo, constituyendo, así, el conducto deferente que entra en la vesícula seminal. Esta es un órgano sacciforme grande, recurvado y situado a nivel del borde anterior y a la izquierda del primer testículo. Las glándulas prostáticas, libres en el parénquima, rodean la parte del conducto eyaculador que conecta la vesícula seminal y la bolsa del cirro. Esta bolsa, en forma de pera, contiene el conducto eyaculador estrecho y un pene incurvado, estando situada anteriormente al poro genital y desembocando su extremo más estrecho en el poro genital, localizado en el borde lateral derecho del primer testículo.

SINIT SIN (1931) describe varias especies, entre las que se encuentra Harmostomum migrans, en la que indica la existencia de una vesícula seminal

curvada en espiral. En Panopistus magnus, P. oviformis y P. pricei destaca, como carácter genérico, la localización del poro genital por debajo del testículo posterior. HOLLOWAY & ETGES (1967) describen, asimismo, P. pricei, indicando la situación del poro genital, próximo a la bifurcación de la vesícula excretora y aluden a un atrio genital presente. Los conductos eferentes confluyen entre el ovario y el testículo posterior y el deferente pasa por detrás del poro genital. Asimismo, VAUCHER & DURETTE-DESSET (1978) citan en P. pricei esta situación del poro genital y la ausencia de bolsa del cirro, así como la presencia de vesícula seminal.

BAER (1932) describe la especie Ityogonimus lorum. En ella los conductos eferentes se reúnen constituyendo una vesícula seminal curvada sobre sí misma que desemboca en la bolsa del cirro, de paredes muy musculosas. El cirro es grande, inerme y bulboso, frecuentemente evaginado formando una protuberancia muy visible. No hay atrio genital común.

DAVIES (1932) presenta más extensamente las características propias de Ityogonimus lorum. El conducto eferente anterior se origina en el margen posterolateral del primer testículo y el conducto eferente posterior lo hace en el borde anterior del testículo posterior. Ambos conductos confluyen por debajo del ovario, formando una vesícula seminal replegada en espiral y de diámetro similar al del útero que continuará posteriormente hasta el poro genital situado en las proximidades del testículo posterior. La vesícula seminal comunica, mediante la pars prostática, rodeada por pequeñas glándulas prostáticas y que finaliza con un brusco estrechamiento, con el cirro cuya pared es fuertemente muscular y se abre al exterior en la apertura genital, formando una ligera protusión.

JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1934) describen la especie Brachylaemus fuscatus en la que indican que el conducto deferente, antes de entrar en la bolsa del cirro, se ensancha constituyendo una vesícula seminal alargada que describe un bucle y se rodea de células, constituyendo una pars prostática. El poro genital se sitúa entre el borde anterior y la región central del primer testículo.

MC INTOSH (1934) estudia la especie Scaphiostomum pancreaticum, en la que indica la presencia de una vesícula seminal replegada en espiral enfrente del poro genital, situado a nivel del margen anterior del primer testículo.

lo, y de un cirro corto. Este mismo autor describe otra especie, Postharmostomum laruei, para la que indica las mismas características en sus conductos terminales. Posteriormente, ROBINSON (1949) propone la nueva combinación Postharmostomum helicis para la especie P. laruei e indica algunas características tales como que el conducto eferente posterior emerge del centro de la superficie anterior del testículo posterior y se dirige a la región posterior o dorsal al poro genital tocando casi la superficie media del ovario en su trayectoria. El conducto eferente emerge de la región dorsal de la superficie anteromedial del testículo anterior y se dirige al plano medio del verme donde confluye con el eferente posterior, constituyendo el conducto deferente. Su porción terminal es estrecha y musculosa, estando rodeada por glándulas prostáticas. La bolsa del cirro alberga un cirro corto e inerte. ULMER (1951) se ocupa también de esta especie pero difiere del autor anterior en la existencia de la bolsa del cirro, sobre la que ULMER considera ausente.

YAMAGUTI (1935) describe la especie Harmostomum syrmatici y en la que observa que el conducto deferente describe convoluciones y posee una pared muscular en su extremo distal, estando rodeada por un pequeño número de células, antes de entrar en la bolsa del cirro. El cirro, alargado en su extremo distal presenta fibras musculares longitudinales internas y circulares externas. El poro genital común se abre en la línea media del verme y a nivel del borde anterior del primer testículo.

KRULL (1935 a), en su descripción de la especie Glaphyrostomum mcintoshi, indica que el poro genital se abre ventralmente a nivel del ovario.

KRULL (1935 b) establece la identidad de Brachylaemus virginiana y describe detalladamente la metacercarias de esta especie, indicando que los conductos eferentes se unen cerca del testículo anterior para formar el conducto deferente que se extiende anteriormente, describiendo algunas espirales y posteriormente tras ellas, para finalizar en un poro genital situado a nivel de la región media o del borde anterior del primer testículo.

BALOZET (1937) reproduce la descripción original de Brachylaemus suis que el mismo había efectuado anteriormente. El poro genital se sitúa en el tercio posterior del cuerpo, a nivel del borde anterior del primer testículo. El cirro se aloja en una bolsa ovoide sobre la cual se encuentra una vesícula seminal que describe una espiral completa. La vesícula recoge el canal de-

ferente, muy sinuoso, situado a la derecha de la bolsa del cirro. La región terminal de la vesícula seminal y la bolsa del cirro están rodeadas por células glandulares (pars prostática).

MASON (1953) describe la especie Brachylaima dolichodirus, en la que el poro genital se sitúa en la región anterior de la mitad posterior del verme. El conducto eferente posterior emerge ventralmente del borde anterior del testículo posterior y asciende a lo largo del ovario, dirigiéndose al lado medio del testículo anterior donde confluye con el eferente anterior originando el conducto deferente. Este es ligeramente sinuoso, dorsal en su posición y asciende hasta sobrepasar el poro genital, curvándose sobre sí mismo para dirigirse hacia la región media del verme, donde origina una vesícula seminal, que finaliza en el conducto eyaculador, que conduce al cirro. Este es glandular e inerte. La bolsa del cirro es bien diferenciable.

CHATTERJI (1957) describe la especie Brachylaemus tisa y destaca que la bolsa del cirro no es visible. La vesícula seminal es voluminosa, situándose enfrente del testículo anterior. El cirro es largo, inerte y protusible. El poro genital está en la línea media y a nivel del testículo anterior.

BIOCCA & FERRETTI (1958) describen la especie Dollfusinus frontalis, en la que indican que los conductos eferentes confluyen en las cercanías del margen posterior del segundo testículo, originando un conducto deferente común provisto de una robusta bolsa del cirro. El cirro es voluminoso y protrusible, situándose la apertura genital en el extremo posterior del cuerpo. Más recientemente, MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a) describen detalladamente esta especie, e indican que el conducto eferente correspondiente al primer testículo emerge de su margen posterior y emprende una trayectoria descendente, y el correspondiente al segundo testículo emerge de su margen anterior y es muy corto. Ambos conductos confluyen a nivel del margen anterior del segundo testículo para constituir un conducto deferente largo y dilatado que emprende una trayectoria descendente. Su última porción se estrecha y aparece rodeada por glándulas, entrando seguidamente en una bolsa pequeña y de paredes gruesas que se contrae cuando conecta con la bolsa del cirro, la cual es corta, de paredes gruesas. Esta bolsa contiene un cirro muscular, inerte, corto, ancho y protrusible, y desemboca en un atrio genital subterminal y ventral. Estos autores no detectan vesícula seminal interna, ni pars prostática, ni células prostáticas internas. Tanto la bolsa del cirro como la bolsa anterior están rodeadas por glándulas.

NARDI (1958), en su descripción de Postharmostomum commutatum, indica únicamente la presencia de un atrio genital evidente situado en el eje medio e inmediatamente por encima del testículo anterior, distinguiéndose una voluminosa bolsa del cirro y la apertura de las vías genitales masculina y femenina. DEIANA & ARRU (1963) indican las mismas características para esta especie. TRAVASSOS et al. (1969), aludiendo a esta especie, indican que la bolsa del cirro está poco desarrollada, que la vesícula seminal es de paredes delgadas y curso irregular y que el cirro es voluminoso y evaginable.

KRUIDENIER & GALLICCHIO (1959) describen la especie Brachylaime microti, en la que el poro genital se abre en la superficie ventral posteriormente al borde anterior del testículo anterior y en el eje medio del verme. El conducto eferente posterior nace en el margen anterior derecho del testículo posterior y recorre dorsalmente el ovario y el borde derecho del testículo anterior. El conducto eferente anterior se origina en el margen derecho anterior del primer testículo y rápidamente confluye con el eferente posterior constituyendo el conducto deferente. Este conduce directamente a la vesícula seminal que describe un lazo y entra en la bolsa del cirro como un conducto eyaculador, no observándose un cirro protrusible. Están presentes glándulas prostáticas.

Los mismos autores redescubren la especie Brachylaime rauschi y observan que el conducto eferente posterior nace en el borde anterior del segundo testículo en el eje medio izquierda y recorre el ovario hacia la derecha alcanzando el margen derecho del testículo anterior donde confluye con el conducto eferente anterior que nace en el borde anterior del primer testículo, formando el conducto deferente. Este describe un círculo a nivel del testículo anterior y se ensancha y recurva formando una vesícula seminal relativamente estrecha. Esta vesícula termina en la bolsa del cirro, que alberga un cirro no espinoso. No se observa glándulas prostáticas. El poro genital se abre ventralmente cerca del borde derecho del verme.

NASIR & RODRIGUEZ (1966) describen la especie Brachylaima degiustii en la que el poro genital es pretesticular, ventral y submediano. La bolsa del cirro incluye un conducto eyaculador, estando ausente las glándulas prostáticas y el cirro. La vesícula seminal, considerablemente dilatada, se estrecha antes de iniciar la bolsa del cirro.

UBELAKER & DAILEY (1966) describen la especie Brachylaima chiapensis, en la que encuentran una bolsa del cirro muscular que contiene el conducto eyaculador. Las glándulas prostáticas, bien desarrolladas, son externas a la bolsa del cirro. La vesícula seminal, posterior a la bolsa del cirro, recibe un conducto deferente que en el margen anterior del ovario se divide en dos conductos eferentes.

LEWIS (1969) redescrive la especie Brachylaimus oesophagei, indicando que los poros masculino y femenino se abren conjuntamente en un atrio genital sobre la superficie ventral. El largo conducto eferente posterior nace en la superficie anteroventral del testículo anterior y el conducto eferente anterior es corto y emerge de la cara anterolateral del primer testículo. El conducto deferente recorre el testículo anterior, gira hacia la derecha y después hacia la izquierda para continuar con la vesícula seminal que a su vez origina la pars prostática, situadas ambas fuera de la bolsa del cirro. Esta es pequeña y oval, conteniendo un conducto eyaculador y el cirro muscular e inerte.

TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN (1969) describen la especie Brachylaemus (Brachylaemus) advena, en la que el poro genital se sitúa en el límite anterior del primer testículo. La bolsa del cirro es postecuatorial, intracecal y pretesticular y contiene un cirro y zona prostática. La vesícula seminal es externa y es sinuosa. Estos mismos autores redescriben Brachylaemus (Centrodos) centrodes con las características propias del género, indicando la presencia de una vesícula seminal externa, y establecen un nuevo subgénero, Brachylaemus (Maxtrema), con una nueva combinación, Brachylaemus (Maxtrema) marsupium, en la que el cirro carece espinas. Sobre la especie Brachylaemus (Mazzantia) mazzantii, destacan la presencia de una bolsa del cirro rudimentaria, hecho corroborado por GOMES & PINTO (1978). Los autores se ocupan también de Glaphyrostomum adhaereus, cuyo poro genital se sitúa en la zona del ovario, con un cirro constituido por un bulbo en forma de pera invertida y con una vesícula seminal sinuosa. Glaphyrostomum propinguum presenta el poro genital algo anterior respecto de G. adhaereus. Para Rallitrema mordeus indican la situación del poro genital en la región ovárica. Cesartrema pintoii presenta el poro genital en el límite anterior del primer testículo y la bolsa del cirro bien conformada, conteniendo únicamente un cirro no espinoso. La vesícula seminal es extrabursal. Scaphiostomum illatabile presenta el poro genital delante del testículo anterior.

CABALLERO DELOYA (1970) describe la especie Brachylaemus (Brachylaemus) bravoae, en la que el poro genital se sitúa a nivel medio o del borde anterior del primer testículo. Los conductos eferentes se unen en la parte anterior del primer testículo, formando una vesícula seminal media que continúa en un conducto eyaculador cuya primera región está fuera de la bolsa del cirro, en tanto que la segunda está en su interior y termina en el cirro.

BAER (1971) describe la especie Brachylaemus eburneensis, indicando únicamente que el poro genital se encuentra a nivel del testículo anterior y que está presente una bolsa del cirro.

FISCHTAL & KUNTZ (1974) describen la especie Brachylaima (Brachylaima) sabahense, en la que observan una vesícula seminal externa curvada en espiral y anterior al primer testículo, y una pars prostatica corta rodeada por pocas células, así como una bolsa del cirro muscular situada en la zona media o anterior al primer testículo o bien enteramente pretesticular, conteniendo un cirro muscular e inerte. El poro genital es ventral respecto a la bolsa del cirro.

PEISLEY & HOWELL (1975) propone el binomio Brachylaime antechini para una especie en la que el poro genital se abre en el margen anterior del primer testículo. La vesícula seminal asciende desde este nivel, se curva y produce finalmente un cirro ebaginable. La bolsa del cirro es pequeña y ovoide. Las células prostáticas rodean la porción próxima de la vesícula seminal.

FISCHTAL & KUNTZ (1976) describen la especie Glaphyrostomum taiwanense, en la que los conductos eferentes emergen del borde anterior del segundo testículo y del borde posterior del primer testículo. La vesícula seminal es externa, curvada y situada a la derecha o anteriormente al primer testículo. El conducto eyaculador es muscular, tubular con un corto recorrido para ensancharse posteriormente. El conducto prostático es estrecho, de paredes delgadas y rodeado por las células prostáticas y entra un poco en la bolsa del cirro. Esta se inicia a nivel del ovario y termina a nivel del testículo posterior. El cirro es espinoso y el poro genital se sitúa a nivel del testículo posterior.

KAMIYA & MACHIDA (1977) describen la especie Brachylaima ishigakiense, en la que los conductos eferentes confluyen anteriormente al primer testículo, formando una vesícula seminal tubular que se curva ante el testículo an-

terior y conecta con la pars prostatica situada anterosiniestramente a la bolsa del cirro. Las glándulas prostáticas están bien desarrolladas. El conducto eyaculador presenta dos partes, una próxima situada fuera de la bolsa del cirro y una distal incluida en la bolsa. Esta es oval y bien desarrollada. El cirro es inerme y el poro genital se sitúa a nivel del margen anterior del primer testículo.

VAUCHER & DURETTE-DESSET (1978) citan la especie Entosiphonus thompsoni a la que ya aludió SINITSIN (1931) y en ella indican la ausencia de bolsa del cirro y la presencia de un profundo atrio genital, así como la situación del poro genital a nivel del borde anterior del testículo anterior.

TURNER & MC KEEVER (1980) describen la especie Ityogonimus scalopi, en la que los conductos eferentes constituyen una vesícula seminal alargada y sinuosa cuyo extremo próximo se encuentra a nivel ovárico y su extremo distal comunica con la bolsa del cirro vía pars prostatica. La bolsa del cirro tiene paredes gruesas y el cirro es pequeño y muscular.

MAS-COMA, ESTEBAN & VALERO (en prensa) describen la especie Scaphiostomum palearcticum, en la que el poro genital, ventral, se abre entre el nivel medio del primer testículo y el margen anterior del mismo. Los conductos eferentes forman un conducto deferente largo, dilatado y curvado que forma una pequeña vesícula seminal externa antes de introducirse en la bolsa del cirro, la cual contiene un recurvado conducto que forma un cirro inerme en su extremo distal. Las glándulas prostáticas están representadas únicamente por un pequeño número de células prostáticas.

MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa b) describen la especie Pseudoleucochloridium pericardicum en la que los conductos eferentes nacen de cada testículo, originándose el anterior en el margen posterior del primer testículo y el posterior en el margen anterior del segundo testículo. Ambos conductos se reúnen, a un nivel ovárico, para formar el conducto deferente, el cual describe una espiral e inicia un recorrido hacia abajo. La última porción del mismo presenta paredes gruesas, está rodeado por glándulas y entra en una bolsa, la cual se halla también rodeada por glándulas. Seguidamente, se estrecha y contacta con la bolsa del cirro, que contiene un cirro protrusible e inerme, y que está rodeada también por glándulas, confluyendo finalmente con el metratermo terminal en el atrio genital. No se observa vesícula seminal in-

terna, ni pars prostatica, ni células glandulares prostáticas. El poro genital se abre en la cara ventral y en la línea media del cuerpo a un nivel postgonádico, mas o menos a mitad de camino entre el testículo posterior y la vesícula excretora.

De este breve repaso de los trabajos publicados sobre el aparato genital masculino en representantes de la familia Brachylaimidae, cabe extraer la importante conclusión de que nos encontramos muy lejos aún de conocer con exactitud la constitución detallada de este aparato en los Digénidos en cuestión. Los contrasentidos, los errores de interpretación y de nomenclatura (se dan distintos nombre a una misma estructura en unas ocasiones, y en otras distintas estructuras reciben el mismo nombre) y la en general evidente insuficiencia e incluso a veces total ausencia de datos son hechos claros que no hacen sino emascarar la naturaleza real de dicho aparato en los Brachyláimidos. Es indudable que puede haber modificaciones del aparato masculino dentro de la misma familia, pero si en realidad existen ello resulta por el momento difícil de esclarecer con la bibliografía actualmente disponible.

1.2.2.2.- APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

1.2.2.2.1.- OVARIO Y OOGENOTOPO

JOHNSTON (1912) indica, en Harmostomum dasyuri, que el oviducto emerge de la región ventral media del ovario y se dirige hacia su borde posterior donde se sitúa el ootipo, y justo enfrente se inicia el canal de Laurer, que se curva hacia la superficie dorsal del verme, donde se abre al exterior. No hay receptáculo seminal. Las glándulas que rodean al ootipo no están bien diferenciadas. El reservorio vitelino se encuentra cercano al ootipo. El útero constituye un receptáculo seminal uterino en su inicio. Este autor destaca también la presencia de canal de Laurer y la ausencia de receptáculo seminal en esta especie.

WERBY (1928), en Harmostomum (Harmostomum) pellucidum, indica que la glándula de Mehlis se sitúa al lado del ovario y el reservorio vitelino por detrás de éste. No hay receptáculo seminal. El canal de Laurer se origina

justamente después del ootipo y desemboca dorsalmente. A la derecha del ovario está el ootipo del que emerge el útero.

SINITZIN (1931) indica en Harmostomum migrans la presencia de un reservorio vitelino y una cámara de fertilización dilatada y oval y poco muscular. El autor indica, para la especie Ectosiphonus ovatus, que la cámara de fertilización y el canal de Laurer están bien desarrollados. En el nuevo binomio Panopistus pricei indica que la cámara de fertilización tiene forma de corazón y posee una fina pared muscular. HOLLOWAY & ETGES (1967) indican, en P. pricei, que el ootipo y la glándula de Mehlis se encuentran entre el ovario y el testículo posterior. Los viteloductos confluyen anteriormente al testículo posterior y el viteloducto común se dirige al ootipo.

BAER (1932), en su estudio de Ityogonimus lorum, indica que presenta un corto canal de Laurer y un receptáculo seminal bastante grande. Los viteloductos confluyen en un gran reservorio vitelino que desemboca en el oviducto, éste rodeado por la glándula de Mehlis.

DAVIES (1932) describe, en Ityogonimus lorum, la presencia de un reservorio vitelino del que emerge un conducto vitelino común que discurre dorsalmente y desemboca en la región distal del oviducto. El canal de Laurer sólo es aparente en un espécimen (nota del autor) y se abre en la región dorsal del oviducto un poco antes que el conducto vitelino común. Posteriormente desemboca en la región dorsal del verme y en su eje medio. No hay receptáculo seminal, indica este autor, aunque BAER (loc. cit.) lo observa y de tamaño bastante grande.

JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1934) destacan, en Brachylaemus fuscatus, que el ootipo posee un canal aferente proveniente del ovario que presenta una ramificación constituida probablemente por el canal de Laurer. El ootipo tiene forma alargada y los autores sostienen que en visión frontal puede confundirse con un receptáculo seminal, remarcando que según su opinión éste está siempre ausente en Brachylaemus. El reservorio se encuentra ventralmente respecto al ootipo.

MC INTOSH (1934), en su descripción de Scaphiostomum pancreaticum, indica que el oviducto emerge de la parte posterior del ovario y que el ootipo, glándula de Mehlis y reservorio vitelino son inmediatamente posteriores al ovario. El receptáculo terminal es antero-lateral respecto al testículo posterior y el canal de Laurer es lateral y dorsal. Acerca de Postharmostomum

laruei indica que el ovario nace en el borde medio del ovario y que el ootipo, glándula de Mehlis y reservorio vitelino se encuentran entre la región media del ovario y el borde anterior del testículo posterior. No se observa cámara de fecundación ni canal de Laurer. ROBINSON (1949) denomina Postharmostomum helicis a esta especie e indica que el reservorio vitelino se sitúa a nivel del borde posterior del ovario y de él emerge un conducto vitelino común que se dirige anterior y ventralmente hacia el oviducto. El oviducto emerge de la superficie media del ovario vía cámara de fecundación y se curva dorso ventralmente, confluyendo aquí con el canal de Laurer y posteriormente con el conducto vitelino común, constituyendo el ootipo. El canal de Laurer se abre dorsalmente al exterior, a nivel del extremo posterior del testículo anterior. ULMER (1951) indica sobre esta especie que no observa cámara de fecundación ni canal de Laurer.

YAMAGUTI (1935) describe Harmostomum syrmatisci e indica que el oviducto emerge del lado izquierdo del ovario y, tras la confluencia con el canal de Laurer, comunica al reservorio vitelino común en forma de ancla situado anterolateralmente al testículo posterior, para girar después hacia abajo y nuevamente hacia arriba pasando cerca del borde izquierdo del ovario. El canal de Laurer, tras su confluencia con el oviducto se dirige posteriormente y gira sobre si mismo a nivel del reservorio vitelino, donde se dilata para abrirse dorsalmente al exterior a nivel del origen del oviducto.

KRULL (1935 a) en Glaphyrostomum mcintoshi indica que el canal de Laurer está presente y se abre dorsalmente a nivel medio del ovario. Este mismo autor describe la metacercaria de Brachylaima virginiana y destaca la presencia de un canal de Laurer largo que se abre distalmente en la superficie dorsal a nivel del ovario, en tanto que en su extremo proximal se une al oviducto. Tras esta confluencia, el oviducto emprende un recorrido ascendente y se une al viteloducto común, formando después el ootipo. La glándula de Mehlis está bien desarrollada.

MC INTOSH (1937) indica en Postharmostomum noveboracensis, la presencia de glándula de Mehlis y cámara de fertilización en situación ventral respecto al ovario. El canal de Laurer se abre dorsalmente a nivel del testículo posterior. El reservorio vitelino se sitúa también ventralmente respecto al ovario.

BALOZET (1937) indica, en Brachylaima suis, la presencia de un reservorio vitelino situado ventralmente en la región ovárica, del que emerge un viteloducto común que se abre en el oviducto. En situación dorsal respecto al oviducto se encuentra el ootipo. Entre el ovario y el testículo posterior se encuentra el canal de Laurer que se abre en la región dorsal a nivel del extremo anterior del testículo posterior, desembocando su extremo anterior en el ootipo.

MASON (1953) supone, en Brachylaima dolichodirus, una situación típicamente dorsal respecto al reservorio vitelino, del oviducto y del ootipo. El canal de Laurer está presente. El reservorio vitelino está situado a la derecha del ovario y anterior al testículo posterior.

CHATTERJI (1957) indica, en Brachylaemus tisa, la no detección del receptáculo seminal ni del canal de Laurer y de la glándula de Mehlis. El reservorio vitelino se sitúa inmediatamente posterior al ovario.

BIOCCA & FERRETTI (1958) describen la especie Dollfusinus frontalis e indican la presencia de un engrosamiento redondeado o piriforme en la confluencia de los viteloductos. El oviducto emerge del ovario y se dirige hacia el centro del cuerpo determinando un ootipo redondeado situado en la parte central del cuerpo y algo posterior y dorsal respecto al ovario. El canal de Laurer, tras un recorrido casi recto, desemboca dorsalmente hacia la extremidad posterior del cuerpo. MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a) describen recientemente esta especie en la que aprecian un corto oviducto que nace en el margen izquierdo del ovario. En su tramo inicial desemboca el conducto proveniente del receptáculo seminal, relativamente grande, de cuyo polo opuesto emerge el canal de Laurer, fino conducto que se dirige hacia la superficie dorsal. El oviducto seguidamente confluye con el conducto vitelino común que emerge de un reservorio vitelino pequeño y triangular, situado detrás del ovario, aproximadamente en el eje medio del cuerpo, en el que desembocan los dos viteloductos originados en los folículos vitelinos posteriores. Posteriormente, el oviducto se ensancha ligeramente para formar el ootipo rodeado por la glándula de Mehlis.

NARDI (1958), en su descripción de Postharmostomum commutatum, no cita el reservorio vitelino, pero indica que los viteloductos confluyen en el eje medio y a la altura del ovario. El receptáculo seminal, la glándula de Mehlis y el canal de Laurer no son diferenciables. TRAVASSOS et al. (1969) indican

la presencia de una glándula de Mehlis muy voluminosa, circular, así como la presencia de canal de Laurer en esta especie.

KRUIDENIER & GALLICCHIO (1959) indican, para Brachylaime microti, que el oviducto se origina en la superficie dorsal del ovario y recibe al canal de Laurer y al conducto vitelino común, dirigiéndose después hacia el margen posterior izquierdo del ovario donde origina el ootipo rodeado por la glándula de Mehlis. El reservorio vitelino tiene forma de cono y se sitúa dorsalmente y en el margen izquierdo del ovario. El canal de Laurer se dirige hacia un receptáculo seminal situado dorsalmente y en el margen izquierdo del ovario, y describe varias curvas cerca del borde del testículo posterior, continuando dorsalmente hacia el poro de salida situado en el lado izquierdo y a nivel del testículo posterior.

Los mencionados autores indican, para Brachylaime rauschi, que el oviducto emerge de la superficie ventral del ovario y se une al canal de Laurer y al viteloducto común en este orden. El canal de Laurer se dirige posteriormente hacia la izquierda, cruza el borde anterior del testículo posterior donde se dilata originando el receptáculo seminal para continuar después dorsalmente hasta la región dorsal, abriéndose al exterior a un nivel ligeramente inferior al borde anterior del ovario. La glándula de Mehlis no es detectable. El reservorio vitelino se encuentra entre el ovario y el testículo posterior, algo desplazado hacia la izquierda.

NARDI & PUCCINI (1961), en su descripción de Brachylaemus erinacei, indican que la glándula de Mehlis es difícilmente observable y que el canal de Laurer y el receptáculo seminal no están suficientemente evidenciados.

NASIR & RODRIGUEZ (1966) indican que en Brachylaima degiustii el reservorio vitelino y el ootipo son posteriores al ovario. El receptáculo seminal está presente. El canal de Laurer se abre dorsalmente en la región anterior del testículo posterior.

UBELAKER & DAILEY (1966) indican que en Brachylaima chiapensis se presenta un oviducto corto que emerge de la superficie ventral del ovario. El canal de Laurer está presente. El receptáculo seminal falta y el ootipo y la glándula de Mehlis se sitúan en el margen anterolateral del ovario. El reservorio vitelino tiene forma cónica y es ventral respecto al ovario.

LEWIS (1969), en Brachylaimus oesophagei, detecta un oviducto que emerge de la superficie medio ventral del ovario y se curva ligeramente dorsalmente para confluir con el canal de Laurer en la región dorsal y después con el viteloducto común. El canal de Laurer se abre dorsalmente en la línea central del verme, cerca del testículo posterior. No hay receptáculo seminal. Posteriormente el oviducto corre dorsalmente y forma el ootipo rodeado por la glándula de Mehlis, entre el ovario y el testículo anterior.

TRAVASSOS et al. (1969) destacan la situación postovárica de la glándula de Mehlis en Brachylaemus (Mazzantia) mazzantii (hecho corroborado por GOMES & PINTO, 1978) y la presencia de glándula de Mehlis y de canal de Laurer en Glaphyrostomum adhaereus, así como en G. propiuquum. En Postharmostomum commutatus, indican la presencia de una glándula de Mehlis muy voluminosa y de canal de Laurer. Los autores indican la presencia de glándula de Mehlis en Scaphiostomum illatabile.

CABALLERO DELOYA (1970) indica, en Brachylaemus (Brachylaemus) bravoae, la tencia de un reservorio vitelino triangular en situación ventral respecto al ovario. El ootipo y la glándula de Mehlis son observables pero no así el canal de Laurer.

FISCHTAL & KUNTZ (1974), en su descripción de Brachylaima (Brachylaima) sabahense, indican que la glándula de Mehlis, bien desarrollada, es ventral respecto al ovario. El reservorio vitelino está a nivel ovárico.

PEISLEY & HOWELL (1970) indica que, en Brachylaima antechini, el reservorio vitelino es cónico y ventral respecto al ovario y que el oviducto emerge de la superficie ventral del ovario. El canal de Laurer está presente pero el receptáculo seminal no es evidente. El ootipo y la glándula de Mehlis se localizan cerca del borde anterolateral del ovario.

FISCHTAL & KUNTZ (1976) precisan, en Glaphyrostomum taiwanense, que el oviducto emerge del lado posteromediano del ovario. La glándula de Mehlis es posteromediana respecto al ovario. El canal de Laurer se extiende hacia la superficie dorsal a nivel ovárico pero no la alcanza. El reservorio vitelino es anterosiniestro al testículo posterior.

KAMIYA & MACHIDA (1977), en la especie Brachylaima ishigakiense, detectan la presencia de un oviducto que nace en el lado derecho del ovario, con-

fluyendo con el canal de Laurer y con el reservorio vitelino ventralmente respecto al ovario. El canal de Laurer se abre a nivel del reservorio vitelino. La glándula de Mehlis es ventral respecto al ovario. El receptáculo seminal está ausente.

GOMES (1979) en su descripción de la especie Postharmostomum (Postharmostomum) freitasi indica la presencia de glándula de Mehlis y la no evidencia de espermoteca y canal de Laurer.

TURNER & MC KEEVER (1980) indican que en Ityogonimus scalopi el receptáculo seminal está ausente y que el canal de Laurer corre anteriormente, extendiéndose hasta el nivel medio del ovario. La glándula de Mehlis, con grandes células, rodea el complejo ovárico. El reservorio vitelino es triangular y ventroposterior al ovario.

MAS-COMA, ESTEBAN & VALERO (en prensa) establecen, en Scaphiostomum palearticum, que el oviducto confluye con el canal proveniente de un pequeño receptáculo seminal, de cuyo polo opuesto emerge el canal de Laurer que sufre una torsión y continúa con una trayectoria casi rectilínea hacia la región dorsal del cuerpo quedando embebido en el parénquima. Posteriormente el oviducto confluye con el conducto vitelino común procedente del reservorio vitelino. Tras esta unión el oviducto constituye el ootipo rodeado por la glándula de Mehlis.

MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa b) indican para Pseudoleucochloridium pericardicum que el oviducto emerge del margen izquierdo del ovario, y en él desemboca un conducto procedente de un receptáculo seminal alargado, de cuyo polo opuesto emerge un corto canal de Laurer que se dirige hacia la superficie dorsal del cuerpo. El oviducto recibe seguidamente al conducto vitelino común procedente de un reservorio vitelino triangular en el que confluyen los viteloductos, los cuales emergen lateralmente de los folículos vitelinos posteriores. El oviducto se ensancha posteriormente para constituir el ootipo rodeado por la glándula de Mehlis.

Al igual que sucedía con el aparato masculino, también existe un confusiónismo similar en lo que se refiere al oogenotopo en los Brachyláimidos de acuerdo con la bibliografía, sin que quepa distinguir, por el momento y de un modo claro, si existen variaciones o no y de que tipos.

1.2.2.2.2.- UTERO Y CONDUCTO TERMINAL

No destacaremos en detalle las descripciones que de la trayectoria seguida por el útero realizan muchos autores, pero si nos ocuparemos de las observaciones existentes sobre el metratermo, en los trabajos de los mismos.

Así, JOHNSTON (1912) cita la presencia de una vagina bien desarrollada en Harmostomum simile y GUBERLET (1928) habla ya de un metratermo de paredes gruesas en Harmostomum (Postharmostomum) hawaiiensis, en tanto que GROSCHAFT, VALLE & HERNANDEZ (1969) describen un metratermo de paredes muy gruesas para la especie anterior bajo el binomio Postharmostomum gallinum.

WERBY (1928) indica la presencia de una vagina en Harmostomum (Harmostomum) pellucidum y BAER (1932) cita la presencia de un metratermo musculoso en Ityogonimus lorum. JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1934) describen un metratermo musculoso en Brachylaemus fuscatus y FISCHTHAL & KUNTZ (1973) indican que el metratermo de esta especie tiene forma de C y está situado a la derecha de la bolsa del cirro.

MC INTOSH (1934) expresa la existencia de un metratermo bien desarrollado en Scaphiostomum pancreaticum. YAMAGUTI (1935) destaca en Harmostomum syntacticum la presencia de un metratermo con fuertes paredes musculares. BALOZET (1937) en Brachylaemus suis indica la presencia de un metratermo que se inicia antes del nivel del poro genital y describe una curva hacia abajo para acceder posteriormente al poro.

ROBINSON (1949), en Postharmostomum helicis, habla de un metratermo musculoso e indica que está rodeado por células glandulares. ULMER (1951) cita también un metratermo glandular en esta especie añadiendo que presenta un esfínter muscular en su extremo cercano al poro genital y una estructura posiblemente valvular en su extremo opuesto.

MASON (1953) en Brachylaima dolichodirus, BIOCCA & FERRETTI (1958) en Dollfusinus frontalis, MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a) en esta misma especie, KRUIDENIER & GALLICCHIO (1959) en Brachylaime rauschi y en Brachylaime microti, así como NASIR & RODRIGUEZ (1966) en Brachylaima degiustii, aluden a la presencia de un metratermo.

LEWIS (1969) destaca la presencia de pequeñas células glandulares rodean-

do al metratermo de Brachylaimus oesophagei. FISCHTAL & KUNTZ (1974) indican también la presencia de células glandulares rodeando a un metratermo muscular de paredes gruesas en Brachylaima (Brachylaima) sabahense, y así ocurre también en Glaphyrostomum taiwanense según los mismos autores (1976).

PEISLEY & HOWELL (1975) en Brachylaime antechini, KAMIYA & MACHIDA (1977) en Brachylaima ishigakiense, TURNER & MC KEEVER (1980) en Ityogonimus scalopi, MAS-COMA, ESTEBAN & VALERO (en prensa) en Scaphiostomum pancreaticum y MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa b) en Pseudoleucochloridium pericardicum, citan la presencia de metratermo.

De acuerdo con estos datos, y a pesar de la falta de alusión al respecto en la mayoría de las descripciones de especies de Brachyláimidos, cabe deducir que la presencia de un metratermo rodeado de células glandulares es un denominador común en los representantes de esta familia.

1.2.2.3.- MORFOFUNCIONALISMO DE LOS APARATOS REPRODUCTORES MASCULINO Y FEMENINO

Son muy escasos los datos bibliográficos referentes a la secuencia cronológica del inicio de funcionamiento de los aparatos reproductores masculino y femenino en las distintas especies de Trematodos pertenecientes a la familia Brachylaimidae. Los autores que estudian los ciclos evolutivos de estas especies llevan a cabo, en muchas ocasiones, ensayos experimentales de infestación de hospedadores definitivos con metacercarias, al objeto de obtener los adultos, y en estos ensayos sería posible determinar la secuencia cronológica de funcionalidad de las estructuras genitales. Sin embargo, los investigadores en su mayor parte, controlan la posible eliminación de huevos del parásito por el hospedador definitivo y no proceden a la disección del mismo hasta conseguir resultados coprológicos positivos. Este modo de actuación conduce invariablemente a la obtención de formas adultas grávidas del parásito en las cuales las estructuras genitales son totalmente funcionales, no siendo posible determinar la cronología de la funcionalidad de las mismas.

JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1932) infestan experimentalmente Passer domesticus L., obteniendo adultos de Brachylaemus nicolli en 7 días. Los mismos

autores (1934) describen la realización experimental del ciclo evolutivo de Brachylaemus fuscatus e indican únicamente que obtienen adultos en Paseriformes y en el pichón doméstico.

KRULL (1935 b) en sus estudios experimentales sobre el ciclo evolutivo de Brachylaemus virginiana no presenta datos de cronología funcional pero indica que zariquellas experimentalmente infestadas por adultos de esta especie eliminan huevos en heces en 19 días. El autor (1935 c), reproduce experimentalmente el ciclo evolutivo de Panopistus pricei pero no consigue infestar los hospedadores definitivos.

DOLLFUS, CALLOT & DESPORTES (1935) indican que las metacercarias de un Brachylaemus se transforman en adultos grávidos en 2 días en lechuzas experimentalmente infestadas.

BALAZET (1937) reproduce experimentalmente el ciclo evolutivo de Brachylaima suis e indica que en las ratas el adulto madura en 9 días. ALICATA (1938, 1940), en sus estudios experimentales sobre el ciclo evolutivo de Postharmostomum gallinum, destaca que los adultos alcanzan la madurez sexual en un mes en pájaros. FARIA DUARTE (1980) establece un período de prepatencia de 24 a 27 días para la obtención experimental de adultos de Postharmostomum gallinum en Gallus gallus. MILLER (1939) en sus estudios experimentales sobre el crecimiento de adultos de Postharmostomum laruei en ratones infestados experimentalmente, indica que transcurridas 400 horas tras la infestación, los adultos son grávidos. ULMER (1949), trabajando con esta misma especie, lleva a cabo infestaciones experimentales de Peromyscus maniculatus y obtiene adultos en los que la producción de huevos se inicia en 8 ó 9 días, en tanto que la obtención de huevos en las heces del hospedador tiene lugar al cabo de 20 días.

ROBINSON (1949) en sus estudios experimentales sobre el ciclo de Postharmostomum helices, no aporta datos concretos. ULMER (1951), trabajando con esta misma especie, indica que aparecen los primeros huevos en el útero del verme en 8 ó 9 días, tras la infestación del hospedador definitivo experimental.

VILLELLA (1953) indica que en las heces de Peromyscus maniculatus aparecen huevos de Entosiphonus thompsoni 15 días después de su infestación con metacercarias. El mismo autor (1954) infesta experimentalmente Cricetus auratus y consigue adultos de Brachylaima rhomboideum tres semanas después.

SIMON-VICENTE (1955) estudia experimentalmente el ciclo evolutivo de Brachylaemus erinacei (= B. suis) y destaca que la obtención de los primeros huevos en el útero de los adultos tiene lugar transcurridos 4 ó 5 días tras la infestación de ratones blancos y gorriones.

DEIANA & ARRU (1968) indican que la metacercaria de Postharmostomum commutatum emplea 30 días en transformarse en adulto en el hospedador definitivo experimental.

JENSEN (1972) indica que ardillas experimentalmente infestadas eliminan huevos de Scaphiostomum pancreaticum transcurridos 30 días desde su infestación.

JOURDANE (1976) indica que las metacercarias de Pseudoleucochloridium soricis evolucionan a adultos en 24-36 horas en su hospedador definitivo, Neomys fodiens y Sorex araneus.

1.3.- CULTIVO IN VITRO DE TREMATODOS DIGENIDOS

1.3.1.- CONSIDERACIONES GENERALES

La consecución del mantenimiento y cultivo de metazoos parásitos fuera de sus hospedadores interesa a un gran número de parasitólogos. Para muchos de ellos ésta representa una vía para el estudio de las relaciones implicadas en el binomio hospedador-parásito, así como la posibilidad de determinar las causas de la especificidad y la naturaleza del parasitismo. READ (1950) indica la necesidad de desarrollar técnicas para el cultivo in vitro de helmintos y de llevar a cabo estudios sobre fisiología intestinal, destacando la dificultad que conlleva el cultivo de helmintos parásitos fuera de sus hospedadores. Posteriormente tiene lugar un considerable avance en el cultivo in vitro de metazoos parásitos, avance que proporciona una importante información concerniente a la fisiología y comportamiento de los parásitos, pero se hace patente que el cultivo de parásitos in vitro no responde, en sí mismo, a los problemas planteados respecto a las relaciones hospedador-parásito. Así lo entiende READ (1955), quién puntualiza su visión del problema indicando que si bien el cultivo in vitro proporciona la respuesta a un gran número de problemas, no es una llave mágica que permita dilucidar totalmente los múltiples aspectos implicados en la relación hospedador-parásito. Su opinión viene avalada por la larga experiencia de microbiólogos y virólogos, quienes tras examinar críticamente los conocimientos actuales sobre los mecanismos implicados en las relaciones hospedador-parásito in vivo, referidos principalmente a bacterias, virus y hongos, y tras evaluar la información proporcionada por los estudios in vitro, concluyen que aunque la información obtenida mediante dichos estudios sobre la naturaleza de muchos procesos fisiológicos esenciales para los microorganismos es de primordial importancia, el conocimiento actual sobre el comportamiento in vivo de dichos microorganismos es superficial (SMITH & TAYLOR, 1964). Las amplias divergencias existentes entre el comportamiento de los microorganismos in vivo e in vitro no permiten extrapolar los resultados obtenidos experimentalmente a situaciones posibles en los hospedadores, patentizándose asimismo la necesidad de extremar las precauciones en la extrapolación de los resultados obtenidos en hospedadores de laboratorio a los hospedadores habituales o naturales. Este punto

de vista es mantenido también en lo que se refiere a metazoos parásitos (SILVERMAN et al., 1962).

Sin embargo, los estudios in vitro constituyen una muy válida aproximación al conocimiento de los requerimientos fisiológicos esenciales de los parásitos y utilizados conjuntamente con experiencias in vivo prestan una valiosa ayuda en la dilucidación de muchos aspectos concernientes a las interrelaciones existentes en el binomio hospedador-parásito. Las técnicas de cultivo in vitro permiten desarrollar trabajos experimentales sobre los requerimientos metabólicos y fisico-químicos de los parásitos, así como estudios sobre antígenos y otros materiales secretados y excretados durante su crecimiento. En este sentido se hace necesaria una estandarización de las técnicas de cultivo in vitro que permita la comparación de los resultados obtenidos por distintos investigadores, constituyendo así dichas técnicas una gran ayuda para la investigación parasitológica.

1.3.2.- PROBLEMAS BASICOS EN EL CULTIVO IN VITRO DE TREMATODOS DIGENIDOS

El cultivo in vitro de Trematodos presenta un considerable número de dificultades originadas, en su mayoría, por la complejidad de sus ciclos evolutivos. No obstante, se ha conseguido importantes avances en este campo durante las últimas décadas. En este sentido, los problemas más importantes con los que el investigador se enfrenta son los siguientes (SMYTH & HALTON, 1983):

- los Trematodos Digénidos presentan hábitats tales como intestino, conducto biliar, corriente sanguínea, ojos, etc. cuyas características físico-químicas son complejas y muy poco conocidas en algunos hospedadores; el tipo de información requerida ha de incluir datos sobre pH, pO_2 , pCO_2 , Eh, niveles de aminoácidos, presión osmótica, concentración de iones fisiológicamente comunes, etc.; una gran parte de esta información es difícil de obtener ya que son necesarias técnicas que no interfieran en si mismas las medidas a realizar;
- las propiedades nutritivas de los materiales biológicos necesarios para el desarrollo de muchas especies de Digénidos son muy

complejas y difíciles de reemplazar por medios químicamente definidos;

- muchas especies, como los helmintos intestinales, se encuentran en hábitats no estériles, circunstancia que implica el empleo de antibióticos previamente a la realización del cultivo in vitro; una solución a este problema es el inicio del cultivo empleando estadíos larvarios cuyo hábitat es estéril (metacercarias);
- los productos resultantes del metabolismo vermidiano son rápidamente eliminados en su hábitat natural y los métodos de cultivo in vitro han de contemplar este requerimiento;
- los ciclos evolutivos de los Trematodos Digénidos implican el concurso de hospedadores distintos por lo que cada estadio de su desarrollo requiere condiciones físico-químicas y nutricionales diferentes, haciendo, asimismo, necesaria la presencia de un estímulo para que el organismo pase de un estadio a otro, en muchos casos.

Observamos, pues, que la problemática concerniente al cultivo in vitro de Trematodos es extensa y en ocasiones de difícil superación, dependiendo, obviamente, del punto del ciclo evolutivo del parásito que constituye el punto de partida del cultivo in vitro. No obstante, la situación actual en este campo de la ciencia nos permite desestimar las afirmaciones de HOBSON (1948), quien indicó en su día que el cultivo de helmintos parásitos in vitro estaba constituido por un conjunto de intentos caracterizados por una total falta de éxito, para concluir conjuntamente con SILVERMAN (1963), que si bien el cultivo in vitro de helmintos parásitos es dificultoso, todos los organismos parásitos sobrevivirán, se desarrollarán y se reproducirán in vitro cuando el esfuerzo inteligente aplicado en este sentido sea suficiente.

1.3.3.- PRINCIPIOS APLICABLES AL CULTIVO IN VITRO DE TREMATODOS DIGENIDOS

Cualquier intento de establecer principios generales en la aplicación de las técnicas de cultivo in vitro a helmintos parásitos se ve limitado por

importantes restricciones. Así, hemos de considerar que estas técnicas son aplicadas, por el momento, únicamente a un número muy reducido de especies parásitas y pocos de los estudios llevados a cabo son lo suficientemente sistemáticos como para proveer una información básica importante, a partir de la cual pueda derivarse generalizaciones aceptables. Además, ningún sistema de cultivo es utilizado por un número de investigadores suficiente para constatar la reproducibilidad de la técnica y cabe destacar que existen marcadas diferencias entre los requerimientos que especies muy próximas presentan en cultivo in vitro. Teniendo siempre presentes las consideraciones anteriormente expuestas que actúan como factores limitantes en el establecimiento a priori de condiciones generales en cultivo in vitro, cabe, sin embargo, indicar que la adaptación de un verme a un sistema de cultivo in vitro requiere la satisfacción por este último de una serie de condiciones que constituyen en sí mismas en gran parte, una respuesta aproximada a la problemática inherente a los métodos de cultivo in vitro que hemos expuesto someramente en el apartado anterior. Así, según SILVERMAN & HANSEN (1971), los distintos factores biológicos que afectan a los vermes, integrando un conjunto básico de requerimientos hacia el cual ha de dirigir inicialmente su atención el investigador pueden ser los siguientes:

- estímulos ejercidos por el hospedador y mecanismos determinantes de los ritmos biológicos;
- factores biológicos actuantes en cada estadio de desarrollo del verme;
- factores que intervienen en el desarrollo y organogénesis de los vermes;
- inhibición inmunológica;
- productos resultantes del metabolismo vermidiano y su eliminación y toxicidad;
- tratamiento del parásito previamente a su cultivo.

1.3.4.- CRITERIOS ORIENTADOS A LA EVALUACION DEL MANTENIMIENTO, CRECIMIENTO, DESARROLLO Y MADURACION DE LOS VERMES IN VITRO

Consideramos importante establecer una distinción entre aquellas condiciones y medios de cultivo que permiten únicamente el mero mantenimiento de los vermes in vitro y aquellos que soportan el crecimiento, desarrollo y maduración de los vermes. SMYTH & HALTON (1983) mencionan la dificultad de definir el término mantenimiento y la imprecisión que conlleva la determinación de dicho estado en un verme cultivado in vitro. Los mencionados autores consideran que el mantenimiento de un verme in vitro implica la instauración de condiciones de cultivo que permitan la actuación del metabolismo vermidiano a un nivel suficiente para mantener activos las células y tejidos del verme pero insuficiente para promover el crecimiento y la maduración del verme en el caso de las metacercarias o la producción de esperma y huevos en el caso de los adultos. El término crecimiento es utilizado por los anteriores autores para indicar la presencia de procesos de división celular y de síntesis de tejidos en el verme, en tanto que el término desarrollo implicaría la diferenciación de células en tejidos y el término maduración incluye la evolución de la genitalia para producir espermatozoides y huevos.

La evaluación de las técnicas de cultivo in vitro requiere la adopción de criterios que permitan reconocer la evolución seguida por los vermes bajo un determinado conjunto de condiciones de cultivo y establecer claramente si ocurre únicamente un mantenimiento de dichos vermes o bien si tiene lugar procesos de crecimiento, desarrollo o maduración de los mismos, conceptos todos ellos que hemos expuesto anteriormente. Una amplia variedad de criterios son utilizados en este sentido, entre los cuales cabe destacar, según SILVERMAN (1965) los siguientes:

- movilidad y reacción del verme a distintos estímulos;
- incremento en tamaño;
- cambios en la morfología externa del verme o evidencias de desarrollo metamórfico;
- criterios fisiológicos como utilización de sustratos;
- organogénesis, gametogénesis y oviposición;

- evidencias citológicas de incremento en la actividad mitótica;
- realización de todo el ciclo evolutivo in vitro.

La idoneidad de algunos de estos criterios está sujeta a discusión ya que puede demostrarse que existe una cierta movilidad y capacidad de reacción a distintos estímulos en vermes moribundos cuyo metabolismo está disminuido, por lo cual pueden permanecer en este estado durante intervalos de tiempo prolongados. La consecución de oviposición in vitro puede indicar que las condiciones físico-químicas del cultivo son adecuadas, pero la producción de huevos ha de ser suficiente para demostrar que no es debida a la utilización de las reservas vermidianas. Asimismo, el crecimiento de los vermes puede constituir una respuesta a condiciones desfavorables.

