



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

## 5.- CULTIVO IN VITRO DE BRACHYLAIMA RUMINAE A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE

El objetivo de nuestros ensayos de cultivo in vitro es estudiar el desarrollo de la metacercaria madura infestante de la especie Brachylaima ruminæ en medios de cultivo artificiales y de composición diversa con vistas a la obtención de adultos de evolución y maduración lo más semejantes posibles a las de adultos obtenibles experimentalmente in vivo en animales de laboratorio. A este efecto hemos empleado diferentes medios de cultivo, cuya preparación y utilización han quedado adecuadamente expuestas en capítulos anteriores (véase apartado 2.2.6 y siguientes). En el presente capítulo nos ocuparemos de los resultados obtenidos en los cultivos in vitro llevados a cabo, los cuales estudiaremos exhaustivamente, efectuando, asimismo, estudios comparativos de los resultados obtenidos en los distintos medios de cultivo ensayados, a fin de poder llegar a establecer aquél medio en que se ha obtenido unos resultados mejores o más prometedores.

### 5.1.- MATERIAL PARASITOLÓGICO UTILIZADO PARA EL CULTIVO IN VITRO

El material parasitológico que ha constituido punto de partida de nuestros trabajos de cultivo in vitro está integrado por metacercarias de Brachylaima ruminæ obtenidas por infestación experimental de los segundos hospedadores intermediarios, los Gasterópodos terrestres de la especie Rumina decollata, con cercarias de la misma especie de Trematodo, cuya determinación específica había sido realizada por quetotaxia.

Tanto el origen de los hospedadores como las técnicas de infestación experimental y las técnicas quetotácicas empleadas, han sido ya expuestos anteriormente (véase apartados 2.1.1.3.1, 2.2.3.1 y 2.2.2. 1.1). Hemos utilizado a lo largo de todas las experiencias de cultivo, aproximadamente 300 metacercarias procedentes siempre del riñón de su caracol hospedador y para cuya obtención se ha hecho necesaria la disección de 6 Gasterópodos segundos hospedadores intermediarios.

## 5.2.- MATERIAL PARASITOLÓGICO UTILIZADO COMO CONTROL

La realización del cultivo in vitro de las metacercarias de Brachylaima ruminæ y el estudio de su evolución in vitro requieren el conocimiento previo y exacto del estadio evolutivo de partida de la experiencia que, en este caso, son las metacercarias maduras infestantes de la especie en estudio. Asimismo, es necesario conocer con exactitud el estadio de desarrollo final alcanzado en los trabajos experimentales, constituido por los adultos de Brachylaima ruminæ. Esto nos permitirá efectuar comparaciones entre el material parasitológico procedente de cultivo y las metacercarias y adultos del Trematodo en estudio, a fin de poder establecer el grado de evolución y desarrollo de dicho material. A estos efectos dispusimos de metacercarias experimentales de la especie Brachylaima ruminæ, que tras su fijación y tinción adecuadas habrán de constituir un material de control. Dispusimos también de adultos de la misma especie de Trematodo obtenidos experimentalmente y que debidamente fijados y teñidos actúan como material de control.

### 5.2.1.- METACERCARIAS EXPERIMENTALES DE BRACHYLAIMA RUMINÆ UTILIZADAS COMO CONTROL

Las metacercarias de Brachylaima ruminæ, que actuarán como material de control, proceden de los mismos Gasterópodos segundos hospedadores intermedarios que proporcionan las metacercarias destinadas a cultivo. Así, en el momento de la disección de cada caracol para la obtención de metacercarias a partir de su riñón, una parte de dichas metacercarias son destinadas a cultivo, en tanto que algunas de ellas son fijadas, teñidas y montadas para constituir el material de control.

Estas metacercarias control son, pues, experimentales y proceden de los mismos Gasterópodos infestados experimentalmente con cercarias de la especie Brachylaima ruminæ, que proporcionan las metacercarias para cultivo. Una parte de las metacercarias control son fijadas en Bouin, entre portaobjetos y cubreobjetos, teñidas con Carmín Borácico de Grenacher, diferenciadas, deshidratadas y montadas en Bálsamo de Canadá, tal y como se ha descrito anteriormente (véase apartados 2.2.2.2 y siguientes). Exponemos en la Tabla 5

las medidas correspondientes a 14 metacercarias que serán utilizadas como material de control o de referencia al efectuar los estudios comparativos con material procedente de cultivo. Otra parte de las metacercarias control son teñidas con aceto-orceína y observadas extemporáneamente al microscopio entre portaobjetos y cubreobjetos, tras lo cual se confecciona con este material preparaciones permanentes, según el método ya descrito (véase apartados 2.2.6.7). Indicamos en esta Tabla 5 las medidas referentes a 5 metacercarias que, cuando proceda, serán también empleadas como material de referencia en estudios comparativos con material de cultivo.