BELL & SMYTH (1958) destacan la necesidad de que los criterios que permitan la evaluación de un método de cultivo sean susceptibles de ser definidos con precisión, estén dirigidos al reconocimiento de caracteres vermidianos de fácil observación bien directamente, bien mediante técnicas sencillas y cubran los procesos de maduración en toda su amplitud. Estos autores establecen una serie de estadios sucesivos en el crecimiento, desarrollo y maduración de Cestodos y Trematodos, susceptibles de ser detectados mediante técnicas citológicas e histoquímicas. Dichos estadios o fases son los siguientes, aplicados a los Trematodos:

- fase 0: metacercaria sin esbozo de primordio genital;
- fase 1: multiplicación celular determinada por el número de mitosis puestas de manifiesto mediante colchicina y aceto-orceína;
- fase 2: configuración corporal del verme;
- fase 3: organogénesis evidenciada mediante técnicas usuales de tinción;
- fase 4: inicio de gametogénesis, esencialmente detección de estadios iniciales de espermatogénesis mediante aceto-orceína;
- fase 5: gametogénesis completa con producción de espermatozoides detectados mediante aceto-orceína;

- fase 6: vitelogénesis y formación de la cubierta de los huevos en los vermes, detectando dichos procesos mediante Fast Red Salt B;
- fase 7: oviposición evidenciada directamente al microscopio que es conveniente que sea seguida por tests de embrionación de los huevos.

Estos criterios citológicos e histoquímicos parecen ser los más adecuados para la evaluación de técnicas de cultivo in vitro de Trematodos Digénidos, si bien pueden utilizarse criterios alternativos o adicionales si se considera oportuno en situaciones puntuales, teniendo presente que cualquier criterio propuesto conviene que sea preciso en su conceptualización de fácil y rápida realización.

La adopción de criterios concretos que permitan determinar con precisión la validez de una técnica de cultivo in vitro orientada al mantenimiento de vermes adultos presenta algunas dificultades, tanto si los vermes adultos constituyen el punto inicial del cultivo como si son el resultado de un cultivo in vitro a partir de estadios evolutivos anteriores al de adulto. En este sentido, cabe destacar que la constatación de una producción de huevos in vitro comparable en número y fertilidad a la que tiene lugar in vivo constituye un criterio preciso de evaluación del método de cultivo, si bien es oportuno añadir exámenes citológicos orientados a la detección de posibles anomalías en este nivel. Ambos criterios aplicados simultáneamente proporciona una información aceptable acerca del nivel mantenido por los procesos metabólicos del verme adulto. La normalidad de dichos procesos que han de ser equiparables a los que tienen lugar in vivo ha de ser precisamente determinada en el caso de llevar a cabo estudios bioquímicos sobre el metabolismo vermidiano in vitro, en los cuales se determina datos biológicos fundamentales.

1.3.5.- TECNICAS DE CULTIVO

La finalidad de un cultivo in vitro es reemplazar las condiciones ambientales o microhábitat propio del parásito in vivo. El parásito es extraído del

microhábitat que le es propio y es introducido en un microhábitat artificial sobre el que se puede ejercer un control experimental. Son relativamente pocos los microhábitats controlados experimentalmente que han sido utilizados y en ellos se hace necesaria la contribución de un conjunto de factores cuya finalidad es reemplazar con un alto grado de aproximación las condiciones ambientales que el hospedador procura al verme.

Este conjunto de factores está constituido por el medio de cultivo y por las condiciones físico-químicas que acompañan al mismo, entre las cuales cabe destacar la atmósfera de cultivo, el pH del medio, la naturaleza del mismo, la presencia o no de agitación en el cultivo, la temperatura, esterilidad, etc. El desarrollo de un cultivo in vitro está influenciado en gran parte por la elección del medio de cultivo a utilizar pero es, a nuestro entender, igualmente importante la influencia que ejercen las condiciones físico-químicas establecidas en el cultivo, hasta el punto de que en ocasiones la sólo introducción de agitación en un cultivo promueve el correcto desarrollo del mismo. El mantenimiento de unas condiciones físico-químicas determinadas en un cultivo in vitro conlleva la puesta a punto de distintas técnicas, muchas de las cuales son comunmente empleadas por la mayoría de los investigadores en sus trabajos en este campo.

1.3.5.1.- ESTERILIZACION

Una de las principales dificultades que se presentan en el cultivo in vitro de helintos es impedir la contaminación del mismo por microorganismos tales como bacterias y hongos que no sólo pueden desarrollarse rápidamente en los medios de cultivo utilizados sino que pueden producir toxinas letales para los parásitos. Las fuentes de contaminación son múltiples y entre ellas cabe destacar el medio de cultivo, los aparatos utilizados en el cultivo, el parásito a cultivar y el medio ambiente en el que se desarrolla el cultivo. La descripción de técnicas clásicas dirigidas a impedir la contaminación de un cultivo ha sido llevada a cabo por autores tales como PAUL (1965) y PARKER (1961).

Asimismo, TAYLOR & BAKER (1968, 1978) presentan una detallada descripción de las técnicas de esterilización más comunmente empleadas en el culti-

vo in vitro de helmintos, indicando dichos autores que la esterilización puede llevarse a cabo bien sea por destrucción física de los microorganismos conseguida mediante calor seco, calor húmedo o radiaciones, bien mediante eliminación física de los mismos por filtración, centrifugación o lavado, o bien por inhibición o destrucción química de los microorganismos mediante el empleo de antibióticos. Los autores precisan la necesidad de mantener condiciones asépticas en la manipulación de los cultivos mediante el empleo de técnicas ya indicadas anteriormente por PAUL (1970), así como a lo largo de los procesos encaminados a la obtención de productos tales como extractos de tejidos, sangre, etc., que no pueden ser sometidos a esterilización. El empleo de antibióticos en el cultivo in vitro de helmintos ha sido largamente cuestionado por numerosos autores tales como BERNTZEN (1962), VOGEL (1963) y WEBSTER & CAMERON (1963) en sus trabajos sobre cestodos y por CLEGG (1965) quien proclamó que Schistosoma mansoni es sensible a la cloromicetina. No obstante, el empleo de antibióticos en el cultivo in vitro de helmintos está generalizado en la mayor parte de los investigadores.

1.3.5.2.- ATMOSFERA DE CULTIVO y PH

Aunque ha sido determinado el consumo de oxígeno por parte de distintas especies de helmintos, los datos obtenidos son difíciles de evaluar sin tener conocimiento exacto de la tensión de oxígeno existente en el hábitat normal del parásito. SILVERMAN (1963), SILVERMAN et al. (1966) y BERNTZEN (1966) indican que los helmintos parásitos requieren oxígeno a bajas tensiones. El concepto, largo tiempo mantenido, de que los parásitos son anaerobios obligados o también facultativos es objeto de una cuidadosa revisión por parte de SMITH (1969), quien demuestra que las exigencias bioquímicas a partir de las cuales se acepta que los helmintos presentan una respiración anaerobia pueden no ser válidas por causa de errores en los procedimientos experimentales. El autor muestra que existen enzimas aerobias y sugiere que la presencia de hemoglobina y mitocondrias normales en los tejidos de los helmintos parece indicar que los helmintos son aerobios. Esta opinión concuerda con las expresadas por READ (1950, 1968) y SILVERMAN (1965), quienes indican que el microhábitat de los vermes intestinales parece ser muy similar al que existe

en los espacios intercelulares. Los helmintos intestinales no viven en la luz intestinal donde la tensión de oxígeno es muy baja sino que se encuentran inmediatamente adyacentes a los tejidos de la mucosa intestinal, en el microhábitat denominado "paramucosal" donde disponen de oxígeno y donde se mantiene un nivel de pH próximo a la neutralidad por efecto de la barrera mucosa. A pesar de las anteriores opiniones, un gran número de investigadores emplean sistemas de cultivo que mantienen una atmósfera de cultivo enriquecida en dióxido de carbono y en la que el oxígeno se encuentra disminuido respecto a su proporción normal en el aire. Sin embargo, la utilización de aire como atmósfera de cultivo se hace cada vez más frecuente en las investigaciones actuales sobre cultivo in vitro, con resultados positivos.

El mantenimiento de un pH, en el medio de cultivo, próximo a la neutralidad es una condición de cultivo in vitro ampliamente adoptada en la mayor parte de trabajos sobre cultivo de helmintos intestinales. El empleo de sustancias reguladoras de pH permite el mantenimiento del mismo dentro de los límites fijados por el investigador. En este sentido, son utilizados distintas sustancias tales como bicarbonatos, fosfatos y más recientemente aminos. GOOD et al. (1966) introducen una de las sustancias más ampliamente utilizadas actualmente como regularores de pH. Dicha sustancia denominada comunmente HEPES (ácido N'-2-hidroxiethylpiperacina-N'-etanosulfónico) actúa como "zwterion" y permite eliminar la necesidad de introducir un exceso de dióxido de carbono en la atmósfera de cultivo cuando se emplea bicarbonatos como reguladores de pH.

1.3.6.- SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO IN VITRO DE TREMATODOS DIGENIDOS

Son muchas las especies de Trematodos Digénidos que han sido cultivadas in vitro a lo largo de los últimos años con resultados dispares originados, fundamentalmente, por las remarcables diferencias existentes en los requerimientos nutricionales exigidos por las mismas. Así, algunas especies son susceptibles de ser cultivadas en medios de cultivos relativamente simples, en tanto que otras muestran probadas dificultades en su cultivo. Consideramos de interés presentar los logros obtenidos hasta el momento actual en el cultivo in vitro de los Trematodos Digénidos al objeto de evidenciar las dife-

rencias a que anteriormente hemos aludido. No pretendemos que nuestra relación sea exhaustiva, ya que excedería los límites del presente escrito pero sí lo suficientemente extensa como para reflejar las tendencias actuales en este campo de la investigación parasitológica. Presentamos las distintas especies que han sido sometidas a cultivo in vitro durante alguna o varias fases de su ciclo biológico agrupadas sistemáticamente por familias con el fin de conseguir la máxima claridad en nuestra exposición. En este sentido hemos seguido el orden propuesto por TAYLOR & BAKER (1978).

1.3.6.1.- FAMILIA SCHISTOSOMATIDAE

La importancia sanitaria de un gran número de especies incluidas en esta familia ha motivado que muchos investigadores hayan dirigido su atención hacia el cultivo in vitro de las mismas, intentando, en un principio, mantener los adultos in vitro para el ensayo de fármacos antihelmínticos y, posteriormente, conseguir el cultivo de los estadios larvarios que concurren en el ciclo evolutivo de las distintas especies.

1.3.6.1.1.- SCHISTOSOMA MANSONI

A) HUEVOS

Los intentos de mantener huevos viables in vitro están dirigidos a la realización de tests inmunológicos. Usualmente, los huevos de S. mansoni son obtenidos a partir del hígado de mamíferos experimentalmente infestados, tales como ratón (VOGE & SEIDEL, 1972) o hamsters (BASCH & DICONZA, 1974) o bien a partir del intestino delgado de hamsters (JACQUELINE & BIGUET, 1973), en condiciones asépticas. NEWSOME (1957) establece un método para mantener in vitro huevos viables de S. mansoni que serán utilizados en el test de precipitación circumoral. NEWPORT & WELLER (1982 a), empleando un medio de cultivo químicamente definido suplementado con albúmina, hidrolizado de lactalbúmina e hidrolizado de caseína, consiguen la eclosión de huevos de S. mansoni y la liberación de miracidios infestantes.

B) MIRACIDIOS

VOGUE & SEIDEL (1972) consiguen la evolución de miracidios a esporocistos jóvenes utilizando como medio de cultivo BME suplementado con aminoácidos adicionales, ácidos orgánicos, sales y azúcares, añadiendo también suero de caballo inactivado. El pH es 6,7-6,0 mantenido mediante bicarbonato sódico y la temperatura de cultivo es de 26°C. BASCH & DICONZA (1974) llevan a cabo la transformación de miracidios en esporocistos utilizando un medio de cultivo definido muy complejo (Medio BASCH & DICONZA) al que añaden suero humano. El pH de cultivo es 7,0-7,2 mantenido mediante Hepes y la temperatura es de 25±1°C. Los esporocistos obtenidos al cabo de 14 días resultan infestantes para Biomphalaria glabrata produciendo cercarias infestantes al cabo de 20-46 días. Los medios de cultivo utilizados en el cultivo de miracidios están basados en análisis de hemolinfa de B. glabrata, y, en este sentido, MUFTIC (1969) notifica el cultivo de miracidios a esporocistos madres, esporocistos hijos y cercarias infestantes para ratones. Ahora bien, SMYTH (1976) recomienda una revisión de este trabajo. BENNEX & JACOBELLI (1981) consiguen, asimismo, la transformación in vitro de miracidios en esporocistos primarios, empleando un medio de cultivo basado en el medio Schneider para Drosophila y consiguiendo un período de mantenimiento en cultivo de 19 días. La atmósfera de cultivo es aire con un 8% de CO₂.

C) ESPOROCISTOS

CHERNIN (1963, 1964) mantiene porciones de glándula digestiva y gónadas de B. glabrata infestados experimentalmente en una solución fisiológica que contiene glucosa y trehalosa a una temperatura de 26-28°C, consiguiendo la emisión de cercarias infestantes. DICONZA & HANSEN (1973) emplean líneas celulares de mosquito en un medio compuesto por lactalbúmina hidrolizada en solución de Hanks con suero bovino fetal inactivado, huevo ultrafiltrado, fracción A de suero bovino y antibióticos (pH = 6,8-7,0 y temperatura 28°C), logrando la aparición de bolas germinales y procesos tegumentarios de tipo microvilli en los esporocistos hijos así cultivados. HANSEN et al. (1973) llegan a obtener esporocistos hijos secundarios a partir de esporocistos primarios, utilizando cámaras de cultivo construidas con membranas Nuclepore y cé-

lulas procedentes de mosquito que no contactan con los esporocistos en cultivo. El medio empleado es el mismo que hemos indicado anteriormente. Posteriormente BUECHER et al. (1974) y HANSEN et al. (1974) consiguen la aparición de una segunda generación de esporocistos hijos en medios libres de células que contienen concentraciones exactas de compuestos sulfídricos, bajo una atmósfera de cultivo constituida por una mezcla estrictamente controlada de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. En ausencia de una combinación correcta de reductores o de gases el cultivo no es satisfactorio. DICONZA & BASCH (1974) describen un procedimiento sencillo para el cultivo de esporocistos hijos utilizando un medio igual al empleado en el cultivo de miracidios para obtener esporocistos madre. Los esporocistos incrementan su tamaño y tras 14 días de cultivo son infestantes para B. glabrata.

D) CERCARIAS

Recientemente han aparecido numerosos trabajos orientados a la consecución de la transformación de cercarias en esquistosómulos. Para ello STIREWALT et al. (1966) utilizan membranas biológicas obtenidas a partir de piel abdominal de ratón, en tanto que STIREWALT & UY (1969) emplean membranas artificiales. Ultimamente EVELAND & MORSE (1975) describen un sistema para la conversión in vitro de cercarias en esquistosómulos obteniendo buenos resultados mediante el empleo de solución Eagle y suero de rata (1:1) a 37°C durante 3 h y cultivo en Medio II de Clegg durante 14 días. Las cercarias de S. mansoni son transformadas en esquistosómulos por YASURAOKA et al. (1978), únicamente por incubación en NCTC 109 con un 50% de suero humano o de conejo. La adición posterior de eritrocitos consigue la evolución de los esquistosómulos que llegan al estadio de fusión de ciegos intestinales tras 12 días de cultivo, produciendo los machos, en el día 30, espermatozoides, pero las hembras no producen huevos. BASCH (1981 a) consigue obtener esquistosómulos a partir de cercarias, mediante pasos repetidos a través de una doble jeringa y cultiva los esquistosómulos así obtenidos en Medio 169 (BME + hidrolizado de lactalbúmina + glucosa + hipoxantina + serotonina + insulina + hidrocortisona + triyodotironina + MEM vitaminas + medio Schneider + 10% suero humano) al que adiciona células rojas humanas Tipo 0, llegando a obtener vermes apa-

reados tras 7 semanas de cultivo. La temperatura de cultivo es 36°C y la atmósfera es aire fluyente con 5% de CO₂.

E) ESQUISTOSOMULOS

CLEGG (1959, 1961, 1965) consigue buenos resultados en el cultivo de esquistosómulos. Inicialmente (1959) empleó un medio de cultivo consistente en suero, solución Hanks, eritrocitos y lactalbúmina hidrolizada, que modifica posteriormente (1961) empleando suero de conejo inactivado y solución Eagles con lactalbúmina hidrolizada, glucosa y eritrocitos de conejos más antibióticos. El pH se mantiene a 7,4 con dióxido de carbono y la temperatura a 37°C. Por último, el autor (1965) cultiva los esquistosómulos en un saco de celulosa que contiene algunos hematíes sumergido en el medio de cultivo anteriormente descrito, al que el autor adiciona extracto de embrión bovino. El autor consigue una maduración de los esquistosómulos en 24-30 horas con producción de espermias en los machos y de algunos huevos en las hembras. BASCH (1981 b) cultiva esquistosómulos obtenidos previamente in vitro (1981 a) hasta conseguir la aparición de glándulas vitelógenas, ovarios y testículos en los vermes, así como la aparición de huevos anormales. Para ello emplea Medio 169 con cultivo a 37-38°C y en una atmósfera de aire fluyente con 5% CO₂.

F) ADULTOS

En este campo tienen un gran interés los trabajos de SENFT & SENFT (1962) y SENFT (1963, 1965), autores que consiguen mantener adultos procedentes de ratones en medio NCTC 109 con puesta de huevos continuada durante 24 horas, si bien los huevos no son viables y su organización celular es anormal. MICHAELS & PRATA (1968) mantienen adultos apareados en 90% Medio 199 + 10% suero bovino y en 80% Medio Esencial Eagle + 20% Suero bovino, ocurriendo oviposición entre los días 2 y 10 de cultivo (85% durante los 5 primeros días). La temperatura de cultivo es de 37°C y la atmósfera de aire fluyente con 4,5% CO₂. Los huevos maduran en 5 días en el primer medio y en 7 días en el segundo. SCHILLER et al. (1975) mantienen adultos in vitro durante 12 días con producción de huevos viables utilizando el medio de cultivo difásico emplea-

do por SCHILLER (1965) en el cultivo de Hymenolepis diminuta, consistente en agar-sangre como base y solución Hanks como fase líquida, ligeramente modificada. Los autores indican que los vermes mantenidos en condiciones de aerobiasis producen mayor cantidad de huevos viables que los mantenidos en anaerobiasis. LANCASTRE & GOLVAN (1973) mantienen adultos durante 120 días sobre células Kb o HeLa, ocurriendo oviposición en 15 días, si bien los huevos son anormales. COLES (1972) mantiene adultos de S. mansoni in vitro durante un corto período de tiempo (3 días), empleando lactalbúmina de Earle con un 10% de suero bovino neonatal, produciendo los vermes 3 huevos por día. MICHAELS & PRATA (1968) consiguen, asimismo, mantener adultos in vitro con producción de 24 huevos por día durante los 5 primeros días, en un medio de cultivo constituido por Medio 199 y suero bovino (9:1). BASCH & HUMBERT (1981) cultivan in vitro vermes procedentes de ratón durante 53 días con producción de huevos viables, tras ser implantados dichos vermes en venas mesentéricas de ratón. El medio de cultivo empleado es RPMI 1640 con 10% suero bovino fetal con o sin glucosa y con hematies humanos. NEWPORT & WELLER (1982 a) mantienen adultos in vitro durante 17-21 días con producción de huevos hasta el día 14, siendo éstos viables y los miracidios infestantes para B. glabrata. El medio de cultivo es complejo e incluye un medio químicamente definido descrito por los mismos autores (1982 b), suplementado con hidrolizado de lactalbúmina y de caseína.

WU et al. (1985) demuestran que la inclusión de suero de sangre de la vena porta en un medio de cultivo constituido por RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal induce un incremento en la oviposición de vermes apareados in vitro, manteniéndose el cultivo a 37°C, en aire con 5% de CO₂. MERCER & CHAPPELL (1985) mantienen adultos de S. mansoni in vitro en Medio 199 suplementado con un 10% de suero bovino, produciendo los vermes 400 huevos/pareja durante 10 días.

1.3.6.1.2.- SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM

SMITH et al. (1976) cultivan S. haematobium en un medio esencialmente igual al empleado por CLEGG (1965) para S. mansoni. La finalidad de este estudio es conseguir un sistema de cultivo para ambas especies de interés para

analizar la inmunidad cruzada. Los autores transforman las cercarias en esquistosómulos por penetración a través de piel de ratón aislada. El medio de cultivo de los esquistosómulos contiene suero humano y solución Earle (1:1) conteniendo esta última lactalbúmina hidrolizada, penicilina y estreptomicina, adicionándose glóbulos rojos humanos. La atmósfera de cultivo contiene un 8% de CO₂ en aire y la temperatura es de 37°C. Este cultivo consigue un buen desarrollo de los vermes que alcanzan una longitud aproximada a la que presentan los adultos in vivo pero las hembras no alcanzan su madurez sexual aunque los machos si llegan a producir esperma. No se observa acoplamiento in vitro.

1.3.6.1.3.- SCHISTOSOMA JAPONICUM

Recientemente VOGÉ & SEIDEL (1972) cultivan miracidios de S. japonicum hasta estadios parecidos a esporocistos jóvenes en medios de cultivo monoxénicos con fibroblastos de ratón o células de riñón de mono, consiguiendo un aumento de tamaño y de número de núcleos germinales en los mismos, en 4 semanas, a temperatura ambiente (24-26°C) en condiciones de aerobiasis. HSU SHIH-Ê (1974) indica que los huevos de esta especie pueden ser cultivados in vitro sin ocurrir una migración tisular, produciendo miracidios en un medio que contiene suero y eritrocitos. Los vermes adultos no sólo eliminan los huevos que ya existían en su útero sino que producen también nuevos huevos, principalmente tras 2-7 días de cultivo. KAWANAKA et al. (1983 a) establecen la composición del medio esencial mínimo (MEMSE-J) que permite el cultivo de huevos de S. japonicum y la maduración de los mismos in vitro a partir de la obtención de huevos maduros en 2 semanas, empleando Medio RPMI 1640 a 37°C en aire con 5% de CO₂ (1983 b). CHOW & CHIU (1972) cultivan adultos y esquistosómulos en solución Earle con eritrocitos de perro, lactalbúmina hidrolizada, antibióticos y suero humano, de perro, cerdo o bovino. Los esquistosómulos se desarrollan en suero de perro, apareciendo órganos reproductores al cabo de 2-3 semanas. KAWANAKA (1985) indica que el medio químicamente definido MEMSE-J con un 10% de suero bovino fetal permite la evolución de miracidios de S. japonicum en esporocistos primarios y su mantenimiento in vitro durante 55 días, consiguiendo éstos doblar su tamaño.

La temperatura de cultivo es de 37°C y la atmósfera de cultivo es aire con un 5% de CO₂.

1.3.6.1.4.- SCHISTOSOMA BOVIS

Adultos de esta especie son mantenidos in vitro durante 14-18 días en un medio químicamente definido sin producción de huevos (MAGZOUB, 1973), ocurriendo la producción de huevos no viables al adicionar suero de caballo al medio de cultivo.

1.3.6.1.5.- TRICHOILHARZIA OCELLATA

Cercarias y esquistosómulos de esta especie se desarrollan en un medio compuesto por solución Earle con lactalbúmina hidrolizada y suero de pato o pollo con glóbulos rojos homólogos, consiguiéndose una organogénesis importante (HOWELL & BOURNS, 1974). El pH es de 7,4-7,6, la temperatura 39-40°C y la atmósfera de cultivo contiene un 5% de CO₂ en aire.

Recientemente MELLINK & VAN DEN BOVENKAMP (1985) consiguen la transformación in vitro de miracidios de T. ocellata en esporocistos madre que resultan infestantes para los hospedadores intermediarios (Lymnaea stagnalis). Estos autores emplean un medio de cultivo complejo constituido por Medio Basal Eagle sin L-glutamina, Medio Esencial Mínimo Eagle, Medio Drosophila de Schneider, sales minerales, glucosa, Hepes y antibióticos, suplementado con suero humano. El pH de cultivo es 7,8-8,0, la temperatura es de 24°C y la atmósfera de cultivo es 1,73% CO₂ y 98,27% O₂. Los autores continúan el cultivo in vitro de los esporocistos madre obtenidos como se ha indicado, empleando el mismo medio y utilizando aire húmedo como atmósfera de cultivo. El esporocisto madre se desarrolla y evoluciona pero no produce esporocistos hijos, aunque al cabo de 10 días de cultivo es capaz de infestar al hospedador intermediario L. stagnalis. Los mencionados autores llevan también a cabo cultivos in vitro de esporocistos madre obtenidos a partir de caracoles experimentalmente infestados, empleando el medio anteriormente indicado y consiguiendo la liberación de esporocistos hijos durante las primeras 24 horas

de cultivo, y hasta la primera semana del mismo. Estos esporocistos hijos son mantenidos en cultivo doblando su tamaño en la primera semana del mismo, pero no existen indicios de maduración en los mismos. El cultivo de esporocistos hijos maduros obtenidos a partir de caracoles experimentalmente infestados, utilizando siempre el mismo medio de cultivo ya indicado, consigue un incremento en el tamaño de los mismos y formación de bolas germinales, pero los procesos de embrionización se detienen en los primeros estadios. Los embriones cercarianos que pudieran estar presentes en el momento de transferir los esporocistos hijos maduros al medio de cultivo son liberados pero no evolucionan.

1.3.6.2.- FAMILIA FASCIOLIDAE

Es indudable el interés sanitario y económico de muchas de las especies incluidas en esta familia, por lo que han sido objeto de atención por parte de los investigadores que dirigen sus esfuerzos hacia el cultivo in vitro de Trematodos Digénidos. Estos esfuerzos han sido orientados principalmente hacia el cultivo de una especie, Fasciola hepatica, con resultados diversos.

1.3.6.2.1.- FASCIOLA HEPATICA

A) *MIRACIDIOS, REDIAS Y CERCARIAS*

El cultivo de estos estadios larvarios fué emprendido por PULLIN (1973), quien empleó un medio básico de cultivo muy complejo basado en análisis de la hemolinfa de Lymnaea truncatula y en formulaciones de los medios comerciales NCTC 109 y Medio Eagle. El medio contiene sales inorgánicas, glucosa, aminoácidos, vitaminas y antibióticos pero no proteínas ni lípidos. El autor consigue el mantenimiento de las redias en este medio durante 5 días, pero éstas no evolucionan aunque las cercarias inmaduras, obtenidas a partir de estas redias, sí parecen evolucionar en el medio de cultivo según el autor, y al ser introducidas en agua se enquistan.

WILSON et al. (1971) consiguen transformar miracidios de F. hepatica en esporocistos madre, empleando el mismo medio de cultivo utilizado por PULLIN (loc. cit.), si bien estos esporocistos no prosiguen su evolución. La misma transformación tiene lugar también en hemolinfa de Lymnaea sp. según el autor.

B) METACERCARIAS

WIKERHAUSER & CVETNIĆ (1967) consiguen el mantenimiento in vitro durante 2 días de metacercarias desenquistadas según el procedimiento descrito por WIKERHAUSER (1960), empleando un medio de cultivo constituido por medio Hédon - Fleig suplementado con antibióticos. La temperatura de cultivo es de 37°C y la atmósfera de cultivo es aire. Los autores prolongan el tiempo de mantenimiento de las metacercarias in vitro hasta 14 días, en un cultivo monoxénico integrado por un primocultivo de células de riñón de embrión bovino en un medio constituido por solución Hanks con 5% de suero de caballo inactivado y 0,5% de lactalbúmina hidrolizada, pero no tiene lugar ningún tipo de desarrollo postmetacercarial. Posteriormente, WIKERHAUSER et al. (1970) amplían a 20 los días de mantenimiento de las metacercarias en cultivos monoxénicos, sin conseguir una evolución de las mismas.

OSUNA-CARRILLO & GUEVARA-POZO (1974) son los únicos autores, hasta el momento, que llevan a cabo un cultivo in vitro de metacercarias de F. hepatica, consiguiendo en 54 días cuadruplicar la longitud de los vermes, los cuales desarrollan ramificaciones intestinales, el primordio genital y masas testiculares e inician la evolución de la bolsa del cirro y glándulas vitelógenas. Para ello emplean un medio de cultivo basado en suero de caballo inactivado al que adicionan una suspensión de hematíes de oveja en solución Alsever. La temperatura de cultivo es de 38 °C y la atmósfera de cultivo es 10% CO₂ y 90% N₂.

Posteriormente DAVIES & SMYTH (1978) ensayan una gran diversidad de medios de cultivo, intentando conseguir la evolución de las metacercarias de F. hepatica in vitro. Estos autores indican que el medio más favorable es el constituido por NCTC 135 con un 50% de suero de pollo inactivado y glóbulos rojos de oveja. La temperatura de cultivo es de 37-38°C, el pH es de 7,4 apro-

ximadamente y la atmósfera de cultivo es aire. En estas condiciones los vermes, al cabo de 13 días, aumentan seis veces su tamaño y desarrollan ramificaciones secundarias en sus ciegos intestinales, pero la evolución del primordio genital no es importante, presentando su región posterior una apariencia bilobulada como única transformación a destacar.

C) ADULTOS

Son numerosos los autores que intentaron en su día el mantenimiento in vitro de F. hepatica con resultados diversos. Así, STEPHENSON (1947 b) establece el primer intento sistemático en este sentido y es el medio constituido por una solución de NaCl, KCl, CaCl₂, borato sódico y glucosa el que proporciona los mejores resultados, sobreviviendo en él los vermes durante 60 horas, a 36 °C y con un pH de 8,2-8,6. DAWES (1954) emplea solución Hédon - Fleig para mantener los adultos de F. hepatica in vitro y lo consigue durante 72 horas sin pérdida de movimiento ni de coloración natural por parte de los vermes. Ocasionalmente, el autor consigue una supervivencia de 5-6 días e incluso de 12 días en estas condiciones. ROHRBACHER (1957) emplea una solución fisiológica salina que contiene NaCl, KCl, CaCl₂, Mg₂Cl, Na₂HPO₄, NaHCO₃, citrato sódico y glucosa a la que adiciona extracto de hígado para conseguir un mantenimiento correcto de los vermes durante 21 días.

En las experiencias anteriormente mencionadas los criterios empleados para evaluar el mantenimiento de los vermes en el medio de cultivo están basados en la movilidad, coloración y apariencia general de los mismos, hecho que CLEGG (ver DAWES & MULLER, 1957) critica, demostrando anomalías fisiológicas en los vermes al cabo de tan sólo 3 horas de cultivo en solución Hédon - Fleig. Este autor mantiene los vermes durante 18 días en el medio mencionado. BENEX (1966) mantiene adultos de F. hepatica durante 40 días en un medio de cultivo constituido por solución Hanks, con un 20% de suero de conejo, un 0,3% de glucosa y un 0,05% de hematíes de carnero al que se adiciona antibióticos. La temperatura de cultivo es de 37-38°C y el pH es de 7,9. WIKERHAUSER & CVETNIĆ (1967) indican que los adultos se mantienen únicamente durante 5 días en solución Hédon - Fleig con antibióticos y durante tan sólo 2 días en medios de cultivos celulares, siendo la temperatura de 37°C y la

atmósfera de cultivo aire. FOSTER (1970) mantiene adultos de F. hepatica durante 16 días en medio Earle - Eagle a una temperatura anormalmente baja, 28°C.

RATCLIFFE et al. (1969) evalúan el mantenimiento de los adultos de F. hepatica in vitro examinando la producción de huevos. Estos autores mantienen los vermes en solución glucosalina e indican que es favorable la adición de un 30% de suero de ternero y de 10% de sangre de ternero.

1.3.6.2.2.- FASCIOLOPSIS BUSKI

LO & CROSS (1974) indican que los adultos de Fasciolopsis buski se mantienen durante 9 días en el medio de cultivo empleado por ROHRBACHER (loc. cit.), para el cultivo de adultos de Fasciola hepatica. La temperatura de cultivo es de 37°C y el pH es de 7,2-7,4.

1.3.6.2.3.- FASCIOLOIDES MAGNA

El cultivo in vitro de estadios larvarios de Fascioloides magna ha sido objeto de atención por parte de los investigadores. Ya en 1925, BARLOW indica la aparición de cambios metamórficos en el miracidio de esta especie cultivado en linfa de caracol, seguidos por crecimiento del esporocisto.

FRIEDL (1961 a, b) lleva a cabo cultivos de redias de F. magna en varias soluciones salinas fisiológicas que contienen aminoácidos individualizados, así como en medios con proteínas denaturalizadas y con productos resultantes de la degradación de proteínas. El autor indica que la supervivencia de las redias es óptima en solución Ringer a la que adiciona hidroxiprolina, prolina y serina (8-10 días). La adición de azúcares, acetato de sodio o proteínas desnaturalizadas no mejora los resultados. La temperatura de cultivo es de 25-29°C.

1.3.6.3.- FAMILIA STRIGEIDAE

1.3.6.3.1.- COTYLURUS LUTZI

Esta especie de Digénido es actualmente la única cuyo ciclo evolutivo ha sido completado a partir de huevos de adultos obtenidos in vitro procedentes de metacercarias.

VOGE & JEONG (1971) consiguen la evolución in vitro de tetracotilos de Cotylurus lutzi que originan adultos productores de huevos. El medio de cultivo empleado por los autores está constituido por NCTC 135 con un 50% de suero de pollo. La temperatura de cultivo es de 39-41°C, el pH es de 7,3-7,4 y la atmósfera de cultivo es aire. Los adultos originados in vitro presentan unas dimensiones, organografía y tiempo de desarrollo superponibles a los mostrados por los vermes obtenidos in vivo, aunque los huevos producidos por aquéllos no presentan cubierta externa rígida y no son capaces de embrionar. BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973) modifican el medio de cultivo empleado por VOGUE & JEONG (loc. cit.), quedando constituido por 40% NCTC 135, 40% de suero de pollo y 20% de extracto de mucosa intestinal de pollo. Utilizando este medio de cultivo, a una temperatura de 40°C y con aire como atmósfera de cultivo, los autores consiguen la evolución de tetracotilos de C. lutzi a adultos en 5 días con producción de huevos viables capaces de embrionar y eclosionar, originando miracidios capaces de infestar a caracoles de la especie Biomphalaria glabrata, los cuales, posteriormente, emiten cercarias que originan tetracotilos en otros individuos de caracoles de la misma especie. Estos tetracotilos son capaces de infestar, a su vez, a los hospedadores definitivos, Taeniopygia castanotus, que eliminan huevos del verme en sus heces algunas semanas después de su infestación experimental.

BASCH & DICONZA (1975) se ocupan del cultivo in vitro de estadios larvarios del Digénido C. lutzi. Estos autores cultivan cercarias obtenidas a partir de esporocistos procedentes del caracol Biomphalaria glabrata infestado experimentalmente, empleando un medio de cultivo constituido por sales minerales, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, glucosa y HEPES (ver DICONZA & BASCH, 1974). La temperatura de cultivo es de 25±1°C y el pH es de 7,0-7,2. Transcurridos 48 días, las cercarias han evolucionado a tetracotilos enquistados, los cuales son cultivados por los autores en el medio de cul-

tivo anteriormente empleado por BASCH, DICONZA & JOHNSON (loc. cit.), evolucionando dichas larvas hasta el estadio de adulto, si bien no hay producción de huevos. Los mismos autores llevan a cabo el cultivo in vitro de miracidios procedentes de hevos eliminados por adultos cultivados in vitro, empleando el mismo medio de cultivo ya descrito para el cultivo de cercarias y consiguiendo la evolución de los miracidios hasta esporocistos madre que contienen bolas germinales en su interior, en 7-10 días de cultivo.

1.3.6.3.2.- COTYLURUS ERRATICUS

MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) cultivan metacercarias de Cotylurus erraticus en un medio de cultivo integrado por M 199 o NCTC 135 con un 80% de suero de pollo y antibióticos. Estas metacercarias evolucionan y alcanzan el estadio adulto en 6 días, con producción de huevos, si bien éstos no son viables. La temperatura de cultivo es de 41 °C. Los autores indican que distintas proporciones de suero de pollo, tales como 20% y 40%, adicionadas a los medios M 199 o NCTC 135 permiten también la evolución de metacercarias a adultos con producción de huevos, aunque el tiempo necesario es más largo que el indicado anteriormente.

1.3.6.3.3.- COTYLURUS STRIGEOIDES

FRIED, BARBER & BUTLER (1978) emplean, para el cultivo in vitro de tetracotilos de Cotylurus strigeoides el mismo medio ya utilizado por BASCH et al. (1973) para el cultivo de Cotylurus lutzi. En dicho medio, constituido por NCTC 135 con un 40% de suero de pollo inactivado y un 20% de extracto de mucosa intestinal de pollo, FRIED et al. (loc. cit.) consiguen la evolución de tetracotilos desenquistados de C. strigeoides, obteniendo adultos productores de huevos al cabo de 6 días de cultivo, si bien dichos huevos presentan una cubierta muy fina y no parecen estar embrionados.

1.3.6.4.- FAMILIA DIPLOSTOMATIDAE

1.3.6.4.1.- DIPLOSTOMUM PHOXINI

El primer intento de cultivar in vitro esta especie de Digénido es debido a FERGUSON (1943), quien consigue que cercarias de esta especie, cultivadas en tejidos oculares de peces, ratas conejos u ovejas en solución Ringer, evolucionen alcanzando el estadio de metacercaria, con una apariencia normal, pero estas metacercarias no son infestantes.

Posteriormente, BELL & HOPKINS (1956) llevan a cabo un intento sistemático de conseguir in vitro la evolución de metacercarias de Diplostomum phoxini hasta el estadio adulto. Ensayan una serie de medios de cultivo entre los cuales destacan el constituido por suero de pato con un 10% de yema de huevo de pato no fertilizado, como aquel en que se obtiene los mejores resultados, llegando los vermes a producir espermatozoides activos en pequeñas cantidades, al cabo de 48 horas de cultivo, aunque no hay una evolución posterior de dichos vermes en los cinco días siguientes. La temperatura de cultivo es de 39°C y la atmósfera de cultivo es aire.

BELL & SMYTH (1958) trabajando en el cultivo de esta misma especie, D. phoxini, consiguen la evolución de metacercarias hasta adultos productores de espermatozoides y huevos, aunque éstos se muestran anormales. El medio de cultivo empleado por los autores está integrado por yema y albúmina de huevo de gallina, estando los cultivos sometidos a agitación discontinua.

WYLLIE, WILLIAMS & HOPKINS (1960) estudian los resultados obtenidos por BELL & HOPKINS (1956) en el cultivo de metacercarias de D. phoxini e intentan sustituir la yema de huevo de gallina empleada por estos autores en su medio de cultivo por sustancia menos complejas. Así, ensayan una gran variedad de medios de cultivo, entre los cuales destacan el constituido por solución fisiológica, glucosa y albúmina de huevo de gallina como medio básico al que adicionan extracto de levadura, suero de caballo y aminoácidos. La temperatura de cultivo es de 39±1°C, el pH es 6,0-7,0 y la atmósfera de cultivo es aire. En estas condiciones los autores consiguen la evolución de las metacercarias de D. phoxini, obteniendo, en 6 días de cultivo, adultos productores de huevos, aunque dichos huevos presentan una cubierta anormal. Pos-

teriormente, los mismos autores (WILLIAMS, HOPKINS & WYLLIE, 1961) intentan determinar la fracción del extracto de levadura que es utilizada por los vermes con la finalidad de sustituirla por un suplemento químicamente definido. Así, los autores emplean un medio de cultivo básico constituido por solución salina fisiológica, glucosa, suero de caballo y albúmina de huevo de gallina al que adicionan extracto de levadura, indicando que en dicho extracto existen dos fracciones activas, una de las cuales es una fracción dializable cuyo efecto puede ser reproducido mediante adición de aminoácidos, en tanto que la otra fracción es no dializable, resistente a la hidrólisis ácida y básica y cargada básicamente, y su efecto puede ser reproducido parcialmente mediante la adición de piridoxina al medio de cultivo.

Posteriormente KANNANGARA & SMYTH (1974) cultivan metacercarias de D. phoxini empleando medios líquidos, medios semisólidos, medios bifásicos, tubos de cultivos dobles, sistemas circulatorios y membranas carioalantoides de embriones de pollo. Las metacercarias evolucionan óptimamente en un medio de cultivo semisólido constituido por yema y albúmina de huevo de gallina (5:1) coagulados y macerados, siendo importante el tamaño de partícula existente en el medio, por lo que los autores indican la conveniencia de coagular las anteriores sustancias a 80°C durante 1½ hora y homogenizarlas a baja velocidad durante 15 segundos. Los vermes llegan a producir huevos en este medio, con cubierta irregular y provistos de opérculo. La temperatura de cultivo es de 41°C, el pH es de 7,4 aproximadamente y la atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.4.2.- DIPLOSTOMUM SPATHACEUM

KANNANGARA & SMYTH (1974) cultivan metacercarias de Diplostomum spathaceum ensayando los mismos medios de cultivo que emplean para las metacercarias de Diplostomum phoxini. Los autores indican que los mejores resultados referidos a D. spathaceum son los obtenidos en el medio de cultivo semisólido integrado por yema, albúmina y NCTC 135 (5:1:1), en el que los vermes presentan testículos y ovario al cabo de 6 días y sustancia vitelina y huevos en 10 y 12 días respectivamente, presentando dichos huevos una cubierta irregular en grosor. La temperatura de cultivo es de 41°C, el pH es de 7,4 apro-

ximadamente y la atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.4.3.- POSTHODIPILOSTOMUM MINIMUM

FERGUSON (1940) emplea solución salina Tyrode diluida con agua (5:3) a la que adiciona suero de pollo y extracto de levadura para el cultivo de metacercarias de Posthodiplostomum minimum. Estos vermes evolucionan hasta adultos en los que se observa espermatozoides y óvulos anormales y no viables. La temperatura de cultivo es de 39°C.

1.3.6.5.- FAMILIA ECHINOSTOMATIDAE

1.3.6.5.1.- ECHINOPARYPHIUM SERRATUM

HOWELL (1968) consigue cultivar in vitro metacercarias de Echinoparyphium serratum que evolucionan hasta llegar a mostrar espermatozoides en la vesícula seminal, testículos desarrollados, sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas o en el útero y óvulos aparentemente normales. El medio de cultivo empleado por el autor para la consecución de estos resultados incluye yema y albúmina de huevo de gallina, solución Hanks o Parker 199 y extracto de levadura. La temperatura de cultivo es de 39°C, el pH es 6,6-6,8 y la atmósfera de cultivo es aire. Los cultivos son sometidos a agitación continua.

1.3.6.5.2.- ECHINOSTOMA MALAYANUM

JAW & LO (1974) cultivan in vitro individuos adultos maduros e inmaduros procedentes de ratas (Rattus norvegicus) infestadas experimentalmente. Los vermes inmaduros son mantenidos durante un máximo de 14 días en Medio 199 y los adultos maduros durante 53 días en solución Earle conteniendo un 20% de suero de cerdo. No tiene lugar ningún tipo de crecimiento de los vermes in vitro. La temperatura de cultivo es de 37°C.

1.3.6.6.- FAMILIA PSILOSTOMATIDAE

1.3.6.6.1.- SPHAERIDIOTREMA GLOBULUS

BERNTZEN & MACY (1969) consiguen el desarrollo in vitro de metacercarias de Sphaeridiotrema globulus hasta el estadio adulto con producción de huevos capaces de embrionar y eclosionar, aunque no comprueban la capacidad infestante de los miracidios. Los autores emplean un medio de cultivo constituido por NCTC 109 con un 20% de yema de huevo de gallina. La temperatura de cultivo es de 42°C, el pH es 7,4-8,0 y la atmósfera de cultivo es 10% CO₂, 10% O₂ y 80% N₂. Los cultivos son sometidos a rotación durante 5 minutos cada 2 horas. Este trabajo constituye un hito en el cultivo in vitro de Trematodos Digénidos, pues, por primera vez se llega a conseguir la producción de huevos capaces de embrionar y eclosionar in vitro.

1.3.6.7.- FAMILIA LEUCOCHLORIDIOMORPHIDAE

1.3.6.7.1.- LEUCOCHLORIDIOMORPHA CONSTANTIAE

FRIED & CONTOS (1973), empleando un medio de cultivo constituido por NCTC 135 con un 20% de yema de huevo de gallina, consiguen el desarrollo in vitro de las metacercarias de Leucochloridiomorpha constantiae que llegan a alcanzar el estadio de adulto productor de huevos, algunos de los cuales muestran cubierta pero su viabilidad no ha sido determinada por los autores. La temperatura de cultivo es de 37,5-42°C, el pH varía entre 7,2 y 8,0 y la atmósfera de cultivo es aire. Posteriormente, los mismos autores (1976) indican que el medio de cultivo por ellos utilizado permite una transformación tegumentaria durante la maduración de los vermes in vitro que es muy similar a la que ocurre en los vermes obtenidos experimentalmente en pollos domésticos.

1.3.6.7.2.- AMBLOSOMA SUWAENSE

SCHNIER & FRIED (1980) consiguen el desarrollo in vitro de metacercarias de Amblosoma suwaense que evolucionan hasta llegar a adultos, algunos de los cuales contienen huevos aparentemente normales pero cuya viabilidad no ha sido determinada. El medio de cultivo en que los autores consiguen los resultados expuestos está constituido por NCTC 135 con un 20% de yema de huevo de gallina, siendo así idéntico al empleado por FRIED & CONTOS (1973) para el cultivo de Leucochloridiomorpha constantiae. La temperatura de cultivo es de 37,5°C y la atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.8.- FAMILIA GYMNOPHALLIDAE

1.3.6.8.1.- PARVATREMA TIMONDAVIDI

Metacercarias de Parvatrema timondauidi son cultivadas in vitro por YASURAOKA et al. (1974), llegando estos vermes a alcanzar el estadio adulto con producción de huevos capaces de embrionar y formar un miracidio en su interior. Los autores indican que los resultados óptimos son conseguidos en un medio de cultivo constituido por NCTC 109 al que se adiciona un 20% de suero bovino o de pollo inactivado. La temperatura de cultivo es de 41°C y la atmósfera de cultivo es 8% CO₂ en aire. Los cultivos son sometidos a rotación (12 revoluciones por hora).

1.3.6.9.- FAMILIA HETEROPHYIDAE

1.3.6.9.1.- METAGONIMUS YOKOGAWAI

En un medio de cultivo constituido por NCTC 109, extracto de embrión bovino y suero humano (3:4:3), YASURAOKA & KOJIMA (1970) cultivan metacercarias de Metagonimus yokogawai consiguiendo que estos vermes evolucionen in vitro

hasta el estadio adulto en el que tiene lugar gametogénesis, se observa espermatozoides en la vesícula seminal de los vermes y huevos en útero con cubiertas imperfectamente formadas. La temperatura de cultivo es de 37,5°C, el pH es 7,2 y la atmósfera de cultivo presenta un 8% CO₂ en aire.

1.3.6.10.- FAMILIA MICROPHALLIDAE

1.3.6.10.1.- GYNAECOTYLA ADUNCA

HUNTER & CHAIT (1952) emplean un medio de cultivo consistente en agua de mar al 1% para el cultivo in vitro de metacercarias de Gynaecotyla adunca, observando dichos autores la presencia de espermatozoides en el conducto eyaculador y cirro de los vermes transcurridas 1-3 horas de cultivo y formación de huevos al cabo de 10-12 horas, con producción de huevos normales transcurridas 80 horas desde el inicio del cultivo. La temperatura de cultivo es de 40°C.

1.3.6.10.2.- MICROPHALLUS PYGMAEUS

PASCOE et al. (1970) y RICHARDS et al. (1972) mantienen in vitro esporocistos hijos maduros de Microphallus pygmaeus, empleando el Medio 199 conteniendo solución Earle modificado al objeto de simular el medio interno del molusco marino hospedador. Los primeros autores prolongan el mantenimiento de los esporocistos hasta 36 días a 4°C, en tanto que los autores citados en segundo lugar aseguran un mantenimiento de los esporocistos durante 56 días a 10°C.

1.3.6.10.3- MICROPHALLUS SIMILIS

Una amplia variedad de medios de cultivo es ensayada por DAVIES & SMYTH (1979) para el cultivo in vitro de metacercarias de Microphallus similis. Dichas metacercarias evolucionan a adultos productores de huevos en una gran

parte de los medios ensayados, siendo el constituido por NCTC 135 con un 20% de suero bovino fetal aquél en que los autores obtienen una mayor proporción de vermes con huevos. Parte de estos huevos presentan un aspecto normal pero no son capaces de embrionar y están acompañados por huevos constituidos por células vitelinas pero no óvulo o por huevos sin opérculo y con cubiertas alteradas. La temperatura de cultivo es de 38-41°C, el pH es aproximadamente 7,4 y la atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.10.4.- MICROPHALLOIDES JAPONICUS

Microphalloides japonicus es cultivado desde el estadio de metacercaria hasta el de adulto productor de huevos por FUJINO et al. (1977). Estos autores emplean un medio de cultivo constituido por Eagle al que adicionan suero de pollo.

1.3.6.11.- FAMILIA TROGLOTREMATIDAE

1.3.6.11.1.- PARAGONIMUS WESTERMANI

YOKOGAWA, OSHIMA & KIHATA (1955, 1958) y YOKOGAWA (1965) cultivan metacercarias de Paragonimus westermani en un medio de cultivo consistente en suero de gato diluido en solución Tyrode, al que adicionan hematíes de gato tras 3 semanas de cultivo. Los vermes incrementan 12 veces su tamaño tras 203 días de cultivo y muestran ovario, útero y testículos diferenciados, aunque no se observa sustancia vitelina ni huevos. La temperatura de cultivo es de 37°C y el pH oscila entre 7,0 y 7,4.

KANNANGARA (1974) emplea un medio de cultivo muy complejo integrado por suero humano (40%), NCTC 135 (40%) con extracto de levadura (2%) y glucosa (1%), extracto de embrión de pollo (10%) y eritrocitos humanos (10%) para cultivar metacercarias de P. westermani, consiguiendo que los vermes evolucionen y diferencien primordios testiculares, de ovario y útero al cabo de 17 días de cultivo. Un verme muestra óvulos imperfectamente formados y mate-

rial granular de origen vitelino al cabo de 43 días de cultivo, momento en el que ocurre la contaminación de los cultivos. La temperatura de cultivo es de 37°C y los cultivos son sometidos a agitación (40 r.p.m.).

Es interesante destacar los intentos llevados a cabo para conseguir el cultivo in vitro de otras especies de Troglotremátidos tales como Paragonimus miyazakii (HATA et al., 1982, YOKOGAWA et al., 1978) y Paragonimus ohi-rai (HATA et al., 1982).

1.3.6.12.- FAMILIA OPISTORCHIIDAE

1.3.6.12.1.- CLONORCHIS SINENSIS

HOEPPLI & CHU (1937) mantienen metacercarias y adultos de Clonorchis sinensis durante cinco meses en un medio de cultivo constituido por suero de caballo y solución Tyrode o plasma de conejo a partes iguales pero no consiguen ningún crecimiento en los vermes. La temperatura de cultivo es de 37°C y el pH oscila entre 7 y 8. Posteriormente, SUN (1969) estudia la posibilidad de emplear el Medio 199 para el mantenimiento de adultos de C. sinensis in vitro con y sin adición de suero de conejo, consiguiendo que los vermes sobrevivan durante 96 y 28 días respectivamente. La temperatura de cultivo es de 37°C.

1.3.6.12.2.- OPISTORCHIS VIVERRINI

Vermes adultos de esta especie son mantenidos in vitro durante 15 días por TUTI, VICHASRI & SIRISINHA (1982) en medio basal Earle. La adición a este medio de un 5% de bilis humana normal no ultrafiltrada, o de suero humano o de hamster aumenta el período de mantenimiento hasta 40 días e incrementa diez veces la producción de huevos por los vermes.

1.3.6.13.- FAMILIA ISOPARORCHIIDAE

1.3.6.13.1.- ISOPARORCHIS HYPSELOBAGRI

NIZAMI & SIDDIQI (1975) mantienen adultos de Isoparorchis hypselobagri en solución fisiológica conteniendo glucosa durante 49 días si bien los vermes pierden peso a lo largo del cultivo y su producción de huevos se deteriora progresivamente. La adición de sangre de bovino al medio de cultivo reduce a la mitad la pérdida de peso experimentada por los vermes en cultivo. El pH de cultivo es de 7,0 inicialmente, descendiendo a 5,5-4,5 al cabo de 1-2 días de cultivo. La atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.14.- FAMILIA BUCEPHALIDAE

1.3.6.14.1.- BUCEPHALOIDES GRACILESCENS

Medios de cultivo líquidos, semisólidos y bifásicos son empleados por HALTON & JOHNSTON (1983) en el cultivo in vitro de metacercarias de Bucephaloides gracilescens. Los autores indican que el medio de cultivo semisólido constituido por NCTC 135, suero de pollo, albúmina y yema de huevo de gallina (1:1:1:1) consiguen la evolución de las metacercarias a adultos productores de huevos, en 14 días, aunque éstos no son viables. La temperatura de cultivo es de 18°C y la atmósfera de cultivo es aire.

1.3.6.15.- FAMILIA PLAGIORCHIIDAE

1.3.6.15.1.- HAPLOMETRA CYLINDRACEA

DAWES & MULLER (1957) llevan a cabo varios ensayos en los que utilizan las soluciones Ringer Hédon - Fleig como medio de cultivo para Haplometra ci-

lindracea. Los autores consiguen un período de mantenimiento máximo de 105 días situando los vermes adultos en solución Hédon - Fleig en condiciones no estériles, a un pH de 8,2-8,4 y a una temperatura de cultivo de 20°C. La adición de glucosa, extracto bovino o triptosa muestra únicamente un ligero incremento en el tiempo de mantenimiento de los vermes.

1.3.6.15.2.- HAEMATOLECHUS MEDIOPLEXUS

CHURCHILL & CROWTHER (1961) mantienen un adulto de Haematolechus medioplexus en un medio de cultivo constituido por agar nutriente Difco y solución Ringer durante 40 días. BURTON (1962) estudia el consumo de glucosa por H. medioplexus y mantiene estos vermes durante 50 horas en solución fisiológica salina con un 1-2% de glucosa, llegando a indicar la necesidad de un aporte externo de glucosa para el mantenimiento de las reservas glicogénicas de los vermes y para la espermatogénesis.

CAPITULO SEGUNDO

MATERIAL
Y
METODOS

2.- MATERIAL Y METODOS

Considerando la estructuración general del presente trabajo y teniendo en cuenta que los estudios, tanto cronobiológicos como histológicos y de cultivo in vitro, que en él se lleva a cabo, están referidos a una única especie de Trematodo, el Digénido Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu, 1985, establecemos un único capítulo de Material y Métodos.

Dentro de este capítulo describimos detalladamente el material biológico sobre el que se ha trabajado, que incluye el material parasitológico constituido por las formas larvarias y adulta de la especie de Brachyláimido en cuestión, cuyo ciclo evolutivo exponemos, y las especies de Gasterópodos y Micromamíferos que actúan como hospedadores intermediarios y definitivos en el mismo. Indicamos, asimismo, la procedencia u origen del material parasitológico (cercarias, metacercarias y adultos de B. ruminæ) utilizado en los estudios cronobiológicos, histológicos y de cultivo, ya que en unos casos el material procede de la Naturaleza y en otros casos su origen es experimental, es decir, procede de infestaciones experimentales realizadas en el Laboratorio.

Además del material biológico, tanto parasitológico como de hospedadores, hemos precisado del concurso de materiales no biológicos que englobamos bajo la denominación de materiales especiales y cuya descripción y enumeración hemos llevado a cabo considerando el tipo de estudio (cronobiológico, histológico o de cultivo) en que han sido empleados.

La metodología engloba todas aquellas técnicas y procesos necesarios para la consecución de los estudios llevados a cabo. Enumeramos y describimos, en primer lugar, aquellas técnicas que tienen un carácter general, siendo de importancia básica tanto para los estudios cronobiológicos, como para los histológicos y de cultivo. Estas técnicas son las malacológicas y mastozoológicas que incluyen la búsqueda y recolección de Gasterópodos hospedadores en la Naturaleza y su adecuado mantenimiento en el Laboratorio, así como el mantenimiento de los Micromamíferos hospedadores definitivos, necesario para la consecución de infestaciones experimentales.

Las técnicas helmintológicas engloban todos los procesos practicados sobre el material parasitológico en sus distintas fases, tanto larvarias como adulta, siendo éstos los dirigidos a la detección y reconocimiento correctos del

material parasitológico (quetotaxia) y aquellos procesos de fijación, coloración y montaje del material encaminados a permitir su estudio general al microscopio y a mantener un material que, en cualquier momento, pueda ser utilizado en estudios comparativos con material procedente de tinciones específicas o de técnicas puntuales.

Las distintas infestaciones experimentales realizadas en el Laboratorio, tanto de segundos hospedadores intermediarios como de hospedadores definitivos, quedan aquí indicadas como técnicas experimentales de infestación. A ellas haremos referencia siempre que sea necesario indicar el origen experimental del material parasitológico.

Además de estas técnicas generales, indicamos con detalle aquellas técnicas específicas y propias de los distintos tipos de experiencias realizadas sobre el material biológico. Algunas de ellas, como es el caso de las técnicas cronobiológicas, han sido estructuradas y aplicadas por primera vez en nuestro Laboratorio, en tanto que otras, como sucede con las técnicas histológicas, si bien siguen en su estructuración general los procedimientos habitualmente empleados por distintos autores, presentan, asimismo, algunas peculiaridades derivadas de las características propias del material biológico sobre el que han sido aplicadas, que creemos conveniente puntualizar. Algo similar ocurre con las técnicas de cultivo in vitro, en las que hemos mantenido sus características generales establecidas por otros autores, aún cuando muestran algunas modificaciones adecuadas al objeto concreto de estudio sobre el que han sido realizadas.

2.1.- MATERIAL

Incluiremos en este apartado el estudio del material utilizado en nuestro trabajo, distinguiendo entre el material propiamente biológico y los materiales especiales que concurren en el mismo.

2.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Consideramos como material biológico tanto el material parasitológico

constituido por el Trematodo Digénido Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu, 1985 en sus formas larvarias y adulta, como los Gasterópodos Pulmonados que actúan como primer y segundo hospedadores intermediarios y los Micromamíferos actuantes como hospedadores definitivos.

2.1.1.1.- MATERIAL PARASITOLÓGICO: BRACHYLAIMA RUMINÆ MAS-COMA ET MONTOLIU, 1985

Dentro de este apartado expondremos detalladamente el ciclo evolutivo de la especie de Trematodo Digénido Brachylaima ruminæ que constituye, en definitiva, el objeto de nuestro estudio, incluyendo la descripción detallada de todas las formas, tanto larvarias como adulta, que concurren en dicho ciclo.

2.1.1.1.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ADULTO

La descripción morfo-anatómica del adulto de Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu, 1985 que aquí exponemos está basada en ejemplares experimentales fijados y montados in toto.

- Hospedadores: Eliomys quercinus ophiusæ Linnaeus, 1766 (Gliridae);
Rattus rattus Linnaeus, 1758, Mus musculus Linnaeus, 1758 (Muridae).
- Microhábitat: intestino delgado, preferentemente duodeno.
- Clasificación sistemática:

Phylum Plathelminthes

Superclase Trematoda Rudolphi, 1809

Clase Digenea Van Beneden, 1858

Orden Brachylaimida (La Rue, 1957)

Superfam. Brachylaimoidea Allison, 1943

Fam. Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930

Subfam. Brachylaiminae Joyeux et Foley, 1930

Gen. Brachylaima Dujardin, 1843

Brachylaima ruminæ Mas-Coma et Montoliu, 1985

El adulto presenta un cuerpo ovalado, alargado y provisto de un tegumento grueso que muestra una espinulación bien marcada en la parte anterior del Digénido, extendiéndose dicha espinulación generalmente hasta un nivel acetabular. Sin embargo, el límite posterior de las espinas es muy variable, pudiendo llegar a alcanzar incluso el nivel anterior del ovario. La evidencia de esta espinulación está en función de la perfecta conservación del tegumento, fácilmente deteriorable durante los procesos de fijación y montaje.

El verme presenta dos ventosas bien desarrolladas, estando situada la ventosa oral subterminalmente y en posición ventral, en tanto que el acetábulo, ventral, se localiza en el límite del primer tercio anterior del cuerpo.

El aparato excretor es de tipo "stenostoma", con dos canales colectores principales bien visibles que confluyen en una vesícula excretora posterior, corta, que comunica al exterior mediante el poro excretor emplazado en el extremo posterior del cuerpo.

El aparato digestivo se inicia con un espacio prefaríngeo variable, visible o no según los individuos, que se continúa en una faringe ovalada, relativamente grande, donde se inician, tras un trayecto esofágico casi inexistente, dos ciegos intestinales que corren paralelamente a los bordes laterales del cuerpo, extendiéndose hasta casi el borde posterior del mismo.

El aparato genital masculino está integrado por dos testículos subiguales localizados en el último tercio del cuerpo, intracecalmente. Su forma es ovalada y presentan la disposición típica de los Brachyláimidos, uno anterior al ovario y otro posterior al mismo. Los conductos deferentes convergen en una bolsa del cirro grande, larga y contorneada, que contiene un cirro inerte que emerge al evaginarse por un atrio genital ventral. El poro genital se sitúa ventralmente, aproximadamente en el eje longitudinal del cuerpo, y a un nivel ligeramente anterior o coincidente con el primer testículo, pero nunca posterior al nivel medio de éste.

El aparato genital femenino está constituido por un ovario redondeado y localizado intertesticularmente. Las glándulas vitelógenas se sitúan paralelamente a los bordes laterales del cuerpo con emplazamiento extracecal, extendiéndose desde un nivel aproximadamente acetabular hasta el nivel medio del primer testículo. Los viteloductos parten lateralmente, de la parte posterior de las glándulas vitelógenas, dirigiéndose hacia la parte central del

cuerpo y convergiendo en un pequeño reservorio vitelino situado directamente por debajo del ovario. El útero se inicia en el ootipo, es decir, a nivel post-ovárico y asciende entre ovario y testículo anterior, conformando una serie de asas uterinas, hasta llegar a alcanzar la bifurcación intestinal, para descender nuevamente hasta conformar la porción uterina final, en la cual se distingue un metratermo bien evidente que desemboca, por último, en el poro genital. Los huevos son ovalados, operculados y embrionados en el momento de la puesta, adquiriendo un color amarillento pardo tanto más oscuro cuanto más próximos se encuentren al poro genital.

En la Tabla 1 exponemos las mediciones realizadas sobre especímenes adultos obtenidos experimentalmente en los Roedores Eliomys quercinus ophiu-sae, Rattus rattus y Mus musculus, los cuales son asimismo los que actúan en la isla de Formentera como hospedadores definitivos, procediendo los animales de las dos últimas especies de cepas mantenidas en el Laboratorio. Indicamos, en esta misma Tabla, la edad de las metecercarias utilizadas para la infestación de los Micromamíferos ensayados.

2.1.1.1.2.- CICLO EVOLUTIVO

El ciclo evolutivo de B. ruminæ ha sido experimentalmente dilucidado, en su totalidad, en nuestro Laboratorio por MONTOLIU (1978) y MAS-COMA & MONTOLIU (1978 a, b).

Se trata de un ciclo triheteroxeno terrestre en el que actúan como hospedadores intermediarios los Gasterópodos siguientes:

- Primer hospedador intermediario: Rumina decollata (Linnaeus, 1758) (Subulinidae).
- Segundo hospedador intermediario: Rumina decollata (Linnaeus, 1758) (Subulinidae); Eobania vermiculata (Müller, 1774), Theba pisana (Müller, 1774), Otala (Otala) punctata (Müller, 1774), Trochoidea (Xerocrassa) caroli (Dohrn et Heyne-mann, 1862) (Helicidae); Ferussacia follicu-la (Gmelin, 1790) (Ferussacidae).

Hospedador	<u>Rattus rattus</u>	<u>Eliomys quercinus ophiusae</u>	<u>Mus musculus</u>
Edad adultos	10 días	15 días	22 días
Edad metacerc.	13 meses	11 meses	6 meses
	n=5	n=5	n=10
	V.E.	V.E.	V.E.
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
Longitud	2407-2662	2870-3194	2863-3681
Anch. máx.	517-557	547-593	536-656
Vent. oral	211-223/180-209	223-230/210-219	204-225/195-225
Acetábulo	194-201/181-194	206-219/198-212	202-225/187-202
Rel. VO/VV	1,00-1,27	1,08-1,22	0,89-1,24
Faringe	86-93/104-111	97-109/108-122	67-112/105-127
Test. I	259-296/187-252	255-296/201-237	268-313/238-283
Test. II	266-304/209-263	252-304/227-252	213-358/246-298
Ovario	187-205/137-170	180-198/137-160	194-238/171-208
Huevos	26,5-32,5/14,5-16	25-30,5/14,5-16	26-30/15-16,5
Dist. VO-VV	365-456	532-653	417-641
Dist. VV-TI	836-957	1041-1201	1203-1636
	2541	3028	3273
	528	570	581
	218/198	227/215	217/208
	198/186	215/201	213/195
	1,16	1,13	1,09
	90/108	102/115	97/115
	277/209	281/219	292/265
	288/237	288/238	262/268
	196/158	189/147	217/193
	29/15,5	28/16	27,2/15,5
	418	597	517
	901	1131	1409

Tabla 1.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones en μm de adultos experimentales obtenidos en distintos hospedadores (superficies en μm^2) (según MONTOLIU, 1984).

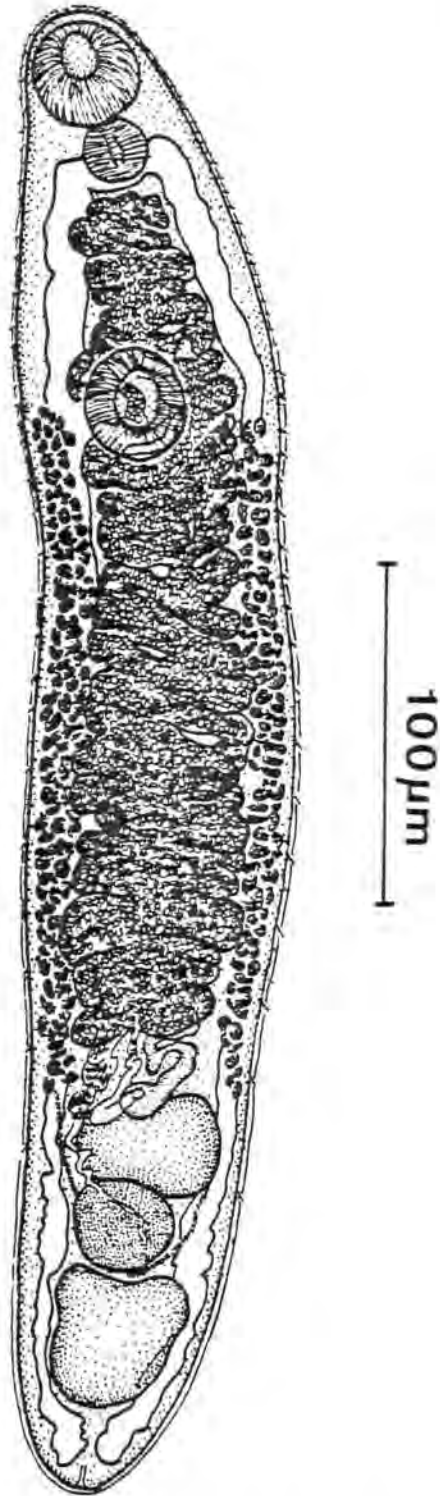


Fig. 1.- Brachylaima ruminiae: morfología general del adulto: ejemplar de 21 días obtenido experimentalmente en Mus musculus en visión ventral.

- Localización geográfica: Formentera (Islas Pitiusas).

De acuerdo con los estudios efectuados, el ciclo de Brachylaima ruminiae se desarrolla en la isla de Formentera según el esquema siguiente:

- los huevos son eliminados al medio externo directamente con las heces por el Micromamífero hospedador definitivo (Eliomys quercinus ophiusae, Rattus rattus y Mus musculus);
- estos huevos son ingeridos por el Gasterópodo terrestre primer hospedador intermediario en cuyo interior eclosionan, liberándose el miracidio a nivel de tracto digestivo y originándose los esporocistos ramificados que se localizarán en el hepatopáncreas;
- las cercarias producidas por los esporocistos, cercarias terrestres de tipo microcerco, salen activamente del Molusco al medio externo donde se mantienen vivas en condiciones de humedad adecuadas;
- las cercarias en libertad reptan sobre el sustrato húmedo, contactando con otro Gasterópodo terrestre actuante como segundo hospedador intermediario, en el cual penetran por el orificio excretor y ascienden, vía canal excretor, hasta alcanzar el riñón donde evolucionan, alcanzando el estadio de metacercaria infestante (un número menor es capaz de alcanzar el estadio infestante también a nivel de glándulas pédeas, al menos en R. decollata);
- las metacercarias, no enquistadas, alcanzan su tamaño definitivo transcurridos varios meses tras la infestación del Gasterópodo con la cercarias;
- el Micromamífero hospedador definitivo se infesta por ingestión del caracol segundo hospedador intermediario, quedando en libertad las metacercarias que migran por el tracto digestivo hasta alcanzar el nivel duodenal del intestino delgado donde evolucionan hasta adultos grávidos.

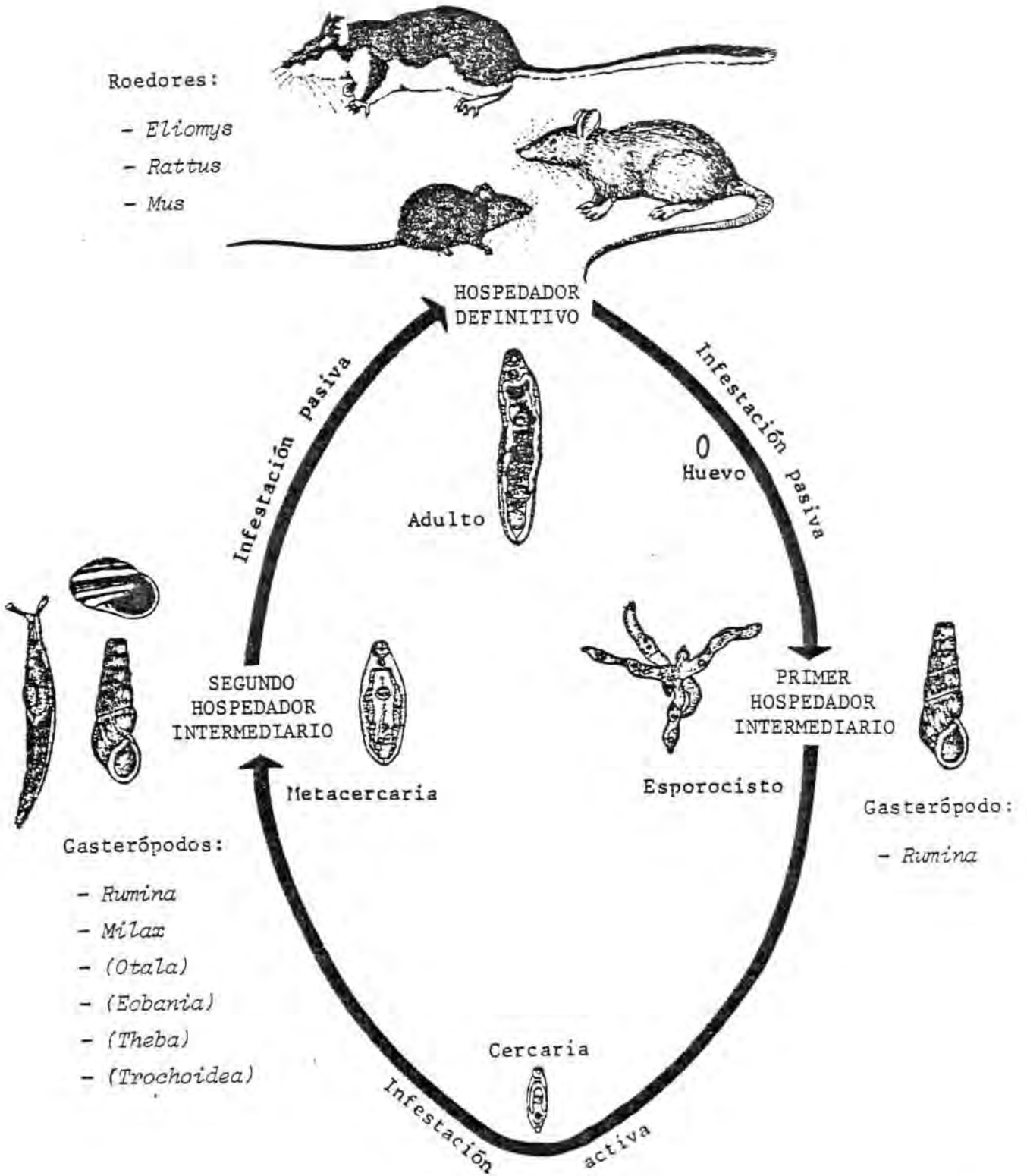


Fig. 2.- Esquema general del ciclo evolutivo de *Brachylaima ruminiae* en la isla de Formentera.

2.1.1.1.3.- CARACTERIZACION DE LOS ESTADIOS LARVARIOS

Procedemos, a continuación, a la descripción detallada de los distintos estadios larvarios que concurren en el ciclo evolutivo de B. ruminæ.

A) ESPOROCISTOS

Los esporocistos se localizan, en el Gasterópodo primer hospedador intermediario, a nivel del hepatopáncreas o glándula digestiva del Pulmonado, pudiendo extenderse hasta las paredes externas del riñón e incluso ocupar espacios libres alrededor del intestino en casos de parasitación extremadamente intensa.

Presentan un aspecto sacciforme muy ramificado, alcanzando estas ramificaciones una longitud muy variable y oscilando sus diámetros entre 45 y 334 μm . Su pared externa es extremadamente fina y transparente, permitiendo observar la presencia de un elevado número de cercarias en el interior de casi todas las ramas, coexistiendo todo tipo de estadios evolutivos, desde verdaderas bolas germinales hasta cercarias completamente desarrolladas y muy activas.

La emisión de cercarias maduras por los esporocistos tiene lugar a través de los poros terminales situados en los extremos de las ramificaciones. Por delante de cada poro terminal se sitúa una "cámara de eyección" separada del resto de la ramificación por una estrangulación marcada, que probablemente interviene en la expulsión de las cercarias al comprimir sus paredes y ejercer presión sobre la cercaria en ella situada, dirigiéndola hacia el orificio de salida.

B) CERCARIAS

Consideramos en este apartado tanto la morfología y anatomía de las cercarias maduras, es decir, recién emitidas, como su quetotaxia y algunos aspectos de su emisión y comportamiento.

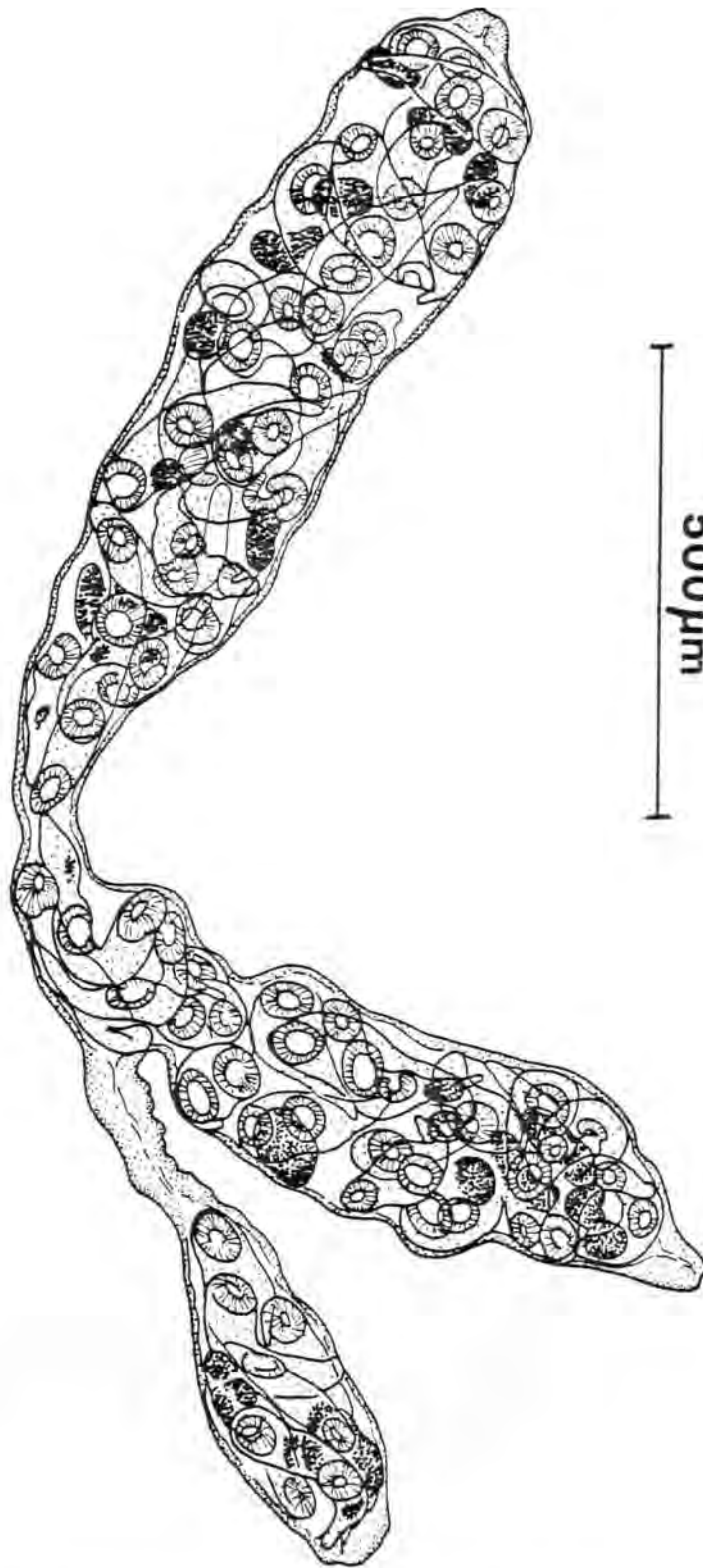


Fig. 3.- Brachylaima ruminiae: ramificaciones terminales de un esporocisto.



Fig. 4 A) Brachylaima ruminae: microfotografía de un esporocisto ramificado procedente de Rumina decollata naturalmente infestado. x 36.

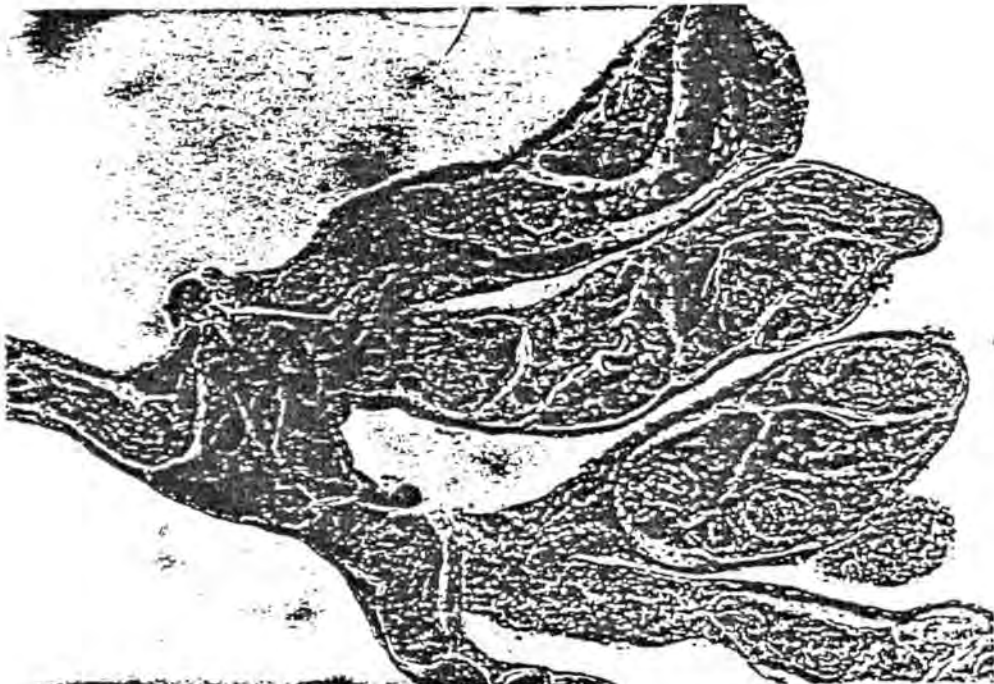


Fig. 4 B) Brachylaima ruminae: microfotografía de un detalle de esporocisto de la figura anterior mostrando una ramificación terminal. x 130.

a) *Morfología y anatomía*

La cercaria de Brachylaima ruminae pertenece al grupo de las cercarias de tipo microcerco (pero no acuática sino terrestre) caracterizado por la presencia de una cola reducida a un muñón caudal, diferenciado del resto del cuerpo por un ligero estrangulamiento.

El cuerpo de la cercaria es lanceolado, provisto de un tegumento aparentemente liso pero en el que es posible diferenciar una finísima espinulación homogéneamente distribuída por todo el cuerpo.

Presenta dos ventosas circulares y subiguales, situándose la ventosa oral en la región anterior con emplazamiento subterminal-ventral, mientras que el acetábulo se localiza en una zona ligeramente post-ecuatorial.

El aparato digestivo está constituido por una faringe voluminosa y dos ciegos intestinales cortos, que suelen terminar a nivel acetabular medio.

En la región post-acetabular se aprecia claramente dos agrupaciones de células glandulares laterales, distinguiéndose la presencia de 6 células glandulares en cada uno de estos grupos. Sus canales glandulares se dirigen hacia la parte apical, lateralmente y más o menos paralelamente a las paredes corporales, desembocando en la región anterior de la abertura oral.

Se evidencia un primordio genital de aspecto granuloso situado en la parte posterior del cuerpo, a nivel medio entre acetábulo y muñón, localizándose antes de la bifurcación de los canales excretores principales.

El aparato excretor es de tipo "stenostoma", presentando una vesícula excretora más o menos piriforme, en la que convergen dos canales colectores principales en cuyo interior puede observarse, sin dificultad, el movimiento vibrátil de los cilios. La proyección del excretor al exterior se realiza mediante un corto canal posterior que se bifurca a nivel medio del muñón caudal, desembocando ambas bifurcaciones simétricamente cerca de su extremo final. Los canales colectores ascienden sin llegar al borde posterior de la ventosa oral y descienden nuevamente hasta nivel acetabular medio, lugar donde confluyen las ramificaciones procedentes de las células flamíferas. Estas células flamíferas se distribuyen según la siguiente fórmula:

$$2 ((3 + 3) + (3))$$

Las dimensiones de las cercarias tanto in vivo como fijadas y montadas in toto son expuestas en la Tabla 2.

b) *Quetotaxia*

La distribución de sensores, o quetotaxia, de la cercaria de Brachylaima ruminae se caracteriza, principalmente, por su simplicidad. Las papilas o sensores se concentran, principalmente, sobre las dos ventosas, siendo escaso el número de papilas somáticas laterales y casi nulas las papilas ventrales y dorsales.

Región cefálica

Papilas de la boca por cada hemicuerpo (50 cercarias examinadas)

$$C_I = 2C_{IV} \text{ en entorno bucal} + 1C_{IL} + 1C_{ID}$$

$$C_{II} = 10 \text{ papilas dispuestas regularmente alrededor de la boca}$$

$$C_{III} = 5C_{III}^V + 6C_{III}^L + 11C_{III}^D \text{ (10 + 1D)}$$

Papilas de la región anterior (papilas del estilete según RICHARD, 1971) (27 cercarias examinadas)

$$H(=St) = \text{aproximadamente 18 papilas}$$

Cuerpo, papilas por cada hemicuerpo (50 cercarias examinadas)

$$A_I = 1 \text{ ó } 2A_I$$

$$A_{II} = 1 \text{ ó } 2A_{II}^L$$

$$A_{III} = 1A_{III}^L$$

$$M_I = 3M_I^L$$

$$P_I = (\text{a veces } 1P_I^L)$$

$$P_{II} = 1P_{II}^L$$

$$P_{III} = 4P_{III}^L$$

Acetábulo (50 cercarias estudiadas)

$$S_I = 6S_I$$

$$S_{II} = 6S_{II}$$

$$S_{III} = 3 \text{ ó } 4S_{III}$$

	Fijadas entre porta y cubreobjetos			in vivo		
	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s
Longitud	210-335	255	30,8	410-547	486	56
Anch. máx.	79-157	112	12,6	155-198	178	16,8
Vent. oral	52-67/47-62	59/56	2,7/3,1	75-93/72-90	86/79	8,2/7,3
Acetábulo	46-61/39-58	52/49	3,3/3,2	75-93/75-90	85/82	7,7/7
Rel. VO/VV	1,07-1,58	1,31	0,12	0,91-1,04	0,97	0,05
Faringe	14-24/18-35	18/26	2,6/3,1	32-47/25-39	41/33	5,5/5,4
Prim. genit.	29-60/15-29	48/20	7,2/3,3	-	-	-
Dist. VO-VV	45-109	65	12,3	90-173	145	29,3
Ap. caudal (l.x a.b.)	9-23/11-26	14/19	2,9/2,9	32-43/47-54	38/50	4,5/3,3

1 139 1

Tabla 2.- Brachylaima ruminae: dimensiones en μm de cercarias emitidas por ejemplares de Rumina decollata naturalmente infestados (Isla de Formentera); apéndice caudal: l. x a. b. = longitud x anchura base (según MONTOLIU, 1984).

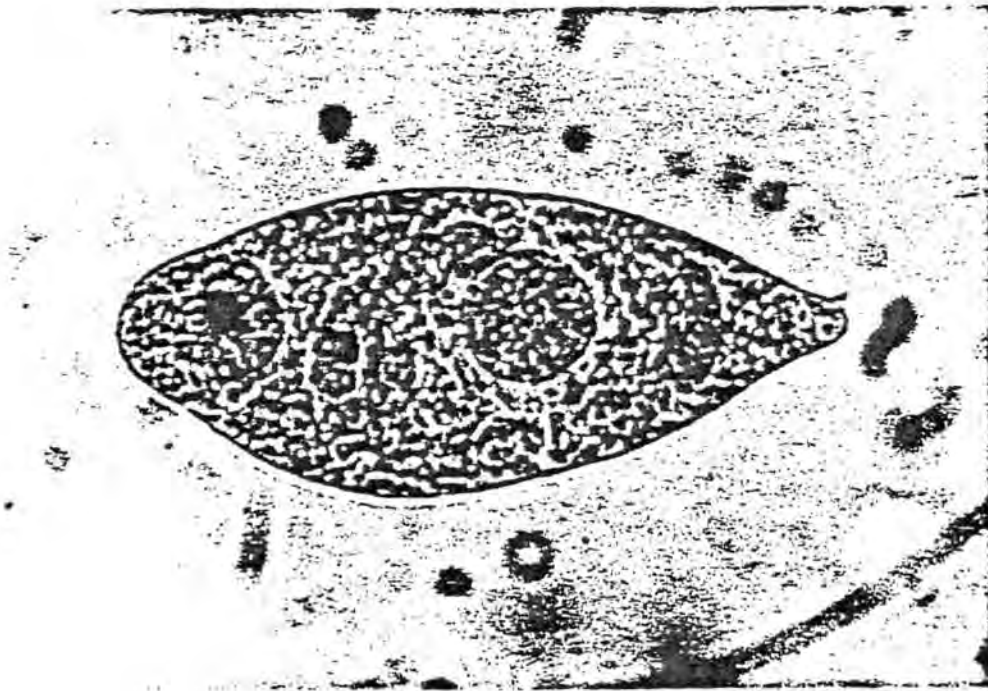
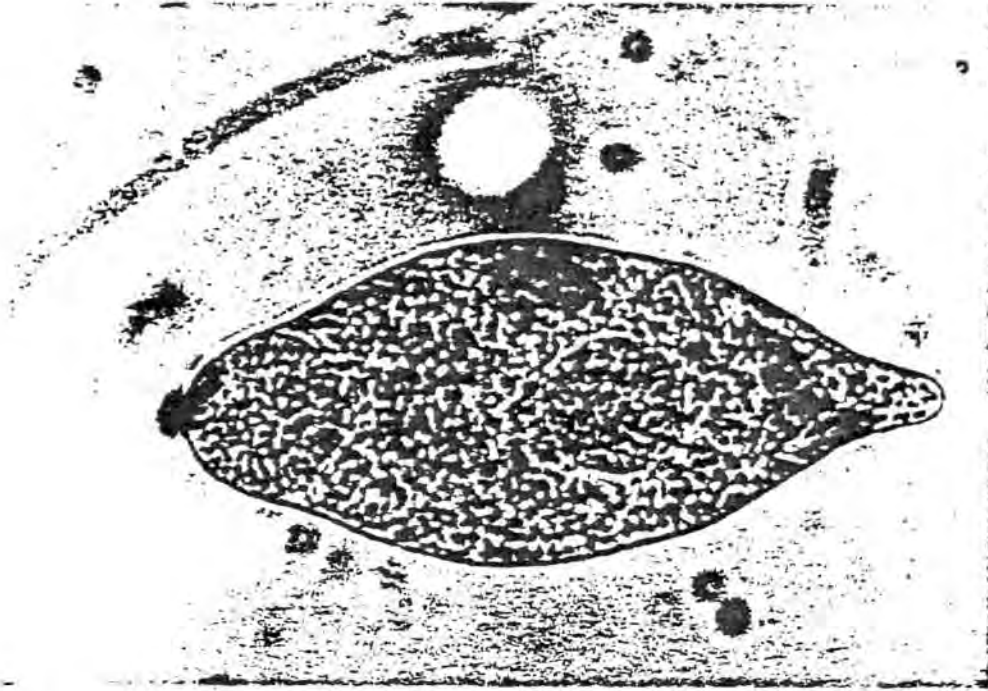


Fig. 6.- Brachylaima ruminae: microfotografías de dos cercarias maduras recién emitidas por Rumina decollata naturalmente infestada. x 324.

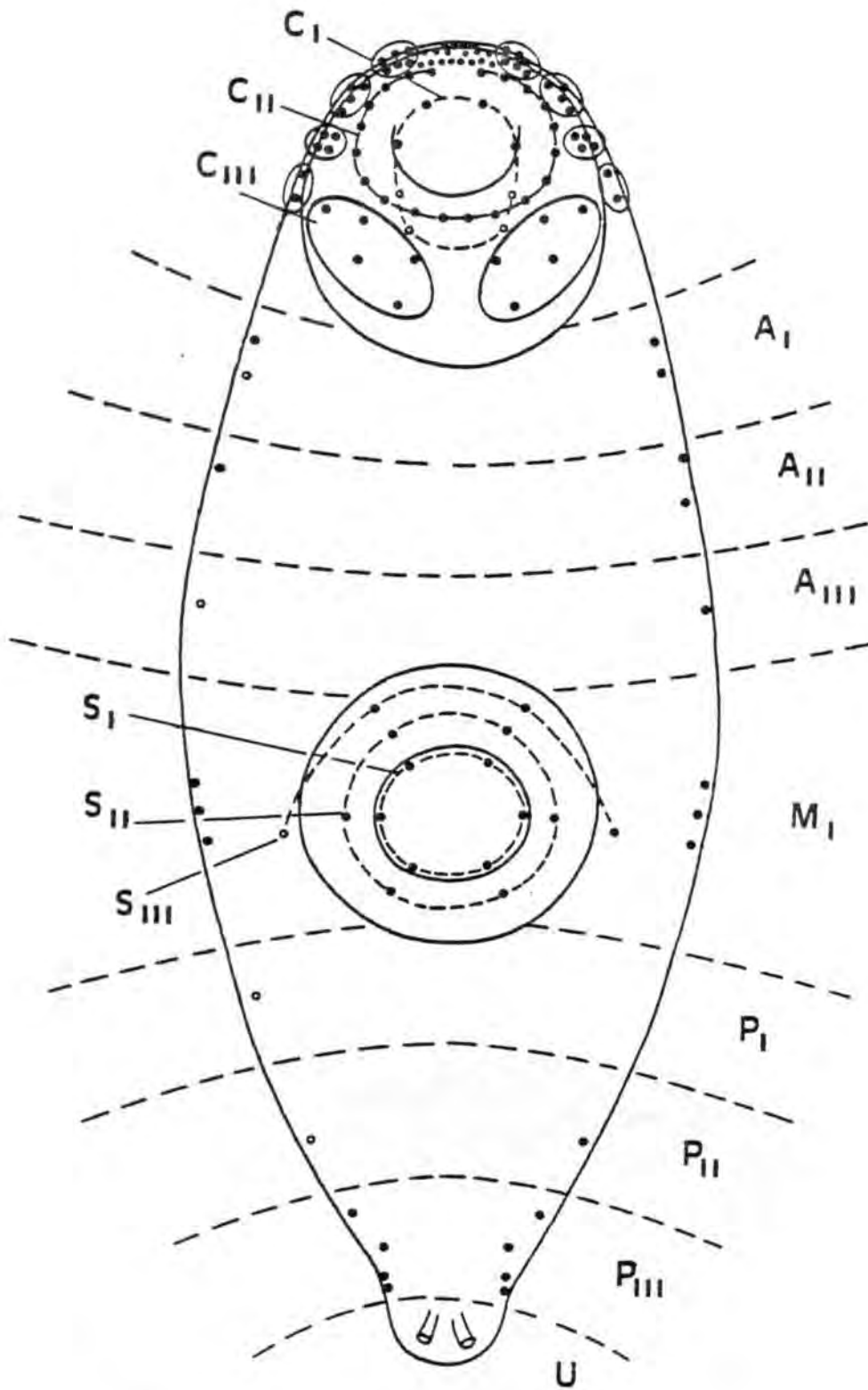


Fig. 7.- *Brachylaima ruminae*: quetotaxia hipotética de la cercaria en visión ventral.

Cola (50 cercarias examinadas)

U = 0

e) *Emisión y comportamiento*

Es difícil precisar, bajo la lupa binocular, el lugar concreto de emisión de cercarias por el Gasterópodo primer hospedador intermediario, aunque la presencia de un alto número de cercarias en el pneumostoma permite suponer que éste es por lo menos uno de los puntos de salida de las cercarias al exterior. La cuestión de las vías de salida seguidas por las cercarias de especies de la familia Brachylaimidae, a nivel de caracol primer hospedador intermediario, se hallan actualmente en estudio detallado mediante técnicas histológicas por parte de BARGUES, en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

Las cercarias emitidas se desplazan sobre el sustrato húmedo mediante movimientos de reptación. Son bastante resistentes en el medio externo, superando, en película acuosa, las 24 horas de vida en libertad e incluso llegando, en ocasiones, a superar 48 horas de vida libre.

c) *METACERCARIAS*

La metacercaria infestante de Brachylaima ruminæ presenta como microhábitat preferente el riñón del Gasterópodo segundo hospedador intermediario, si bien se ha podido apreciar, también, su presencia en las glándulas pédeas de estos hospedadores, aunque este microhábitat ha de considerarse como alternativo. Presentan un tamaño considerable, mostrando un cuerpo alargado con su anchura máxima a nivel acetabular, ligeramente post-acuatorial. En su tegumento, bastante grueso, se aprecia ya la espinulación propia del adulto.

La ventosa ventral se localiza similarmente a la de la cercaria, en posición subterminal-ventral y es de mayor tamaño que el acetábulo, el cual se sitúa a un nivel ligeramente pre-ecuatorial.

El aparato digestivo presenta una faringe globulosa, pudiendo observarse o no, un corto espacio prefaríngeo. El espacio esofágico es corto, casi

inexistente, y origina los dos ciegos intestinales, anchos y contorneados, que se extienden a ambos lados del cuerpo de la metacercaria, hasta alcanzar su región posterior, aunque sin llegar al extremo terminal.

El sistema excretor es de tipo "stenostoma", observándose claramente los dos tubos colectores principales, la vesícula excretora y el poro excretor que es terminal. Las células flamíferas, difíciles de contar, se presentan en número muy superior al de las de las cercarias.

El aparato genital aparece ya totalmente conformado, con dos testículos y un ovario bien visibles, dispuestos intracecalmente, situándose el ovario en posición intertesticular. Las tres gónadas presentan un aspecto esferoidal u ovalado, siendo el ovario generalmente menor que los testículos. Las glándulas vitelógenas son fácilmente observables en dos campos latero-posteriores situados extracecalmente, desde un nivel acetabular medio hasta un nivel oscilante entre el poro genital y el primer testículo. Los conductos vitelinos parten de la zona posterior de las glándulas vitelógenas y convergen bajo el ovario, formando un pequeño receptáculo.

El poro genital, situado ventralmente, se encuentra entre un nivel algo anterior al primer testículo y el nivel del margen anterior del mismo. El útero, bien diferenciado, parte del ootipo y asciende entre ovario y primer testículo, alcanzando casi la bifurcación intestinal, y desciende, siguiendo el mismo recorrido, hasta el poro genital.

En las Tablas 3 A, B, C y D se reproduce las dimensiones de las metacercarias a lo largo de su evolución a nivel renal dentro del Gasterópodo Rumina decollata en condiciones experimentales. Para la evolución morfométrica experimental de las metacercarias a nivel de las glándulas pédeas de la misma especie de Pulmonado, cabe dirigirse a la obra de MONTOLIU (1984).

2.1.1.2.- ESPECIES HOSPEDADORAS ESTUDIADAS

Expondremos, en este apartado, las principales características de los hospedadores que concurren en el ciclo evolutivo de Brachylaima ruminae, ya que el conocimiento de su naturaleza y ecología nos habrán de ser imprescindibles para aprehender posteriormente la bionomía de los estadios larvarios y adulto del Digénido en cuestión.