#### 5.2.2.- ADULTOS EXPERIMENTALES DE BRACHYLAIMA RUMINAE UTILIZADOS COMO CONTROL

La consecución en el Laboratorio del ciclo evolutivo de la especie de Trematodo en estudio nos permitió disponer de adultos experimentales del Digénido. Estos adultos han sido obtenidos por infestación experimental de los hospedadores definitivos, que en nuestro caso son roedores de la especie Mus musculus domesticus nacidos y criados en el Laboratorio, con metacercarias, asimismo experimentales, de Brachylaima ruminæ. Estas metacercarias utilizadas en la infestación de los hospedadores definitivos proceden de los mismos caracoles segundos hospedadores intermediarios que proporcionan las metacercarias destinadas a cultivo in vitro y las empleadas como control. Las técnicas de infestación de los roedores han sido descritas anteriormente (véase apartado 2.2.3.2), así como las técnicas de disección de los mismos (véase apartado 2.2.5.1).

Se obtuvo así 15 adultos de 24 horas de edad, 15 de 48 horas, 12 de 3 días de edad, 15 de 4 días, 16 de 5 días, 11 de 6 días, 14 de 7 días, 16 de 8 días, 12 de 9 días, 17 de 12 días, 9 de 14 días, 13 de 15 días, 12 de 18 días y 10 de 21 días de edad, considerando como edad el tiempo transcurrido entre la infestación experimental del hospedador definitivo con metacercarias y el momento de su disección. Estos adultos fueron fijados en Bouin entre portaobjetos y cubreobjetos, teñidos con Carmín Borácico de Grenacher, diferenciados, deshidratados y montados en Bálsamo de Canadá, según las técnicas descritas anteriormente (véase apartados 2.2.2.2 y siguientes).

La evolución morfométrica de estos adultos queda expresada en las Tablas

6 A, 6 B, 6 C y 6 D, donde exponemos las medidas correspondientes a los adultos de distintas edades. Este material será utilizado como control o material de referencia y nos permitirá evaluar la evolución del material procedente de cultivo y efectuar estudios comparativos.

### 5.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO ENSAYADOS

Exponemos en este apartado los resultados obtenidos en las experiencias de cultivo llevadas a cabo, tratando separadamente los datos aportados por cada uno de los medios de cultivo ensayados, si bien agruparemos la información obtenida atendiendo a la naturaleza y características físicas de los medios de cultivo, que nos permite clasificarlos como medios de cultivo monofásicos, bifásicos y semisólidos.

Los materiales empleados en la preparación de los distintos medios, así como las técnicas que concurren en su elaboración y en el mantenimiento de los cultivos, han sido debidamente expuestos en capítulos anteriores (véase apartados 2.1.2.3 , 2.2.6 y siguientes). Quedarán reflejadas en los apartados siguientes las observaciones diarias realizadas durante el desarrollo de los cultivos mediante microscopía invertida, que permite visualizar los especímenes en cultivo y evaluar su evolución morfoanatómica, su mayor o menor grado de actividad e incluso observar si ha habido o no ingestión de medio, así como percibir la aparición de contenido vitelino en glándulas vitelógenas. Todo ello permite una evaluación continuada del desarrollo de cada cultivo, que orienta sobre la conveniencia o no del mantenimiento del mismo, sobre la posibilidad de su interrupción o sobre la necesidad de llevar a cabo toma de muestras. Ahora bien, la evaluación definitiva de un medio de cultivo se realiza, principalmente, atendiendo a las características morfoanatómicas presentadas por especímenes procedentes del mismo que son sometidos a distintas pruebas, tales como tinción con aceto-orceína o coloración con Red Fast B Salt, que evidencian la evolución de testículos y glándulas vitelógenas respectivamente y a características morfométricas presentadas por los distintos especímenes tras su fijación, coloración y montaje definitivo. Todas las técnicas aquí enumeradas han sido ya descritas (véase apartados 2.2.6.6 y siguientes).

Rumina decollata

14 meses

Hospedador

Edad

Tinción

Aceto-orceína

Carmín de Grenacher

n=5

n=14

V.E.

V.E.

$\bar{x}$

$\bar{x}$

Long. corp.  
Anch. máx.  
Vent. oral  
Acetábulo  
Rel. VO/VV  
Faringe  
Test. I  
Test. II  
Ovario  
Dist. VO-VV  
Dist. VV-TI  
Superf. VO  
Superf. VV  
Sup. corp.  
VO-VV/Long.