Edad	15 días			24 días			30 días		
	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s
Longitud	425-607	498	49,8	507-775	659	71,3	670-976	806	73,7
Anch. máx.	144-206	174	15,2	176-281	235	31,5	211-387	281	41,1
Vent. oral	82-101/71-92	91/83	4,8/4,9	97-127/80-118	113/103	9/8,3	101-150/93-135	123/112	10,5/9,8
Acetábulo	71-90/67-86	81/77	4,3/4,5	86-116/82-107	103/94	9/6,6	93-138/75-112	107/97	10,5/7,2
Rel. VO/VV	1,04-1,61	1,21	0,13	0,96-1,44	1,20	0,10	1,00-1,66	1,33	0,15
Faringe	28-37/37-56	34/44	2,4/5,7	34-56/47-71	47/63	4,2/7,3	45-60/52-76	51/68	4,5/5,9
Test. I	-	-	-	-	-	-	22-41/16-35	31/23	5/5,8
Test. II	-	-	-	-	-	-	24-45/18-31	31/23	4,6/3
Ovario	-	-	-	-	-	-	22-37/18-36	29/22	4,1/4,5
Ap. caudal (l.x a.b.)	19-37/15-31	31/26	4,4/3,7	30-48/24-33	39/30	5,9/3	41-65/22-30	51/28	7,8/3,2
Dist. VO-VV	94-176	130	24	108-219	164	29,9	123-253	193	29,2
Dist. VV-TI	-	-	-	-	-	-	165-253	207	25,5
Superf. VO	4633-6644	5941	527	6126-11465	9149	1347	7711-13684	10755	1604
Superf. VV	3790-6114	4950	508	5572-9622	7423	1739	5508-11150	8216	1229
Superf. corp.	63541-85553	73439	5795	71676-167730	123768	27527	114538-263104	178855	36435
VO-VV/long.	0,22-0,32	0,26	0,03	0,21-0,31	0,25	0,03	0,17-0,30	0,24	0,03

Tabla 3 A) Brachylaima ruminae: evolución morfométrica de metacercarias experimentales a nivel renal en Rumina decollata; apéndice caudal: l. x a.b. = longitud x anchura; dimensiones en μm y superficies en μm^2 (según MONTOLIU, 1984).

Edad	1,5 meses			2 meses			3 meses		
	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s
Longitud	654-1015	833	95,9	700-1051	869	97,8	894-1081	991	54,1
Anch. máx.	245-402	314	37,8	261-432	345	43,1	305-432	362	36,6
Vent. oral	105-161/97-135	125/116	18,6/10,3	105-157/105-142	127/121	11,2/10,6	123-150/120-138	139/131	9,2/5,8
Acetábulo	87-150/80-116	110/100	11/9,6	90-123/82-120	105/101	18,6/10,5	103-135/99-116	117/111	8,5/5,9
Rel. VO/VV	1,14/1,74	1,35	0,12	1,14-1,73	1,39	0,11	1,20-1,56	1,41	0,10
Faringe	48-63/60-87	48/74	9,3/6,6	45-60/60-87	53/74	4,5/7,4	48-63/69-82	58/77	4,4/4,6
Test. I	26-54/22-45	38/29	6,7/5,7	26-52/18-48	41/31	7,7/7,5	37-55/26-41	47/33	6,4/7
Test. II	26-60/18-45	39/29	7,3/4,9	30-60/20-46	44/32	7,8/7,4	45-67/24-41	53/33	6,5/4,8
Ovario	26-60/22-37	37/27	5,6/3,8	26-48/18-41	40/31	6,1/5,2	37-52/30-41	42/34	4,8/3,9
Dist. VO-VV	112-251	176	32,2	120-230	176	26,8	171-238	210	20,7
Dist. VV-TI	142-268	213	31,3	165-283	226	33,2	223-298	264	19,8
Superf. VO	8329-15639	11567	2009	8659-15948	12154	1961	11979-15904	14252	1501
Superf. VV	5670-13195	8669	1606	5831-11310	8795	1543	8170-12299	10164	1172
Sup. corp.	14464-299369	207491	45466	151848-334590	237595	50853	214626-343852	282878	39135
VO-VV/long.	0,16-0,27	0,21	0,02	0,17-0,22	0,20	0,01	0,19-0,24	0,21	0,02

Tabla 3 B) Brachylaima ruminae: evolución morfológica de metacercarias experimentales a nivel renal en Rumina decollata (continuación); dimensiones en μm y superficies en μm^2 (según MONTOLIU, 1984).

Edad	4 meses			5 meses			6 meses		
	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s
Longitud	700-1073	913	80,3	922-1394	1188	87,4	1081-1416	1268	86,9
Anch. máx.	261-380	315	29,8	395-544	462	32,5	425-536	487	31,1
Vent. oral	112-146/108-140	130/121	8,4/9	140-180/123-173	164/149	8,2/9,6	153-176/142-174	170/159	6,7/8
Acetábulo	105-123/93-120	112/106	5,1/6,7	112-155/101-146	139/130	7,1/9,4	138-157/123-150	149/141	5/6,9
Rel. VO/VV	1,04-1,76	1,33	0,14	1,11-1,68	1,36	0,11	1,10-1,50	1,29	0,09
Faringe	48-67/63-82	55/73	3,8/4,8	52-75/78-105	61/91	4,8/5	60-76/86-102	66/91	4,6/6,9
Test. I	27-48/22-37	38/28	4,6/3,8	45-91/33-63	67/48	8,9/6,7	42-97/37-63	72/51	12/7,2
Test. II	30-56/18-39	42/28	5,6/4,9	56-108/33-72	74/50	10,1/7,6	52-116/39-75	78/55	12,3/9,5
Ovario	26-45/20-33	36/28	4,5/8,9	45-80/35-60	60/46	6,6/5,7	48-78/33-60	66/50	8,6/6,9
Dist. VO-VV	142-246	195	25,8	194-329	255	26,7	223-372	276	28,3
Dist. VV-TI	140-298	245	36	246-407	321	32,7	253-417	342	35,7
Superf. VO	9459-15881	12380	1574	14844-23291	19250	1980	17179-24052	21188	1700
Superf. VV	7710-11639	9334	957	9277-17200	14276	1466	13822-18083	16468	1103
Sup. corp.	166041-307810	225887	31130	291465-558425	433011	54222	367200-569688	486193	54233
VO-VV/long.	0,18-0,24	0,21	0,02	0,19-0,28	0,22	0,02	0,21-0,24	0,22	0,01

Tabla 3 C) Brachylaima ruminata: evolución morfológica de metacercarias experimentales a nivel renal en Rumina decollata (continuación); dimensiones en μm^2 (según MONTOLIU, 1984).

Edad	7 meses n=14			8 meses n=7			9 meses n=12		
	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s	V.E.	\bar{x}	s
Longitud	1118-1491	1290	118,3	1148-1286	1237	61,3	1140-1398	1281	87,3
Anch. máx.	462-574	511	31,3	462-536	507	26,4	509-600	544	28,4
Vent. oral	153-183/140-180	170/160	10,1/14,1	153-168/150-157	159/155	4,9/2,7	169-183/155-180	176/166	5,3/7,6
Acetábulo	140-168/112-157	154/140	7,3/11,5	150-157/135-150	154/143	2,9/5,5	149-173/137-158	161/150	7,4/8,2
Rel. VO/VV	1,10-1,42	1,27	0,11	1,03-1,23	1,12	0,08	1,14-1,38	1,22	0,07
Faringe	56-75/82-108	66/94	6,7/8	60-71/86-93	66/90	4,1/2,5	65-77/90-108	71/98	3,4/5,1
Test. I	67-90/48-78	75/59	8,1/8,5	67-82/45-71	90/57	12,5/10,7	57-97/39-54	75/47	13,5/5,5
Test. II	71-105/45-78	84/58	10,3/10,7	75-106/52-71	90/60	12,5/6,5	54-101/36-57	77/49	13/7,1
Ovario	60-86/41-43	70/53	7,2/6	63-78/48-71	71/54	5,1/8,2	54-81/38-65	67/53	7,6/10,6
Dist. VO-VV	225-343	270	34,3	213-255	238	19,1	228-289	260	21,3
Dist. VV-TI	251-387	331	42,7	298-365	337	27,2	281-410	352	37,7
superf. VO	17179-26719	21537	3050	18083-20314	19287	730	20817-29084	23521	2290
Superf. VV	12370-19915	16275	1744	15904-18555	17311	880	16086-21536	18938	1541
Sup. corp.	405853-628258	519079	68299	463893-530296	499857	25963	475283-630687	547018	49986
VO-VV/long.	0,20-0,23	0,21	0,01	0,18-0,20	0,19	0,01	0,18-0,23	0,21	0,02

Tabla 3 D) Brachylaima ruminae: evolución morfológica de metacercarias experimentales a nivel renal en Rumina decollata (continuación y fin); dimensiones en μm y superficies en μm^2 (según MONTO-LIU, 1984).

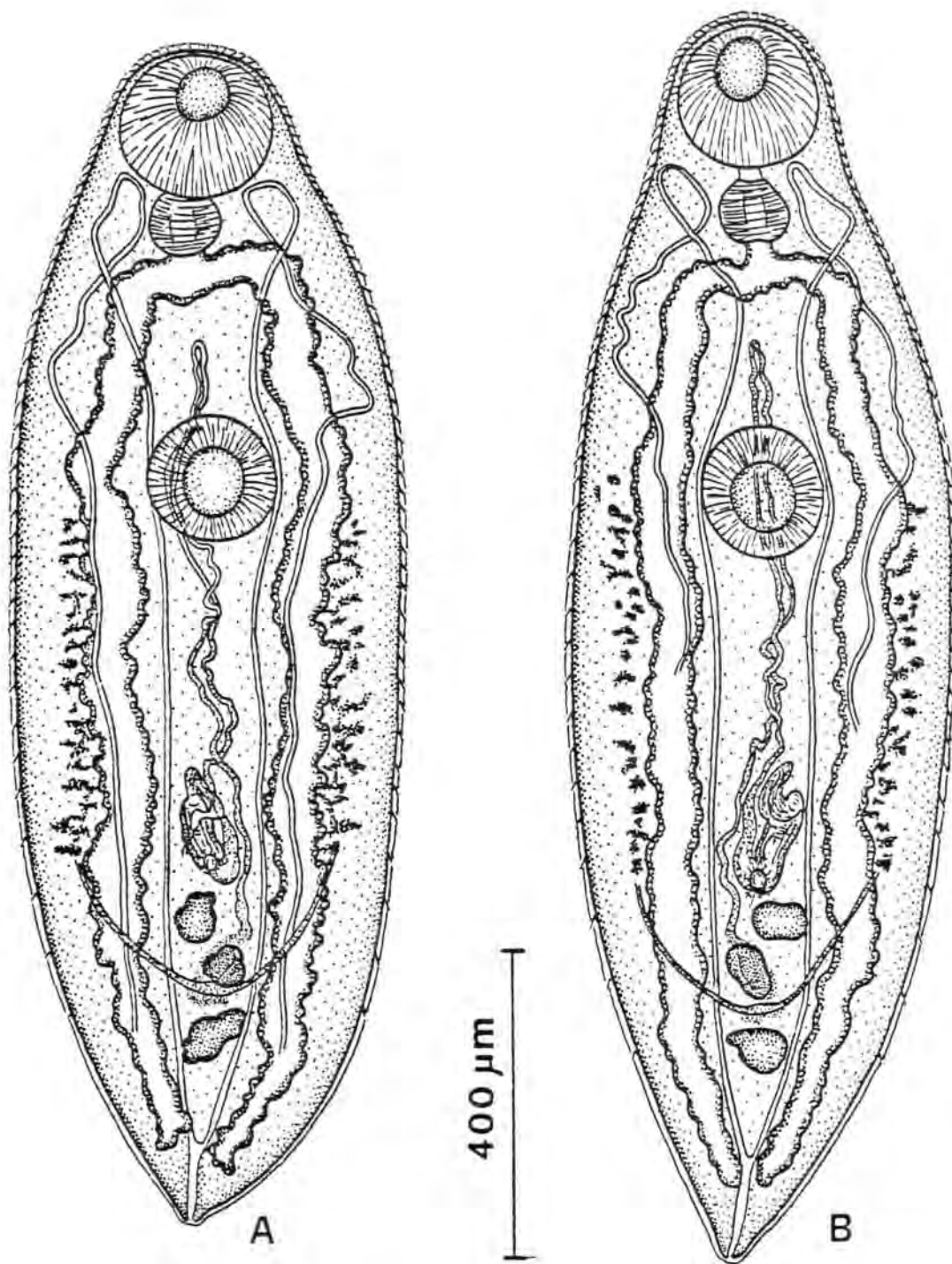


Fig. 8.- Brachylaima ruminae: morfología general de la metacercaria infestante en visión ventral: A) ejemplar de 2 años obtenido experimentalmente en Rumina decollata a nivel de glándulas pédeas; B) ejemplar de 19 meses obtenido experimentalmente en Rumina decollata a nivel renal.

Consideramos separadamente los Gasterópodos Pulmonados terrestres, que constituyen los primeros y segundos hospedadores intermediarios en el ciclo evolutivo del Digénido en estudio, y los Micromamíferos que actúan como hospedadores definitivos.

2.1.1.2.1.- HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS: RUMINA DECOLLATA (LINNAEUS, 1758)

Los primeros y segundos hospedadores intermediarios en los ciclos evolutivos de Brachyláimidos son siempre Moluscos de la Clase Gastropoda, Subclase Pulmonata, Orden Stylommatophora, todos ellos terrestres.

La especie de Brachyláimido objeto de nuestro estudio, Brachylaima ruminiae, ostenta en su ciclo evolutivo, en Formentera, una única especie de Gasterópodo Pulmonado terrestre como primer hospedador intermediario: Rumina decollata (Linnaeus, 1758), hecho ya indicado por MONTOLIU (1984). Según esta misma autora, pueden actuar como segundos hospedadores intermediarios varias especies de Gasterópodos, tanto en la Naturaleza como en el Laboratorio, aunque destaca la evidencia de Rumina decollata (Linnaeus, 1758) como segundo hospedador intermediario preferente.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, optamos, en su día, por emplear en nuestros estudios únicamente la especie de Gasterópodo Rumina decollata como segundo hospedador intermediario para la obtención experimental de metacercarias. Así, describimos solamente esta especie de Gasterópodo Pulmonado terrestre por ser la única especie que interviene en nuestros trabajos, actuando como primer y segundo hospedador intermediario.

La clasificación taxonómica de esta especie, según las directrices de GIUSTI (1970), FORCART (1976) Y ZILCH (1959-60), es la siguiente:

O. Stylommatophora

Fam. Subulinidae

Subfam. Rumininae

Gen. Rumina Risso, 1826

Rumina decollata (Linnaeus, 1758)

La concha de esta especie presenta una forma cónico-cilíndrica o con tendencia a fusiforme, truncada por el ápice en los adultos, quedándose con

sólo cuatro o cinco vueltas poco hinchadas, de crecimiento regular y con sutura distinta pero no profunda. En los individuos jóvenes el ápice es, empero, redondeado y liso. El ombligo se presenta en forma de rendija. La boca es ovalada y está ligeramente inclinada. El peristoma es liso y cortante, presentando algunos individuos un reborde interior.

La concha es generalmente sólida, algunas veces córnea-transparente, de color amarillo sucio a castaño. Presenta una escultura en general poco visible y a veces casi lisa. Las dimensiones oscilan en tre 10-12 mm de diámetro y 22-30 mm de altura.

Es una especie circummediterránea, muy frecuente y de amplia ecología (GASULL, 1963; GIUSTI, 1970). En las Baleares se presenta en todas las islas e incluso en islotes, no encontrándose solamente en regiones de bosque a bastante altura sobre el nivel del mar (BOFILL i POCH & AGUILAR-AMAT, 1924; JAECKEL, 1952 y 1954).

Exite casos de gigantismo (GASULL, 1963) en todas las Baleares, preferentemente en Ibiza. Dentro de una misma comunidad se encuentra ejemplares de talla gigante (alturas hasta de 40 mm) mezclados con ejemplares de talla normal. Estos ejemplares gigantes tienen la concha muy sólida, no cilindro-cónica sino marcadamente fusiforme, con fuerte escultura y peristoma con labios reforzados y reborde interior que se cierra sobre el lado columelar, redondeando toda la boca.

R. decollata ocupa preferentemente biotopos constituídos por garriga (matorrales; bosque bajo seco; a poca altura sobre el nivel del mar; en grandes extensiones uniformes de flora), confinándose en el hábitat secundario, constituído por grandes piedras que le ofrecen protección contra el calor solar. Puede localizarse también en cultivos de regadío y por tanto en zonas de humedad regularmente regadas (GASULL, 1965).

En Formentera esta especie está extendida por toda la isla, presentándose principalmente en hábitats húmedos, bajo grandes piedras rodeadas de vegetación de tipo Gramíneas y en muros de piedra (véase SCHRODER, 1978; PAUL, 1982; GASULL, 1984).

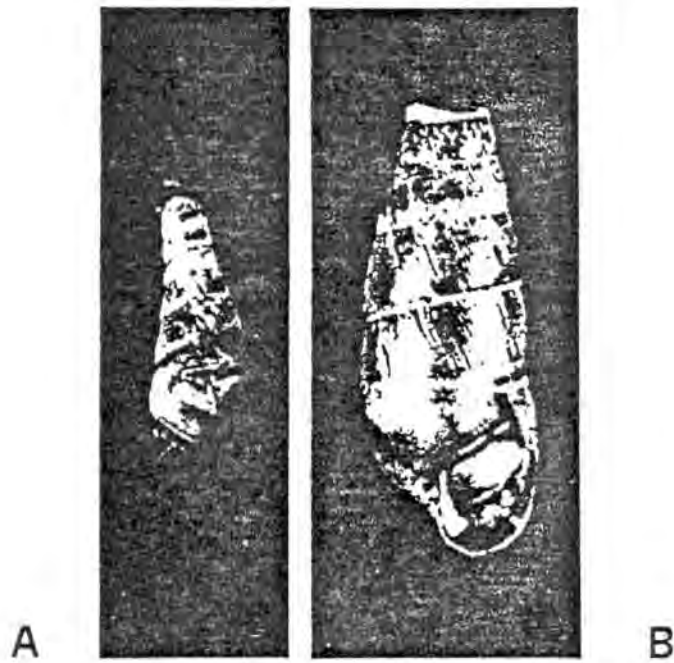


Fig. 9.- Rumina decollata: ejemplares joven (A) y adulto (B) procedentes de la isla de Formentera mostrando respectivamente la concha entera y típicamente truncada por el ápice. x 2,4.



Fig. 10.- Mus musculus: fotografía mostrando un ejemplar adulto en la naturaleza.

2.1.1.2.2.- HOSPEDADORES DEFINITIVOS: MUS MUSCULUS LINNAEUS, 1758

Los hospedadores definitivos en los ciclos evolutivos de los Brachyláimidos son Vertebrados pertenecientes exclusivamente a Aves y Mamíferos.

La especie de Brachyláimido por nosotros estudiada, Brachylaima ruminiae, presenta en su ciclo evolutivo en la isla de Formentera, tres especies de Micromamíferos Roedores como hospedadores definitivos: Eliomys quercinus ophiu-sae Thomas, 1925 (Gliridae), Rattus rattus Linnaeus, 1758 y Mus musculus Linnaeus, 1758 (Muridae), según indica MONTOLIU (1984).

Esta autora ha realizado infestaciones, en el Laboratorio, de las tres especies mencionadas, apuntando la viabilidad de todas ellas como hospedadores definitivos y la no observación de diferencias en cuanto al desarrollo del adulto en las mismas. Esto nos ha llevado a utilizar, en nuestros estudios y por motivos prácticos, únicamente la especie Mus musculus Linnaeus, 1758 como hospedador definitivo. Hemos empleado, a tal efecto, una cepa de ratones caseros originada a partir de ejemplares capturados en la ciudad de Barcelona y pertenecientes a la subespecie domesticus. Sus reducidas necesidades de espacio y fácil mantenimiento en el estabulario, la hacen óptima para los trabajos experimentales.

Mus musculus domesticus es una forma comensal de Mus musculus al igual que la forma brevirostris, presentando, ambas formas, colas de longitud relativamente elevada. SCHWARZ & SCHWARZ (1943) diferencian a domesticus de brevirostris por tener aquél el dorso más oscuro, el vientre con "Grannenhare" (pelos más gruesos con las puntas negras), los dedos tan sólo con las falanges de color blanco, carecer de franja lateral y poseer cola unicolor, marrón oscuro. La clasificación subespecífica propuesta por SCHWARZ & SCHWARZ (1943), basada en la coloración de los animales, algunas medidas corporales y la longitud relativa de la cola, ha venido siendo aceptada hasta la actualidad y tan solo ha sido modificada en algunos aspectos por ZIMMERMANN (1949). En el caso de todas las formas de Mus, el pie posterior no sobrepasa los 19 mm, el peso va de 10 a 24 gr, la longitud cabeza-cuerpo oscila entre 7,5 y 10,3 cm y la cola presenta 150-200 anillos. La edad únicamente puede ser determinada con exactitud en animales nacidos y criados en el Laboratorio.

El cambio de pelaje está directamente relacionado con la edad del animal, aunque se ha de considerar la influencia ejercida por el ambiente sobre el

momento de su aparición, a partir del segundo cambio. Para más información sobre el ratón doméstico cabe dirigirse a la obra de LOPEZ-FUSTER (1978).

2.1.1.3.- ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

Tras la descripción morfológica del material biológico objeto de nuestro estudio, llevada a cabo en apartados anteriores, exponemos, en el presente apartado, el material biológico que hemos utilizado concretamente en los distintos estudios, indicando su procedencia o naturaleza, es decir, si tiene un origen natural o un origen experimental. Diferenciamos en tres apartados sucesivos el material correspondiente a estudios cronobiológicos, histológicos y de cultivo in vitro.

2.1.1.3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN CRONOBIOLOGIA

La dilucidación del patrón de emergencia de cercarias de B. ruminæ emitidas por los Gasterópodos terrestres de la especie R. decollata albergantes de esporocistos requiere el concurso de un material biológico constituido por estos Gasterópodos primeros hospedadores intermediarios y por las cercarias emitidas.

Los Gasterópodos albergantes de esporocistos emisores de cercarias fueron capturados en la Naturaleza en el curso de dos expediciones realizadas a la isla de Formentera (Islas Pitiusas) en los años 1979 y 1981. En la primera expedición, llevada a cabo en octubre de 1979, fueron capturados 160 ejemplares de R. decollata en el enclave denominado Ca'n Campanich, de los cuales 14 ejemplares resultaron estar infestados por esporocistos y ser emisores de cercarias. El porcentaje de infestación por esporocistos de B. ruminæ resultó ser, pues, en estos ejemplares, el 8,75 %. En la segunda expedición, que tuvo lugar en octubre de 1981, fueron recogidos 449 ejemplares procedentes todos ellos, al igual que en el caso anterior, del enclave denominado Ca'n Campanich. 10 ejemplares resultaron estar infestados por esporocistos y ser emisores de cercarias. El porcentaje de infestación resultó ser, pues, en estos ejemplares, el 2,23 %.

Los Gasterópodos, una vez capturados, son objeto de técnicas de selección orientadas a detectar aquellos Pulmonados albergantes de esporocistos emisores de cercarias y a determinar las cercarias por quetotaxia (véase apartados 2.2.2.1.1 y 2.2.2.1.2). Tras la realización de estas técnicas, los Gasterópodos son mantenidos en el Laboratorio (véase apartado 2.2.1.1.2) hasta el inicio de los estudios cronobiológicos en los cuales únicamente serán empleados aquellos que han resultado ser emisores de cercarias cuya quetotaxia indica que pertenecen a Brachylaima ruminæ.

2.1.1.3.2.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN HISTOLOGIA

Los estudios histológicos y citológicos llevados a cabo sobre el Trematodo Brachylaima ruminæ han requerido el concurso de un material biológico constituido por metacercarias y adultos de dicha especie de Digénido.

El confucionismo sistemático reinante en la familia Brachylaimidae y la existencia de especies indistinguibles a partir de las características morfológicas de los adultos nos llevó a realizar todos nuestros trabajos sobre un material biológico de origen experimental, a fin de evitar la posibilidad de introducir errores derivados de las dificultades de adjudicar un determinado espécimen a una determinada especie.

A) METACERCARIAS

Las metacercarias empleadas en nuestros estudios histológicos tienen un origen experimental, procediendo de Gasterópodos de la especie Rumina decollata infestados experimentalmente con cercarias de Brachylaima ruminæ emitidas por Gasterópodos de la misma especie infestados naturalmente. La determinación específica de estas cercarias se llevó a cabo por quetotaxia.

Los Gasterópodos fueron recolectados en el curso de una expedición realizada a la isla de Formentera (Islas Pitiusas) en octubre de 1981, tanto los emisores como los no emisores (véase apartado 2.1.1.3.1).

La infestación de los Gasterópodos con cercarias se llevó a cabo según la técnica expuesta en el apartado 2.2.3.1. En este caso infestamos 6 ó 7 in-

dividuos con cada individuo emisor. Los Gasterópodos así infestados fueron mantenidos en el Laboratorio durante un año aproximadamente. Al cabo de este tiempo fueron diseccionados y las metacercarias procedentes del riñón de los mismos fueron utilizadas en trabajos histológicos. Estas metacercarias fueron empleadas, también, para la infestación experimental de los hospedadores definitivos al objeto de obtener adultos, como exponemos a continuación.

Así, una parte de las metacercarias fueron destinadas a ser incluidas en parafina para la obtención de cortes histológicos y con tal fin fueron fijadas en Bouin caliente y agitación. Otra parte de las mismas fueron fijadas con Bouin entre portaobjetos y cubreobjetos para ser posteriormente teñidas con Carmín Borácico de GRENACHER y mantenidas como material control. Por último, algunas metacercarias fueron fijadas en alcohol de 70° entre portaobjetos y cubreobjetos para ser teñidas posteriormente con Red Fast Salt B a fin de estudiar el contenido vitelino en glándulas vitelógenas. Las técnicas de fijación y coloración son expuestas posteriormente (véase apartados 2.2.5.2., 2.2.2.2.1, 2.2.2.2.2. y 2.2.6.7.).

B) ADULTOS

Los adultos de Brachylaima ruminæ objeto de estudios histológicos fueron obtenidos experimentalmente por infestación, en el Laboratorio, de los hospedadores definitivos con metacercarias. Estas metacercarias eran a su vez experimentales, procediendo de Gasterópodos de la especie Rumina decollata infestados experimentalmente con cercarias de Brachylaima ruminæ emitidas por Pulmonados de la misma especie, naturalmente infestados y cuya determinación específica se efectuó mediante quetotaxia.

Los hospedadores definitivos utilizados en las infestaciones experimentales fueron ratones caseros, Mus musculus, nacidos y criados en el Laboratorio, siendo la técnica seguida la expuesta posteriormente en el apartado 2.2.3.2.

Las metacercarias empleadas en todas las infestaciones experimentales de los hospedadores definitivos procedían, todas ellas, de Gasterópodos simultáneamente infestados con cercarias en el Laboratorio. Las metacercarias fueron utilizadas transcurrido un año desde las infestaciones de los Gasterópodos con cercarias. Los ratones ensayados, todos ellos machos, fueron intubados con 15-20 metacercarias por individuo.

Los hospedadores definitivos experimentales fueron diseccionados una vez transcurridos distintos intervalos de tiempo tras la infestación con metacercarias. Así, hemos obtenido adultos experimentales de 24 horas, 48 horas, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 18 y 21 días.

Una parte de los adultos de cada edad fueron fijados en Bouin caliente agitando para ser incluidos posteriormente en parafina. Otros fueron fijados en Bouin entre portaobjetos y cubreobjetos para ser posteriormente teñidos y montados a fin de disponer de un material de control. Por último, algunos especímenes fueron fijados en alcohol de 70º entre portaobjetos y cubreobjetos para ser teñidos posteriormente con Red Fast Salt B a fin de estudiar el contenido vitelino en glándulas vitelógenas. Las técnicas utilizadas son expuestas posteriormente (véase apartados 2.2.5.2, 2.2.2.2.1, 2.2.2.2.2 y 2.2.6.7).

2.1.1.3.3.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO EN CULTIVO IN VITRO

Los ensayos de cultivo in vitro llevados a cabo requieren disponer de un material biológico constituido por las metacercarias cuya evolución in vitro se trata de estudiar.

Hemos utilizado metacercarias experimentales procedentes de Gasterópodos de la especie Rumina decollata infestados experimentalmente con cercarias de Brachylaima ruminae emitidas por caracoles de la misma especie infestados naturalmente y cuya determinación específica se hizo por quetotaxia. Estos Gasterópodos emisores y no emisores, fueron recolectados en la isla de Formentera (Islas Pitiusas) en el curso de una expedición realizada a la misma en el mes de octubre de 1979, tal como se indicó anteriormente (véase apartado 2.1.1.3.1). La infestación de los Gasterópodos no emisores con cercarias se realizó según la técnica que se expone posteriormente (véase apartado 2.2.3.1).

La edad de las metacercarias empleadas en cultivo in vitro era de 14 meses, habiendo transcurrido este tiempo entre la infestación del segundo hospedador intermediario y la disección del mismo para obtener las metacercarias destinadas a cultivo in vitro.

2.1.2.- MATERIALES ESPECIALES

Dentro del material utilizado en el presente trabajo hemos descrito en los apartados anteriores el material biológico empleado, tanto de carácter parasitológico como las especies hospedadoras estudiadas. En el presente apartado nos referimos a todos aquellos materiales que concurren en el trabajo pero cuya naturaleza no es estrictamente biológica, designándolos como materiales especiales.

Dado que nuestros estudios presentan tres aspectos bien diferenciados distinguimos el material especial propio de cronobiología, de histología y de cultivo in vitro. Se trata de materiales que aún no constituyendo el objeto primordial del estudio concurren en las técnicas empleadas en el mismo, por lo que su descripción se hace necesaria.

2.1.2.1.- MATERIAL CRONOBIOLOGICO

Las experiencias realizadas en los estudios cronobiológicos han sido orientadas hacia la dilucidación de la naturaleza de los ritmos cronobiológicos de emergencia de las cercarias de Brachylaima ruminæ a partir del Gasterópodo primer hospedador intermediario Rumina decollata, analizándose la dependencia y relaciones de dichos patrones de emisión con el fotoperíodo, termoperíodo, etc. Todo ello ha venido a entrañar numerosas y considerables dificultades, principalmente metodológicas, ya que hemos de tener en cuenta que trabajamos con Gasterópodos y cercarias terrestres, por lo que ha sido necesario establecer técnicas específicas que inevitablemente han precisado en todo momento de una continua colaboración humana. No se trata, pues, de técnicas sofisticadas y complejas con instrumentación automática que minimizan la intervención humana, como ocurre en el caso de cercarias acuáticas, sino de técnicas sencillas (véase apartado 2.2.4) con un alto grado de intervención por parte del operador.

La automatización, en nuestro caso, ha quedado relegada únicamente al empleo de un aparato que nos ha permitido dissociar la acción de los factores abióticos iluminación y temperatura, considerados a priori de importancia más relevante sobre la emisión cercariana. Hemos empleado, a este efecto, un apa-

rato para el ensayo de condiciones climáticas, marca SUPER, que permite establecer un programa de iluminación dependiente del tiempo y fijar la temperatura interior en un intervalo comprendido entre 0° y 50 °C. El aparato en cuestión es una cámara de germinación provista de circulación por aire forzado, con una capacidad útil de 300 litros, estando constituido por un compresor hermético complementado con resistencias para mantener la temperatura, un regulador electrónico con sonda de platino cuya sensibilidad es $\pm 0,5$ °C, un reloj temporizador de 24 horas y 4 tubos fluorescentes GROLUX de hasta 5000 lux, con encendido independiente.

Las restantes manipulaciones realizadas por el operador con los Gasterópodos emisores o con las cercarias emitidas no requieren el concurso de materiales especiales, sino que únicamente se utiliza cápsulas de Petri de vidrio con un diámetro de 5,5 cm, pinceles, solución de Lugol y agua natural (de montaña) no clorada ni tratada.

2.1.2.2.- MATERIAL HISTOLOGICO

El estudio histológico de metacercarias y adultos de Brachylaima ruminiae requiere la adecuada exposición de los tejidos de este Trematodo para su estudio microscópico. Las técnicas dirigidas a la consecución de esta finalidad conllevan, en nuestro caso, el empleo de material no biológico propio y específico que es utilizado únicamente en este tipo de estudios y además implican la utilización de material rutinariamente empleado en el Laboratorio cuya enumeración aquí se hace innecesaria al ser su uso común a estas y otras técnicas de Laboratorio.

El material únicamente empleado en estudios histológicos que describimos aquí con algún detalle consiste en los medios de inclusión empleados para la confección de bloques que son parafina y Resina SPURR y el microtomo utilizado en la obtención de cortes.

2.1.2.2.1.- MEDIOS DE INCLUSION

Hemos incluido material parasitológico en dos medios muy dispares, tal como son parafina y resina SPURR cuyas prestaciones serán también muy distintas.

A) PARAFINA

Hemos empleado la inclusión en parafina para nuestros estudios histológicos por ser el método que ofrece un mayor número de ventajas prácticas y un mayor número de posibilidades de aplicación de técnicas posteriores. La parafina es una mezcla de hidrocarburos y en algunos casos de ceras, de composición variable. El interés de la parafina reside en su elevada estabilidad química, en su solubilidad en diferentes disolventes que permite su eliminación y en su facilidad para ser cortada mediante una cuchilla. El carácter físico más importante de la parafina es, para el histologista, su punto de fusión. Cuando éste es elevado, la parafina es dura.

Hemos utilizado parafina de punto de fusión 55-60 °C en pastilla (PAN-REAC) que es adecuada para una gran diversidad de materiales. Se tendrá en cuenta que las parafinas duras son adecuadas para materiales duros. Es desaconsejable impregnar un material en parafina blanda, de bajo punto de fusión, previamente a la inclusión definitiva del mismo en una parafina más dura, ya que existe el riesgo de no eliminar totalmente la parafina blanda a lo largo de la inclusión, resultando un bloque heterogéneo en el que es difícil practicar cortes correctos.

B) RESINA

La resina tipo SPURR (SPURR, 1969) proporciona buenos resultados, dada su baja densidad, para la obtención de cortes semifinos del material en él incluido.

2.1.2.2.2.- MICROTOMO

El microtomo utilizado es de la marca REICHERT, modelo OmU2, empleando cuchillas metálicas para material incluido en parafina y cuchillas de vidrio, confeccionados con un aparato marca SUNKAY-MESSER, para el material incluido en resina.

2.1.2.3.- MATERIAL DE CULTIVO IN VITRO

El cultivo in vitro conlleva el empleo de material de índole muy diversa. Así, hemos utilizado medios de cultivo químicamente definidos, factores de crecimiento, sustancias reguladoras de pH, soluciones fisiológicas, antibióticos e instrumental apropiados para el desarrollo de dichas técnicas y que definimos a continuación.

2.1.2.3.1.- MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Actualmente está generalizado el empleo de medios de cultivo químicamente definidos para soportar el crecimiento de un gran número de líneas celulares. Estos medios de cultivo aportan los aminoácidos y vitaminas necesarios para el desarrollo, crecimiento y multiplicación celular. El conocimiento concreto de su composición química permitiría especular sobre los requerimientos nutricionales y necesidades metabólicas del material biológico que en ellos se cultiva, pero, desafortunadamente, el cultivo de Trematodos, y principalmente, su evolución in vitro, no puede llevarse a cabo mediante la utilización exclusiva de medios de cultivo químicamente definidos, sino que es necesaria, en el cultivo de un gran número de Trematodos, la adición de factores de crecimiento biológicos como suero, yema de huevo, etc., cuya composición química y constantes físicas no están totalmente dilucidadas.

En el presente trabajo hemos utilizado dos medios de cultivo químicamente definidos y comerciales, que han servido de base para la preparación de medios más complejos:

- M 199 (Flow Laboratories) cuya composición es:

L-Alanina.....	25,00	mg/litro
L-Arginina HCL.....	70,00	"
L-Acido aspártico.....	30,00	"
L-Cisteína HCl.....	0,0987	"
L-Cisteína sal disódica.....	23,66	"
L-Acido glutámico.....	66,82	"
L-Glutamina.....	100,00	"
Glutation.....	0,05	"
Glicina.....	50,00	"
L-Histidina HCl H ₂ O.....	21,88	"
L-Hidroxiprolina.....	10,00	"
L-Isoleucina.....	20,00	"
L-Leucina.....	60,00	"
L-Lisina HCl.....	70,00	"
L-Metionina.....	15,00	"
L-Fenilalanina.....	25,00	"

L-Prolina.....	40,00	mg/litro
L-Serina.....	25,00	"
L-Treonina.....	30,00	"
L-Triptofano.....	10,00	"
L-Tirosina.....	40,00	"
L-Valina.....	25,00	"
L-Acido ascórbico.....	0.05	"
Biotina.....	0,01	"
Calciferol.....	0,10	"
D-Calcio pantotenato.....	0,01	"
Colina cloruro.....	0,50	"
Acido fólico.....	0,01	"
i-Inositol.....	0,05	"
Menaftona sodio bisulfito trihidrato...	0,019	"
Acido nicotínico.....	0,025	"
Nicotinamida.....	0,025	"
p-Acido aminobenzoico.....	0,05	"
Piridoxal HCl.....	0,025	"
Piridoxina HCl.....	0,025	"
Riboflavina.....	0,01	"
Tiamina HCl.....	0,01	"
DL-Tocoferol fosfato, sal disódica.....	0,01	"
Vitamina A acetato.....	0,1147	"
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	185,5	"
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O.....	0,01	"
KCl.....	400,0	"
KH ₂ PO ₄	60,00	"
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	200,0	"
NaCl.....	8000	
Na ₂ HPO ₄	47,50	"
Adenina sulfato.....	10,00	"
5'-AMP.....	0.20	"
ATP, sal disódica.....	10,00	"
Colesterol.....	0,20	"
2-Deoxirribosa.....	0,50	"
Glucosa.....	1000	

Guanina HCl.....	0,30	mg/litro
Hipoxantina.....	0,30	"
Ribosa.....	0,50	"
Acetato sódico.....	36,71	"
Rojo fenol sódico.....	17,00	"
Timina.....	0,30	"
Tween 80.....	5,00	"
Uracilo.....	0,30	"
Xantina.....	0,30	"

- CMRL 1066 (Flow Laboratories) cuya composición es:

L-Alanina.....	25,00	mg/litro
L-Arginina HCl.....	70,00	"
L-Acido aspártico.....	30,00	"
L-Cisteína HCl.....	233,3	"
L-Cisteína, sal disódica.....	23,66	"
L-Acido glutámico.....	75,00	"
L-Glutamina.....	100,0	"
Glutation.....	10,00	"
Glicina.....	50,00	"
L-Histidina HCl H ₂ O.....	20,00	"
L-Hidroxiprolina.....	10,00	"
L-Isoleucina.....	20,00	"
L-Leucina.....	60,00	"
L-Lisina HCl.....	70,00	"
L-Metionina.....	15,00	"
L-Fenilalanina.....	25,00	"
L-Prolina.....	40,00	"
L-Serina.....	25,00	"
L-Treonina.....	30,00	"
L-Triptofano.....	10,00	"
L-Tirosina.....	40,00	"
L-Valina.....	25,00	"
L-Acido ascórbico.....	50,00	"
Biotina.....	0,01	"
D-Calcio pantotenato.....	0,01	"

Colina cloruro.....	0,50 mg/litro	
Acido fólico.....	0,01	"
i-Inositol.....	0,05	"
Acido nicotínico.....	0,025	"
Nicotinamida.....	0,025	"
p-Acido aminobenzoico.....	0,05	"
Piridoxal HCl.....	0,025	"
Piridoxina HCl.....	0,025	"
Riboflavina.....	0,01	"
Tiamina HCl.....	0,01	"
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	264,9	"
KCl.....	400,0	"
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	200,0	"
NaCl.....	6800	"
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	158,3	"
Colesterol.....	0,20	"
Cocarboxilasa.....	1,00	"
Coenzima A, trilitio sal dihidrato....	2,50	"
Deoxiadenosina H ₂ O.....	10,00	"
Deoxicitidina H ₂ O.....	10,00	"
Deoxiguanosina H ₂ O.....	10,00	"
FAD, sal disódica.....	1,00	"
Glucosa.....	1000	"
5-Metil deoxicitidina.....	0,10	"
NAD.....	7,00	"
NADP, sodio sal dihidrato.....	1,00	"
Acetato sódico.....	50,00	"
Glucuronato sódico H ₂ O.....	4,20	"
Rojo fenol sódico.....	10,00	"
Timidina.....	10,00	"
Tween 80.....	5,00	"
UTP, trisodio sal dihidrato.....	1,00	"

Ambos medios presentan en su composición L-Glutamina ya que hemos utilizado la forma comercial en polvo de los mismos. Esta sustancia es omitida en estos medios cuando su presentación comercial es en forma líquida, debido a

la inestabilidad de la L-Glutamina en solución a temperaturas superiores a -10 °C. Ambos medios se presentan comercialmente exentos de bicarbonato sódico.

2.1.2.3.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO

Hemos indicado ya la importancia del empleo de factores de crecimiento cuya naturaleza es generalmente biológica en el cultivo in vitro de Trematodos. En ocasiones se ha intentado sustituir estos factores de composición química compleja, tales como suero, yema y/o albúmina de huevo de gallina, extractos de mucosa intestinal, etc., por otros cuya composición química fuera perfectamente conocida. Así, WILLIE et al. (1960) sustituyen la yema de huevo por extracto de levadura, de composición más conocida, en el cultivo de Diplostomum phoxini, con buenos resultados.

Sin considerar estos intentos aislados de consecución de un medio totalmente definido en su composición química, podemos indicar que la adición de factores de crecimiento a los medios de cultivo para Trematodos es casi general en la mayor parte de los trabajos publicados hasta la fecha.

En el presente trabajo hemos empleado los siguientes factores de crecimiento:

- Suero bovino fetal (Gibco Europe);
- Suero bovino neonatal (Flow Laboratories);
- Extracto de embrión bovino 50% en Hanks (Flow Laboratories);
- Yema y albúmina de huevo de gallina.

2.1.2.3.3.- SUSTANCIAS REGULADORAS DE pH

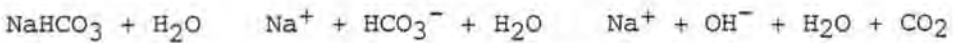
Todos los medios de cultivo utilizados en el cultivo de tejidos llevan incorporadas sales inorgánicas cuyas finalidades son:

- mantenimiento del pH;
- mantenimiento de la presión osmótica.

El crecimiento de células animales en un medio de cultivo completo es

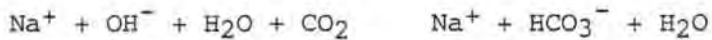
óptimo cuando el medio está tamponado a $\text{pH} = 7,2-7,4$. Las sustancias reguladoras de pH presentan una efectividad óptima cuando su pK_a es próximo al pH requerido.

La sustancia más comunmente utilizada en medios de cultivo de tejidos es el bicarbonato sódico, que se disocia según la siguiente ecuación:



Tiene dos importantes desventajas:

- el bicarbonato sódico tiene un $\text{pK}_a = 6,3$ a 37°C , por lo que su poder regulador de pH no es óptimo respecto al pH fisiológico;
- la disociación del bicarbonato sódico libera CO_2 , resultando un incremento en la alcalinidad, por lo que es necesario controlar dicha disociación introduciendo CO_2 en la atmósfera del cultivo, hecho que previene la liberación de CO_2 y reduce la concentración de iones hidroxilo en la solución:



Las soluciones reguladoras de pH pueden dividirse en dos grupos:

- aquellas soluciones que se equilibran con aire en un sistema cerrado y que contienen una concentración baja de bicarbonato sódico: p.e.: solución Hanks;
- aquellas soluciones que se equilibran con una fase gaseosa en la que la tensión de CO_2 es alta (aproximadamente 5%) y que contienen una alta concentración de bicarbonato sódico en solución: p.e.: solución Earle.

La solución fisiológica Earle presenta un alto poder regulador del pH ya que contiene una gran cantidad de bicarbonato sódico, pero su empleo es dificultoso ya que requiere la presencia de una fase gaseosa muy rica en CO_2 (5% CO_2 y 95% aire) en el medio de cultivo. La no utilización de esta atmósfera rica en CO_2 provoca un rápido aumento de pH a la temperatura normal de incubación. El color púrpura del medio indica entonces una elevación del pH que implica la inhibición del crecimiento celular.

Un método alternativo consiste en la utilización de un medio con suficiente capacidad reguladora de pH , pero que no requiera la presencia de una

atmósfera tan rica en CO₂ sobre el medio de cultivo. En algunos casos esta situación puede lograrse utilizando un medio que contenga solución Earle, pero con una concentración de bicarbonato sódico no superior a 0,85 g/l.

LEIBOVITZ (1963) presentó una solución, utilizando el poder regulador de pH de aminoácidos con bases libres (no en forma de clorhidratos), eliminando el bicarbonato sódico, sustituyendo galactosa por glucosa y adicionando piruvato. El pH resultante es 7,8 aproximadamente, algo superior al de otras soluciones reguladoras, pero dado que no existe liberación de CO₂, el pH de la solución no sufre fluctuaciones importantes y permite el crecimiento celular en cultivo abierto.

GOOD et al. (1966) presentaron una solución eficaz al problema mediante la utilización del denominado tampón HEPES (ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-etanosulfónico). Este compuesto actúa como zwitterion, siendo óptimo para medios de cultivo de tejidos debido, principalmente, a que no requiere una atmósfera enriquecida en CO₂ para el mantenimiento correcto del pH. Esta sustancia presenta un peso molecular de 238,3 g, un pK_a de 7,3 a 37 °C, pK_a/°C = -0,014 siendo su solubilidad 2,25 M a 0 °C. El tampón HEPES es satisfactorio en medios de cultivo tisulares, pudiendo presentar efectos tóxicos únicamente a concentraciones superiores a 40 mM. Se utiliza habitualmente a una concentración de 20 mM. Si es necesaria la adición de bicarbonato sódico al medio de cultivo, como requerimiento nutricional, se recomienda una concentración de bicarbonato inferior a 0,85 g/l, cuando la concentración de HEPES es 20 mM.

2.1.2.3.4.- SOLUCIONES FISIOLÓGICAS

A lo largo del desarrollo del cultivo in vitro de Brachylaima ruminæ hemos precisado la utilización de soluciones fisiológicas empleadas en el aislamiento de metacercarias obtenidas por disección del Gasterópodo segundo hospedador intermediaeio, en los sucesivos lavados de las mismas y como parte integrante de los medios de cultivo ensayados.

La solución fisiológica más frecuentemente empleada en cultivos ha sido la llamada solución HANKS (Flow Laboratories) obtenida a partir de sales HANKS en polvo. Su formulación es la siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	185,5	mg/litro
KCl.....	400,0	"
KH ₂ PO ₄	60,0	"
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	200,0	"
NaCl.....	8000	"
Na ₂ HPO ₄	47,50	"
Glucosa.....	1000	"
Rojo de fenol sódico.....	17,00	"

Las sales HANKS polvo no contienen bicarbonato sódico, por lo que se adiciona esta sustancia en el momento de reconstruir la solución acuosa. La preparación de la solución, y su esterilización en caso necesario, son descritas en los apartados correspondientes a técnicas de cultivo in vitro (véase apartado 2.2.6.1.2).

La formulación original indicada por HANKS & WALLACE (1949) contiene una concentración de Na₂HPO₄ ligeramente superior a la existente en la anteriormente expuesta.

2.1.2.3.5.- ANTIBIOTICOS

La utilización de antibióticos en el cultivo in vitro de Trematodos es muy frecuente en la mayoría de los trabajos efectuados por distintos autores. En nuestro trabajo hemos adicionado antibióticos a la solución Hanks estéril, en que se realiza el lavado de las metacercarias, previamente al inicio de los cultivos, así como a los medios de cultivo químicamente definidos M199 y CMRL 1066.

En todos los casos hemos utilizado una solución de antibióticos que contiene penicilina 5000 U.I./ml y estreptomina 5000 um/ml (Flow Laboratories). Estos antibióticos fueron empleados en una concentración final de 100 U.I./ml y 100 ug/ml respectivamente tanto para el lavado de metacercarias como en los medios químicamente definidos.

2.1.2.3.6.- INSTRUMENTAL

Las técnicas de cultivo in vitro requieren el empleo de métodos especiales que implican el concurso de un instrumental y aparatos adecuados. Estos tienen como finalidad principalmente obtener condiciones de asepsia y facilitar la observación de los cultivos. Son los siguientes:

- cabina de flujo laminar:
- dispensador automático para pipetas provisto de filtro de aire (Pipet-Aid AC ONLI Drummond Scientific Co.); utilizado para inoculación de metacercarias en cultivo, preparación de los medios de cultivo, adición y manipulación de factores de crecimiento, toma de muestras, etc., al objeto de evitar la introducción de contaminación por parte del operador,
- tubos tipo LEIGHTON (Bellco Glass Inc.); tamaño del tubo: 16 93 mm; tamaño de ventana: 15 55 mm; provistos de tapón a rosca; vidrio de borosilicato; estos tubos son ampliamente utilizados en cultivos in vitro ya que permiten una óptima visualización del estado del cultivo dado que poseen una superficie horizontal; todos los cultivos llevados a cabo en el presente trabajo lo han sido utilizando los tubos descritos, exceptuando el cultivo en medios semisólidos donde hemos empleado cápsulas de Petri de plástico de diámetro 9 cm;
- microscopios invertidos: OLYMPUS COMPACT INVERTER MICROSCOP (Olympus, Tokio, C.K.) y LEITZ DIAVERT (Germany); estos microscopios han sido intensivamente empleados en la observación diaria de los cultivos contenidos en tubos Leighton; permiten apreciar rápidamente el estado evolutivo del cultivo, la mayor o menor actividad de los individuos, así como el crecimiento de los mismos, aunque de una manera empírica.

2.2.- METODOS

El método de trabajo establecido en el presente estudio ha conllevado el

empleo de distintas técnicas que expondremos en el presente apartado.

Algunas de estas técnicas, tales como las técnicas malacológicas y mastozoológicas, las técnicas helmintológicas y las técnicas de infestación experimental, tienen un carácter general y pueden ser comunes en determinados aspectos, a estudios tanto cronobiológicos como histológicos o de cultivo in vitro. Los resultados antedichos requieren, además, el concurso de técnicas propias, específicas y dirigidas al esclarecimiento de aspectos concretos dentro de cada estudio. Estas técnicas son descritas detalladamente, presentándose separadamente las técnicas cronobiológicas y las técnicas de cultivo in vitro.

2.2.1.- TECNICAS REFERENTES A HOSPEDADORES

Debiendo estudiarse distintos aspectos de las formas larvarias, tanto cercarias como metacercarias, de Brachylaima ruminae se hace necesaria la recolección en la Naturaleza de los Gasterópodos Pulmonados terrestres que actúan como hospedadores intermediarios en su ciclo evolutivo y su posterior mantenimiento en el Laboratorio. Asimismo, los estudios efectuados sobre la forma adulta de dicho Trematodo conllevan la necesidad de disponer del hospedador definitivo y mantenerlo en el Laboratorio.

2.2.1.1.- TECNICAS MALACOLOGICAS

Exponemos aquí las técnicas referidas a la recolección y mantenimiento de los Gasterópodos albergantes de las formas larvarias de cercaria y metacercaria del Trematodo en estudio.

2.2.1.1.1.- RECOLECCION DE GASTEROPODOS TERRESTRES

La recolección del Pulmonado terrestre Rumina decollata, actuante como primer y segundo hospedador intermediario de Brachylaima ruminae, se efectuó con ocasión de distintas expediciones llevadas a cabo a la isla de Formentera, la más meridional del Archipiélago Balear y la segunda en extensión de las llamadas Islas Pitiusas.

La malacofauna de Formentera es pobre (véase JAECKEL, 1952, 1954; GASSULL, 1963, 1964, 1965, 1969, 1984; SCHRODER, 1978; PAUL, 1982), por lo que la recolección se realizó únicamente en enclaves concretos, previamente conocidos y prospectados ya en anteriores expediciones, en los que la densidad poblacional de la especie de caracol en cuestión, así como la presencia de los demás elementos necesarios para la evolución del ciclo de Brachylaima ruminae, habían sido determinadas y estudiadas suficientemente con anterioridad.

Los individuos de Rumina decollata utilizados en las experiencias objeto de este escrito proceden de los enclaves de Ca'n Campanich y de Ca'n Carlos, situados en las proximidades de Es Caló, en el istmo de la isla. La búsqueda y recolección de los caracoles de la especie Rumina decollata se llevó a cabo lógicamente teniendo en cuenta las características ecológicas de este Gasterópodo en la isla de Formentera, debidamente apuntadas ya por MONTOLIU (1978, 1984).

El traslado al Laboratorio de estos caracoles se realizó en cajas de plástico con la tapadera perforada. En su interior se colocó tierra, hojas secas y musgo procedentes del mismo lugar donde se había recolectado los Gasterópodos.

2.2.1.1.2.- MANTENIMIENTO DE GASTEROPODOS EN EL LABORATORIO

El mantenimiento en el Laboratorio de los Gasterópodos recolectados es de primordial importancia en este estudio, ya que es necesaria una disponibilidad total de los mismos, al objeto de programar correctamente las experiencias. Es, también, totalmente necesaria una conservación en óptimas condiciones, evitando las consecuencias que factores negativos pudieran ejercer sobre los Gasterópodos. Únicamente en un óptimo estado de conservación los Pulmonados proporcionarán datos fidedignos libres de posibles errores introducidos por mala alimentación, condiciones deficitarias de humedad, etc.

A estos efectos, los caracoles se dispusieron, en el Laboratorio, en cajas de madera de distintos tamaños según el número de especímenes albergados, constituidas únicamente por fondo y paredes, siendo el techo una malla de plástico que garantiza la apropiada ventilación e iluminación.

En el interior de la caja se adecúa un biotopo mediante tierra orgánica de un espesor de 3-4 cm, conteniendo carbonato cálcico, mezclado con arena para facilitar el drenaje. Sobre la tierra se sitúa una capa de musgo que contribuye al mantenimiento de la humedad. Asimismo, reproduciendo la situación en la Naturaleza, se dispone piedras cóncavas sobre la tierra, que proporcionan cobijo y humedad. La alimentación se resuelve con hojas frescas de lechuga, escarola o col renovadas diariamente.

La humedad se mantiene a nivel necesario rociando la tierra con agua natural, de montaña, diariamente y preferentemente al atardecer, evitando así el aletargamiento de los caracoles. La excesiva retención de agua se evita situando las cajas en una estantería metálica que deja libre el fondo de las mismas, permitiendo la salida del exceso de agua.

Estas cajas de madera fueron sustituidas posteriormente por cajas de plástico en las que se dispuso igualmente tierra orgánica, musgo y piedras. La ventilación se consigue practicando orifios en la tapadera. En ellas la humedad se mantiene durante un período de tiempo mayor, permitiendo un buen mantenimiento de los Gasterópodos. Se evita, así, la putrefacción del fondo de las cajas de madera, que aparece tras un tiempo más o menos prolongado de uso de las mismas.

Es importante etiquetar rigurosamente cada caja, indicando la especie contenida, el número de ejemplares, lugar de recolección, fecha de la misma y, en su caso, la experiencia que con ellos se hubiere realizado.

2.2.1.2.- TECNICAS MASTOZOLOGICAS

Exponemos en este apartado las técnicas referentes al mantenimiento de los Micromamíferos albergantes de las formas adultas del Trematodo.

2.2.1.2.1.- MANTENIMIENTO DE MICROMAMIFEROS EN EL LABORATORIO

El Micromamífero utilizado como hospedador definitivo, es decir, con capacidad para albergar la forma adulta de Brachylaima ruminæ, ha sido, en nuestro caso, el roedor Mus musculus (véase apartado 2.1.1.2.2). Los ejempla-

res provienen de una cepa de ratones caseros capturados en la ciudad de Barcelona y pertenecientes a la subespecie domesticus, tal y como hemos indicado con anterioridad.

Su mantenimiento en estabulario es sencillo, empleándose las mismas jaulas utilizadas para ratones albinos. La alimentación se resuelve con pan seco y agua, alternando con un pienso de mantenimiento comercial (PANLAB, S.L.). La reproducción tiene lugar a lo largo de todo el año.

2.2.2.- TECNICAS HELMINTOLOGICAS

Exponemos, como técnicas helmintológicas, todas aquellas técnicas referidas a las distintas formas evolutivas del helminto en estudio, Brachylaima ruminæ y cuyo objetivo es evidenciar y permitir el estudio morfológico y morfométrico de las cercarias, metacercarias y adultos del Trematodo antedicho.

Incluimos en este apartado las técnicas que denominamos de determinación específica, que consideramos de importancia capital en nuestro estudio y punto de partida del mismo, por estar dirigidas a la detección y determinación del estadio larvario de cercaria. Su objetivo será detectar las cercarias y establecer su pertenencia a la especie Brachylaima ruminæ, premisa absolutamente indispensable para la posterior obtención experimental de metacercarias y adultos que pertenecerán, sin lugar a dudas, a dicha especie. Asimismo, indicamos, en técnicas microscópicas generales, los procesos de fijación, coloración, etc., más comúnmente realizados sobre metacercarias y adultos.

2.2.2.1.- TECNICAS DE DETERMINACION ESPECIFICA

La determinación específica de cercarias conlleva el desarrollo de dos procesos consecutivos. El primero de ellos es la detección de Pulmonados albergantes de cercarias, es decir, la detección de los primeros hospedadores intermediarios. El segundo proceso a realizar es el estudio quetotáxico de las cercarias emitidas. Describimos ambos procesos a continuación.

2.2.2.1.1.- DETECCION DE PULMONADOS ALBERGANTES DE ESPOROCISTOS EMISORES DE CERCARIAS

Tras la recolección de los primeros hospedadores intermediarios, potencialmente emisores de cercarias, se ha de proceder a la confirmación de los Gasterópodos efectivamente parasitados, desechando aquellos ejemplares no emisores.

Los Gasterópodos recolectados, presuntos portadores de esporocistos cercariógenos, son dispuestos individualmente, en pequeñas cápsulas de Petri, cuyo fondo se cubre con una fina película de agua natural al efecto de proporcionar el sustrato y la humedad necesaria para facilitar la emergencia de cercarias. Tras mantener los Pulmonados durante un período de tiempo prudencial en estas condiciones, se observa la cápsula bajo una lupa binocular, cuidando de someter a observación la totalidad de la misma. Si el caracol se halla infestado con esporocistos maduros, las cercarias emergerán libremente al exterior al encontrarse en un medio húmedo. Las cercarias son transparentes y fácilmente visibles por su movimiento de reptación, si bien pueden permanecer inmóviles adoptando el aspecto de una gotita de agua.

Los caracoles que han sido detectados como emisores de cercarias deben mantenerse aislados de los demás Gasterópodos no emisores, evitando así una posible infestación de estos últimos por cercarias. Asimismo, los caracoles emisores serán separados entre sí, en cajas individuales, o a la espera de ser utilizados para efectuar estudios en el Laboratorio.

Es de destacar la conveniencia de reexaminar los caracoles que en un primer exámen resultaron no emisores de cercarias, transcurrido un cierto intervalo de tiempo, a fin de asegurar el resultado.

2.2.2.1.2.- DETERMINACION DE CERCARIAS POR QUETOTAXIA

Las preparaciones de quetotaxia constituyen una técnica cuya finalidad es evidenciar el aparato sensorial, muy relacionado con el sistema nervioso.

RICHARD (1971) y BAYSSADE-DUFOUR (1979) demuestran la gran importancia de la quetotaxia de cercarias por su gran aportación de conocimientos sobre la sistemática y la filogenia de los Trematodos. Como indican estas autoras, es ampliamente admitida la hipótesis de que los Digénidos son primitivamente parásitos

de Moluscos, habiendo sufrido secundariamente una adaptación a los Vertebrados. Admitido esto, es interesante fundamentarse en las formas larvarias más que en los adultos para organizar y establecer su sistemática y filogenia. LA RUE (1957) desarrolló una clasificación fundamentada en caracteres larvarios, lo cual tiene un alto valor filogenético, pero está construida sobre el aparato excretor cuya observación es dificultosa. La morfología de las cercarias es adaptativa y sensible a convergencias, pero el aparato sensorial está directamente relacionado con el sistema nervioso, que es menos sensible a convergencias y fenómenos adaptativos. Conociendo la importancia sistemática del aparato sensorial en los Invertebrados, es interesante explotarla comparativamente para el estudio sistemático de los Trematodos.

Para el estudio de las papilas sensoriales hemos utilizado la técnica de impregnación con NO_3Ag descrita por COMBES, BAYSSADE-DUFOUR & CASSONE (1976), cuya realización es más sencilla que la de RICHARD (1971) y que fué puesta a punto en su día, en nuestro Laboratorio, por MONTOLIU (1978).

La técnica consta de los siguientes pasos:

- disponer varias cercarias vivas, mediante una fina pipeta, en un pocillo de una bandeja de plástico que consta de múltiples pocillos;
- llenar el pocillo de agua destilada repetidas veces, vaciándolo sucesivamente mediante una pipeta al objeto de lavar las cercarias y evitar la posibilidad de impurezas;
- retirar, tras el último lavado, el exceso de agua del pocillo, dejando únicamente el mínimo posible;
- situar, en el pocillo que contiene las cercarias, unas gotas de solución de nitrato de plata al 3-5%, con una pipeta que se utilizará únicamente para esta solución;
- exponer 5-10 minutos a la luz solar o bajo una lámpara de rayos ultravioletas;
- retirar el nitrato de plata con la misma pipeta anterior;
- llenar, con pipeta limpia, el pocillo de agua destilada y realizar varios lavados sucesivos, utilizando pipetas limpias cada vez.

Realizada la impregnación y tras los últimos lavados con agua destilada de las cercarias, que eliminan todo resto de nitrato, se procede al montaje de las cercarias entre portaobjetos y cubreobjetos. El medio de montaje elegido ha sido Goma de Cloral de FAURE que es miscible con el agua y no requiere una deshidratación previa de las cercarias impregnadas. Su fórmula es la siguiente:

Agua destilada.....	50 cc
Hidrato de cloral.....	50 gr
Glicerina.....	20 cc
Goma arábica.....	30 gr

Se disuelve el cloral en frío, se añade la glicerina y se mezcla bien; en esta solución se disuelve la goma arábica introducida en una pequeña bolsa de gasa.

Para montar las cercarias se retira el agua del último lavado y con una pipeta se traslada las cercarias, en un mínimo de agua, sobre un portaobjetos y se rodean con la Goma de Cloral. Cabe también la posibilidad de añadir unas gotas de Lactofenol a la Goma de Cloral pues actúa favorablemente, haciendo que las cercarias queden más extendidas y clarificándolas. Sin embargo, presenta el inconveniente de que es corrosivo, con lo cual la duración de las preparaciones no es tan prolongada. Las preparaciones obtenidas por uno u otro sistema requieren el sellado con laca, esperando, antes de proceder al lacado, que la goma se haya secado ligeramente.

Las cercarias impregnadas, examinadas al microscopio, aparecen claras, casi blancas sobre fondo amarillo. Según la calidad de las impregnaciones, las papilas sensoriales, teniendo la misma localización, pueden adquirir aspectos muy diferentes. Si la impregnación ha resultado buena, las papilas se presentan bajo la forma de un pequeño círculo marrón de 1,5 a 1,8 μ m de diámetro, en cuyo centro se halla un punto igualmente marrón que es el corte óptico del cilio. Los contornos de los orificios de las glándulas de penetración se colorean igualmente, si bien no son circulares en general y están desprovistos de punto central.

RICHARD (1971) propone una nomenclatura de las papilas basada en una cercaria hipotética, en la que las papilas están dispuestas en las intersec-

ciones de seis ejes longitudinales, dos ventrales, dos laterales y dos dorsales, correspondientes a los ejes nerviosos, con círculos transversales correspondientes a las comisuras. Desde la parte anterior hacia la parte posterior de la cercaria, RICHARD (1971) sitúa cuatro círculos transversales para la zona cefálica, tres para la zona preacetabular, uno para la zona media o acetabular, tres para la zona postacetabular, once para el tronco caudal y once para cada furca. Sobre el acetábulo las papilas se disponen en círculos concéntricos. La cercaria hipotética se aproxima mucho a las cercarias del género Schistosoma.

2.2.2.2.- TECNICAS MICROSCOPICAS GENERALES

Exponemos aquí las técnicas generales utilizadas en el estudio microscópico de metacercarias y adultos de Brachylaima ruminæ. Hemos de puntualizar que aquellas técnicas de fijación y coloración específicamente destinadas al estudio histológico o de cultivo in vitro del material parasitológico serán expuestas en los apartados correspondientes a técnicas histológicas y a técnicas de cultivo.

2.2.2.2.1.- FIJACION Y CONSERVACION

El líquido fijador más comúnmente empleado para la fijación de Trematodos, tanto en sus formas larvarias como adultas, es el líquido fijador de BOUIN. En nuestro caso las fijaciones se han realizado siempre sobre material vivo.

Los Trematodos deben ser fijados entre portaobjetos y cubreobjetos. Para ello se deposita el verme en vivo, mediante una pipeta o pincel, en una pequeña gota de agua sobre el portaobjetos. Se coloca una gota de líquido de BOUIN en la cara inferior de un cubreobjetos y se deja caer éste sobre el Trematodo, cuidando al binocular de efectuar la fijación en un momento en que el verme no se halle ladeado. En el caso de que la fijación ocurriera en posición ladeada del ejemplar, puede enderezarse convenientemente si se opera con rapidez, mediante unos toques certeros y adecuados en la dirección deseada realizados con una fina aguja enmangada. El Trematodo debe permanecer unos

20 minutos entre portaobjetos y cubreobjetos. Posteriormente se levanta cuidadosamente el cubreobjetos y se traslada el verme con un pincel a una cápsula de Petri con BOUIN, donde permanecerá alrededor de 30 minutos. Finalmente se lleva el parásito a alcohol de 70º, en el cual conviene realizar varios pases o lavados hasta que el verme pierda por completo la coloración amarilla proporcionada por el líquido fijador.

El líquido fijador de BOUIN se prepara según la siguiente fórmula:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico....	75p
Formol al 40%.....	25p
Acido acético glacial.....	5p

La conservación del material se realiza siempre en alcohol de 70º, cuidando de no caer en el error de mantener el material fijado en BOUIN durante un tiempo excesivo, ya que este líquido es un buen fijador pero no un buen conservador.

2.2.2.2.2.- COLORACION DEL MATERIAL FIJADO

En la obtención de preparaciones permanentes, tanto de formas larvarias como adultas, del Digénido en cuestión, cuya finalidad es el estudio morfológico general de las mismas, se ha utilizado como colorante Carmín Borácico de GRENACHER, propio para teñir Trematodos.

La fórmula del colorante es la siguiente: se mezcla 100 cc de una solución acuosa de Bórax al 4% con 2 ó 3 gr de Carmín nº 40; se hierve suavemente durante 30 minutos y luego se añade igual volumen de alcohol de 70º; se deja reposar 24 horas y finalmente se filtra.

El material a teñir debe permanecer en el colorante durante 24 horas. En el caso de hallarse conservados los helmintos en alcohol de 70º, no es necesario efectuar lavado previo alguno. Tras la tinción se efectúa la diferenciación en alcohol clorhídrico. Para ello se extrae los vermes del colorante, trasladándolos a alcohol de 70º, al cual se adiciona lenta y meticulosamente, gota a gota, ácido clorhídrico comercial. La operación debe ser controlada bajo lupa binocular, empleando tanto luz superior como iluminación infe-

rior para obtener una buena diferenciación. Esta suele coincidir con la observación de una tonalidad rosada en el parásito con luz superior, apreciándose simultáneamente una buena distinción, por transparencia, de las estructuras con luz inferior. Una diferenciación excesiva impide la correcta visualización de las estructuras y obliga a una nueva tinción. La duración de esta operación varía según el grosor y tamaño del verme. Así también, para formas adultas del Trematodo se puede emplear ácido clorhídrico concentrado, siendo suficiente la utilización de ácido clorhídrico 1N en formas larvarias.

Realizada la diferenciación se introduce los vermes en una capsulita con alcohol de 70º, donde deberán permanecer unos 10 minutos. A continuación se procede a los pasos previos al montaje.

2.2.2.2.3.- MONTAJE

El medio de montaje utilizado para la obtención de preparaciones permanentes del material fijado y teñido ha sido el Bálsamo de Canadá. Esta resina comercial ha sido siempre la más empleada por solidificar muy rápidamente y proporcionar preparaciones de vida casi indefinida.

El empleo del Bálsamo de Canadá como medio de montaje implica una deshidratación previa del material, pues el Bálsamo no es soluble en agua. Para llevar a cabo esta deshidratación en el montaje de formas parásitas, tanto larvarias como adultas, se ha utilizado una serie de pequeñas capsulitas de Petri y un pincel, o una pipeta si el material es de reducidas dimensiones, para trasladar los helmintos desde una capsulita a otra. Tras la diferenciación el verme permanecerá unos 10 minutos en alcohol de 70º. Luego pasará sucesivamente 5 minutos en alcohol de 95º, 5 minutos más en alcohol etílico absoluto, 5 en alcohol butílico y por último 5 en xilol, finalizándose con ello la cadena de deshidratación. Es posible reducir los tiempos empleados en cada paso para las formas larvarias. Se procede al montaje del material entre portaobjetos y cubreobjetos utilizando la menor cantidad posible de Bálsamo de Canadá, a fin de evitar un grueso excesivo entre verme y cubreobjetos que pudiese dificultar el uso de un objetivo de gran aumento en su estudio microscópico.

2.2.2.2.4.- ESTUDIO AL MICROSCOPIO

Relacionamos, en este apartado, los microscopios utilizados en este trabajo:

- Microscopio AMPLIVEL de Zeiss (Jena): utilizado exclusivamente para estudio directo en óptica normal y mediciones;
- Microscopio WILD M-20 provisto de dispositivo de dibujo para observación binocular: utilizado especialmente para dibujo y visualización de la quetotaxia de cercarias;
- Microscopio ZETOPAN de Reichert provisto de dispositivo de fotografía: utilizado en iluminación y contraste de fases, tanto para observación directa como para fotografía (películas utilizadas: Kodak Ektachrome ET 135-36 de 160 ASA y 23 DIN para diapositivas en color y Kodak Plus-X-Pan PX 135-36 de 125 ASA y 22 DIN para fotografías en blanco y negro;
- Lupa binocular NIKON (Stereoscopic microscope model SMZ-6) provista de "zoom": utilizada en el recuento de cercarias y en la disección de los hospedadores.

2.2.2.3.- TECNICAS MORFOMETRICAS

Se ha realizado mediciones al microscopio sobre material fijado y montado in toto. Todas las medidas efectuadas han sido tomadas siempre en un mismo microscopio (ver apartado anterior) con la ayuda de un micrómetro ocular que previamente había sido calibrado para dicho microscopio. Las características morfométricas de los distintos especímenes estudiados, tanto de los obtenidos experimentalmente en sus hospedadores naturales como los obtenidos en cultivo in vitro, son utilizadas fundamentalmente para llevar a cabo estudios morfométricos comparativos entre ambos tipos de vermes. En todo caso se ha tomado en ~~mu~~ las siguientes medidas:

Longitud corporal: distancia entre los dos puntos más extremos del verme. Esta distancia debe tomarse siempre pasando por el eje bilateral del Trematodo aunque sea necesario hacerlo en dos o más operaciones. De esta manera

se consigue una mayor exactitud en el cálculo de las superficies corporales.

Anchura corporal máxima: se toma la distancia sobre el eje perpendicular al de la longitud y por donde el verme es más ancho.

Ventosa oral (ϕ máximo x ϕ opuesto): las dimensiones de la ventosa vienen dadas por dos parámetros, diámetro máximo y diámetro opuesto. El interés de tomar dos diámetros que sean perpendiculares reside en que el cálculo de superficies puede realizarse mediante la fórmula de la superficie de una elipse en el caso de que las ventosas no formen una circunferencia perfecta.

Ventosa ventral (ϕ máximo x ϕ opuesto): se emplea para medir el acetábulo los mismos parámetros que para la ventosa oral, diámetro máximo por diámetro opuesto.

Distancia entre ventosas: es la distancia existente entre el margen posterior de la ventosa oral y el margen anterior del acetábulo, medida más exacta, a nuestro entender, que la que une los dos centros de las ventosas, preconizada esta última por diversos autores.

Faringe (long. x anch. máx.): su dimensión viene determinada por dos parámetros, su longitud, coincidente con el eje bilateral del verme, y su anchura máxima sobre el eje transversal.

Ovario (ϕ máximo x ϕ opuesto): se procede igual que para las ventosas, ya que las gónadas son más o menos esféricas.

Testículo I (ϕ máximo x ϕ opuesto): es el testículo anterior y se mide igual que las ventosas.

Testículo II (ϕ máximo x ϕ opuesto): es el testículo posterior y sus parámetros son los mismos que para las ventosas.

Huevos (long. x anch. máx.): su dimensión viene determinada por dos parámetros, su longitud y su anchura máxima. Se escoge para medir aquellos huevos que son ya maduros, pero no localizados ni en el inicio del útero ni en el metratermo, ya que los primeros no presentan su forma oval definitiva y los segundos pueden estar deformados. Una mejor valoración de la variabilidad de las dimensiones de los huevos aconseja medir en cada ejemplar de Trematodo por lo menos dos huevos.

Distancia Acetábulo-Testículo I: es la distancia que une el margen posterior del acetábulo con el margen anterior del primer testículo. Esta medi-

da da una idea del crecimiento de la parte posterior del verme.

A partir de las mediciones descritas elaboramos superficies expresadas en μm^2 y relaciones entre ellas útiles para una mejor interpretación del desarrollo evolutivo de los vermes. Las efectuadas para este estudio se exponen a continuación:

Superficie corporal: para calcular esta superficie se emplea la fórmula del área de una elipse que se ajusta, si no exactamente, para medir la superficie corporal del verme. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$S = \pi \cdot r_1 \cdot r_2$$

que aplicada a la superficie corporal sería:

$$\text{Sup. corp.} = \pi \cdot \frac{\text{Longitud corporal}}{2} \cdot \frac{\text{Anchura máxima}}{2}$$

Superficie de la Ventosa oral: se aplica, como en el caso anterior, la fórmula del área de la elipse, que quedaría:

$$\text{Sup. VO} = \pi \cdot \frac{\phi \text{ máximo VO}}{2} \cdot \frac{\phi \text{ opuesto VO}}{2}$$

Los dos radios, r_1 y r_2 , equivaldrían a los diámetros máximo y opuesto dividido por 2 respectivamente. En el caso de que los dos diámetros fueran iguales se ha de aplicar la fórmula de la superficie de un círculo: πr^2 .

Superficie de la Ventosa ventral: se procede igual que para la ventosa oral:

$$\text{Sup. VV} = \pi \cdot \frac{\phi \text{ máximo VV}}{2} \cdot \frac{\phi \text{ opuesto VV}}{2}$$

Relación entre ventosas (VO/VV): es el resultado de dividir la superficie de la ventosa oral por la superficie de la ventosa ventral. Expresado en una fórmula sería como sigue:

$$\text{VO/VV} = \frac{\pi \cdot \frac{\phi \text{ máx. VO}}{2} \cdot \frac{\phi \text{ opuesto VO}}{2}}{\pi \cdot \frac{\phi \text{ máx. VV}}{2} \cdot \frac{\phi \text{ opuesto VV}}{2}} = \frac{\phi \text{ máx. VO} \cdot \phi \text{ opuesto VO}}{\phi \text{ máx. VV} \cdot \phi \text{ opuesto VV}}$$

El valor de esta relación oscila, en nuestros vermes, entre 0 y 2, pudiendo variar esta relación al pasar el Trematodo de uno a otro estadio evolutivo.

Situación del Acetábulo (VO-VV/long.): esta situación viene dada por la división de la distancia entre ventosas respecto a la longitud corporal del verme:

$$\frac{VO-VV}{\text{Long. corp.}} = \frac{\text{Distancia entre ventosas}}{\text{Longitud corporal}}$$

Esta relación informa sobre el crecimiento de la parte posterior del verme (desde el acetábulo hacia abajo) respecto al del resto del cuerpo.

Situación de las gónadas (VV-TI/long.): viene dada por la división de la distancia entre acetábulo y primer testículo respecto a la longitud corporal del verme:

$$\frac{VV-TI}{\text{Long. corp.}} = \frac{\text{Distancia entre acetábulo y primer testículo}}{\text{Longitud corporal}}$$

Esta relación informa sobre el crecimiento de la parte posterior del verme con respecto al resto del cuerpo de una manera directa.

2.2.3.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE INFESTACION

Los estudios cronobiológicos llevados a cabo sobre la emisión de cercarias de Brachylaima ruminae por el Gasterópodo primer hospedador intermedio Rumina decollata han sido realizados con caracoles emisores naturales, por lo que no hemos llevado a cabo infestación alguna de Gasterópodos no emisores para una posible obtención de emisores experimentales.

Por el contrario, los estudios histológicos programados sobre metacercarias y adultos de Brachylaima ruminae, así como los cultivos in vitro de metacercarias, han requerido la obtención experimental de estas formas evolutivas de Digénido, al objeto de asegurar estrictamente su pertenencia a la especie indicada. Con esta finalidad y a partir de cercarias procedentes de emisores naturales cuya identificación exacta se consigue mediante técnicas que-
totáficas (véase apartado 2.2.2.1.2), hemos realizado infestaciones experimentales del segundo hospedador intermedio con cercarias para la obtención de metacercarias e infestaciones experimentales del hospedador definitivo con metacercarias para la obtención de adultos.

Exponemos las técnicas utilizadas en el Laboratorio en cada uno de estos casos.

2.2.3.1.- INFESTACION DEL SEGUNDO HOSPEDADOR INTERMEDIARIO CON CERCARIAS

La finalidad de esta técnica de infestación consiste en posibilitar el acceso de las cercarias emitidas por el caracol primer hospedador intermedio a los caracoles que actuarán como segundos hospedadores intermedios. Para ello se dispondrá inicialmente del Gasterópodo emisor y de aquellos caracoles que se quiere infestar, sin olvidar constatar previamente, y durante un período prudencial de tiempo, la no emisión de cercarias.

El proceso consiste en colocar juntos el caracol emisor y aquellos que se quiere infestar, en un cristalizador de dimensiones adecuadas. Es conveniente señalar o destacar de una manera visible e inconfundible el individuo emisor a fin de evitar posibles errores posteriores.

Dispondremos en el fondo del cristalizador un papel de filtro bien empapado en agua natural, cubriendo totalmente dicho fondo. La finalidad de este papel de filtro es doble, pues mantiene, por un lado, la humedad necesaria para la emisión de cercarias y, por otra parte, constituye la base necesaria para la reptación de las cercarias, imprescindible en su traslado desde el caracol emisor hasta establecer contacto con el segundo hospedador. Debe puntualizarse la conveniencia de no cerrar herméticamente el cristalizador para facilitar la renovación de aire, por lo que se colocará la tapa invertida y manteniendo un resquicio abierto. También es posible prescindir de la tapa, colocando en su lugar una malla de plástico para que no escapen los caracoles, pero este último sistema requiere una constante vigilancia del cristalizador, rociando el papel de filtro antes de que se llegue a secar.

El tiempo que deberán permanecer en contacto el caracol emisor con los futuros segundos hospedadores puede oscilar entre 24 horas y 5 días. Se ha comprobado que un tiempo de infestación largo aumenta la probabilidad de que dicha infestación ocurra, al tiempo que aumenta también la intensidad de infestación por caracol infestado. En el caso de mantener el contacto durante varios días se vigilará con frecuencia el cristalizador para cambiar el papel de filtro y limpiar el cristalizador con agua natural. Es necesario efectuar esta limpieza a fin de evitar que se acumulen dentro del cristalizador la mucosidad y excretas de los caracoles, lo cual podría llegar a originar la muerte de los Gasterópodos. Para facilitar el proceso de infestación es conveniente bajar frecuentemente los caracoles que estén adheridos a las pa-

redes o techo del cristalizador y colocarlos juntos sobre el papel de filtro húmedo.

Durante el desarrollo de la infestación es conveniente suministrar alimento a los caracoles, consistente en hojas de lechuga tiernas, limpias y bien humedecidas con agua natural. Además de como alimento, la lechuga actúa, al igual que lo hace el papel de filtro, como base necesaria para la reptación de las cercarias. Las hojas de lechuga han de ser renovadas antes de que se pudran.

2.2.3.2.- INFESTACION DEL HOSPEDADOR DEFINITIVO CON METACERCARIAS

En la Naturaleza el hospedador definitivo adquiere el adulto correspondiente, en el caso de los Brachyláimidos, al ingerir un caracol terrestre parasitado con metacercarias infestantes.

Al intentar reproducir la infestación en el Laboratorio, se plantea la problemática de comprobar previamente que el caracol se halle infestado con metacercarias y por lo tanto, tener que recurrir a la disección de éste, resultando imposible la infestación por ingestión del caracol vivo.

El método de infestación seguido consiste en la intubación a nivel estomacal, en ratón, de las metacercarias mediante sonda gástrica. Se procede a diseccionar el caracol bajo lupa binocular, extrayendo cuidadosamente las metacercarias alojadas en el riñón, si bien muchas de ellas emergen espontáneamente. Tras varios lavados, para eliminar restos del caracol que pudieran obstruir la sonda, se aíslan las metacercarias en una pequeña cápsula de Petri con suero fisiológico o agua natural. Las metacercarias son intubadas mediante sonda gástrica, en este mismo medio líquido en el que se hallan aisladas. Tanto las dimensiones de la sonda gástrica a utilizar como la cantidad de líquido que se puede intubar dependen del tamaño del hospedador definitivo ensayado. Es de destacar la utilidad de separar en distintas capsulitas de Petri el número exacto de metacercarias a intubar por animal, evitando así errores de conteo.

Una infestación correcta requiere la inmovilización total del animal, en nuestro caso del ratón y la intubación de un número conocido de metacercarias, cuidando que éstas no resten adheridas a las paredes de la sonda. Los

animales así infestados fueron mantenidos a dieta de pan y agua natural.

2.2.4.- TECNICAS CRONOBIOLOGICAS

Las características propias que exhiben las técnicas utilizadas para el estudio de la emisión de cercarias nos ha llevado a considerarlas separadamente, teniendo en cuenta, asimismo, que han sido estructuradas y aplicadas por primera vez en nuestro Laboratorio.

El estudio cronobiológico de una emisión cercariana implica la determinación del número de cercarias emitidas por el hospedador de dichas formas larvarias, en función del tiempo y de los factores ambientales, principalmente iluminación (fotoperíodo) y temperatura (termoperíodo).

La metodología a seguir para la consecución de estos fines específicos requiere la concurrencia de los siguientes cuatro procesos:

- fraccionamiento de la emisión cercariana en función del tiempo;
- aislamiento y contaje de cercarias;
- estudio de la influencia de la iluminación;
- estudio de la influencia de la temperatura.

2.2.4.1.- FRACCIONAMIENTO DE LA EMISION CERCARIANA EN FUNCION DEL TIEMPO

Se incluye en este proceso las técnicas orientadas a conseguir el aislamiento, en intervalos regulares de tiempo, de las cercarias emitidas durante un período de tiempo determinado.

A este efecto se aísla individualmente los Moluscos emisores en sendas capsulitas de Petri de vidrio, a fin de llegar a establecer la emisión propia de cada individuo. En nuestro caso se partió de 18 ejemplares de Rumina decollata, emisores comprobados de cercarias. Estos son colocados en sendas capsulitas de Petri, cuidando de humedecer el fondo de las mismas con agua natural de montaña a fin de conseguir el grado de humedad necesario para la emisión de cercarias.

Se ha de impedir que el caracol pueda llegar a salir de la cápsula, pues induciría a error en el conteo de cercarias. Para lograrlo se sitúa la tapa de la capsulita en posición invertida sobre ella. A fin de permitir una ventilación adecuada del interior de la cápsula de Petri que posibilite una respiración normal del caracol, la tapa no cubrirá totalmente la capsulita, sino que se mantendrá una pequeña abertura. Esta abertura ha de ser mínima, ya que en caso contrario los Moluscos se introducen por ella y en sus intentos de ganar el exterior, desplazan la tapadera que puede llegar a caer. La abertura permite asimismo, el rápido equilibrio de la temperatura interior de la capsulita con la temperatura externa que será modificada en el curso de la experiencias.

Estas manipulaciones permiten el fraccionamiento de la cantidad de cercarias emitidas en función del tiempo e individuo emisor, simplemente cambiando a cada caracol emisor de una cápsula de Petri a otra una vez transcurrido el intervalo de tiempo estipulado (en nuestro caso, siempre de 1 hora).

2.2.4.2.- AISLAMIENTO Y CONTAJE DE CERCARIAS

El aislamiento de las cercarias emitidas por un individuo emisor determinado durante un período de tiempo conocido se logra, tal y como acabamos de apuntar, trasladando el Molusco, en el momento requerido, a una nueva cápsula de Petri, idéntica a la de procedencia y dispuesta de la misma manera. En la cápsula inicial quedarán recogidas y aisladas todas las cercarias emitidas.

Previamente al tránsito del Gasterópodo desde la cápsula inicial a la final, se rociará todo el caracol con agua natural de montaña para recoger, en la cápsula inicial, todas las posibles cercarias que se mantengan sobre la concha o el cuerpo del hospedador. Estas cercarias serán arrastradas por el agua y quedarán recogidas en la cápsula inicial. Esta manipulación se practicará con el máximo cuidado, para evitar la pérdida de cercarias que pueden quedar sobre el Molusco o ser arrastradas fuera de la cápsula, introduciendo errores en el conteo posterior. El rociado del Molusco con agua de montaña cumple, además, la finalidad de estimular al caracol para una continuación de la emisión cercariana.

Las cercarias, cuidadosamente aisladas y mantenidas en sus correspondientes capsulitas con agua de montaña, se observan a la lupa binocular, presentando una apariencia transparente y una movilidad relativa. Ambos factores dificultan un conteo correcto de las mismas, por lo que se añade, a la cápsula a observar, unas gotitas de solución de Lugol, mediante lo cual las cercarias mueren, perdiendo su movilidad, y adquieren una coloración parda, siendo así perfectamente visibles y facilitándose su conteo a la lupa binocular. Para su conteo, en nuestro caso, se ha procedido siempre a un conteo exacto, esto es, individuo por individuo, con ayuda de un pincel adecuado para la separación de las cercarias ya contadas.

Las cápsulas de Petri, que contienen las cercarias emitidas y a las que se ha añadido unas gotas de Lugol, pueden guardarse durante tiempo, practicándose el conteo en el momento más oportuno.

Es imprescindible una numeración de las cápsulas, cuidando de que cada individuo emisor se sitúe, a lo largo de los distintos períodos de tiempo estudiados, en cápsulas sucesivas etiquetadas con un mismo número. Este número coincidirá, además, con el situado en la caja de madera o plástico que constituirá el habitáculo de cada Molusco en períodos de reposo o interexperimentales.

Los Gasterópodos de la especie Rumina decollata emisores de cercarias se identificaron individualmente con un número.

2.2.4.3.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ILUMINACION

Hemos destacado los factores iluminación y temperatura como aquellos factores del medio ambiente cuya influencia es a priori la más relevante sobre la emisión cercariana. No debemos olvidar, empero, el posible concurso de otros factores abióticos sometidos a variaciones cíclicas, que pueden llegar a constituir también sincronizadores potenciales de la emisión cercariana.

El estudio cronobiológico de la emisión cercariana en el Laboratorio requiere la disociación de la acción de estos factores, iluminación y temperatura, para conseguir, así, establecer la influencia de cada uno de ellos.

La iluminación se ha programado en períodos alternos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad mediante el encendido, en período luminoso, de dos de los cuatro tubos GROLUX existentes en la cámara climática donde se realiza las experiencias. Estos tubos se encuentran situados en el fondo posterior del aparato, en posición vertical y, por lo tanto, perpendicularmente a la situación de las bandejas sobre las que se colocan las cápsulas que contienen los Moluscos emisores, con lo cual todos ellos reciben una intensidad uniforme de luz.

Mediante la programación de los períodos lumínicos en el tiempo, y manteniendo constante el factor temperatura, es posible estudiar la influencia de la iluminación sobre la emisión de cercarias.

2.2.4.4.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El efecto del termoperíodo sobre la emisión cercariana es estudiado mediante el empleo del aparato de ensayo de condiciones climáticas descrito anteriormente (véase apartado 2.1.2.1), estableciendo una iluminación constante lo cual permite observar, separadamente, la acción de la temperatura sobre la emisión.

El aparato utilizado permite modificar la temperatura interior mediante un mando situado en el exterior del mismo, de modo que hace innecesarios la apertura y cierre del aparato en cada cambio de temperatura.

La lectura de la temperatura interior del aparato se hace en un termómetro situado en esta zona pero, dado que el aparato presenta una doble puerta siendo transparente la interior, se consigue la lectura de la temperatura abriendo únicamente la puerta exterior. Se consigue así, eliminar toda posibilidad de alteración de temperatura originada por la apertura y cierre del aparato.

La temperatura es mantenida mediante una corriente continua de aire. Ello permite una uniformidad total de la misma en el interior del aparato y una estabilización rápida después de introducir una modificación en la temperatura.

Las cápsulas de Petri que contendrán los hospedadores emisores se sitúan en el climatizador, una hora antes del comienzo de la experiencia, rociadas

con agua de montaña en su interior, al objeto de que su temperatura sea exactamente la del interior del aparato, al situar en ella los Moluscos emisores justo al comienzo de la experiencia.

Simultáneamente se introduce en el climatizador otra serie completa de capsulitas que permanecerán sin caracoles, aunque ya con la película de agua, durante la primera hora de la experiencia. Transcurridos 60 minutos de ella, se inicia la operación de traslado de los Gasterópodos desde las capsulitas donde se habían situado, a la nueva serie de cápsulas.

Separada la primera serie de cápsulas, correspondiente a la primera hora de emisión y colocados los Moluscos en la segunda serie de cápsulas, que corresponderán a la segunda hora de emisión, se introducirá en el climatizador otra serie de cápsulas que permanecerán con su película de agua pero sin caracol, al objeto de que adquieran la temperatura programada durante la segunda hora de emisión.

El pulverizador que contiene el agua natural de montaña necesaria para el lavado de los Moluscos en el momento del cambio de cápsula, coincidente con cada hora, y para humedecer las cápsulas destinadas a la hora siguiente, se mantendrá constantemente en el interior del climatizador para que su temperatura sea, en todo momento, igual a la de los Moluscos emisores.

2.2.5.- TECNICAS HISTOLOGICAS

Una parte bien diferenciada del presente trabajo está dirigida al estudio histológico y citológico de las metacercarias y adultos del Trematodo Brachylaima ruminae. Con este estudio se pretende contribuir al esclarecimiento de la organización estructural de dicho Digénido, así como llevar a cabo algunos estudios referidos al morfofuncionalismo de los aparatos reproductores masculino y femenino. Las técnicas utilizadas a tales efectos presentan unas características propias bien definidas que nos llevan a tratarlas separadamente. El objetivo de estas técnicas es conseguir una exposición adecuada de los tejidos del Trematodo que permita su estudio. A tal efecto los vermes son incluidos en dos medios de inclusión distintos y se practica cortes de los mismos que son posteriormente teñidos para evidenciar las estructuras a considerar.

2.2.5.1.- DISECCION DE LOS SEGUNDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS Y HOSPEDADORES DEFINITIVOS EXPERIMENTALES

En el estudio histológico realizado sobre formas larvarias y adultas de Brachylaima ruminæ, hemos empleado metacercarias y adultos experimentales al objeto de asegurar estrictamente su pertenencia a la especie indicada.

Las metacercarias experimentales son obtenidas por infestación experimental de los segundos hospedadores intermediarios, caracoles de la especie Rumina decollata, con cercarias naturalmente emitidas por los primeros hospedadores intermediarios y cuya identificación se realiza por quetotaxia (véase apartado 2.2.3.1). La disección de los segundos hospedadores intermediarios para la obtención de metacercarias se lleva a cabo en forma análoga a la que se describe en técnicas de cultivo in vitro (véase apartado 2.2.6.3), aunque en el caso que nos ocupa se simplifica enormemente el proceso, por no ser necesario el mantenimiento de condiciones asépticas.

Utilizaremos en nuestros estudios histológicos únicamente metacercarias procedentes del riñón del Pulmonado Rumina decollata. La disección del caracol se inicia sometiéndolo a un lavado concienzudo en agua corriente para eliminar los restos de tierra que pueden quedar adheridos a la concha, realizándose el último lavado con agua natural de montaña.

El caracol se sitúa en una cápsula de Petri con una pequeña cantidad de suero fisiológico y procedemos a eliminar la concha utilizando tijeras finas para evitar dañar al Gasterópodo. Eliminada la concha, se traslada al caracol a una nueva cápsula con suero fisiológico, donde diseccionamos cuidadosamente el riñón procurando separarlo intacto y sin roturas del resto del Gasterópodo. El riñón se aísla en una nueva cápsula con suero donde se desgarrá cuidadosamente operando con dos finas agujas enmangadas. Las metacercarias emergen espontáneamente del riñón en su mayor parte, si bien algunas restan adheridas a los "acini" del mismo, por lo que han de ser cuidadosamente desprendidas con una aguja enmangada. Las metacercarias una vez libres, son trasladadas, mediante una pipeta Pasteur, a una nueva cápsula con suero, repitiéndose esta operación cuantas veces sea necesario, hasta conseguir que las metacercarias restan bien limpias y queden libres de todo residuo de "acini" del riñón del hospedador. La disección del caracol y el aislamiento de metacercarias son operaciones que han de realizarse bajo lupa binocular.

Los adultos de Brachylaima ruminæ utilizados en estudios histológicos son de origen experimental, es decir, obtenidos por infestación en el Laboratorio del hospedador definitivo con metacercarias asimismo experimentales. El hospedador definitivo empleado es el Micromamífero Mus musculus de la subespecie domesticus, criado en el Laboratorio y por tanto libre de estos parásitos. La infestación de estos hospedadores sigue la técnica ya descrita (véase apartado 2.2.3.2).

La disección de los hospedadores definitivos experimentales se realiza tras la muerte de los mismos por asfixia en eter. El animal es abierto cuidadosamente, exponiendo al exterior su tracto digestivo íntegro. Diseccionamos este tracto digestivo disponiendo separadamente, en cápsulas de Petri con suero fisiológico, sus distintos tramos. Así, estudiamos esófago y estómago, intestino delgado e intestino grueso y ciego. En todos los casos desgarramos el tubo digestivo con dos pinzas, evitando practicar cortes con bisturí que pudieran dañar a los vermes situados en su interior. El microhábitat habitual de Brachylaima ruminæ es el duodeno del hospedador, coincidiendo así nuestras observaciones con las efectuadas por MONTOLIU (1984). Los adultos, todavía vivos, se presentan fuertemente adheridos por su ventosa oral a la mucosa intestinal y exhiben un color rojo intenso en sus ciegos intestinales, apuntando la posibilidad de que en su alimentación incluyan sangre procedente del hospedador.

Algunos de estos adultos se desprenden espontáneamente de la mucosa intestinal, pero otros tienden a seguir fijados a la misma, por lo que han de ser pacientemente desprendidos mediante un pincel cuidando de no dañarlos.

La apertura del tubo digestivo del roedor y la búsqueda de vermes en el mismo ha de realizarse bajo la lupa binocular, aún cuando los vermes de varios días de edad son visibles a simple vista, destacando sobre la mucosa intestinal por su movimiento y por el color rojo intenso de sus ciegos intestinales. Los vermes son aislados, mediante pipeta Pasteur, en una cápsula con suero fisiológico, eliminando todo residuo de mucosa intestinal procedente del hospedador.

2.2.5.2.- FIJACION DE METACERCARIAS Y ADULTOS EXPERIMENTALES PARA SU ESTUDIO HISTOLOGICO

La fijación más comúnmente empleada en Trematodos utiliza BOUIN como líquido fijador y se realiza entre portaobjetos y cubreobjetos. Hemos empleado este tipo de fijación en parte del material constituido por metacercarias y adultos experimentales destinados a estudios histológicos, a fin de mantener un material que pueda ser utilizado como control en estudios comparativos. La técnica seguida en esta fijación ha sido ya expuesta en el apartado 2.2.2.1.

Las metacercarias y adultos experimentales, sobre los que hemos realizado el presente estudio histológico, han sido fijados en BOUIN caliente sin ser sometidos a presión alguna. El procedimiento seguido es muy simple: el material a fijar, bien sean metacercarias o adultos, obtenido por disección de los Gasterópodos segundos hospedadores intermediarios o de los roedores hospedadores definitivos experimentales, es dispuesto en cápsulas de Petri con suero fisiológico; los vermes, todavía vivos, son trasladados mediante pipeta Pasteur y en una mínima cantidad de suero, a un vial conteniendo BOUIN calentado a baño maría; dado el pequeño tamaño del material a fijar, no es necesario precisar con exactitud el volumen de BOUIN a emplear; una vez introducido el material en el vial se agita éste vigorosamente y se mantiene el material en el fijador durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, la fijación se detiene trasladando el material a alcohol de 70° o bien lavándolo en agua corriente. Ambos procedimientos tienen sus detractores y sus defensores según sean consultados trabajos de uno u otro autor, por lo que hemos empleado las dos técnicas al objeto de constatar a posteriori si existe o no diferencias apreciables entre ellas.

En el caso de emplear alcohol de 70° se procede a trasladar el material fijado a dicho alcohol, realizándose varios cambios del mismo hasta que el material pierde la coloración amarillenta que le confiere el BOUIN. Hemos llevado a cabo estos lavados situando el material en un pequeño vial que se llena de alcohol de 70° el cual diariamente es eliminado por decantación, manteniendo el mínimo posible, y es reemplazado por alcohol de 70° limpio. Esta operación se repite tantas veces como sea necesario hasta eliminar la coloración amarillenta del material fijado.

Si la fijación se detiene con agua corriente, se traslada el material desde el fijador a un nuevo vial con agua cuya boca se cierra con una gasa en varios dobles que se asegura a la boca del vial mediante una goma elástica. El conjunto se sumerge en un cristizador suficientemente grande, manteniéndolo bajo el grifo de manera que el agua se renueva constantemente. Esta operación se prolonga por espacio de tres horas. Transcurrido este tiempo el material es trasladado, mediante pipeta Pasteur, a un nuevo vial con alcohol de 50° donde permanecerá de 4 a 8 horas, tras lo cual es trasladado nuevamente a otro vial con alcohol de 70°.

El material procedente de ambas técnicas y mantenido en alcohol de 70° está dispuesto para ser utilizado posteriormente y se mantiene en viales perfectamente cerrados y cuidadosamente rotulados indicando especie, hospedador de que procede, carácter experimental, edad, tipo de fijación y procesado posterior.

2.2.5.3.- INCLUSION EN PARAFINA

La inclusión en parafina es una técnica ampliamente empleada en estudios histológicos, pues permite la confección de cortes de espesor variable sobre los que son aplicables gran número de tinciones de alta utilidad en este tipo de estudios.

La parafina es un medio de inclusión no miscible con agua, carácter que implica una deshidratación previa del material, en nuestro caso vermidiano, que ha sido fijado en soluciones fijadoras de naturaleza acuosa como el líquido de BOUIN. Esto nos lleva a distinguir entre las operaciones de deshidratación previas a la inclusión en parafina y la inclusión propiamente dicha, a saber, la confección de bloques de parafina, procesos ambos que exponemos en los siguientes apartados.

2.2.5.3.1.- DESHIDRATACION DEL MATERIAL FIJADO PREVIA A SU INCLUSION EN PARAFINA

El material a deshidratar es aquél que ha sido fijado en BOUIN y poste-

riormente trasladado a alcohol de 70º o bien lavado con agua y tratado sucesivamente con alcohol de 50º y de 70º.

El deshidratante más comúnmente empleado es el alcohol etílico en graduaciones crecientes hasta llegar a alcohol absoluto, pero la parafina no es miscible con este alcohol, por lo cual ha de ser reemplazado, antes de la inclusión, por un líquido intermediario miscible simultáneamente con el alcohol etílico y con la parafina. La parafina, empero, es perfectamente miscible con alcohol isopropílico, por lo que éste puede ser utilizado como deshidratante sustituyendo al alcohol etílico, en cuyo caso no precisamos de líquido intermediario.

Hemos ensayado ambas pautas de deshidratación en parte de nuestro material, por lo que describimos el protocolo correspondiente a ambas, si bien hemos de indicar que, por comodidad de procesado y mayor disponibilidad de reactivos, hemos empleado con mayor frecuencia la deshidratación en alcohol etílico, no observando ninguna diferencia entre ambas al estudiar el material deshidratado según una u otra.

A) DESHIDRATAACION EN ALCOHOL ETILICO

Hemos tomado como punto de partida el material vermidiano, metacercarias y adultos, situado ya en alcohol etílico de 70º y mantenido en viales perfectamente cerrados. La deshidratación se lleva a cabo en pequeñas capsulitas de Petri donde se sitúa los alcoholes de graduación sucesiva, trasladando el material desde una a otra cuidadosamente con un pincel.

Los alcoholes empleados y tiempos correspondientes son los siguientes.

Alcohol etílico 80º.....	1 hora
Alcohol etílico 96º.....	30 minutos
Alcohol etílico absoluto.....	15 minutos (7 baños sucesivos)
Xilol (líquido intermediario)..	30 minutos (2 baños sucesivos)

En este punto el material está presuntamente deshidratado y situado ya en el líquido intermediario soluble en parafina, por lo que se procede a impregnar el material en parafina y a confeccionar los bloques. Esta técnica,

común tanto a la deshidratación etílica como a la isopropílica, será expuesta en el apartado siguiente (véase apartado 2.2.5.3.2).

B) DESHIDRATAACION EN ALCOHOL ISOPROPILICO

En este caso hemos tomado como material de partida aquél fijado en BOUIN y lavado en agua, pasando en este punto a desarrollar el siguiente protocolo:

Alcohol isopropílico 50º.....	4 horas
Alcohol isopropílico 70º.....	8 horas
Alcohol isopropílico 90º.....	8 horas
Alcohol isopropílico 96º.....	4 horas
Alcohol isopropílico absoluto.....	8 horas (2 baños sucesivos)

La deshidratación se lleva a cabo, al igual que en el caso anterior, en una serie de capsulitas de Petri conteniendo los distintos alcoholes. Considerando que el alcohol isopropílico es, como hemos indicado, miscible con la parafina, podemos proceder a impregnar el material en la misma.

2.2.5.3.2.- IMPREGNACION EN PARAFINA Y CONFECCION DE BLOQUES

Tras la realización de una deshidratación cuidadosa del material fijado, procedemos a impregnar el mismo en parafina para la posterior confección de bloques. La técnica de impregnación y confección de bloques es común tanto al material procedente de deshidratación etílica como al procedente de deshidratación isopropílica.

La impregnación se realiza en parafina líquida y en estufa a una temperatura 1º ó 2 ºC superior a la temperatura de fusión de la parafina. Hemos realizado dos baños sucesivos de impregnación en parafina que consideramos suficientes para conseguir una eliminación total del líquido de deshidratación o del líquido intermediario, dado el pequeño tamaño del material a impregnar.

El protocolo es el siguiente:

1^{er} baño de parafina..... 1 hora
2^o baño de parafina..... 2 horas
mantener a temperatura ambiente..... 1 hora
refundir en estufa..... 1 hora
mantener a temperatura ambiente..... 30 minutos
refundir en estufa y confeccionar los bloques.

Estas impregnaciones son realizadas en cápsulas de Petri. El paso del material desde xilol o alcohol isopropílico al primer baño de parafina se lleva a cabo tomando el material con pipeta Pasteur limpia y previamente calentada a la llama para evitar que al contacto con la parafina ésta solidifique. Esta misma pipeta Pasteur puede ser empleada para trasladar el material desde el primer baño de parafina al segundo, tomando siempre la precaución de calentarla antes de ser utilizada.

El material, tras estos dos baños sucesivos en parafina, es mantenido fuera de la estufa durante una hora, con lo cual la parafina solidifica. Transcurrido este tiempo, es introducido nuevamente en la estufa para que tenga lugar la fusión de la parafina y se repite ambos procesos, tras los cual procederemos a confeccionar los bloques.

Para la confección de bloques empleamos unas barras de Leuckart fabricadas con unas tiras de aluminio, por lo que al carecer de peso han de ser previamente soldadas sobre un portaobjetos vertiendo parafina en la línea de unión con el portaobjetos, con el fin de conseguir un receptáculo hermético. Las dimensiones de los bloques son de 2-2,5 cm de longitud, 1-1,5 cm de anchura y 1 cm de altura. Incluimos únicamente una metacercaria o un adulto en cada bloque.

La inclusión del material en parafina implica, pues, disponer previamente del conjunto constituido por las barras de Leuckart y el portaobjetos, previamente hermetizado. En este receptáculo vertemos parafina fundida, limpia, llenándolo completamente, y tomamos rápidamente el material a incluir, con una pipeta Pasteur calentada a la llama, del segundo baño de parafina donde se encuentra, trasladándolo a la parafina vertida en el molde. La utilización de pipeta Pasteur para esta manipulación tiene la ventaja de que el material es fácilmente capturado, aunque su tamaño sea pequeño, pero ofrece el inconveniente de incluir alguna burbuja de aire en el bloque al expulsar el

material de la pipeta Pasteur, por lo que es conveniente pasar el material al interior de la pipeta en un volumen considerable de parafina fundida, a fin de que pueda ser expulsado de la misma antes de que llegemos a hacer salir toda la parafina de la pipeta, ya que, cuando ésto ocurre, corremos el riesgo de introducir burbujas de aire en el molde.

El material, ya en el molde, ha de ser orientado rápidamente mediante ligeros toques con una aguja enmangada, hasta que adopte la posición deseada. Es conveniente llegar a conseguir que el material se mantenga próximo a una de las caras laterales del molde. Esta cara es identificada mediante un corte oblicuo en una de sus esquinas y así en el momento de confeccionar cortes del bloque al microtomo comenzaremos por esta cara, que nos llevará más rápidamente al verme incluido. En algunos casos el verme es visible por transparencia observando la cara inferior del bloque, ya que al ser incluido tiende a quedar cerca de la base del molde, pero en otros casos el verme es invisible en el bloque ya solidificado, por lo que una cuidadosa orientación previa del mismo facilita en gran medida la obtención de cortes. Todas estas operaciones han de ser realizadas rápidamente, pues una vez la parafina inicia su solidificación en la cara superior del molde es muy difícil observar el material incluido debido a su pequeño tamaño. El procedimiento se facilita cuando se lleva a cabo sobre una superficie negra que permite una mejor visualización del material incluido.

Realizadas las operaciones expuestas, esperamos unos minutos hasta observar la formación de una ligera "telilla" en la superficie del bloque de parafina, que nos indica el inicio de solidificación de la misma. Cuando ésto ocurre, se sumerge todo el molde en un cristalizador lleno de agua del grifo a temperatura ambiente. El molde se desprende espontáneamente al cabo de un corto espacio de tiempo, quedando libre el bloque de parafina que se extrae del agua y se seca.

El bloque ha de ser identificado o rotulado y con este fin procedemos a situar en su superficie lateral una etiqueta adhesiva con un número, que recubrimos con una fina capa de parafina líquida de modo que tras su solidificación sea perfectamente visible. Este número nos llevará a conocer más fácilmente todas las características del material incluido, tales como especie, estadio evolutivo, edad, etc., que anotaremos cuidadosamente junto con el protocolo seguido en la inclusión y con posibles observaciones en un lugar desti-

nado a tal fin. Hemos conservado los bloques al abrigo de la humedad y del polvo, manteniéndolos siempre a temperatura ambiente.

2.2.5.3.3.- OBTENCION DE CORTES AL MICROTOMO Y CONFECCION DE PREPARACIONES

Una vez obtenidos los bloques de parafina que contienen los vermes incluidos en su interior confeccionamos, a partir de ellos, cortes de espesor variable que nos permiten, tras su montaje y tinción, realizar observaciones al microscopio.

El bloque de parafina, antes de ser situado en el microtomo, ha de ser tallado convenientemente, denominándose "piramidado del bloque" a esta operación. Consiste en eliminar el exceso de parafina que rodea al material incluido mediante cortes sucesivos con un escalpelo hasta conseguir que este material quede englobado en un prisma de parafina. Es conveniente que la superficie del corte tenga la forma de un trapecio isósceles en el que al menos dos lados sean rigurosamente paralelos. Si no se respeta este paralelismo, se obtendrá, al confeccionar los cortes, series curvadas. Conviene mantener intacta la parafina que no rodea al material incluido en el bloque, a fin de conseguir una mayor superficie de unión al portabloques del microtomo que mejorará sensiblemente la fijación del bloque en el mismo.

Tallado el bloque, éste es fijado al portabloques del microtomo lo más sólidamente posible y perfectamente centrado en el mismo. En nuestro caso no hemos utilizado calor ni ningún otro procedimiento para mejorar la adhesión que no sea el propio sistema de sujeción que ofrece el microtomo.

Procedemos a obtener los cortes cuyo grosor varía entre 5 y 6 μm según los casos. Ofrece una cierta dificultad apreciar exactamente el momento en que se comienza a cortar el verme por lo que no hemos de despreciar aquellos cortes que presenten un aspecto dudoso en cuanto a ausencia o no de contenido vermidiano en ellos. Los cortes así obtenidos han de ser cuidadosamente extendidos y adheridos a un portaobjetos. Estas operaciones se realizan depositando los cortes mediante un pincel sobre la superficie de agua mantenida a 30 $^{\circ}\text{C}$ aproximadamente y a la que se ha adicionado gelatina molida (FERROSA) en una proporción de 20 gr por cada 2-3 litros de agua. Hemos de indicar que esta solución ha de ser renovada cada pocos días.

Los cortes flotan sobre la superficie del agua y se extienden suavemente, desapareciendo los pliegues que hayan podido formarse durante su obtención. Al mismo tiempo adquieren una gran transparencia, por lo cual puede observarse, por unos momentos y sobre el fondo negro del baño maría, una mayor opacidad en la pequeña zona presumiblemente correspondiente a la superficie del verme.

Tras unos minutos de permanencia sobre el agua albuminada, los cortes son recogidos sobre un portaobjetos perfectamente limpio sumergiendo parcialmente el mismo bajo el corte para tratar de conseguir que dicho corte quede sobre el portaobjetos al ser extraído fuera del agua. Es conveniente centrar y orientar correctamente el corte sobre la superficie del portaobjetos mediante pequeños toques con una aguja enmangada, cuidando siempre de no dañar la superficie del corte. Puede situarse uno o varios cortes sobre cada portaobjetos.

Los portaobjetos presentando los cortes en su superficie son mantenidos en posición inclinada hasta eliminar todo el exceso de agua albuminada. En todo momento hemos de mantener un orden correlativo en la serie de portaobjetos que reflejará fielmente el orden de obtención de los cortes en el microtomo y por lo tanto su seriado. Los portaobjetos ya secos son numerados con un lápiz graso en su extremo esmerilado, siendo esta rotulación inalterable a las tinciones que posteriormente se practica sobre ellos.

El secado posterior de los cortes se realiza en estufa a 40 °C durante 5-6 días, con lo cual son aptos para ser procesados posteriormente en orden a realizar sobre ellos distintas tinciones que permitan su estudio histológico y citológico.

2.2.5.3.4.-TINCIONES UTILIZADAS SOBRE CORTES HISTOLOGICOS DE MATERIAL INCLUIDO EN PARAFINA

La coloración de los cortes tiene como objeto evidenciar la estructura histológica a estudiar y hacer resaltar aquellos elementos de interés. La mayor parte de soluciones colorante empleadas a tal objeto son soluciones acuosas por lo que, considerando que los tejidos sobre los que se han de practicar están incluidos en parafina y han sido sometidos a un proceso de des-

hidratación previo a su inclusión, es preciso practicar un desparafinado e hidratación de los cortes antes de proceder a su tinción.

La operación de desparafinado consiste en eliminar el medio en que está incluido el verme, es decir, la parafina, mediante un disolvente como el xilol, continuándose con la eliminación del xilol con alcohol etílico y con la sustitución de éste por agua. Estas operaciones son realizadas vertiendo los distintos reactivos directamente sobre los portaobjetos en cuya superficie se encuentran los cortes. Estos portaobjetos se disponen horizontalmente sobre dos varillas de madera, las cuales reposan a su vez sobre los bordes de un recipiente cualquiera que recogerá los reactivos ya desechados. El tratamiento directo de los cortes sobre los portaobjetos presenta la ventaja de reducir las cantidades de reactivos a unas pocas gotas y los reactivos permanecen siempre limpios, pero si el tratamiento por el reactivo ha de ser durante un tiempo prolongado o bien se ha de procesar un elevado número de preparaciones es recomendable utilizar recipientes cerrados en cuyo interior se coloca un volumen alto de reactivo y varias preparaciones simultáneamente.

Los tiempos de desparafinado e hidratación, así como la secuencia de reactivos empleados, son expuestos a continuación:

xilol (1).....	10 minutos
xilol (2).....	10 "
alcohol etílico absoluto.....	6 "
alcohol etílico 90º.....	6 "
alcohol etílico 70º.....	6 "
agua destilada.....	6 "

Los reactivos han de ser cuidadosamente vertidos sobre los portaobjetos evitando hacerlos incidir directamente sobre la zona donde se encuentra el corte, sino que serán vertidos gota a gota alrededor de esta zona dejando que se extiendan suavemente sobre ella hasta llegar a cubrirla. Hemos de evitar en todo momento que el corte quede seco por evaporación del reactivo o desplazamiento del mismo. El reactivo es eliminado inclinando suavemente el portaobjetos sin moverlo violentamente. Todas estas precauciones están encaminadas a evitar que los cortes pierdan su adherencia al portaobjetos y sean arrastrados por los reactivos o bien queden plegados.

Una vez los cortes son desparafinados e hidratados correctamente puede practicarse las coloraciones necesarias sobre ellos.

Las tinciones a realizar sobre cortes histológicos están siempre en función de las características propias del objeto en estudio. Nuestro trabajo tiene una doble finalidad. Por un lado intentamos obtener una visión generalizada de las estructuras y tejidos del verme y por otro evidenciar los distintos procesos que concurren en la gametogénesis.

Al objeto de conseguir una visión global de las estructuras del verme, hemos practicado algunas tinciones panorámicas como son la doble tinción con hematoxilina-eosina, la tinción con hematoxilina-picrofucsina o tinción triple de VAN GIESON y muy raramente la tinción de MALLORY. Hemos utilizado la tinción con hematoxilina férrica según HEINDENHEIN para estudios de gametogénesis, pues proporciona imágenes muy claras de los núcleos celulares en reposo e imágenes de los cromosomas correspondientes a las células en división.

Describimos aquí las diferentes tinciones realizadas, así como las soluciones colorantes utilizadas. Los tiempos empleados pueden variar en función de la potencia tinctorial de los colorante.

A) DOBLE TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA

Hemos realizado esta tinción directamente sobre los cortes situados en los portaobjetos. El protocolo es el siguiente:

- desparafinado con xilol;
- hidratación según protocolo ya comentado;
- 1-3 minutos en hematoxilina de DELAFIELD;
- 10 minutos lavado en agua del grifo;
- 2 minutos en agua destilada;
- 5 minutos en solución de eosina acuosa al 1%;
- 5 minutos en alcohol etílico de 90°;
- 5 minutos en alcohol etílico absoluto;

- 15 minutos en esencia;
- 2 minutos en xilol;
- montaje.

La hematoxilina de DELAFIELD empleada en esta tinción presenta la formulación siguiente:

Hematoxilina.....	4 g	solución A
Alcohol etílico absoluto..	25 ml	
Sulfato aluminico amónico.	40 g	solución B
(alumbre amoniacal)		
Agua destilada.....	400 ml	

Mezclamos ambas soluciones y filtramos al cabo de 4 ó 5 días, añadiendo después:

Glicerina.....	100 ml
Alcohol metílico.....	100 "

Filtramos nuevamente al cabo de 4 ó 5 días y la solución resultante puede ser ya utilizada, presentando una conservación ilimitada. Antes de emplearla hemos de diluir a la mitad con agua destilada y filtrar.

Esta tinción colorea los núcleos de color azul marino oscuro, el citoplasma celular de color rosado así como las fibras musculares, en tanto que las fibras conjuntivas aparecen azuladas.

B) TINCION CON HEMATOXILINA-PICROFUCSINA

Hemos practicado esta tinción, al igual que la anterior, directamente sobre portaobjetos. Su realización implica:

- desparafinado con xilol;
- hidratación hasta agua destilada;
- 2-5 minutos en hematoxilina de GROAT;
- 15 minutos en agua del grifo (2 cambios);

- 3-5 minutos en picrofucsina;
- 5 minutos en alcohol etílico absoluto (2 cambios);
- 15 minutos en esencia;
- 2 minutos en xilol;
- montaje.

La hematoxilina de GROAT presenta la siguiente fórmula:

Acido sulfúrico concentrado.....	0,8 ml	solución A
Sulfato férrico amónico..... (alumbre férrico)	1 g	
Agua destilada.....	50 ml	
Hematoxilina.....	0,5 g	solución B
Alcohol etílico de 96°.....	50 ml	

Mezclar ambas soluciones y filtrar transcurridas unas horas. La solución así obtenida puede ya ser utilizada. Se conserva bien durante 3 meses.

La solución de picrofucsina se prepara (según VAN GIESON) del siguiente modo:

Fucsina ácida al 1% en agua destilada.....	10 ml
Solución acuosa saturada de ácido pícrico..	100 ml

Se conserva de 8 a 10 meses, recomendándose preparar poco y frecuentemente. Esta coloración tiñe los núcleos celulares de negro, el citoplasma de color rosado, las fibras elásticas de color rojo y las fibras musculares de color marrón.

C) TINCION DE MALLORY

Hemos practicado esta tinción, al igual que las anteriores, directamente sobre portaobjetos. La secuencia de reactivos está aquí expuesta:

- desparafinado e hidratación de cortes;
- 15 minutos en sublimado corrosivo (bicloruro de mercurio en agua destilada que actúa como mordiente)

- lavado rápido en agua destilada;
- 15 segundos en fucsina ácida al 1%;
- lavado rápido en agua destilada;
- 1 minuto en ácido fosfomolibdico al 1% (mordiente);
- lavado rápido en agua destilada;
- 75 segundos en líquido de MALLORY;
- lavado rápido en agua destilada;
- 10 segundos en azul de anilina S.A. alcohólica (diferenciación)
- 10 segundos en alcohol etílico absoluto;
- 15 minutos en esencia;
- montaje.

Esta tinción es bastante más laboriosa que las anteriormente descritas y no nos ha ofrecido buenos resultados, por lo que no la hemos empleado rutinariamente. Tiñe los núcleos y cromosomas de rojo, las granulaciones citoplasmáticas de color naranja rojizo, las fibras de colágeno azules, las fibras musculares rojizas, las fibras nerviosas de color lila y la sustancia vitelina de color amarillo.

El líquido de MALLORY tiene la siguiente formulación:

Azul de anilina S.A.....	0,5 g
Orange G.....	2 g
Acido axálico.....	2 g
Agua destilada.....	100 ml

D) TINCION CON HEMATOXILINA FERRICA SEGUN HEINDENHEIN

Esta tinción requiere unos tiempos muy largos de mordentaje y coloración, por lo que se ha realizado introduciendo los portaobjetos con los cortes en cubetas de vidrio donde se sitúa el mordiente y el colorante. Estas cubetas han de estar perfectamente cerradas para evitar la evaporación. Se operasegún el siguiente protocolo:

- desparafinado e hidratación de los cortes;
- 20 horas en sulfato férrico amónico al 5% (mordiente);
- lavado rápido en agua destilada;
- 22 horas en hematoxilina según HEINDENHEIN;
- diferenciación en sulfato férrico amónico al 2,5% controlada al microscopio;
- 30 minutos en agua del grifo;
- 5 minutos en agua destilada;
- 5 minutos en alcohol etílico de 70°;
- 5 minutos en alcohol etílico de 90°;
- 5 minutos en alcohol etílico absoluto;
- 15 minutos en esencia;
- 2 minutos en xilol;
- montaje.

La diferenciación es un punto de gran importancia en esta coloración y como hemos indicado se lleva a cabo con la misma solución utilizada como mordiente, el alumbre férrico, pero diluída a la mitad. Ha de ser controlada al microscopio y se mantiene hasta que únicamente quedan teñidos los núcleos celulares. En nuestro caso hemos mantenido un tiempo de diferenciación oscilante entre 20-30 minutos dependiendo de la maduración alcanzada por la solución colorante.

La solución colorante, hematoxilina de HEINDENHEIN o hematoxilina férrica, se prepara de la siguiente manera:

Hematoxilina.....	1 g
Alcohol etílico absoluto.....	10 ml
Agua destilada.....	90 ml

Esta solución madre ha de madurar durante un mes. Antes de utilizarla ha de ser diluída a la mitad con agua destilada.

2.2.5.3.5.- MONTAJE

La totalidad de las preparaciones permanentes obtenidas a partir de cortes teñidos presentan Bálsamo de Canadá como medio de montaje. Este montaje se realiza tal y como se ha indicado anteriormente (véase apartado 2.2.2.2.3.)

2.2.5.4.- INCLUSION EN RESINA

La inclusión en resina de los materiales sobre los que se desea practicar cortes semifinos es una técnica ampliamente empleada en estudios histológicos. Este medio de inclusión es inmisible con agua y este hecho determina la necesidad de proceder a una deshidratación de los especímenes que en él se desee incluir, ya que este material ha sido fijado, en nuestros estudios, con una solución fijadora acuosa como es el líquido de BOUIN. Incluimos en nuestro protocolo los procesos de deshidratación del material, inclusión en resina y confección de bloques previos a la obtención de cortes, así como el protocolo seguido en la tinción practicada sobre los mismos y el montaje definitivo de preparaciones.

2.2.5.4.1.- DESHIDRATAACION DEL MATERIAL FIJADO PREVIA A LA INCLUSION EN RESINA

El material a deshidratar está constituido por vermes fijados en BOUIN y trasladados posteriormente a alcohol de 70%. El deshidratante empleado es la acetona en concentraciones sucesivamente crecientes (30, 50, 70, 90) hasta llegar a acetona absoluta, manteniendo el material durante 5 minutos en cada una de las mezclas.

2.2.5.4.2.- INCLUSION EN RESINA Y CONFECCION DE BLOQUES

Los vermes, una vez situados en acetona absoluta, se tratan con mezclas de acetona y óxido de propileno, sustancia esta última que actúa como agente intermediario entre la acetona absoluta y el medio de inclusión. Las composiciones de estas mezclas de acetona y óxido de propileno presentan proporciones crecientes de esta última sustancia hasta llegar a óxido de propileno puro. Una vez eliminado el agente intermediario por decantación, se procede a

tratar el material a incluir en resina con mezclas de óxido de propileno y resina, previamente a su inclusión en resina pura. Ha proporcionado buenos resultados el empleo de mezclas de óxido de propileno y resina en las proporciones 1:3, 2:2 y 3:1 sucesivamente. La resina utilizada es SPURR (SPURR, 1969) de baja viscosidad.

2.2.5.4.3.- OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS Y CONFECCION DE PREPARACIONES

Los bloques obtenidos según el protocolo descrito son piramidados con la ayuda de un aparato diseñado a tal fin, marca REICHERT modelo TH60. Los cortes que practican sobre el material incluido, presentan un grosor de 1 μ m. Estos cortes obtenidos en el ultramicrotomo, empleando una cuchilla de vidrio, se recogen cuidadosamente mediante una fina varilla de vidrio redondeada en su extremo y se depositan individualmente sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de agua destilada. El corte permanece sobre la superficie del agua y se acerca a él un trocito de papel de filtro impregnado en xilol, a fin de conseguir la total desaparición de pliegues en el mismo. El portaobjetos se sitúa sobre una platina a 80°C hasta conseguir la total evaporación del agua sobre él depositada, con lo cual el corte queda adherido al vidrio.

2.2.5.4.4.- TINCION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS SEMIFINOS

Una vez adheridos los cortes al portaobjetos se procede a su tinción, en la que empleamos azul de metileno al 0,5 % en solución borax al 1 %. Para ello se deposita una gota del colorante sobre el corte y se coloca el portaobjetos en la platina a 80 °C durante 1-2 minutos. El exceso de colorante se arrastra con agua destilada y se seca la preparación en la platina hasta la total evaporación del agua residual.

2.2.5.4.5.- MONTAJE

El montaje de los cortes teñidos y secos no requiere más que el depósito cuidadoso de una gota de Bálsamo del Canadá sobre los mismos. Sobre el conjunto se sitúa un cubreobjetos y se deja secar.

2.2.6.- TECNICAS DE CULTIVO IN VITRO

El cultivo in vitro de parásitos, y más concretamente de Trematodos, conlleva la utilización de un serie de técnicas básicas y de empleo generalizado.

En nuestro intento de cultivar in vitro el Trematodo Digénido Brachylaima ruminae desde el estadio de metacercaria hasta el estadio de adulto, hemos precisado el concurso de técnicas cuyo objetivo es, primordialmente, el mantenimiento de condiciones asépticas, tanto durante la preparación de los medios de cultivo como en el transcurso de la extracción de las metacercarias a partir de su hospedador, el Gasterópodo Rumina decollata. El mantenimiento de condiciones de asepsia es, también, de primordial importancia durante la inoculación del material de cultivo en los distintos medios a ensayar, así como a lo largo del tiempo de cultivo, en la obtención de muestras del material cultivado para su posterior estudio microscópico y morfológico.

2.2.6.1.- PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

La complejidad de los medios de cultivo utilizados nos lleva a describir sus técnicas de preparación atendiendo a los sucesivos pasos que las integran y teniendo en cuenta, asimismo, que los medios empleados están constituidos por varios componentes, tales como medios químicamente definidos, solución salina Hanks, dos tipos de macerado, suero bovino fetal (FAS), suero bovino neonatal (NBBS), extracto de embrión bovino (BEE₅₀), yema y albúmina de huevo de gallina que, en algunos casos, requieren una manipulación previa a su utilización, la cual será descrita detalladamente.

2.2.6.1.1.- PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Como se ha indicado anteriormente (véase apartado 2.1.2.3.1), hemos utilizado en nuestras experiencias, dos tipos de medios de cultivo químicamente definidos, M 199 y CMRL 1066, cuya composición química hemos descrito en el apartado anteriormente mencionado.

La reconstrucción de la solución acuosa de estos medios a partir de su presentación comercial en polvo incluye, también, la adición de HEPES y NaHCO_3 como reguladores de pH, ya que se utilizó medios comerciales exentos de HEPES y de bicarbonato sódico,

La pauta seguida consta de los siguientes pasos:

- pesar 1,32 g de NaHCO_3 (BDH Chemicals LTD.);
- pesar 7,39 g de HEPES (Flow Lab.);
- disponer 1 litro de agua tridestilada (Difco);
- disponer el medio comercial en polvo en cantidad suficiente para 1 litro.

Situarse en un vaso de precipitados:

- un agitador magnético;
- medio de cultivo en polvo;
- NaHCO_3 y HEPES;
- parte del agua tridestilada procedente del lavado de la bolsa que contenía el medio en polvo y de los recipientes donde se ha pesado NaHCO_3 y HEPES;
- verter el resto del agua;
- agitar suavemente durante 1 hora;
- ajustar el pH a 7,4-7,5 mediante la adición gota a gota y con agitación de NaOH 1N, observándose el desarrollo de un color rojo intenso;
- esterilizar la solución resultante por filtración a través de una membrana Millipore con un diámetro de poro de 0,2 μm , recogiendo el medio en un Erlenmeyer previamente esterilizado en autoclave.

El medio de cultivo presuntamente estéril así obtenido se transfiere a frascos de almacenaje y se incuba a 37 °C durante un período de tiempo prudencial. La adopción de esta medida preventiva nos permitirá detectar la posible contaminación accidental del medio y evitará la utilización de un medio no estéril que, obviamente, introduciría errores y problemas en los posteriores cultivos a realizar.

2.2.6.1.2.- PREPARACION DE LA SOLUCION FISIOLOGICA SALINA HANKS

La solución fisiológica Hanks, cuya composición química se ha indicado anteriormente (véase apartado 2.1.2.3.4), ha sido ampliamente utilizada en nuestros ensayos de cultivo in vitro, tanto durante la disección del Gasterópodo hospedador de metacercarias, como durante los sucesivos lavados de las mismas, entrando, además, a formar parte de los medios de cultivo, aunque en pequeñas cantidades.

Esta solución ha sido preparada a partir de sales Hanks en polvo comerciales, adicionando bicarbonato sódico y agua tridestilada. La solución se esteriliza por filtración a través de membranas Millipore con un diámetro de poro de 0,2 um, como se ha indicado ya en la preparación de los medios de cultivo químicamente definidos.

La formulación utilizada es la siguiente:

Hanks polvo.....	9,9 g
NaHCO ₃	0,35 g
Agua tridestilada.....	1 l

2.2.6.1.3.- CONDICIONES DE MANIPULACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Nos hemos referido anteriormente (véase apartado 2.1.2.3.2) a la necesidad de introducir en los medios de cultivo sustancias de naturaleza biológica cuya composición química y constantes físicas no son totalmente conocidas. En el apartado antedicho hemos enumerado las sustancias de este carácter que denominamos factores de crecimiento, utilizados por nosotros. Vamos a referirnos aquí a su procedencia, comercial o no, así como a las operaciones a realizar con ellos, previas a su incorporación a los medios de cultivo a ensayar.

A) SUERO BOVINO FETAL (FCS) (GIBCO EUROPE)

Su procedencia es comercial. Se almacena a -20 °C y previamente a su incorporación a los medios de cultivo, en estado líquido, se inactiva some-

tiéndolo a una temperatura de 56 °C durante 30 minutos en baño maría. La manipulación de este producto requiere un máximo cuidado para evitar la contaminación del mismo. La apertura y cierre de las botellas ha de hacerse siempre en cabina de flujo laminar y la extracción del mismo a partir de los frascos de almacenaje se llevará a cabo siempre con pipeta estéril.

B) SUERO BOVINO NEONATAL (NBBS) (FLOW LABORATORIES)

Este producto es comercial y requiere un procesado idéntico al suero bovino fetal (FCS), ya indicado en el apartado anterior.

C) EXTRACTO DE EMBRION BOVINO (BEE₅₀) (FLOW LABORATORIES)

Es un producto comercial cuya presentación es al 50% en solución Hanks. No requiere inactivación previa a su utilización. Su manipulación requiere el mantenimiento cuidadoso de condiciones asépticas.

D) YEMA Y ALBUMINA DE HUEVO DE GALLINA

Estas sustancias han sido obtenidas a partir de huevos de gallina utilizados en alimentación humana. Su extracción se llevó a cabo en el mismo momento de ser empleadas como medio de cultivo, operando en cabina de flujo laminar y cuidando de esterilizar previamente por ebullición el material metálico (escalpelo, pinzas, etc.) empleado.

El proceso se inicia pintando el extremo fino de un huevo con una solución de I₂ al 1% en alcohol absoluto. Una vez se ha secado se agujerea cuidadosamente la cáscara y se levanta una porción de la misma. Se vierte la clara en una cápsula de Petri de plástico estéril y la yema en otra cápsula igualmente estéril, cubriéndolas cuidadosamente.

2.2.6.1.4.- ELABORACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS

Tomando como base los medios comerciales M 199 y CMRL 1066 químicamente definidos y adicionando distintos factores de crecimiento en diferentes proporciones, hemos elaborado una serie de medios de cultivo que difieren entre sí, obviamente en su composición, y simultáneamente también en sus características físicas por lo que, con el fin de lograr una máxima comprensión, agruparemos los medios ensayados en tres tipos: monofásicos, bifásicos y semisólidos.

A) MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS

Hemos considerado monofásicos aquellos medios de cultivo ensayados que están constituidos por una fase única. En nuestro caso esta fase es líquida. Dos tipos de medios de cultivo monofásicos fueron empleados en nuestro estudio. Ambos presentan como base M 199, al cual se adicionó suero bovino fetal (FCS) en dos proporciones distintas, resultando los medios que denominaremos:

Medio A: M 199 + 20% FCS

Medio B: M 199 + 60% FCS

Ambos medios, A y B, se elaboran en cabina de flujo laminar, tomando con una pipeta estéril, la cantidad deseada de M 199 preparado con anterioridad y conteniendo ya regulador de pH y antibióticos. Este medio M 199 se distribuye en dos frascos en las cantidades deseadas y se adiciona suero bovino fetal, previamente inactivado, en cantidad suficiente para alcanzar la proporción deseada en ambos frascos. Estos frascos se rotularán cuidadosamente indicando la composición del medio que contienen y se mantendrán a 37 °C hasta su utilización.

Hemos adicionado a estos medios de cultivo, en algunos casos, una pequeña proporción de macerados cuyo componente básico es suero bovino neonatal (NBBS) coagulado, acompañado o no por otras sustancias. Hemos ensayado dos macerados distintos cuyas formulaciones son las siguientes:

Macerado 1: NBBS coagulado.....	50 ml
Hanks.....	50 ml
Macerado 2: NBBS coagulado.....	50 ml
Hanks.....	50 ml
BEE ₅₀	5 ml

La elaboración de ambos tipos de macerado a partir de sus componentes sigue exactamente la misma pauta. Operando siempre en cabina de flujo laminar y con material estéril, iniciaremos el proceso situando 50 ml de NBBS en un vaso de precipitados estéril e incubaremos a 75º-80 ºC durante 45 minutos. Adicionaremos 50 ml de solución Hanks una vez coagulado el suero y homogeneizaremos la mezcla con una varilla de vidrio. Verteremos esta mezcla en un Waring-blendor y trituraremos el material durante 10 segundos a 1000 rpm. Obtendremos así el macerado tipo 1 que almacenaremos a 37 ºC en frascos Carrel.

La preparación del macerado tipo 2 sigue, como hemos indicado, una pauta idéntica, diferenciándose únicamente en que se deposita conjuntamente suero bovino neonatal (NBBS) y extracto de embrión bovino (BEE₅₀) en el vaso de precipitados y se lleva a coagular ambos productos conjuntamente, continuando con las operaciones ya indicadas.

Estos macerados han sido adicionados en cantidades muy pequeñas, tanto a los medios de cultivo monofásicos A(M 199 + 20% FCS) y B(M 199 + 60% FCS) como a las fases líquidas ensayadas en los medios de cultivo bifásicos, como veremos a continuación.

B) MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS

Los medios bifásicos utilizados presentan una fase sólida y una fase líquida. En nuestro caso hemos empleado una fase sólida común a todos los medios bifásicos ensayados y constituida por suero bovino neonatal (NBBS) coagulado. Para conseguir este sustrato sólido se deposita, operando en cabina de flujo laminar y con pipeta estéril, 3 ml de NBBS en cada uno de los tubos Leighton de 10 ml estériles que serán utilizados en el cultivo y se lleva a coagular en estufa a 75º-80 ºC durante 45 minutos.

Sobre este sustrato común hemos ensayado seis tipos de fases líquidas, cuya composición indicamos:

Medio A(M 199 + 20% FCS)

Medio B(M 199 + 60% FCS)

Medio B(M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 1

Medio B(M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 2

Medio C(CMRL 1066 + 60% FCS) + macerado tipo 2

Medio D(CMRL 1066 + 20% FCS) + macerado tipo 1

Hemos descrito ya la preparación del Medio A y del Medio B, así como la de ambos tipos de macerados, 1 y 2. La composición de los medios C y D, comparándola con la de los medios A y B ya descritos, sugiere rápidamente que su preparación sigue exactamente la pauta ya indicada para los medios A y B, siendo necesario únicamente sustituir el medio M 199 empleado en A y B por el medio CMRL 1066 de composición química algo más compleja

En cada uno de los tubos Leighton en los cuales se ha establecido el sustrato sólido se vierte 5 ml de medio B, medio C o medio D, operando siempre en cabina de flujo laminar y con pipeta estéril, tomando esta cantidad de sus respectivos frascos de almacenaje. Por último, y manteniendo siempre condiciones asépticas, se deposita en cada tubo 0,2 ml de macerado tipo 1 ó 2, tomándolos de sus frascos de almacenaje.

C) MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS

Denominamos semisólidos a aquellos medios de cultivo en cuya composición hemos introducido yema y albúmina de huevo de gallina como constituyentes básicos de su formulación. Hemos indicado ya (véase apartado 2.2.6.1.3 D)) el procedimiento de obtención de la mencionadas sustancias. Aisladas, pues, la yema y la albúmina en cápsulas de Petri separadas nos dispondremos a elaborar dos tipos de medios semisólidos cuyas composiciones son:

Yema + albúmina + BEE₅₀ + Medio D (2:1:1:3)

Yema + albúmina + Medio D (2:1:3)

Estos medios de cultivo se preparan en cápsulas de Petri de plástico

estériles (ϕ 6 cm), procediendo, en primer lugar, a depositar en cada cápsula 3 ml de medio D. Sobre este medio se vierte 1 ml de yema y 2 ml de albúmina. Además, en aquél medio que contiene BEE₅₀, se situará 1 ml de esta sustancia. Se homogeniza la mezcla mediante una varilla de vidrio estéril, agitando suavemente y se cubre cuidadosamente las cápsulas de Petri que contienen los medios dispuestos ya para ser inoculados.

2.2.6.1.5.- ENUMERACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS

Establecidas ya las operaciones necesarias para la fabricación de los medios de cultivo ensayados pasamos a indicar exactamente la composición y número de replicados de cada medio de cultivo ensayado, así como el número de metacercarias utilizadas en cada medio.

A) MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS

Hemos utilizado los siguientes medios de cultivo monofásicos:

- Medio A + 4% macerado tipo 1

Medio A: M 199 + 20% FCS

Macerado tipo 1: NBBS coagulado 50 ml
Hanks 50 ml

Medio A/tubo: 5 ml

Macerado tipo 1/tubo: 0,2 ml

Nº replicados: 2

Nº metacercarias/tubo: 10 aproximadamente

- Medio B + 4% macerado tipo 2

Medio B: M 199 + 60% FCS

Macerado tipo 2: NBBS 50 ml
BEE₅₀ 5 ml
Hanks 50 ml

| coagulados

Medio B/tubo: 5 ml

Macerado tipo 2/tubo: 0,2 ml

Nº replicados: 2

Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Control: Medio B: M 199 + 60% FCS

Medio B/tubo: 5 ml

Nº replicados: 2

Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

B) MEDIOS DE CULTIVO BIFÁSICOS

Como hemos indicado anteriormente la fase sólida es común a todos los medios bifásicos ensayados, habiendo sido empleadas distintas fases líquidas.

Fase sólida: NBBS coagulado

Volumen de fase sólida/tubo: 3 ml

Fases líquidas:

- Medio B: M 199 + 60% FCS

Medio B/tubo: 5 ml

Nº replicados: 2

Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Medio B + 4% macerado tipo 2

Medio B: M 199 + 60% FCS

Macerado tipo 2: NBBS 50 ml	coagulados
BEE ₅₀ 5 ml	
Hanks 50 ml	

Medio B/tubo: 5 ml

Macerado tipo 2/tubo: 0,2 ml

Nº replicados: 4

Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Medio B + 4% macerado tipo 1

Medio B: M 199 + 60% FCS

Macerado tipo 1: NBBS coagulado 50 ml
Hanks 50 ml

Medio B/tubo: 5 ml

Macerado tipo 1/tubo: 0,2 ml
Nº replicados: 3
Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Medio C + 4% macerado tipo 2

Medio C: CMRL 1066 + 60% FCS
Macerado tipo 2: NBBS 50 ml
BEE₅₀ 5 ml | coagulados
Hanks 50 ml

Medio C/tubo: 5 ml
Macerado tipo 2/tubo: 0,2 ml
Nº replicados: 5
Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Medio D + 4% macerado tipo 1

Medio D: CMRL 1066 + 20% FCS
Macerado tipo 1: NBBS coagulado 50 ml
Hanks 50 ml

Medio D/tubo: 5 ml
Macerado tipo 1/tubo: 0,2 ml
Nº replicados: 5
Nº metacercarias/tubo: 10 aprox.

- Control: Medio A: M 199 + 20% FCS

Medio A/tubo: 5 ml
Nº replicados: 2
Nº metacercarias/tubo: 10 aprox

C) MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS

Estos medios son preparados en cápsulas de Petri de plástico y así son utilizados. Hemos ensayado los siguientes:

- Yema de huevo + albúmina + BEE₅₀ + Medio D (2:1:1:3) = Medio E

Volúmen yema/cápsula: 1 ml
Volúmen albúmina/cápsula: 2 ml

Volúmen BEE₅₀/cápsula: 1 ml

Medio D (CMRL 1066 + 20% FCA)/cápsula: 3 ml

Nº replicados: 1

Nº metacercarias/cápsula: 10 aprox.

- Yema de huevo + albúmina + Medio D (2:1:3) = Medio F

Volúmen yema/cápsula: 1 ml

Volúmen albúmina/cápsula: 2 ml

Medio D (CMRL 1066 + 20% FCS)/cápsula: 3 ml

Nº replicados: 1

Nº metacercarias/cápsula: 10 aprox.

2.2.6.2.- CONDICIONES FISICAS DE CULTIVO

Las constantes físicas de cultivo, tales como pH, temperatura, atmósfera de cultivo, etc., han sido establecidas atendiendo inicialmente a diversas consideraciones tales como naturaleza del hospedador definitivo, que en nuestro caso son Micromamíferos cuyo duodeno actúa como microhábitat final donde ocurre la evolución de metacercaria a adulto. Pasemos seguidamente a efectuar un breve comentario sobre las mismas:

- pH: todos los medios de cultivo ensayados presentan HEPES como producto regulador de pH, habiéndose ajustado el mismo a un valor comprendido entre 7,4 y 7,5;
- temperatura: considerando que el Micromamífero hospedador definitivo presenta una temperatura corporal de 37 °C aproximadamente, los cultivos se han llevado a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo $37 \pm 0,5$ °C;
- atmósfera de cultivo: los cultivos se han realizado utilizando aire como atmósfera de cultivo, es decir, en condiciones de aerobiosis;
- agitación: los medios de cultivo pueden ser sometidos a agitación, bien en tambor giratorio, en agitadores orbitales, etc., bien por el contrario pueden llevarse a cabo en re-

poso o estacionarios; en nuestro caso los cultivos realizados en medios monofásicos han sido sometidos a agitación en tambor giratorio; los medios de cultivo semisólidos, por el contrario, se han llevado a cabo en condiciones estacionarias y en cuanto a los cultivos en medios bifásicos se han mantenido en condiciones estacionarias todos ellos, exceptuando tres de los replicados cuya composición es Medio C + macerado tipo 2 en su fase líquida, que se han cultivado en tambor giratorio.

2.2.6.3.- DISECCION DE LOS SEGUNDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS EXPERIMENTALES

Las metacercarias de Brachylaima ruminae son albergadas por los Gasterópodos segundos hospedadores intermediarios. En nuestros cultivos hemos utilizado únicamente metacercarias experimentales, es decir, procedentes de Gasterópodos segundos hospedadores intermediarios infestados experimentalmente en el Laboratorio con cercarias cuya determinación específica se ha realizado por quetotaxia.

Como hemos indicado anteriormente (véase apartado 2.1.1.2.1), hemos empleado en nuestro estudios solamente la especie de Gasterópodo terrestre Rumina decollata como segundo hospedador intermediario experimental. Las metacercarias se encuentran preferentemente en el riñón de este caracol y son libres, es decir, no enquistadas. Este hecho es de singular importancia en el planteamiento de un cultivo in vitro, ya que permite someter directamente a cultivo las metacercarias extraídas del segundo hospedador intermediario, haciendo innecesario el proceso intermedio de desenquistamiento que ha de llevarse a cabo previamente al cultivo de las metacercarias cuando éstas se hallan enquistadas.

En nuestro caso, pues, la obtención de metacercarias requiere únicamente la disección del segundo hospedador intermediario R. decollata. Esta operación se practica en cabina de flujo laminar, cuidando de esterilizar previamente por ebullición todo el material metálico, tal como tijeras, pinzas, etc., que ha de ser utilizado.

En estas condiciones se procede a eliminar cuidadosamente la concha del caracol, cuidando de no dañar al mismo ni perforar la cavidad renal del Gasterópodo. El caracol, libre ya de su concha, se sitúa en una cápsula de Petri estéril que contiene solución Hanks igualmente estéril y se separa el riñón intacto que se aísla en una nueva cápsula de Petri con solución Hanks. En esta segunda cápsula se procede a abrir el riñón, tras lo cual las metacercarias contenidas en el mismo emergen al exterior. Aquellas metacercarias que permanecen adheridas a los acinos internos del riñón han de ser desprendidas cuidadosamente al objeto de no dañarlas. Una vez liberadas todas las metacercarias, se trasladan, mediante una pipeta Pasteur estéril, a una nueva cápsula en Hanks con el fin de separarlas de cualquier resto del riñón del caracol. Las metacercarias así obtenidas en condiciones asépticas están ya dispuestas para manipulaciones posteriores.

2.2.6.4.- DIGESTION EN PEPSINA Y LAVADO DE LAS METACERCARIAS

Las metacercarias obtenidas por disección del caracol segundo hospedador intermediario son sometidas a varios lavados sucesivos en solución Hanks estéril a fin de conseguir eliminar la posible contaminación superficial de las mismas.

En nuestro trabajo realizamos rutinariamente cinco lavados consecutivos de las metacercarias antes de ser inoculadas en los medios de cultivo. Para estos lavados se dispone cinco tubos de plástico estériles, situando en cada uno de ellos 20 ml de solución Hanks estéril que contiene 100 ug/ml de penicilina y 100 U.I./ml de estreptomicina. Se toma las metacercarias, a partir de la cápsula donde han sido aisladas, con pipeta Pasteur estéril en un mínimo de Hanks y se transfieren a uno de los tubos de lavado. Este tubo se sitúa en un tambor giratorio colocado en el interior de una estufa a 37 °C donde permanece por espacio de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las metacercarias son trasladadas a un segundo tubo con Hanks y se repite la operación hasta un total de cinco lavados consecutivos. Hemos de señalar que todas las operaciones de transferencia de metacercarias desde uno a otro tubo de lavado han de ser realizadas en cabina de flujo laminar y mediante pipetas estériles.

Excepcionalmente y únicamente en un caso, las metacercarias obtenidas por disección del caracol no son inmediatamente sometidas a lavado, sino que se procede a su digestión previa en una solución de pepsina al 0,5% en Hanks a pH = 2 y a 37 °C durante 30 minutos. Tras este procesado, las metacercarias son rápidamente lavadas en Hanks estéril, permaneciendo en reposo en esta solución durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se observa que las metacercarias se mantienen vivas y se continúa con el protocolo habitual consistente en los cinco lavados sucesivos con Hanks estéril, como ya se ha indicado.

2.2.6.5.- CULTIVO IN VITRO DE LAS METACERCARIAS

Las metacercarias procedentes del último lavado con Hanks estéril son transferidas a una cápsula de Petri estéril para, a partir de aquí, proceder a su inoculación en los distintos medios de cultivo a ensayar. Las metacercarias dispuestas en la cápsula de Petri son más fáciles de contar que si están situadas en el tubo de lavado, por lo que al tomarlas con pipeta Pasteru para su inóculo conoceremos el número exacto o aproximado de metacercarias depositadas en cada tubo de cultivo.

Una vez inoculados los distintos tubos o placas de cultivo, operando siempre en condiciones de asepsia, son incubados en estufa a 37 °C. En el interior de la misma se dispone un tambor giratorio donde se coloca aquellos cultivos que han de ser sometidos a agitación, en tanto que los restantes son sometidos a condiciones estacionarias y en posición vertical.

Los tubos de cultivo son examinados diariamente en un microscopio invertido. Esto permite controlar el grado de movilidad de las metacercarias, su mayor o menor actividad y su adherencia o no a la fase sólida en el caso de medios de cultivo bifásicos. Es posible observar, también, la presencia o ausencia de partículas sólidas en los ciegos intestinales, así como la acusada distensión de los mismos en algunos casos. Es apreciable además el crecimiento de las gónadas cuando ésto ocurre, la presencia de sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas y la aparición de huevos en el útero.

La toma de muestras o extracción de individuos en cultivo a lo largo del mismo se realiza siempre manteniendo condiciones asépticas y tomando el

o los individuos deseados mediante pipeta Pasteur. El momento de la toma de muestras está siempre relacionado con los resultados obtenidos en la observación de los cultivos al microscopio. Así, la presencia de sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas determina la extracción de uno o varios individuos para su posterior fijación, tinción y estudio microscópico.

2.2.6.6.- FIJACION DEL MATERIAL PROCEDENTE DE CULTIVO

Los individuos tomados como muestra a lo largo del tiempo de cultivo y aquellos individuos resultantes del cultivo una vez finalizado el mismo son sometidos a fijación para ser teñidos posteriormente.

La fijación ha sido realizada siempre entre portaobjetos y cubreobjetos, a partir del material vivo. Los vermes, previamente a su fijación, han de ser lavados con solución Hanks en un pocillo para eliminar todos los restos de medio de cultivo que pudieran quedar sobre la superficie de los Trematodos.

Sobre este material se ha practicado dos tipos de fijaciones:

- fijación en alcohol de 70°;
- fijación en BOUIN.

La fijación del material en alcohol de 70° obedece a la necesidad de practicar posteriormente una tinción de dicho material con Fast Red B Salt para cuya realización es imprescindible fijar previamente el material en alcohol de 70°. Esta fijación se realiza depositando el verme sobre un portaobjetos con un pincel y colocando una gota de alcohol de 70° en la cara inferior de un cubreobjetos con el cual se cubrirá el verme. Esta fijación ha de ser controlada a la lupa binocular al objeto de asegurar que el verme adquiera una posición correcta al ser fijado. El verme así situado entre portaobjetos y cubreobjetos se coloca en una cápsula de Petri grande con alcohol de 70° de manera que éste cubra totalmente tanto el portaobjetos como el cubreobjetos y se mantiene durante toda una noche. Posteriormente se retira el cubreobjetos y se mantiene el verme libre en alcohol de 70°.

La fijación del material en BOUIN se lleva a cabo en la misma forma ya indicada anteriormente (véase apartado 2.2.2.2.1).

2.2.6.7.- TINCIONES ESPECIALES REALIZADAS SOBRE MATERIAL DE CULTIVO

La tinción más comúnmente empleada en Trematodos es la realizada con Carmín Borácico de GRENACHER que hemos empleado ampliamente sobre formas larvarias y adultas, como ya se indicó (véase apartado 2.2.2.2.2). Esta tinción está orientada a permitir un estudio microscópico morfológico general del material teñido.

Sobre material procedente de cultivo hemos realizado, además, otras tinciones con finalidades específicas que indicamos seguidamente.

A) *TINCION CON ACETO-ORCEINA*

Esta tinción se ha realizado sobre material vivo, no fijado, al objeto de observar al microscopio el estado de evolución de las gónadas de los vermes en estudio, pues evidencia la organización de la cromatina en los núcleos celulares.

Se sitúa los vermes procedentes de cultivo en un portaobjetos excavado y se lava varias veces con solución Hanks. Eliminado el líquido del último lavado se deposita, con pipeta Pasteur limpia, varias gotas de aceto-orceína sobre el material a teñir en el mismo portaobjetos excavado. Este se cubre cuidadosamente con otro portaobjetos invertido sobre él y el conjunto se incuba en estufa a 38 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se separa ambos portaobjetos y se saca de la estufa. Se deposita el verme junto con la mínima cantidad posible de aceto-orceína sobre un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos ejerciendo una ligera presión. Se invierte la preparación sobre un papel de filtro para eliminar el exceso de aceto-orceína y se observa al microscopio.

La solución de aceto-orceína utilizada se prepara, según PAUL (1970), disolviendo 2 g de orceína (Gurr 022200) en 100 ml de ácido acético glacial al 50%. Hay que filtrar la solución antes de utilizarla. Se sugiere utili-

zar orceína natural, aunque en nuestro caso se empleó orceína sintética por no disponer del producto natural.

A partir de las preparaciones extemporáneas obtenidas con material teñido con aceto-orceína puede confeccionarse preparaciones permanentes. Para ello se somete a las preparaciones extemporáneas a una deshidratación en alcohol de 90º, alcohol absoluto y xilol sucesivamente, cuidando de realizar tres baños sucesivos en alcohol absoluto hasta eliminar totalmente la aceto-orceína en exceso, antes de pasar a xilol. Se levanta cuidadosamente el cubreobjetos y se sitúa 1 ó 2 gotas de Bálsamo del Canadá sobre el verme, colocando nuevamente otro cubreobjetos. Estas preparaciones permanentes no presentan, empero, la calidad de las preparaciones extemporáneas y su observación al microscopio es algo más dificultosa.

B) TINCIÓN CON RED FAST B SALT

El colorante empleado en esta tinción reacciona con los derivados fenólicos existentes en las sustancias vitelinas desarrollándose un color marrón rojizo que evidencia la presencia de contenido vitelino cualquiera que sea su localización. Mediante esta tinción podemos observar sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas, en el reservorio vitelino y en el interior del útero, constituyendo parte integrante de los huevos.

La tinción se realiza sobre material previamente fijado en alcohol de 70º entre portaobjetos y cubreobjetos. Se extrae los vermes del alcohol y se sitúa este material en una cápsula de Petri con agua destilada. Se prepara una solución de Fast Red B Salt polvo al 1% en agua destilada y se filtra, colocando los vermes rápidamente en esta solución colorante. Transcurridos aproximadamente 30 minutos y desarrollado ya el color marrón rojizo que evidencia la presencia de sustancia vitelina, se transfiere los vermes a alcohol de 70º y se deshidrata el material en alcoholes de graduación sucesivamente creciente hasta llegar a alcohol absoluto y xilol. El traslado del material desde una a otra de las cápsulas de Petri que contienen los distintos alcoholes se ha de realizar cuidadosamente, empleando un pincel fino al objeto de no dañar los vermes.

C) TINCION CON CARMIN ACIDO DE GOWER

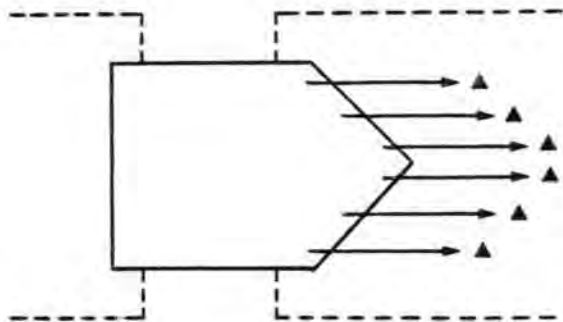
El objetivo de esta tinción es evidenciar la organografía interna de los vermes para posibilitar su estudio microscópico. Esta tinción ha sido practicada sobre material previamente teñido con Fast Red B Salt, el cual había sido fijado en alcohol de 70° entre portaobjetos y cubreobjetos.

La tinción sigue el protocolo que exponemos a continuación. Los vermes teñidos en solución al 1% de Fast Red B Salt son trasladados a una cápsula de Petri con agua destilada y tras un cierto tiempo de lavado en agua son situados en Carmín de Gower, donde permanecen en tinción por espacio de 2-3 horas. Tras la tinción se efectúa una diferenciación en alcohol clorhídrico, para lo cual se extrae los vermes del colorante, trasladándolos a alcohol de 70° al cual se adiciona, gota a gota, ácido clorhídrico comercial. La diferenciación ha de ser controlada bajo lupa binocular y llega a ser correcta cuando el parásito exhibe una tonalidad rosada con iluminación superior, distinguiéndose simultáneamente, por transparencia las distintas estructuras con iluminación inferior. Tras la diferenciación se introduce los vermes en una capsulita con alcohol de 70°, donde permanecerán 10 minutos. Se procede, a continuación, a la deshidratación previa al montaje.

El colorante empleado, carmín de GOWER, presenta la siguiente formulación:

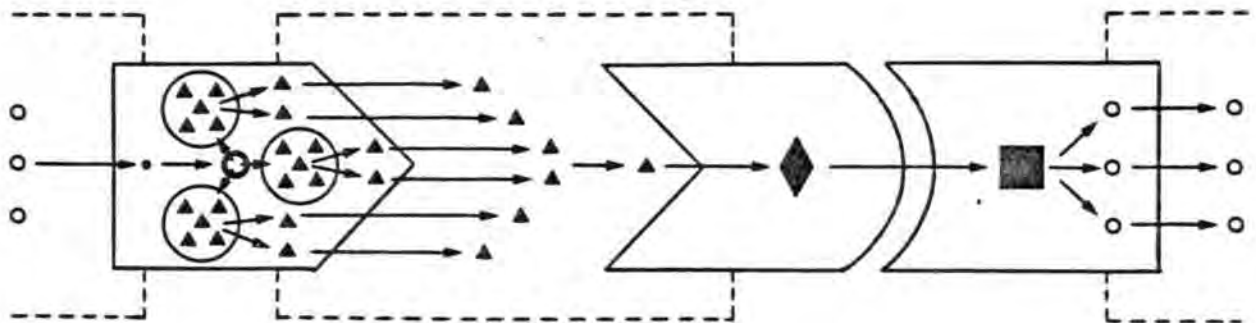
Carmín ácido.....	1 g
Alumbre potásico.....	10 g
Agua destilada.....	c.s.p. 200 ml

El carmín ácido se obtiene disolviendo 10 g de carmín en 100 ml de ácido acético al 45%. Para ello se adiciona el carmín a la solución ácida y se hierve suavemente durante algunas horas, agitando cuidadosamente. Se mantiene un residuo insoluble que, tras enfriar la solución y filtrarla, se seca sobre el papel de filtro. La solución colorante se consigue disolviendo el carmín ácido y el alumbre potásico en agua destilada, calentando suavemente. Se enfría, filtra y adiciona un cristal de timol para prevenir el crecimiento de mohos. Es conveniente mantener esta solución en la oscuridad.



CAPITULO TERCERO

CRONOBIOLOGIA DE LA
EMISION DE CERCARIAS
DE BRACHYLAIMA RUMINAE



3.- CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION DE CERCARIAS DE BRACHYALIMA RUMINAE

3.1.- EMISIONES CERCARIANAS

La dilucidación del patrón cronobiológico de emisión de cercarias de Brachylaima ruminæ por los Gasterópodos primeros hospedadores intermediarios, los caracoles de la especie Rumina decollata, es el objetivo de las experiencias cronobiológicas llevadas a cabo. Exponemos en este capítulo los resultados obtenidos en dichas experiencias, resultados que pasamos a estudiar seguidamente de modo exhaustivo. Hemos indicado en capítulos anteriores las técnicas cronobiológicas implicadas en la realización experimental de este trabajo (véase apartado 2.2.4), así como el material parasitológico empleado en el mismo (véase apartado 2.1.1.3.1).

3.1.1.- EXPERIENCIAS CRONOBIOLOGICAS REALIZADAS

El estudio cronobiológico de las emisiones cercarianas requiere la disociación de los dos factores abióticos cuya influencia es considerada de mayor importancia: iluminación y temperatura. A este objeto hemos planteado la realización en el Laboratorio de distintas experiencias, en las que se ha establecido fotoperíodos y termoperíodos diferentes. Asimismo, consideramos importante la influencia del tiempo sobre la emisión cercariana, por lo que hemos llevado a cabo una experiencia de emisión ininterrumpida de 120 horas (5 días) de duración, que nos proporciona datos referidos a la influencia de la emisión continua. Además, tenemos también en cuenta la influencia de los períodos de emisión y de no emisión que preceden a las experiencias. Detallamos a continuación todas las experiencias realizadas, especificando las condiciones exactas en que han sido llevadas a cabo.

- Experiencia A: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 10 °C
Número de individuos emisores: 8

I.P.N.E. (Intervalo previo de no emisión): 8 días
(LD 12:12)

I.P.E. (Intervalo previo de emisión): 1 día (LD 12:12)

Duración de la experiencia: 26 horas

- Experiencia B: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 10
I.P.N.E.: 2 días (LD 12:12)
I.P.E.: 10 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 26 horas

- Experiencia C: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 20 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 6 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 26 horas

- Experiencia D: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 10 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 6 días (LD 12:12)
I.P.E.: 12 horas
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia E: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 6 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia F: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 20 °C

Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 6 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia G: Fotoperíodo: 12 horas oscuridad - 12 horas luz (DL 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 7
I.P.N.E.: 30 días (LD 12:12)
I.P.E.: 5 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia H: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas luz (LL 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 7
I.P.N.E.: 26 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (DL 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia J: Fotoperíodo: 12 horas oscuridad - 12 horas oscuridad
(DD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 7
I.P.N.E.: 13 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (LL 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia K: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo natural: T: 15°-20°-15°-10°-15°C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 2 días (LD 12:12)
I.P.E.: 10 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia L: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo invertido: T: 15°C-10°C-15°C-20°C-15°C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: 27 días (LD 12:12)
I.P.E.: 1 día (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia M: Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad (LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores. 8
I.P.N.E.: 16 días (LD 12:12)
I.P.E.: 10 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 120 horas (5 días)

3.1.2.- DATOS NUMERICOS

Los ensayos que hemos realizado nos permiten conocer el número de cercarias emitidas por cada individuo emisor en cada una de las horas de las experiencias. A partir de estos valores absolutos obtendremos valores relativos y valores porcentuales sobre la emisión cercariana en las condiciones del ensayo. Estos valores son obtenidos del modo que se expone a continuación:

- Valores absolutos: indican el número de cercarias emitidas por cada individuo emisor (i) a lo largo de una hora concreta de ensayo. Estos valores absolutos los representamos por:

$$X_i$$

- Valores relativos: calculados, para cada individuo emisor, dividiendo el valor absoluto de la emisión cercariana correspondiente a cada hora de la experiencia por el valor horario medio de la emisión absoluta de dicho individuo considerando la totalidad de la experiencia. Los valores relativos tienen como finalidad posibilitar la

comparación entre las emisiones cercarianas de los distintos individuos, ya que eliminan las diferencias originadas por las distintas dimensiones de los respectivos esporocistos (la capacidad de emisión diferirá en cada individuo, como es lógico, según el mayor o menor desarrollo -tamaño- del esporocisto que contenga). Estos valores relativos los representamos por:

$$\frac{X_i}{\bar{X}_i}$$

- Valores porcentuales: se obtienen, para cada individuo emisor, dividiendo cada valor absoluto horario por la suma de las emisiones horarias del individuo durante las horas de la experiencia y multiplicando el valor resultante por 100. Estos datos porcentuales permiten conocer el porcentaje de emisión cercariana correspondiente a las distintas horas de la experiencia, tomando como 100 la emisión total individual ocurrida al cabo de la misma. Estos valores porcentuales los representamos por:

$$\frac{X_i}{N_i} \cdot 100$$

Los datos en valores absolutos correspondientes a cada experiencia son compilados en cuadros, que son numerados correlativamente en números arábigos, indicando además, la letra que denomina a la experiencia a que se refiere la información contenida en el cuadro. En dichos cuadros exponemos algunos datos de interés, tales como:

\bar{x}_i : valor medio de la emisión cercariana de cada individuo emisor respecto a la totalidad del ensayo.

N_i : número total de cercarias emitidas por cada individuo considerando la totalidad de la experiencia.

\bar{x}_h : valor medio de las emisiones cercarianas presentadas por los distintos individuos durante una hora concreta de la experiencia.

N_h : número total de cercarias emitidas durante una hora de la experiencia, considerando las emisiones de todos los individuos durante esta hora.

3.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La información contenida en los cuadros de valores absolutos se ha representado gráficamente, construyéndose dos gráficas. En una de ellas se representa en ordenadas el valor absoluto de la emisión cercariana de cada individuo emisor y en abscisas las horas a lo largo de las cuales ha transcurrido la experiencia. En la segunda gráfica se recoge en ordenadas el valor medio de la emisión cercariana en cada hora del ensayo y en abscisas las horas durante las cuales se llevó a cabo. Los valores relativos son tratados gráficamente del mismo modo. Las representaciones gráficas de los valores porcentuales se toman acumulativamente, significando cada punto de la gráfica el porcentaje de la emisión cercariana realizada por un individuo desde el inicio de la experiencia hasta la hora en que está calculado el punto.

Así, construimos seis representaciones gráficas para cada una de las experiencias realizadas; estas gráficas son numeradas correlativamente en números romanos:

Gráfica I : valores absolutos individuales en función del tiempo

Gráfica II: valores absolutos horarios medios en función del tiempo

Gráfica III: valores relativos individuales en función del tiempo

Gráfica IV: valores relativos horarios medios en función del tiempo

Gráfica V : valores porcentuales individuales en función del tiempo

Gráfica VI: valores porcentuales horarios medios en función del tiempo

Este conjunto de seis gráficas se repite y numera exactamente igual para todas las experiencias, distinguiéndose entre sí las gráficas correspondientes a las distintas experiencias por ir acompañadas por la letra que designa la experiencia a que se refiere.

Las emisiones cercarianas correspondientes a los distintos individuos emisores se han representado gráficamente utilizando grafismos diferentes que las hacen perfectamente distinguibles entre sí, manteniéndose la correspondencia grafismo-individuo en todas las gráficas. En todas las experiencias cronobiológicas intervienen los mismos individuos de Rumina decollata, excepto en las experiencias D, E y F en que los emisores son distintos de los empleados en las restantes experiencias. En el primer caso los 13 emisores empleados son representados mediante los grafismos siguientes:

1	—————
3	—————
5	- - - - -
6	→ → → →
7	- - - - -
8	—————
9	· · · · ·
10	○ ○ ○ ○
11	→ → → →
13	- - - - -

Los 8 emisores empleados en las experiencias D, E y F presentan los grafismos que indicamos a continuación:

1	—————
3	- - - - -
4	—————
5	- - - - -
6	—○—○—
7	—●—●—
9	—————
10	→ → → →

3.1.4.- ORDEN ESQUEMATICO DE EXPOSICION

El estudio de la información proporcionada por los datos en valores absolutos referidos a cada experiencia, así como la información procedente de las representaciones gráficas de estos valores y de los valores relativos y porcen-

tuales en función del tiempo, se lleva a cabo siguiendo un esquema general que se mantiene para cada una de las experiencias y que contempla los siguientes apartados:

- Análisis de los valores individuales
- Análisis de los valores horarios
- Representaciones gráficas

- Análisis de los valores individuales

Entendemos por valores individuales las emisiones cercarianas correspondientes a cada individuo emisor ocurridas en cada una de las horas de la experiencia. Destacamos la situación temporal de las emisiones máxima y mínima referidas a la totalidad del ensayo y correspondientes a cada uno de los emisores que intervienen en la experiencia, así como las horas en que ocurren las emisiones máxima y mínima referidas al período de luz y al período de oscuridad, considerando ambos períodos aisladamente. El estudio de los valores individuales incluye también unas breves indicaciones sobre el individuo cuya emisión cercariana total ha sido la más elevada al término del ensayo, poniendo de relieve, asimismo, la superioridad o inferioridad de la emisión de cada individuo en el primer período de 12 horas respecto a la presentada en el segundo período por el mismo emisor.

- Análisis de los valores horarios

Denominamos valores horarios a las emisiones cercarianas producidas en una determinada hora del ensayo por todos los individuos emisores. El estudio de dichos valores incluye la determinación de aquellas horas de la experiencia en que se produce el valor horario máximo y el valor horario mínimo referidos a la totalidad del ensayo, así como la determinación de los intervalos de tiempo en que ocurren los valores horarios más elevados y los menos importantes referidos a los dos períodos de 12 horas de que constan generalmente las experiencias, considerados aisladamente. Indicamos exactamente las horas en que se

sitúan los valores horarios máximos y mínimos referidos a dichos períodos considerados separadamente. Los valores horarios totales, es decir, la emisión cercariana total ocurrida en cada hora del ensayo es también motivo de estudio destacándose los intervalos de tiempo en que dichos valores son importantes o bien se presentan reducidos e indicándose las horas en que ocurren los máximos y mínimos de estos valores, tanto referidos a la totalidad de la experiencia como a los dos períodos de 12 horas que normalmente la integran, considerados separadamente. La emisión cercariana media correspondiente a cada una de las horas del ensayo, obtenida, obviamente, a partir del correspondiente valor horario total, es denominada valor horario medio y sus valores máximos y mínimos siguen exactamente el comportamiento de los correspondientes a los valores horarios totales.

- Representaciones gráficas

Las representaciones gráficas correspondientes a cada una de las experiencias realizadas son analizadas tanto desde el punto de vista de los valores individuales, considerando el perfil de emisión mostrado por cada uno de los individuos emisores a lo largo del ensayo, como desde el punto de vista de los valores horarios teniendo en cuenta el patrón de emergencia determinado por la emisión cercariana media correspondiente a cada una de las horas de la experiencia. Como hemos indicado anteriormente (véase apartado 3.1.3), se ha confeccionado, para cada ensayo, una gráfica que recoge las emisiones individuales absolutas en función del tiempo, que es acompañada por otra gráfica en la que se representa los valores horarios medios en función del tiempo, en valores absolutos. La información que estas gráficas proporcionan viene complementada por la deducible de dos nuevas representaciones gráficas que muestran los valores relativos individuales en función del tiempo y los valores relativos horarios medios en función del tiempo. A estas gráficas se añade otras dos que exponen respectivamente los valores porcentuales individuales y los valores porcentuales horarios medios, en ambos casos en función del tiempo. El cálculo de los valores relativos y porcentuales a partir de los valores absolutos de emisión cercariana ha sido ya indicado anteriormente (véase apartado 3.1.2), así como el método de construcción de las representaciones gráficas porcentuales.

3.2.- EMISION DE CERCARIAS EN RELACION CON EL FOTOPERIODO

Iniciamos el estudio de la emergencia cercariana exponiendo las posibles modalidades de emisión en relación con el fotoperíodo y en ausencia de otras posibles variaciones del medio. En una primera aproximación al estudio de la influencia del fotoperíodo sobre la emisión cercariana se dispone una alternancia de iluminación y oscuridad similar a la natural: 12 horas luz - 12 horas oscuridad. La elección de este fotoperíodo viene determinada por su semejanza al fotoperíodo natural, respondiendo así a la necesidad de iniciar las experiencias en situaciones similares a las concurrentes en la Naturaleza. Los ensayos, efectuados con el fin de estudiar la influencia de la iluminación sobre la emergencia cercariana, son realizados a temperatura constante, eliminando así la influencia de este factor ambiental sobre la emisión.

Al objeto de acumular una mayor cantidad de datos, que permitan una interpretación adecuada de los resultados, se realiza seis experiencias con idéntico fotoperíodo, variando el termoperíodo, las experiencias A, B, C, D, E y F, ya detalladas adecuadamente con anterioridad (véase apartado 3.1.1). En las experiencias A, B y C intervienen los mismos individuos emisores de R. decollata, iniciándose esta serie de ensayos con la experiencia B, realizada a 15 °C, en la que intervienen inicialmente 13 individuos emisores, de los cuales los identificados con los números 2, 4 y 12 presentan una emisión muy reducida por lo que no son considerados en este ensayo ni en los sucesivos. La experiencia C, realizada en segundo lugar, a temperatura constante de 20 °C, se inicia con los emisores números 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13, presentando los ejemplares 6 y 11 una emisión muy reducida por lo que no son considerados. El ensayo A, llevado a cabo a temperatura constante de 10 °C, emplea los mismos emisores ya utilizados en la experiencia anterior.

Las experiencias denominadas D, E y F son llevadas a cabo con ejemplares de R. decollata distintos de los utilizados en las experiencias A, B y C. Las experiencias D, E y F son iniciadas con 10 individuos emisores, de los cuales los identificados con los números 2 y 8 presentan una emisión cercariana muy poco importante, circunstancia que nos lleva a no considerarlos en ninguna de estas tres experiencias. Así, pues, en todas ellas intervienen únicamente los emisores nº 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Habiendo observado en las experiencias

anteriores que los emisores de la especie R. decollata soportan satisfactoriamente tanto la temperatura de 10 °C como las de 15 °C y 20 °C, se lleva a cabo en primer lugar la experiencia D en la que se mantiene una temperatura constante de 10 °C, para continuar con la experiencia E realizada a temperatura constante de 15 °C, realizándose en último lugar la experiencia F a una temperatura constante de 20 °C. En todos estos ensayos se mantiene un fotoperíodo natural de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, es decir, un fotoperíodo muy similar al que ocurre en la Naturaleza.

Tras la realización de las experiencias anteriormente descritas, en las que se mantiene un fotoperíodo análogo al natural, se consideró oportuno llevar a cabo ensayos con fotoperíodos distintos del natural, al objeto de observar su posible influencia sobre la emisión cercariana. Se consideró en primer lugar la posibilidad de invertir el fotoperíodo natural introduciendo oscuridad en aquellas horas que deberían estar iluminadas y viceversa. La temperatura permanece constante durante toda esta experiencia, que denominamos G, en la que son utilizados los individuos emisores números 1, 3, 5, 7, 8, 9 y 10 ya empleados en las experiencias A, B y C. La experiencia H se realiza en iluminación continua, es decir, con un fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas luz y en ella intervienen los mismos emisores ya utilizados en la experiencia G. La última experiencia dirigida a la dilucidación de la influencia de la iluminación mantiene a los individuos emisores sometidos a oscuridad continua, es decir, con un fotoperíodo de 12 horas oscuridad - 12 horas oscuridad y es denominada J, interviniendo en ella los mismos emisores que en los ensayos G y H.

3.2.1.- EMISION DE CERCARIAS EN FOTOPERIODO NORMAL

La dilucidación del patrón de emergencia de cercarias de B. ruminæ implica, en primer lugar, la realización de emisiones experimentales en las que se establece un fotoperíodo próximo al imperante en la Naturaleza. Este fotoperíodo, que denominamos normal, está constituido por la alternancia de períodos claros y oscuros que siguen la secuencia 12 horas luz - 12 horas oscuridad. Iniciamos, pues, las experiencias cronobiológicas sobre la emisión cercariana en

condiciones de iluminación muy similares a las que se presentan en la Naturaleza. Hemos llevado a cabo seis experiencias en las que se establece un fotoperíodo normal, a la vez que en ellas se mantiene constante la temperatura con la finalidad de obviar la influencia que sus fluctuaciones pudieran ejercer sobre la emisión cercariana. Estas experiencias son las denominadas A, B, C, D, E y F. Las condiciones de iluminación y temperatura, así como los períodos previos de emisión y de no emisión, juntamente con los individuos emisores que intervienen en cada experiencia han sido expuestos detalladamente en apartados anteriores (véase apartados 3.1.1 y 3.2). Únicamente cabe destacar que los individuos emisores utilizados en las experiencias A, B y C son distintos a los empleados en los ensayos D, E y F, aunque han sido numerados ambos grupos de igual forma. Hemos de indicar también que las experiencias A y D han sido realizadas a una temperatura constante de 10 °C, en tanto que durante los ensayos B y E la temperatura es de 15 °C y en las experiencias C y F la temperatura se mantiene constante a 20 °C.

Estudiamos en este apartado, además de las experiencias indicadas, los cinco períodos de 24 horas que integran la experiencia M. Este ensayo es estudiado en un apartado posterior, ya que los resultados obtenidos en el mismo corresponden a cercarias emitidas en relación con la duración de la emisión, si bien esta circunstancia no impide que podamos considerar como experiencias independientes a los períodos de 24 horas que constituyen la totalidad de la experiencia M. Cada uno de estos cinco períodos de 24 horas constituye en sí mismo una experiencia completa sometida a un fotoperíodo normal y a temperatura constante, interviniendo en ellos los mismos individuos emisores que concurren en las experiencias A, B y C. Exponemos a continuación las circunstancias que concurren en cada uno de dichos períodos:

- Experiencia M(I): Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad

(LD 12:12)

Termoperíodo: T cte.: 15 °C

Número de individuos emisores: 8

I.P.N.E.: 16 días (LD 12:12)

I.P.E.: 10 días (LD 12:12)

Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia M(II) : Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad
(LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: nulo
I.P.E.: 1 día (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia M(III) : Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad
(LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: nulo
I.P.E.: 2 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia M(IV) : Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad
(LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: nulo
I.P.E.: 3 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

- Experiencia M(V) : Fotoperíodo: 12 horas luz - 12 horas oscuridad
(LD 12:12)
Termoperíodo: T cte.: 15 °C
Número de individuos emisores: 8
I.P.N.E.: nulo
I.P.E.: 4 días (LD 12:12)
Duración de la experiencia: 24 horas

En los apartados siguientes exponemos y analizamos los resultados correspondientes a las experiencias A, B, C, D, E, F, M(I), M(II), M(III), M(IV) y M(V), en las que, como hemos indicado se establece un fotoperíodo normal y se mantiene una temperatura constante.

3.2.1.1.- EXPERIENCIA A

Exponemos en este apartado los resultados obtenidos en la experiencia A, realizada con fotoperíodo normal y a temperatura constante de 10 °C. Estos resultados quedan compilados en el Cuadro 1 (A) de valores absolutos y su análisis se lleva a cabo siguiendo el esquema propuesto anteriormente (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.1.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Los individuos emisores que intervienen en la experiencia A presentan su emisión máxima referida a la totalidad del ensayo en horas de luz, exceptuándose el emisor nº 3 que sitúa dicha emisión en el período oscuro. Todos los emisores ofrecen su emisión mínima referida a toda la experiencia en el período oscuro de la misma, exceptuándose nuevamente el emisor nº 3 que presenta su emisión mínima en horas de luz.

Considerando aisladamente el período claro y el período oscuro, cabe destacar que todos los individuos emisores, con la única excepción del emisor nº 3, presentan su emisión máxima referida al período claro superior a su emisión máxima referida al período oscuro. Los emisores nº 5, 7, 8, 9 y 13 sitúan su emisión máxima referida al período iluminado en las horas 4, 6 y 9 del mismo y los emisores nº 1, 3 y 10 presentan dicha emisión en la hora 12 de dicho período. Las emisiones máximas referidas a horas de oscuridad correspondientes a todos los emisores se sitúan en las horas 13, 14, 15, 17 y 18. Respecto a las emisiones mínimas referidas al período clara cabe destacar que todos los emisores sitúan su emisión mínima en las horas 1, 2, 3 y 4 de dicho período, en tanto que las emisiones mínimas referidas al período de oscuridad ocurren, para todos los emisores, en las horas 21, 22, 23 y 24 de dicho período. Resumiendo los anteriores datos, podemos indicar que las emisiones individuales máximas se sitúan en las horas centrales y en la hora final del período iluminado, así como en el intervalo de tiempo constituido por las seis primeras horas de oscuridad, mientras que las emisiones individuales mínimas ocurren en las cuatro primeras horas de luz y en las cuatro últimas horas de oscuridad.

Individuo emisor	Horas de emisión																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	71	256	208	84	110	459	620	436	404	333	389	816	504	393	470	220	154	269	100	110	23	49	106	112	39	87
3	360	101	82	17	113	498	224	241	292	408	320	541	508	545	347	282	512	205	332	164	298	126	72	137	97	96
5	18	20	28	16	64	149	208	275	344	171	158	166	311	125	313	132	69	167	115	36	129	5	106	31	33	24
7	72	99	82	253	521	763	739	710	727	199	140	250	182	164	259	154	385	574	300	232	328	143	137	31	70	14
8	25	7	36	158	140	169	82	82	102	47	51	69	74	44	42	33	82	15	37	27	23	9	3	6	21	6
9	21	21	60	187	124	97	79	36	75	44	38	36	84	62	50	55	48	34	17	9	4	9	2	1	10	29
10	8	6	1	2	5	6	14	8	6	10	20	62	16	44	12	14	5	3	3	13	2	2	1	0	2	9
13	3	11	6	3	5	17	15	7	5	10	14	12	10	5	10	1	4	2	2	0	1	2	2	0	0	0
\bar{x}_h	72,2	65,1	62,9	90,0	135,2	269,7	247,6	224,8	244,4	152,7	141,2	244,0	211,1	172,7	187,9	111,4	138,1	158,6	113,2	73,8	101,0	43,1	53,6	39,7	34,0	33,1

Cuadro 1 (A).- Valores absolutos obtenidos en la experiencia A.

El estudio de los valores individuales de emisión cercariana total nos indica que el emisor nº 7 presenta el número máximo de cercarias emitidas a lo largo de todo el ensayo: 7528. Todos los individuos emisores presentan una emisión total correspondiente al período claro superior a la que ofrecen en el período de oscuridad, con la única excepción del emisor nº 3 que presenta un comportamiento inverso. Concordando con esta situación, las emisiones cercarianas individuales medias referidas a todo el ensayo y a los períodos de luz y de oscuridad muestran el mismo comportamiento.

3.2.1.1.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Las emisiones cercarianas compiladas en el Cuadro 1(A) nos muestran que la hora 12, situada en el período claro, recoge el valor horario máximo referido a todo el ensayo, en tanto que en las horas 20 y 24 ocurre el valor horario mínimo.

Estudiando aisladamente el período claro y el período oscuro, podemos observar que los valores horarios elevados referidos al período claro ocurren en las horas 5, 6, 7, 8 y 9, así como en la hora 12 de dicho período, en tanto que las horas 13, 14, 17 y 18 recogen los valores horarios elevados referidos al período de oscuridad. Los valores horarios menos importantes correspondientes al período iluminado se presentan en las horas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de dicho período, en tanto que los valores horarios reducidos referidos al período oscuro ocurren en las horas 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 de este período. El valor horario máximo referido al período claro coincide con el máximo referido a todo el ensayo y el valor horario máximo referido al período oscuro se presenta en la hora 18. La comparación entre ambos valores, respectivamente 816 y 574, muestra una superioridad del valor horario máximo ocurrido en horas de luz. El valor horario mínimo referido al período claro ocurre en la hora 3 y el correspondiente a horas de oscuridad coincide con el referido a todo el ensayo. Todo este conjunto de datos nos indica que se producen emisiones importantes durante las horas centrales y en la última hora de luz, así como en el intervalo integrado por las seis primeras horas de oscuridad. El valor horario máximo medio es 406 y el valor horario mínimo medio es 5, referidos ambos a la totalidad del ensayo.

Los valores horarios totales presentan su máximo referido a la totalidad del ensayo en la hora 6 situada en el período claro (2158 cercarias) y su mínimo correspondiente a toda la experiencia en la hora 26 (265 cercarias). Considerando aisladamente el período de luz y el de oscuridad, hemos de destacar que el valor horario total máximo referido al período claro coincide con el máximo referido a todo el ensayo y el valor horario total máximo referido al período oscuro se produce en la hora 13 (1689 cercarias). El valor horario total mínimo correspondiente al período claro ocurre en la hora 3 (503 cercarias) y el correspondiente al período oscuro se produce en la hora 24 (318 cercarias). Los valores horarios totales son elevados en las horas 6, 7, 8, 9 y 12 del período claro y en las horas 13, 14, 15, 17, 18 y 19 del período oscuro, en tanto que sus valores son menos importantes en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad. El número total de cercarias emitidas en horas de luz es 15597, valor superior a las cercarias totales emitidas en horas de oscuridad, que son 11390. El valor medio de los valores horarios totales referido a todo el ensayo es 1059. Los valores horarios medios siguen el mismo comportamiento mostrado por los valores horarios totales y su valor medio referido a todo el ensayo es 121.

3.2.1.1.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(A) que recoge las emisiones individuales en valores absolutos en función del tiempo nos muestra que la mayor parte de los individuos emisores presentan emisiones importantes en las horas centrales del período iluminado, así como en la última hora de dicho período. Observamos, también, que ocurren emisiones elevadas en las primeras horas de oscuridad y en las horas centrales del período oscuro. En la gráfica II(A) se representa los valores absolutos horarios medios en función del tiempo, presentando dichos valores un patrón de emergencia integrado por dos bloques de emisión importantes, situado el primero de ellos en las horas 6, 7, 8 y 9 del período iluminado y el segundo en las horas 12, 13, 14 y 15, por lo que este último incluye la última hora de luz y las primeras horas de oscuridad. Esta gráfica muestra que las emisiones cercarianas son menos importantes en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad, presentándose asimismo valores de emisión

reducidos en las horas 10 y 11 del período iluminado.

En la gráfica III(A) se recoge los valores relativos individuales en función del tiempo y su interés radica en que optimiza el perfil de emisión de aquellos individuos emisores que emiten un número reducido de cercarias, número que en valores absolutos no permite apreciar adecuadamente la fluctuación de dicha emisión a lo largo del tiempo. Así, observamos en dicha gráfica que los individuos cuya emisión es menos intensa presentan un perfil de emisión caracterizado por la aparición de acrofases situadas en las horas centrales del período claro y en la última hora de luz y primeras horas de oscuridad. La gráfica IV(A), que recoge los valores relativos horarios medios en función del tiempo, corrobora el perfil de emergencia cercariana observado en la gráfica III(A), a la que hemos aludido anteriormente.

La gráfica V(A) presenta los valores porcentuales individuales en función del tiempo y en ella observamos que la velocidad de emisión es alta en las horas centrales del período claro y en el intervalo de tiempo constituido por la última hora de luz y primeras horas de oscuridad, siendo dicha velocidad de emisión más lenta en las primeras y en las últimas horas del ensayo. La gráfica VI(A) nos presenta los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo que dibujan un perfil de emisión concordante con el indicado para la gráfica V(A).

3.2.1.2.- EXPERIENCIA B

En este apartado estudiamos los resultados obtenidos en la experiencia B realizada bajo fotoperíodo natural de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a temperatura constante de 15 °C. Estos resultados son expuestos en el Cuadro 2(B) de valores absolutos y son analizados según el esquema indicado en apartados anteriores (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.2.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Observamos en el Cuadro 2(B) que los individuos emisores nº 1, 6, 7, 11 y 13 presentan su emisión máxima referida a todo el ensayo en horas de luz, en

Individuo emisor	Horas de emisión																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	6	1	17	59	18	124	272	439	745	1150	793	845	272	753	722	541	432	352	240	249	177	161	169	219	140	41
3	176	32	194	180	136	313	684	587	388	741	409	645	622	501	765	426	814	384	620	56	416	624	?	188	207	340
5	100	32	30	90	113	169	193	112	50	107	25	129	224	175	279	826	314	222	85	48	140	235	75	132	114	57
6	0	11	11	67	10	9	8	5	11	1	20	5	22	7	9	8	9	15	14	7	9	0	3	4	10	3
7	156	36	135	222	122	857	797	712	196	306	140	162	462	320	337	371	437	540	615	337	385	527	117	93	124	72
8	16	17	54	60	29	96	70	37	46	73	31	33	87	80	127	48	51	71	49	41	43	53	20	19	9	20
9	36	19	75	74	35	95	50	54	90	123	61	93	79	154	206	153	43	59	47	56	116	43	48	31	39	51
10	4	2	3	9	41	18	31	33	36	41	38	35	20	58	82	52	68	19	25	36	21	15	19	41	43	44
11	7	31	82	60	142	79	65	62	86	135	88	71	61	65	71	42	42	13	6	4	3	6	2	1	1	2
13	4	1	4	4	18	22	21	20	20	25	28	38	31	33	20	23	27	13	9	20	13	13	18	8	16	5
\bar{x}_h	50,5	18,2	60,5	82,5	66,4	178,2	219,1	206,1	166,2	270,2	163,3	205,1	188,0	214,6	261,8	269,0	223,7	168,8	171,0	85,4	132,3	167,7	52,7	73,6	70,3	63,5

Cuadro 2(B).-- Valores absolutos obtenidos en la experiencia B.

tanto que los emisores nº 3, 5, 8, 9 y 10 sitúan dicha emisión en horas de oscuridad. La emisión mínima referida a toda la experiencia se sitúa para todos los individuos emisores en horas de luz, exceptuándose los emisores nº 1 y 6, que muestran dicha emisión en horas de oscuridad. Así, los emisores nº 7, 11 y 13 coinciden en situar sus emisiones extremas en horas de luz.

La observación aislada del período iluminado y del período oscuro nos lleva a indicar que los emisores nº 5, 6, 7, 8 y 11 sitúan su emisión máxima referida al período claro en las horas 4, 5, 6 y 7 del mismo y los emisores nº 1, 3, 9 y 13 presentan dicha emisión en las horas 10 y 12, en tanto que el emisor nº 10 sitúa su emisión máxima tanto en la hora 5 como en la hora 10 del período claro. Todos los emisores presentan su emisión máxima referida al período oscuro en las horas 13, 14, 15, 16, 17 y 19 del mismo. Por lo que se refiere a las emisiones mínimas correspondientes al período claro, éstas ocurren para todos los emisores en las horas 1 y 2 del mismo y únicamente el emisor nº 5 sitúa dicha emisión mínima en la hora 11 del período claro, mientras que las emisiones mínimas referidas al período oscuro ocurren para todos los emisores en las horas 20, 22 y 24 del mismo. Los datos anteriores nos llevan a destacar que las emisiones individuales máximas ocurren en las horas centrales y finales del período iluminado y dentro de las siete primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones individuales mínimas se sitúan en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad.

El estudio de los valores individuales de emisión cercariana total nos lleva a indicar que el emisor nº 3 presenta el número máximo de cercarias emitidas durante todo el ensayo: 10447. Los emisores nº 1, 6 y 11 muestran una emisión total en horas de luz superior a la que presentan en horas de oscuridad, mientras que los emisores nº 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 13 ostentan un comportamiento inverso. De acuerdo con esta situación los valores individuales de emisión cercariana media mantienen el mismo comportamiento.

3.2.1.2.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

El estudio de los valores absolutos contenidos en el Cuadro 2(B) nos lleva a destacar que la hora 10, situada en el período claro, recoge el valor ho-

rario máximo referido a todo el ensayo y las horas 1 y 22 recogen el valor horario mínimo referido a toda la experiencia.

Estudiando aisladamente el período de luz y el período de oscuridad, podemos observar que los valores horarios elevados referidos al período claro se sitúan en las horas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 del mismo y los valores horarios altos ocurridos en el período oscuro se presentan en las horas 14, 15, 16 y 17 de dicho período. Los valores horarios menos importantes referidos al período claro se presentan en las horas 1, 2, 3 y 4 del mismo y los valores horarios reducidos correspondientes al período oscuro ocurren en las horas 20, 21, 22, 23 y 24 del mismo. El valor horario máximo referido al período iluminado coincide con el valor horario máximo referido a todo el ensayo, en tanto que el valor horario máximo correspondiente al período oscuro ocurre en la hora 16 de dicho período. Comparando ambos valores, respectivamente 1150 y 826, es evidente la superioridad del valor horario máximo referido al período de luz. El valor horario mínimo referido al período claro se produce en la hora 1 y el valor mínimo referido al período oscuro ocurre en la hora 22, siendo ambos valores iguales entre sí, por lo que ambos constituyen el valor mínimo referido a todo el ensayo. Los resultados expuestos nos llevan a indicar que ocurren emisiones importantes en el intervalo constituido por las seis últimas horas de luz y dentro de las primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones reducidas se producen en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad. El valor horario máximo medio referido a todo el ensayo es 535 y el valor horario mínimo medio es 7.

El valor máximo referido a todo el ensayo de los valores horarios totales ocurre en la hora 10 (2702 cercarias), situada en el período claro, en tanto que el valor mínimo (182 cercarias) se presenta en la hora 2, por lo que ambos valores extremos coinciden en situarse en el período iluminado del ensayo. Estudiando aisladamente el período de luz y el de oscuridad, cabe destacar que el valor horario total máximo y el mínimo referidos al período claro coinciden con los referidos al todo el ensayo, en tanto que el valor horario total máximo referido al período oscuro se produce en la hora 15 del mismo (2681 cercarias) y el valor mínimo ocurre en la hora 23 (471 cercarias) del período oscuro. Los valores horarios totales son altos en las horas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 del período claro y en las horas 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 del período de oscuridad, en tanto que son menos importantes en las primeras horas

de luz y en las últimas horas de oscuridad. El número total de cercarias emitidas en el período iluminado es 16873, número inferior al total de cercarias emitidas en horas de oscuridad que es 19830. El valor medio de los valores horarios totales referido a toda la experiencia es 1463. Los valores horarios medios mantienen la misma situación expuesta para los valores horarios totales y su valor medio referido a todo el ensayo es 147.

3.2.1.2.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(B) representa los valores absolutos individuales en función del tiempo y en ella podemos observar que aquellos individuos, cuya emisión es intensa, presentan emisiones elevadas en el intervalo de tiempo constituido por las seis últimas horas de luz y las seis primeras horas de oscuridad aproximadamente. La gráfica II(B) recoge los valores absolutos horarios medios en función del tiempo y el perfil de emisión que en ella se dibuja corrobora la situación descrita en la gráfica I(B) presentando una emisión horaria elevada a lo largo de las seis últimas horas del período iluminado que se mantiene alta durante las seis primeras horas del período oscuro.

En la gráfica III(B) se representa los valores relativos individuales en función del tiempo, valores que nos permiten apreciar las fluctuaciones ocurridas en las emisiones correspondientes a aquellos individuos cuya emisión cercariana es reducida. Dichos individuos presentan un patrón de emisión coincidente con el indicado para los emisores más intensos, es decir, presentan emisiones importantes dentro de las seis últimas horas de luz y de las seis primeras horas de oscuridad, si bien alguno de ellos presenta una acrofase en horas anteriores a las que incluye el período de tiempo anteriormente indicado. Esta situación queda también reflejada en la gráfica IV(B) que recoge los valores relativos horarios medios en función del tiempo y donde podemos observar que los valores altos ocurren una hora antes que en la gráfica II(B) donde se recoge los valores absolutos horarios medios.

La gráfica V(B) muestra los valores porcentuales individuales en función del tiempo, observándose que la emisión cercariana es más rápida en las seis últimas horas de luz y en las seis primeras horas de oscuridad, aún cuando se

mantiene la excepción protagonizada por los emisores cuya emisión es menos intensa los cuales presentan una emisión rápida en horas anteriores al período indicado. La gráfica VI(B), que nos presenta los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo, evidencia esta misma situación.

3.2.1.3.- EXPERIENCIA C

Los resultados obtenidos en la experiencia C realizada bajo fotoperíodo normal de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y a temperatura constante de 20 °C son expuestos en el Cuadro 3(C) en valores absolutos. Estos resultados son estudiados en este apartado siguiendo el esquema anteriormente establecido (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.3.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Las emisiones cercarianas individuales expuestas en el Cuadro 3(C) nos permiten indicar que los individuos emisores nº 3, 5, 7 y 9 presentan su emisión máxima referida a la totalidad de la experiencia en horas de oscuridad, en tanto que los emisores nº 1, 8, 10 y 13 presentan su emisión máxima en horas de luz. Los emisores 1, 3, 5, 7 y 8 ofrecen su emisión mínima referida a todo el ensayo en horas de luz, mientras que los emisores nº 9 y 13 sitúan dicha emisión en horas de oscuridad. El emisor nº 10 sitúa su emisión mínima en la hora 25 del ensayo. Como consecuencia el emisor nº 9 coincide en presentar sus emisiones extremas en el período oscuro y los emisores nº 1 y 8 ofrecen dichas emisiones en el período de luz.

Estudiando aisladamente el período iluminado y el período oscuro cabe destacar que los emisores nº 7, 8, 9, 10 y 13 sitúan su emisión máxima referida al período iluminado en las horas 2 y 3 del mismo y los emisores nº 1 y 3 ofrecen dicha emisión máxima en las horas 6 y 7 del período claro. Únicamente el emisor nº 5 sitúa su emisión máxima referida al período claro en la hora 12. Todos los individuos emisores ofrecen su emisión máxima correspondiente al período de oscuridad en las horas 13, 14, 16, 17 y 18 del mismo. Por lo que respecta a las emisiones individuales mínimas referidas a horas de luz, éstas ocu-

Individuo emisor	Horas de emisión																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	69	224	370	226	158	479	874	434	277	488	332	304	330	480	286	517	361	536	426	382	345	444	487	377	258	246
3	12	82	128	64	637	648	405	171	94	131	122	231	466	1100	600	1261	1336	314	570	444	249	207	70	339	341	172
5	11	7	25	29	33	25	180	99	86	180	109	307	328	357	216	884	629	376	256	136	139	145	32	39	88	40
7	16	44	624	507	334	186	107	79	56	173	370	337	1172	1141	773	339	1051	516	306	297	206	86	215	159	217	88
8	33	309	120	106	99	80	57	30	95	106	68	44	55	180	102	95	141	123	68	59	41	55	94	48	46	52
9	40	230	182	129	52	33	65	149	77	41	46	106	233	353	134	109	94	47	15	26	47	97	20	48	44	45
10	12	85	63	32	28	9	6	19	7	10	35	24	16	45	28	17	6	14	5	12	15	15	11	4	1	2
13	9	38	27	6	19	18	11	18	28	12	14	14	15	37	17	33	14	10	2	14	4	2	8	20	29	26
\bar{x}_h	25,3	127,4	192,4	137,4	170,0	184,8	213,1	151,5	90,0	153,9	137,0	170,9	326,9	461,6	269,5	406,9	454,0	242,0	206,0	171,3	130,8	147,7	117,1	129,3	128,0	83,9

Cuadro 3(C).- Valores absolutos obtenidos en la experiencia C.

rren en las horas 1, 2, 4, 6, 7 y 8 para todos los individuos emisores, en tanto que las emisiones mínimas referidas al período oscuro se producen en las horas 19, 21, 22, 23 y 24 para todos los emisores, exceptuándose el emisor nº 1 que presenta dicha emisión mínima en la hora 15. Estos resultados nos permiten indicar que las emisiones individuales máximas ocurren preferentemente en las primeras horas y en las horas centrales del período claro, así como dentro de las seis primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones individuales mínimas se producen en las ocho primeras horas de luz y dentro de las seis últimas horas de oscuridad.

La observación de los valores individuales de emisión cercariana total nos lleva a destacar que el emisor nº 3 presenta el número máximo de cercarias emitidas en todo el ensayo: 10194. Los emisores nº 8, 10 y 13 presentan una emisión total en horas de luz (1147, 330 y 214 cercarias respectivamente) superior a la mostrada en horas de oscuridad (1061, 188 y 166 cercarias respectivamente), en tanto que los emisores nº 1, 3, 5, 7 y 9 presentan un comportamiento inverso (4235, 2725, 1091, 2833 y 1150 cercarias emitidas en horas de luz y 4971, 6956, 3537, 6261 y 1223 cercarias emitidas en horas de oscuridad). Los valores individuales de emisión cercariana media mantienen la misma situación.

3.2.1.3.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Los valores absolutos contenidos en el Cuadro 3(C) indican que el valor horario máximo referido a todo el ensayo ocurre en la hora 17, situada en el período oscuro, en tanto que el valor horario mínimo se produce en la hora 25.

Considerando aisladamente el período iluminado y el período de oscuridad observamos que los valores horarios elevados se producen en las horas 3, 4, 5, 6 y 7 del período iluminado y en las horas 13, 14, 16 y 17 del período de oscuridad. Los valores horarios menos elevados correspondientes al período iluminado se sitúan en las horas 1, 2, 4, 7 y 9 del mismo y los referidos al período oscuro lo hacen en las horas 19, 21, 22, 23 y 24. El valor horario máximo referido a horas de luz se sitúa en la hora 7, en tanto que el valor horario máximo referido al período oscuro coincide con el referido a la totalidad

del ensayo. Comparando ambos valores, 874 y 1336 respectivamente, observamos una superioridad evidente del último de ellos. El valor horario mínimo referido al período iluminado ocurre en las horas 4 y 7 de dicho período y el correspondiente al período oscuro se sitúa en las horas 19 y 22. Estos datos indican que ocurren emisiones elevadas en las horas centrales del período claro y dentro de las cinco primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones más reducidas se sitúan preferentemente en las primeras horas de luz, así como en algunas horas centrales del período iluminado y en las últimas horas de oscuridad. El valor horario máximo medio y el valor horario mínimo medio referidos ambos a todo el ensayo son 579 y 11 respectivamente.

Los valores horarios totales presentan su valor máximo referido a todo el ensayo en la hora 14 (3693 cercarias) y su valor mínimo en la hora 1 (202 cercarias), ocurriendo así que estos valores extremos se presentan respectivamente en horas de oscuridad y en horas de luz. Considerando separadamente el período iluminado y el período oscuro cabe observar que el valor horario máximo referido al período de luz ocurre en la hora 7 del mismo (1705 cercarias), en tanto que el valor horario máximo correspondiente al período oscuro coincide con el referido a todo el ensayo. El valor horario mínimo del período claro coincide con el mínimo correspondiente a la totalidad de la experiencia y el valor horario mínimo referido al período oscuro ocurre en la hora 23 del mismo (937 cercarias). Así, los valores horarios totales son elevados en las horas 3, 5, 6, 7 y 12 del período claro y en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 del período de oscuridad, en tanto que son menos importantes en la primera hora de luz y en horas anteriores a la última así como en las últimas horas de oscuridad. El número total de cercarias emitidas en el período de luz es 13725, número inferior a las cercarias totales emitidas en horas de oscuridad que son 24373. El valor medio de los valores horarios totales referido a todo el ensayo es 1531. Los valores horarios medios mantienen la situación indicada para los valores horarios totales y su valor medio es 193 referido a todo el ensayo.

3.2.1.3.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(C) presenta las emisiones individuales en valores absolutos en función del tiempo y en ella cabe destacar que la mayor parte de los indi-

viduos emisores presentan emisiones elevadas dentro de las primeras horas y en las horas centrales del período iluminado, así como dentro de las seis primeras horas del período oscuro, en tanto que se aprecia una disminución generalizada de las emisiones en las últimas horas de luz. La gráfica II(C) donde representamos los valores absolutos horarios medios evidencia la situación anteriormente descrita, mostrando la existencia de dos bloques de emisión bien diferenciados, el primero de los cuales ocurre a lo largo de las horas centrales del período claro, en tanto que el segundo comprende las seis primeras horas del período oscuro, mediando entre ambos unas horas durante las cuales ocurren emisiones bajas.

La gráfica III(C) presenta los valores relativos individuales en función del tiempo y en ella podemos observar el perfil de emisión correspondiente a los individuos cuya emisión cercariana es reducida, emisión que presenta el mismo patrón ya expuesto en la gráfica I(C) de valores absolutos, si bien en la gráfica III(C) observamos la existencia de acrofases destacadas en horas iniciales del ensayo que no quedan bien patentes en la gráfica I(C). La gráfica IV(C) recoge los valores relativos horarios medios en función del tiempo y presenta un patrón de emisión concordante con el indicado en las gráficas anteriores, aunque, comparándolo con el recogido por la gráfica II(C), observamos que las emisiones horarias altas se inician una hora antes.

La gráfica V(C) expone los valores porcentuales individuales en función del tiempo y nos muestra que los individuos emisores presentan una velocidad de emisión alta en las horas iniciales del período claro o bien en las horas centrales de dicho período, así como en las primeras horas de luz, aunque excepcionalmente algunos emisores muestran una velocidad de emisión aproximadamente constante a lo largo del ensayo. La gráfica VI(C) recoge los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo e indica que la velocidad de emisión es elevada en las horas iniciales y centrales de luz para disminuir en las horas finales del período claro aumentando nuevamente en el inicio del período oscuro.

3.2.1.4.- EXPERIENCIA D

Las emisiones cercarianas compiladas en el Cuadro 4(D) en valores absolutos constituyen los resultados correspondientes a la experiencia D en la que intervienen los individuos emisores nº 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Estos emisores son distintos a los utilizados en las experiencias A, B, C, G, H, J, K, L y M pero son los mismos que intervienen en las experiencias E y F. El análisis de los resultados obtenidos en el ensayo D se lleva a cabo siguiendo el esquema anteriormente establecido (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.4.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

El estudio de las emisiones cercarianas correspondientes a la experiencia D nos permite indicar que los emisores nº 4, 5, 7 y 10 presentan su emisión máxima referida a la totalidad del ensayo durante el período iluminado en tanto que los emisores nº 1, 3, 6, 8 y 9 ofrecen su emisión máxima en horas de oscuridad. Las emisiones individuales mínimas referidas a todo el ensayo correspondientes a los individuos nº 1, 3, 4, 5, 6 y 7 se presentan en horas de luz y las propias de los emisores nº 9 y 10 ocurren en el período oscuro. Así, los emisores nº 4, 5 y 7 coinciden en presentar sus emisiones extremas dentro del período claro del ensayo y el emisor nº 9 presenta dichos valores en horas de oscuridad.

Considerando aisladamente el período de luz y el período de oscuridad, cabe destacar que los emisores nº 4, 7, 9 y 10 ofrecen su emisión máxima referida al período claro en la hora 1 del mismo y los individuos nº 1, 3, 5 y 6 presentan dichas emisiones en las horas 10, 11 y 12 de dicho período. Las emisiones máximas referidas al período oscuro correspondientes a todos los individuos emisores se presentan en las horas 13, 15, 16, 18 y 19 de dicho período. Las emisiones individuales mínimas referidas al período de luz correspondientes a los emisores nº 1, 3, 5 y 6 ocurren en las horas 1 y 3 de dicho período y las propias de los emisores nº 4, 7, 9 y 10 se presentan en las horas 6, 7 y 8 del período, en tanto que en el período de oscuridad las emisiones mínimas de todos los emisores se producen en las horas 19, 21, 22 y 24 de dicho período. Estos datos nos indican que las emisiones individuales máximas ocurren preferen-

Individuo emisor	Horas de emisión																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	33	70	74	150	280	151	167	186	290	244	256	444	979	641	733	491	697	465	479	405	358	263	334	631
3	20	36	25	34	45	55	58	84	58	151	127	58	244	140	341	280	269	194	227	185	157	64	129	82
4	318	278	187	206	147	31	57	146	94	210	126	137	117	113	253	241	146	168	109	149	252	115	221	185
5	32	28	13	39	24	54	135	239	287	532	340	270	255	182	294	362	130	146	220	131	99	171	225	153
6	41	36	14	38	38	118	87	64	176	230	245	222	389	200	164	276	197	304	451	260	302	243	356	151
7	465	308	193	105	107	96	48	133	292	132	319	195	265	260	128	283	220	222	138	142	103	88	123	121
9	103	35	41	35	33	76	28	27	33	59	64	55	52	32	50	68	86	108	131	72	41	13	53	54
10	302	127	105	82	106	51	69	98	67	87	65	124	140	108	49	88	40	168	81	51	50	17	49	49
\bar{x}_h	164,2	114,7	81,5	86,1	97,5	79,0	81,1	122,1	162,1	205,6	192,7	188,1	305,1	209,5	251,5	261,1	223,1	221,9	229,5	174,4	170,2	121,7	186,2	178,2

Cuadro 4(D).- Valores absolutos obtenidos en la experiencia D.

temente en las horas iniciales y finales del período de luz y dentro de las siete primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones individuales mínimas se sitúan en las horas iniciales y centrales del período de luz y en las horas finales del período de oscuridad.

Los valores individuales de emisión total nos muestran que el emisor nº1 ostenta el número máximo de cercarias emitidas a lo largo de todo el ensayo: 8821. Hemos de indicar que los emisores nº 1, 3, 4, 5, 6 y 9 muestran una emisión total referida al período oscuro (6476, 2312, 2069, 2368, 3293 y 760 cercarias respectivamente) superior a la que presentan en el período claro, en tanto que los emisores nº 7 y 8 muestran el comportamiento inverso. Los valores individuales medios mantienen la misma situación ya descrita para los valores individuales totales.

3.2.1.4.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

El estudio de las emisiones cercarianas expuestas en el Cuadro 4(D) indica que el valor horario máximo referido a la totalidad de la experiencia se produce en la hora 13 del ensayo, mientras que el valor horario mínimo está situado tanto en la hora 3 como en la hora 22 de la experiencia.

El estudio por separado del período de luz y del período de oscuridad nos indica que los valores horarios más elevados ocurridos en el período de luz se producen en las horas 1 y 2 así como en las horas 10, 11 y 12 del mismo y los valores horarios altos correspondientes al período oscuro se presentan en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 de este período. Los valores horarios menos importantes correspondientes al período claro ocurren en las horas 1, 3 y 5 del mismo y los propios del período oscuro se presentan en las horas 14, 17 y 22, es decir, dispersos a lo largo de este período. El valor horario máximo referido al período iluminado ocurre en la hora 13 del mismo y el valor horario máximo correspondiente al período oscuro coincide con el referido a la totalidad del ensayo. El valor horario mínimo referido al período claro, así como el referido al período oscuro, son el mismo y coinciden con el mínimo referido a la totalidad del ensayo. El valor horario máximo medio referido a toda la experiencia es 422. Así, los valores horarios más importantes ocurren en las primeras y últimas horas de luz y en las primeras horas de oscuridad.

Los valores horarios totales presentan su valor máximo referido a la totalidad del ensayo en la hora 13 del mismo (2441 cercarias), ocurriendo el valor mínimo en la hora 6 del ensayo (632 cercarias), con lo cual estos valores extremos ocurren respectivamente en horas de oscuridad y en horas de luz. Considerando aisladamente el período de luz y el de oscuridad, podemos indicar que el valor horario máximo referido al período de luz se presenta en la hora 10 (1645 cercarias) y el correspondiente al período oscuro coincide con el propio de la totalidad del ensayo, mientras que el valor horario total mínimo referido al período de luz coincide con el mínimo de la totalidad de la experiencia, ocurriendo el valor horario total mínimo referido al período oscuro en la hora 22 del mismo (974 cercarias). Las emisiones horarias totales presentan valores altos en las primeras y en las últimas horas de luz (horas 1, 2, 9, 10, 11 y 12), así como en las primeras horas de oscuridad (horas 13, 14, 15 y 16) si bien los valores horarios totales se mantienen elevados durante todo el período de oscuridad. El número total de cercarias emitidas en el período de luz es de 12600, número muy inferior a las cercarias emitidas en el período de oscuridad que son 20261. El valor horario total medio referido a la totalidad del ensayo es de 1369. Los valores horarios medios presentan la misma situación descrita para los valores horarios totales, siendo 172 su valor medio referido a todo el ensayo.

3.2.1.4.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(D) recoge los valores absolutos individuales en función del tiempo y en ella cabe destacar que los individuos emisores presentan emisiones cercarianas elevadas principalmente en la primera y en las últimas horas del período claro, así como durante las seis primeras horas del período de oscuridad. Esta situación queda también reflejada en la gráfica II(D) que expone los valores absolutos horarios medios en función del tiempo y donde podemos observar un perfil de emisión media caracterizado por presentar una acrofase en la primera hora del ensayo tras la cual la emisión media disminuye, presentando nuevamente valores elevados en las últimas horas de luz y a lo largo de las primeras horas de oscuridad, produciéndose un ligero descenso en horas posteriores.

Los valores relativos individuales correspondientes a la experiencia D son representados en función del tiempo en la gráfica III(D) en la que podemos observar que el comportamiento de los individuos cuya emisión es poco intensa es muy similar al indicado para la mayor parte de los emisores y que queda reflejado en las gráficas anteriormente comentadas. La gráfica IV(D) expone los valores relativos horarios medios en función del tiempo y en ella se dibuja un perfil de emisión media que concuerda con el descrito para la gráfica II(D).

La gráfica V(D) muestra los valores porcentuales individuales en función del tiempo y observamos en ella que la mayor parte de los individuos emisores presentan una velocidad de emisión elevada en las últimas horas de luz y a lo largo de la mayor parte del período oscuro. Este comportamiento de los emisores aparece corroborado por el perfil de velocidad media de emisión que presenta la gráfica VI(D) en la que se expone los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo.

3.2.1.5.- EXPERIENCIA E

Los resultados correspondientes a la experiencia E están expuestos en el Cuadro 5(E) en valores absolutos. En esta experiencia intervienen los individuos emisores que son también utilizados en los ensayos D y F, siendo diferentes a los empleados en las experiencias A, B, C, G, H, J, K, L y M. El análisis de los resultados obtenidos en dicho ensayo E se realiza según el esquema establecido anteriormente (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.5.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Las emisiones cercarianas expuestas en el Cuadro 5(E) nos llevan a indicar que los individuos emisores nº 1, 3, 4, 5, 7 y 10 presentan su emisión máxima referida a la totalidad del ensayo en horas de luz en tanto que los emisores nº 6 y 9 la presentan en horas de oscuridad. La emisión mínima referida a todo el ensayo correspondiente a los emisores nº 1, 3, 5, 6 y 9 ocurre

Individuo emisor	Horas de emisión																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	62	130	1425	1468	1681	2170	803	866	716	541	666	632	686	528	934	943	863	368	813	652	570	575	491	284
3	77	128	288	859	561	304	535	343	296	317	331	289	353	247	285	246	264	204	251	348	320	306	261	204
4	380	602	241	746	1134	355	529	501	342	418	267	213	647	481	347	525	366	424	224	238	296	363	172	272
5	0	96	72	259	571	552	536	702	421	360	737	718	399	526	684	585	480	409	350	237	443	326	272	306
6	93	90	153	407	570	702	604	384	557	334	387	370	474	386	577	770	544	478	370	323	218	385	286	306
7	420	630	530	405	1188	378	723	393	551	554	352	335	712	657	486	426	522	200	283	201	380	641	404	460
9	43	224	288	329	316	302	143	157	166	238	174	266	384	300	272	234	130	172	143	130	132	213	141	150
10	125	134	160	143	185	172	229	89	132	57	81	75	138	101	149	50	93	70	25	50	15	40	19	65
\bar{x}_h	150,0	254,2	394,6	577,0	775,7	616,9	512,7	429,4	397,6	352,4	374,4	362,2	474,1	403,2	466,7	472,4	407,7	290,6	307,4	272,4	296,7	356,1	255,7	255,9

Cuadro 5(E).- Valores absolutos obtenidos en la experiencia E.

en horas de luz, en tanto que los emisores 4, 7 y 10 presentan su mínimo de emisión en horas de oscuridad. Como consecuencia, los emisores nº 1, 3 y 5 presentan sus emisiones extremas en el período claro.

Estudiando aisladamente el período de luz y el de oscuridad podemos observar que los emisores nº 1, 3, 4, 6, 7, 9 y 10 muestran su emisión máxima referida al período de luz en las horas 4, 5, 6 y 7 del mismo, en tanto que únicamente el emisor nº 5 presenta su emisión máxima en la hora 11 de dicho período. Las emisiones máximas referidas al período oscuro correspondientes a todos los emisores se producen en las horas 13, 15 y 16 de dicho período. Los individuos nº 1, 3, 5, 6 y 9 ofrecen su emisión mínima referida al período claro en las horas 1 y 2 de dicho período, mientras que los emisores nº 4, 7 y 10 presentan su emisión mínima en las horas 10 y 12. Los individuos nº 1, 4, 5, 6, 7 y 10 sitúan sus emisiones mínimas referidas al período oscuro en las horas 18, 20, 21, 23 y 24 de dicho período, en tanto que los emisores nº 3 y 9 presentan su emisión mínima en las horas 18 y 24 y en las horas 17 y 20 respectivamente. Estos datos nos indican que las emisiones individuales máximas ocurren preferentemente en las horas centrales del período de luz y en las primeras horas de oscuridad, en tanto que las emisiones individuales mínimas se producen en las primeras y últimas horas de luz y en las últimas horas de oscuridad.

Los valores individuales totales indican que el emisor nº 1 presenta el número máximo de cercarias emitidas a lo largo del ensayo: 18867. Cabe destacar que todos los individuos emisores presentan una emisión total correspondiente a horas de luz muy superior a la que muestran en horas de oscuridad, exceptuándose el emisor nº 6 que sigue un comportamiento inverso. Los valores individuales medios mantienen la misma situación descrita para los valores individuales totales.

3.2.1.5.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Los resultados correspondientes a la experiencia E nos permiten observar que la hora 6 recoge el valor horario máximo referido a la totalidad del ensayo, en tanto que la hora 1 recoge el valor horario mínimo del mismo. Así, ocurre que ambos valores horarios extremos ocurren en el período de luz de la experiencia.

Considerando aisladamente los períodos de luz y de oscuridad, podemos indicar que los valores horarios elevados del período iluminado se producen en las horas 3, 4, 5 y 6 del mismo y los valores horarios altos del período oscuro se producen en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 de este período. Durante la hora 1 y también en las horas 10, 11 y 12 del período claro ocurren los valores horarios menos importantes de dicho período y en las horas 21 y 23 se presentan los menores valores horarios del período oscuro. En la hora 6 del período claro se produce el valor horario máximo correspondiente a dicho período que coincide con el máximo referido a todo el ensayo y en la hora 16 del período oscuro ocurre el valor horario máximo referido a dicho período. La hora 1 recoge el valor horario mínimo referido al período iluminado, que coincide con el mínimo referido a todo el ensayo y en la hora 21 ocurre el valor horario mínimo referido al período oscuro. Como consecuencia, los valores horarios más elevados se presentan dentro de las seis primeras horas de luz y en las primeras horas de oscuridad. El valor horario máximo medio referido a todo el ensayo es de 850.

El valor máximo referido a la totalidad del ensayo de los valores horarios totales ocurre en la hora 5 (6206 cercarias), en tanto que el valor mínimo se presenta en la hora 1 (1200 cercarias), por lo que ambos valores extremos se producen dentro del período iluminado del ensayo. Estudiando separadamente el período iluminado y el período oscuro podemos indicar que tanto el valor horario total máximo como el mínimo referidos al período claro coinciden con los correspondientes a todo el ensayo, mientras que el valor horario total referido al período oscuro se produce en la hora 13 del mismo (3793 cercarias) y en la hora 23 ocurre el valor horario mínimo (2046 cercarias). Las emisiones horarias totales presentan valores altos en las horas centrales del período claro (horas 4, 5, 6 y 7) y en las primeras horas de oscuridad (horas 13, 14, 15, 16 y 17). Las cercarias totales emitidas en el período iluminado son 41578, número superior al total de cercarias emitidas en el período oscuro que es 34073. El valor horario total medio referido a la totalidad de la experiencia es 3152. Los valores horarios medios mantienen la misma situación descrita para los valores horarios totales y su valor medio referido a la totalidad del ensayo es 394.

3.2.1.5.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

Los valores absolutos individuales correspondientes al ensayo E son representados en la gráfica I(E) en función del tiempo, observándose en dicha gráfica que la mayor parte de los individuos emisores coinciden en presentar emisiones elevadas en las horas centrales de período iluminado, así como en las primeras horas del período oscuro. Esta situación aparece perfectamente definida en la gráfica II(E) que presenta los valores absolutos horarios medios en función del tiempo y en la que aparece un perfil de emisión media constituido por un primer bloque de emisión situado en las horas centrales de luz y un segundo bloque que ocupa la primera mitad del período oscuro.

La gráfica III(E) expone los valores relativos individuales en función del tiempo, pudiendo observarse en ella que los individuos que protagonizan una emisión de cercarias reducida presentan el mismo comportamiento ya indicado en líneas anteriores. La gráfica IV(E) que representa los valores relativos horarios medios muestra un perfil de emisión absolutamente coincidente con el descrito en la gráfica II(E).

La gráfica IV(E) presenta los valores porcentuales individuales en función del tiempo y en ella cabe destacar que la mayor parte de los individuos emisores muestran una velocidad de emisión elevada en las horas centrales del período iluminado que disminuye en las horas siguientes para incrementarse en la primera mitad del período de oscuridad. Esta situación viene corroborada por el perfil de velocidad media de emisión expuesto en la gráfica VI(E), que recoge los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo y que se ajusta exactamente a la situación descrita para las gráficas anteriores.

3.2.1.6.-EXPERIENCIA F

El Cuadro 6(F) recoge en valores absolutos las emisiones cercarianas que constituyen los resultados correspondientes a la experiencia F. En este ensayo intervienen los individuos emisores nº 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 que han sido utilizados en las experiencias D y F pero son diferentes a los empleados en las restantes experiencias. El estudio de los resultados obtenidos en el ensayo F

Individuo emisor	Horas de emisión																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	34	647	573	370	564	355	113	492	512	1431	829	708	627	735	1240	765	397	302	152	196	191	280	168	
3	6	226	155	215	50	223	151	1082	606	158	459	497	288	501	444	327	315	240	328	186	140	253	182	
4	24	128	547	533	222	126	119	391	127	207	165	348	699	376	611	436	888	381	202	156	112	170	296	166
5	19	84	626	505	350	155	199	318	244	504	558	705	581	418	520	564	344	399	291	276	174	355	242	
6	35	42	411	507	318	192	64	57	52	148	185	224	288	606	639	315	360	349	312	213	239	172	97	200
7	38	77	169	552	441	444	413	214	328	304	468	250	537	660	585	456	435	387	286	322	237	205	320	219
9	27	221	297	196	63	164	98	103	164	197	242	264	306	291	357	263	311	184	266	194	196	155	145	39
10	5	37	53	5	10	23	48	62	74	27	40	28	254	294	121	75	83	62	37	62	60	43	32	32
\bar{x}_h	20,0	78,6	372,0	378,2	248,6	214,7	189,9	176,1	320,4	313,1	405,9	388,4	499,2	465,4	495,9	468,6	466,6	302,4	255,5	214,7	187,7	156,2	222,2	156,0

1
26
65
1

Cuadro 6(F).- Valores absolutos obtenidos en la experiencia F.

se lleva a cabo siguiendo el esquema establecido anteriormente (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.6.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

El estudio de los resultados correspondientes a la experiencia F nos lleva a destacar que los individuos nº 1 y 3 sitúan su emisión máxima referida a todo el ensayo en el período iluminado del mismo, en tanto que los emisores nº 4, 6, 7, 9 y 10 sitúan su emisión máxima en horas de oscuridad. El emisor nº 5 presenta su emisión máxima referida a todo el ensayo tanto en la hora 12 como en la 13 y como consecuencia en período claro y en período oscuro. La emisión mínima referida a la totalidad de la experiencia ocurre, para todos los emisores, en el período iluminado del mismo. Así, los emisores 1 y 3 coinciden en ofrecer sus emisiones extremas en horas de luz.

Estudiando aisladamente el período de luz y el período de oscuridad observamos que los emisores nº 1, 3, 5 y 10 sitúan su emisión máxima referida al período de luz en las horas 9, 11 y 12 del mismo, en tanto que los emisores nº 4, 6, 7 y 9 la ofrecen en las horas 3 y 4 de dicho período. Las emisiones máximas referidas al período oscuro correspondientes a todos los individuos emisores ocurren en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 de dicho período. Todos los individuos emisores coinciden en presentar su emisión mínima referida al período de luz en las horas 1 y 2 del mismo, exceptuándose el emisor nº 10 cuya emisión mínima ocurre tanto en la hora 1 como en la hora 4 de dicho período. Todos los individuos emisores ofrecen su emisión mínima referida al período de oscuridad en las horas 20, 21, 22, 23 y 24 del mismo. Esta situación nos indica que las emisiones individuales máximas ocurren en las horas iniciales y en las horas finales del período claro, así como dentro de las cinco primeras horas del período oscuro, presentándose las emisiones individuales mínimas en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad.

Los valores individuales totales nos indican que al emisor nº 1 corresponde el número máximo de cercarias emitidas en el transcurso de toda la experiencia: 11682. Considerando separadamente el período claro y el período oscuro cabe destacar que todos los individuos emisores ostentan un número de cercarias

emitidas en horas de oscuridad superior al correspondiente a horas de luz, exceptuándose el emisor nº 1 que presenta un comportamiento inverso. Los valores individuales medios mantienen la misma situación expuesta para los valores individuales totales.

3.2.1.6.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Las emisiones cercarianas expuestas en el Cuadro 6(F) evidencian que la hora 11 del ensayo recoge el valor horario máximo referido a la totalidad de la experiencia y en la hora 1 se produce el valor horario mínimo, ocurriendo que ambos valores extremos se presentan en el período iluminado del ensayo.

El estudio aislado del período iluminado y del período de oscuridad nos lleva a destacar que los valores horarios más elevados correspondientes al período de luz se sitúan en las horas 9, 10, 11 y 12 del mismo y los referidos al período oscuro se producen en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 del mismo. Los valores horarios menos importantes quedan situados en las horas 1, 2 y 4 del período iluminado, así como en las horas 19, 23 y 24 del período de oscuridad. Tanto el valor horario máximo como el mínimo referidos al período de luz coinciden con los valores horarios extremos referidos a la totalidad del ensayo. El valor horario máximo referido al período de oscuridad se produce en la hora 16 del mismo, en tanto que las horas 23 y 24 recogen el valor horario mínimo referido a dicho período. El valor horario máximo medio referido a la totalidad del ensayo es de 570. Como consecuencia, los valores horarios elevados ocurren en las últimas horas de luz y en las primeras cinco horas del período oscuro, en tanto que los valores horarios menos importantes se presentan en las primeras horas de luz y en las últimas horas de oscuridad.

Los valores horarios totales sitúan su valor máximo referido a la totalidad del ensayo en la hora 13 del mismo (3994 cercarias) y su valor mínimo queda recogido en la hora 1 de la experiencia (160 cercarias), presentándose así ambos valores extremos en el período oscuro y en horas de luz respectivamente. Estudiando separadamente el período de luz y el período de oscuridad hemos de destacar que el valor horario total máximo referido al período de luz ocurre en la hora 11 del mismo (3247 cercarias) y el valor máximo referido al período

oscuro coincide con el máximo correspondiente a la totalidad del ensayo. El valor horario mínimo referido a horas de luz coincide con el mínimo correspondiente a todo el ensayo, en tanto que la hora 24 recoge el valor horario mínimo referido al período oscuro (1248 cercarias). Las emisiones horarias totales se mantienen elevadas durante las horas iniciales del período de luz (horas 3, 4 y 5), así como durante las horas finales de este período (horas 9, 10, 11 y 12) y dentro del período oscuro, en las horas iniciales del mismo (horas 13, 14, 15 16 y 17). El número total de cercarias emitidas en el período de luz es 24848, número inferior a las cercarias totales emitidas en el período oscuro que es 31125. El valor horario total medio referido a todo el ensayo es 2332. Los valores horarios medios mantienen el mismo comportamiento indicado para los valores horarios totales y su valor medio referido a la totalidad de la experiencia es 292.

3.2.1.6.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(F) expone los valores absolutos individuales en función del tiempo, pudiendo observarse en ella que los individuos emisores presentan emisiones elevadas dentro de las cuatro primeras horas del ensayo, con algunas excepciones, así como en las últimas horas del período iluminado y a lo largo de la primera mitad del período de oscuridad, observándose emisiones muy poco importantes en todos los individuos durante la segunda mitad del período oscuro. La gráfica II(F) presenta los valores absolutos horarios medios en función del tiempo que dibujan un perfil de emisión media en el que se observa un primer bloque importante situado en las cuatro primeras horas de luz y un segundo bloque que abarca las últimas horas de luz y la primera mitad del período oscuro.

La gráfica III(F) expone los valores relativos individuales en función del tiempo, pudiéndose observar que los emisores menos importantes siguen el comportamiento ya indicado para los restantes individuos y descrito en las gráficas anteriores. La gráfica IV(F) que expone los valores relativos horarios medios en función del tiempo presenta un perfil de emisión media totalmente coincidente con el expuesto en la gráfica III(F).

Los valores porcentuales individuales son representados en función del tiempo en la gráfica V(F), evidenciando dicha gráfica que los emisores presentan una velocidad de emisión alta en el inicio del ensayo, que disminuye en las horas siguientes para incrementarse en el inicio del período oscuro, manteniéndose elevada durante la primera mitad del mismo. Este comportamiento queda bien reflejado en la gráfica VI(F) que recoge los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo y muestra un perfil de velocidad media de emisión concordante con la situación anteriormente descrita.

3.2.1.7.- EXPERIENCIA M(I)

Estudiamos en este apartado los resultados correspondientes a la experiencia M(I) que está constituida por el primer período de 24 horas de duración incluido en la experiencia M. Esta presenta una duración ininterrumpida de 120 horas, es decir, está integrada por cinco períodos de 24 horas, cada uno de los cuales puede ser considerado como un ensayo independiente, siendo estudiado el primero de ellos en el presente apartado y los cuatro períodos restantes son expuestos en los apartados siguientes. Los resultados correspondientes a la experiencia M considerada en su totalidad son expuestos en el apartado que estudia la emisión de cercarias en relación con el tiempo (véase apartado 3,4).

Así, la experiencia M(I) tiene una duración de 24 horas, manteniéndose en ella una temperatura constante de 15 °C y un fotoperíodo normal de 12 horas luz - 12 horas oscuridad. Intervienen en este ensayo los emisores nº 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 13. Los valores absolutos obtenidos en esta experiencia son compilados en el primer período de 24 horas del Cuadro 12 (M). La exposición de los resultados referidos a este ensayo sigue el esquema utilizado anteriormente (véase apartado 3,1,4).

3.2.1.7.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

El estudio de las emisiones cercarianas individuales nos permite observar que los individuos emisores nº 1, 3, 5, 7, 8, 10 y 13 presentan su emisión máxima referida a las 24 horas del ensayo durante las horas de luz y úni-

camente el emisor nº 9 presenta su emisión máxima en horas de oscuridad. Los emisores nº 5 y 7 presentan su emisión mínima en la primera hora del ensayo, en tanto que los restantes individuos ofrecen su emisión mínima en las cinco últimas horas de la experiencia, exceptuándose el emisor nº 9 cuyo mínimo de emisión ocurre en la hora 9 del ensayo.

Considerando aisladamente los períodos de luz y de oscuridad podemos indicar que todos los individuos emisores con la única excepción del individuo nº 9 presentan sus emisiones máximas referidas al período iluminado superiores a sus valores máximos referidos al período oscuro. Es destacable el hecho de que los emisores nº 1, 3, 5, 7, 8, 10 y 13 sitúan sus emisiones máximas referidas al período de luz en las horas 3, 4 y 6 del mismo y sus emisiones máximas referidas a horas de oscuridad están agrupadas en el intervalo constituido por las horas 13, 15 y 16. Por lo que se refiere a los valores individuales mínimos, los individuos nº 1, 3, 5, 7 y 10 sitúan su emisión mínima referida al período iluminado en las horas 1 y 2 y los emisores nº 8, 9 y 13 ofrecen su emisión mínima en las horas 9 y 10; las emisiones mínimas referidas a horas de oscuridad se sitúan, para todos los individuos emisores, en las horas 19, 20 22 y 24. Recopilando los datos anteriores podemos indicar que las emisiones cercarianas individuales máximas se agrupan en las horas centrales del período de luz y en las primeras horas de oscuridad, situándose las emisiones mínimas en las primeras y últimas horas de luz y en las últimas horas de oscuridad.

El estudio de los valores individuales de emisión cercariana total nos lleva a considerar que el emisor nº 3 ostenta el número máximo de cercarias emitidas a lo largo del ensayo: 12224. Los emisores nº 1, 3, 5, 7, 8, 10 y 13 presentan una emisión cercariana total en el período claro que es superior a la que estos individuos ostentan en horas de oscuridad, mientras que el emisor nº 9 presenta un comportamiento contrario. Concordando con esta situación, las emisiones individuales medias muestran el mismo comportamiento.

3.2,1.7.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Los valores absolutos compilados en el Cuadro 12 (M) correspondientes al

primer período de 24 horas del ensayo M, es decir, a la experiencia denominada M(I), nos indican que la hora 4, situada en el período iluminado, recoge la emisión cercariana máxima referida a las 24 horas del ensayo, en tanto que la hora 24 recoge la emisión cercariana mínima.

Considerando separadamente el período de luz y el de oscuridad cabe destacar que las horas 4, 5, 6 y 7 recogen las emisiones horarias máximas correspondientes al período de luz y las horas 13, 15 y 16 recogen las emisiones máximas referidas al período oscuro. El valor horario máximo del período iluminado se produce en la hora 4 del ensayo y es debido al emisor nº 7. La emisión cercariana máxima referida a las horas de oscuridad ocurre en la hora 15 y es debida al emisor nº 3. La comparación entre ambos valores, respectivamente 1888 y 808 cercarias, muestra una gran superioridad de la emisión máxima correspondiente al período iluminado respecto al valor horario máximo referido a las horas de oscuridad. Las horas 1 y 2, correspondientes al período de luz recogen los valores horarios mínimos referidos a dicho período, en tanto que las horas 18, 19, 20, 21, 22 y 23 recogen los valores horarios mínimos referidos al período oscuro. Considerando globalmente estos resultados podemos destacar que los valores horarios máximos se sitúan en las horas centrales del período iluminado y en las primeras horas del período oscuro.

Los valores horarios de emisión cercariana total presentan su máximo referido a la totalidad del ensayo en la hora 4 del mismo (6264 cercarias) y su mínimo ocurre en la hora 22 de la experiencia (562 cercarias), por lo que observamos que el valor máximo ocurre en horas de luz, en tanto que el mínimo ocurre en el período oscuro. Estudiando por separado el período de luz y el de oscuridad cabe destacar que el valor horario máximo de emisión cercariana total referido a horas de luz es el anteriormente indicado en tanto que el valor máximo referido a horas de oscuridad ocurre en la hora 13 (2510 cercarias), siendo éste inferior al anterior. Los valores mínimos, respectivamente 586 cercarias en la hora 2 y 562 en la hora 22, presentan la situación inversa. Las emisiones horarias totales son elevadas en las horas centrales del período de luz (horas 3, 4, 5, 6 y 7) y en las horas iniciales del período oscuro (horas 13, 14, 15 y 16). El número total de cercarias emitidas en el período de luz es 31856, número muy superior a las cercarias totales emitidas en horas de oscuridad que son 15908. El valor horario total medio referido a todo el ensayo

es 1990. Los valores horarios medios observados en las distintas horas de la experiencia mantienen, lógicamente, la misma situación indicada para los valores horarios de emisión total y su valor medio referido a todo el ensayo es 249.

3.2.1.7.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

La gráfica I(M) recoge los valores absolutos individuales correspondientes a la experiencia M en función del tiempo y en ella aquellos valores referidos al intervalo constituido por las primeras 24 horas de dicha experiencia integran la representación gráfica de los resultados referidos al denominado ensayo M(I). En dicha gráfica observamos que todos los individuos emisores presentan emisiones importantes en el intervalo de tiempo integrado por las horas centrales del período iluminado, así como en las primeras horas del período oscuro, observándose un descenso generalizado en las emisiones correspondientes a todos los emisores durante las últimas horas de oscuridad. Esta situación queda reflejada claramente en la gráfica II(M), en la que consideramos únicamente sus primeras 24 horas donde se representa los valores absolutos horarios medios referidos al ensayo M(I) en función del tiempo. Esta gráfica muestra claramente la existencia de un primer bloque de emisión situado en las horas centrales del período claro, tras el cual hay un descenso de la emisión cercariana que vuelve a ser elevada en las primeras horas de oscuridad para descender nuevamente en las restantes horas del período oscuro.

La gráfica III(M(I)) presenta los valores relativos individuales referidos al ensayo M(I) en función del tiempo, observándose en ella que el perfil de emisión de todos los individuos, incluidos aquellos cuya intensidad de emisión es reducida, presenta la misma situación ya indicada para las gráficas anteriormente comentadas. Considerando la gráfica IV(M(I)) donde se sitúa los valores relativos horarios medios referidos al ensayo M(I) en función del tiempo, observamos dos bloques de emisión coincidentes con los ya destacados en la gráfica de valores absolutos horarios medios.

Los valores porcentuales individuales son representados en la gráfica V (M(I)) en función del tiempo y cabe destacar en ella que los individuos emiso-

res muestran una velocidad de emisión alta en las horas centrales del período iluminado, velocidad que disminuye en las horas finales de dicho período para aumentar nuevamente en las primeras horas de oscuridad, si bien contemplamos alguna excepción protagonizada por un individuo cuya velocidad de emisión se mantiene prácticamente constante a lo largo del ensayo. La gráfica VI(M(I)) expone los valores porcentuales horarios medios en función del tiempo, evidenciando una velocidad media de emisión alta en las horas centrales de luz que se hace menor al final de este período y sufre un ligero incremento en las primeras horas de oscuridad.

3.2.1.8.- EXPERIENCIA M(II)

La experiencia M(II) engloba las emisiones cercarianas ocurridas a lo largo del segundo período de 24 horas incluido en el desarrollo de la experiencia M. Los datos en valores absolutos correspondientes a dicho ensayo M(II) están expuestos en el Cuadro 12 (M), siendo los correspondientes al segundo período de 24 horas. A lo largo del ensayo M(II) se mantiene una temperatura constante de 15 °C y un fotoperíodo normal de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, interviniendo en él los individuos emisores nº 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 13. El estudio de los resultados obtenidos en este ensayo se lleva a cabo siguiendo el esquema anteriormente establecido (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.8.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Las emisiones cercarianas individuales recogidas en el Cuadro 12 (M) y correspondientes a este ensayo M(II) nos muestran que los individuos emisores nº 1,5,8,9,10 y 13 presentan su emisión máxima referida a la totalidad del ensayo en horas de oscuridad y únicamente los emisores nº 3 y 7 presentan su emisión máxima en horas de luz. Respecto a las emisiones individuales mínimas cabe indicar que los emisores nº 1, 5, 7, 8, 9 y 10 sitúan dichas emisiones en horas de luz y únicamente los individuos nº 3 y 13 ofrecen su emisión mínima en horas de oscuridad.

Estudiando separadamente los períodos de luz y de oscuridad podemos indicar que los individuos emisores nº 1, 3 y 7 muestran emisiones máximas correspondientes al período claro superiores respectivamente a las presentadas en horas de oscuridad. Los emisores nº 5, 8, 9 y 10 mantienen un comportamiento contrario, en tanto que el emisor nº 13 presenta iguales ambas emisiones máximas. Cabe destacar que los individuos nº 1, 5, 8, 9 y 10 sitúan sus emisiones máximas referidas al período iluminado en las horas 8, 9, 10, 11 y 12 de dicho período, mientras que los emisores nº 3, 7 y 13 ofrecen dichas emisiones máximas en las horas 1, 3 y 4 del período claro, es decir, en horas iniciales del mismo. Todos los individuos emisores ofrecen sus emisiones máximas referidas al período oscuro en las horas 13, 14, 15, 16 y 17 del mismo, es decir, en sus horas iniciales. Las emisiones mínimas referidas al período de luz correspondientes a los emisores nº 1, 5, 8, 9, 10 y 13 se presentan en las horas 1, 2, 3, 4 y 5 de dicho período y las correspondientes a los individuos nº 3 y 7 ocurren en las horas 11 y 7 respectivamente. Las emisiones mínimas referidas al período oscuro se presentan en las horas 22, 23 y 24 para todos los individuos con excepción del emisor nº 7 que ofrece su emisión mínima en la hora 16. El emisor nº 13 presenta una emisión muy reducida a lo largo de este ensayo, anulándose en la hora 18 del mismo, continuando dicho individuo con emisiones nulas o despreciables. Como consecuencia de la situación descrita, cabe indicar que las emisiones cercarianas individuales máximas ocurren principalmente en las últimas horas del período claro, así como en horas iniciales del mismo y en horas iniciales del período oscuro, situándose las emisiones individuales mínimas en las primeras horas del período iluminado y en las últimas horas del período de oscuridad.

Los valores individuales de emisión cercariana total muestran que corresponde al emisor nº 3 el número máximo de cercarias emitidas a lo largo de todo el ensayo: 7724. Los emisores nº 3 y 10 presentan una emisión cercariana total correspondiente al período iluminado que es superior a la que muestran en el período de oscuridad, en tanto que los individuos nº 1, 5, 7, 8 y 9 mantienen un comportamiento contrario. Los valores de emisión individual media presentan una situación concordante con la descrita para los valores de emisión individual total.

3.2.1.8.2.- ANALISIS DE LOS VALORES HORARIOS

Los valores absolutos correspondientes a la experiencia M(II) expuestos en el Cuadro 12 (M) muestran que la hora 3 del ensayo, situada en el período claro, recoge la emisión cercariana máxima referida a la totalidad de la experiencia y la hora 18 presenta la emisión mínima del ensayo.

El estudio aislado de los períodos de luz y de oscuridad nos lleva a indicar que las horas 3, 4, 5 y 6 ofrecen los valores horarios máximos correspondientes al período iluminado y las horas 13, 14, 17, 18 y 19 recogen los valores horarios máximos referidos al período de oscuridad. El valor horario máximo referido a horas de luz se produce en la hora 3 del mismo, siendo originado por el emisor nº 3. El valor horario máximo correspondiente al período oscuro ocurre en la hora 14 del mismo y está también originado por el emisor nº 3. Las horas 2 y 3 juntamente con las horas 8, 9 y 10 recogen los valores horarios mínimos referidos al período de luz, en tanto que en las horas 18, 21, 22, 23 y 24 se produce emisiones nulas debidas todas ellas al emisor nº 13. La consideración global de estos resultados indica que los valores horarios máximos se sitúan en la primera mitad del período iluminado, así como en las primeras horas y en horas centrales del período oscuro, en tanto que los valores horarios mínimos se sitúan en la segunda mitad del período claro y en las últimas horas del período oscuro.

Los valores horarios de emisión cercariana total presentan su máximo referido a la totalidad del ensayo en la hora 14 del mismo (1572 cercarias), en tanto que el valor mínimo ocurre en la hora 23 de la experiencia (456 cercarias), ocurriendo ambos valores extremos en el período de oscuridad del ensayo. Considerando aisladamente el período iluminado y el período oscuro podemos destacar que el valor horario total máximo referido al período de luz se presenta en la hora 3 del mismo (1473 cercarias) y el valor máximo referido al período de oscuridad coincide con el máximo correspondiente a la totalidad del ensayo, siendo superior al anterior. Los valores mínimos referidos a las horas de luz y de oscuridad ocurren respectivamente en las horas 2 (657 cercarias) y 23 (456 cercarias), siendo este último el valor mínimo referido a la totalidad del ensayo. Las emisiones horarias totales presentan valores elevados en las horas 3, 4, 5 y 6 y en las horas 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 en tanto que sus

valores son inferiores en las últimas horas del período de luz y en las últimas horas del período oscuro. El número total de cercarias emitidas en horas de luz es 10979, número inferior al total de cercarias emitidas en horas de oscuridad que son 12756. El valor horario total medio referido a todo el ensayo es 989. Los valores horarios medios presentan una fluctuación idéntica a la expuesta para los valores horarios totales a lo largo del ensayo y su valor medio referido a toda la experiencia es 124.

3.2.1.8.3.- REPRESENTACIONES GRAFICAS

Los valores absolutos individuales representados en el segundo período de 24 horas de la gráfica I(M) constituyen los resultados en valores absolutos obtenidos en la experiencia M(II). La mayor parte de los individuos emisores presentan emisiones poco importantes en la primera mitad del período claro, aunque se observa algunas excepciones. Durante las seis primeras horas del período oscuro los individuos emisores coinciden en presentar emisiones elevadas, si bien también aquí se presentan algunas excepciones. La gráfica II(M), dentro de su segundo período de 24 horas, recoge los valores absolutos horarios medios correspondientes al ensayo M(II) en función del tiempo, presentando un perfil de emergencia cercariana en el que cabe destacar una emisión media ligeramente alta a partir de la tercera hora del ensayo y hasta la mitad del período claro, emisión que desciende en las últimas horas de luz para elevarse nuevamente a lo largo de la primera mitad del período oscuro.

La gráfica III(M(II)) presenta los valores relativos individuales en función del tiempo y muestra que la mayor parte de los individuos mantienen emisiones poco importantes a lo largo de la primera mitad del período iluminado, observándose excepciones protagonizadas por tres individuos emisores. Las emisiones son algo más elevadas en las últimas horas de luz pero no llegan a alcanzar el nivel de emisión existente en la primera mitad del período oscuro. Esta situación queda bien reflejada en la gráfica IV(M(II)) que presenta los valores relativos horarios medios en función del tiempo y en la que podemos observar que la emisión media más elevada ocurre a lo largo de las seis primeras horas de oscuridad, ocurriendo una emisión algo importante en las horas centra-

les de luz que desciende en las horas siguientes y presenta un ligero incremento en las últimas horas del período claro.

La gráfica V(M(II)) expone los valores porcentuales individuales en función del tiempo, mostrándonos una velocidad de emisión aproximadamente constante para la mayor parte de emisores en el período claro, manteniéndose las excepciones a que antes hemos aludido, así como un ligero incremento en dicha velocidad durante las primeras horas de oscuridad. La gráfica VI(M(II)), que recoge los valores porcentuales horarios medios de emisión, corrobora la situación descrita para la gráfica anterior.

3.2.1.9.- EXPERIENCIA M(III)

Las emisiones cercarianas correspondientes al tercer período de 24 horas de la experiencia M constituyen los resultados que englobamos dentro de la experiencia M(III). Estos valores están expuestos en el Cuadro 12(M) y son los referidos al tercer período de 24 horas. Durante el transcurso del ensayo M(III) se mantiene un fotoperíodo normal de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y una temperatura constante de 15 °C, interviniendo en dicho ensayo los individuos nº 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 13, si bien este último emisor presenta emisiones prácticamente nulas a lo largo de toda la experiencia M(III). El estudio de los resultados obtenidos en dicha experiencia se desarrolla siguiendo el esquema ya establecido (véase apartado 3.1.4).

3.2.1.9.1.- ANALISIS DE LOS VALORES INDIVIDUALES

Considerando detenidamente las emisiones cercarianas individuales expuestas en el Cuadro 12(M) y referentes a la experiencia M(III), cabe destacar que los individuos emisores nº 1, 8 y 13 presentan su emisión máxima referida a las 24 horas del ensayo en horas de luz, en tanto que los emisores nº 3, 5, 7, 9 y 10 ofrecen su emisión máxima en horas de oscuridad. Las emisiones individuales mínimas correspondientes a los emisores nº 1, 5, 7, 9, 10 y 13 ocurren en horas de luz y únicamente los individuos nº 3 y 8 sitúan sus emisiones mínimas en horas de oscuridad. Así, pues, los individuos nº 1 y 13 coinciden en

presentar tanto su emisión máxima como su emisión mínima en horas de luz y el emisor nº 3 sitúa ambas emisiones en horas de oscuridad.

Considerando aisladamente los períodos de luz y de oscuridad, observamos que los emisores nº 1, 8 y 13 presentan sus emisiones máximas correspondientes al período claro superiores respectivamente a las que ofrecen en período oscuro, en tanto que los restantes individuos presentan un comportamiento inverso. Cabe destacar que todos los individuos presentan sus emisiones máximas referidas al período claro en las horas 7, 9, 10, 11 y 12 de dicho período y sus emisiones máximas referidas al período de oscuridad en las horas 14, 16, 17 y 18 de este período, con la única excepción del emisor nº 5 cuya emisión máxima referida al período oscuro se sitúa en la hora 20, apareciendo más tardíamente que las anteriormente indicadas. Las emisiones mínimas referidas al período iluminado ocurren en las horas 2, 3, 4, 5 y 6 para todos los individuos, exceptuándose el emisor nº 3 cuya emisión mínima se presenta en la hora 12. El emisor nº 13 presenta emisiones nulas en la mayor parte de las horas del período iluminado. En el período oscuro las emisiones mínimas se sitúan en las horas 20, 22, 23 y 24 para los emisores nº 1, 3, 5, 7 y 8 y únicamente los emisores nº 9 y 10 presentan emisiones mínimas en las horas 13 y 17, es decir en horas iniciales del período. El emisor nº 13 únicamente emite 2 cercarias en las horas de oscuridad por lo que sus emisiones son nulas en la mayoría de dichas horas. Los datos anteriores indican que las emisiones cercarianas individuales máximas se presentan en las seis últimas horas de luz y en las seis primeras horas de oscuridad, situándose las emisiones mínimas en la primera mitad del período iluminado y en la última mitad del período oscuro preferentemente.

El estudio de los valores individuales de emisión cercariana total muestra que el emisor nº 7 ostenta el número máximo de cercarias emitidas a lo largo de todo el ensayo: 7918. Los emisores nº 1, 8 y 13 muestran una emisión cercariana total en horas de luz que es superior a la que presentan en horas de oscuridad, mientras que los restantes individuos proceden inversamente. Los valores de emisión individual media mantienen la situación anteriormente descrita.