1318-924,5	1139,6	1545,5-1091	1334,3
469-387,5	426,1	626,5-447,5	507
172,5-135/165-131,5	159,8/152,4	187,5-161,5/176,5-154	173,7/168,6
184-127,5/169-116,5	155,4/145,7	169-150/161,5-139	156,5/150,9
1,20-1,07	1,09	1,35-1,08	1,23
86,5-67,5/101,5-82,5	78,9/94,6	82,5-71,5/112,5-94	75,6/102,2
79-60/60-45	67,6/51,6	94-56,5/56,5-41,5	70,1/49,1
75-64/64-49	67,6/53,6	109-64/64-37,5	80/50,2
71,5-64/60-41,5	67,6/47,9	75-52,5/56,5-41,5	60,6/49,7
283,5-149	208,8	328-194	283,8
380-223,5	299,6	447,5-283,5	362,1
22343-13935	19248	25389-19946	23013
24410-11660	18050	21425-16337	18564
485241-248926	385693	715326-395672	531992
0,254-0,136	0,183	0,229-0,178	0,212

1  
5  
3  
5  
1

Tabla 5.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de metacercarias experimentales obtenidas en riñón de Rumina decollata; superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Edad	24 horas		48 horas		3 días	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	1545,5-1182	1371,3	1909-1363,5	1610,4	1977-1454,5	1787
Anch. máx.	611-387,5	466,7	522-417,5	466,6	537-380	479,1
Vent. oral	217,5-176,5/199-154	195,4/177,4	214-172,5/199-154	199,6/182,4	221,5-191,5/206,5-176,5	204,7/188,3
Acetábulo	184-150/187,5-146,5	169,1/163,6	187,5-169/184-150	179,1/169,6	191,5-180/184-161,5	185,4/177
Rel. VO/VV	1,40-1,11	1,26	1,53-0,96	1,20	1,28-1,03	1,77
Faringe	94-79/131,5-86,5	86,8/102,8	101,5-75/127,5-101,5	89,9/109,3	101,5-86,5/120-101,5	93,4/111,2
Test. I	116,5-79/105-56,5	93,2/75,1	146,5-79/116,5-79	116,7/91,6	199-124/154-97,5	156,9/126,3
Test. II	112,5-79/94-56,5	98,5/71,1	172,5-101,5/124-71,5	125,9/96,2	187,5-124/154-90	158,3/125,5
Ovario	90-64/75-45	75,1/61,9	116,5-79/101,5-60	94,6/78,4	139-86,5/116,5-71,5	121,5/102,5
Huevos						
Dist. VO-VV	358-209	285,2	432,5-253,5	326,1	402,5-298	351,1
Dist. VV-TI	462-268,5	371,8	566,5-358	450,3	626-358	519,2
Superf. VO	33976-23415	27283	33430-22885	28641	34041-26577	30294
Superf. VV	27082-17250	21794	27083-20312	23872	27660-23327	25771
Sup. corp.	720041-373467	505657	759772-446870	591926	804729-467734	540105
VO-VV/long.	0,240-0,177	0,209	0,226-0,177	0,202	0,238-0,166	0,198

536

Tabla 6 A) Brachylaima ruminae: evolución morfológica de adultos experimentales obtenidos en Mus musculus; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Edad	4 días		5 días		6 días	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	2227-1636	1869,8	2091-1591	1795,3	2045-1772,5	1948,7
Anch. máx.	573-466	491,1	552-462	500,1	596,5-477	531,1
Vent. oral	225-195/191,5-169	209/181,5	214-187,5/206-180	205,2/194,5	225-191/210-154	209,1/188,4
Acetábulo	191,5-169/101,5-169	182,4/177,8	187,5-172,5/180-165	182,1/173,7	206-180/184-169	190,7/177,2
Rel. VO/VV	1,32-0,97	1,17	1,41-1,12	1,26	1,29-0,91	1,17
Faringe	101,5-86,5/131,5-105	92,8/115,5	112,5-86/135-105	97/117,1	101-82,5/127,5-109	92,3/119,1
Test. I	236,5-127,5/187,5-124	170,5/145,5	232,5-142,5/195-131	185/156,9	266-131/236-112,5	173,4/126,4
Test. II	251,5-140/165-124	189,7/147,5	247,5-157,5/195-112,5	199,3/154,8	270-135/191-112,5	193,6/153,7
Ovario	169-127,5/139-112,5	147,8/127,3	176,5-124/154-101	159,2/137,2	191-135/180-116	162,3/143
Huevos	30-26,2/15-11,2 (n=3)	28,1/12,5	33,7-26,2/18,7-11,2	30,5/14,8	33,7-26,2/15-15	30,1/15
Dist. VO-VV	447,5-313	382	402,5-298	339,7	417,5-313	359,8
Dist. VV-TI	701-417,5	540,2	596,5-402,5	505,8	626-526	593,1
Superf. VO	32696-27395	29765	34017-26493	31440	35277-26293	30939
Superf. VV	31042-21869	25518	27082-22796	24845	29107-24374	26538
Sup. corp.	817745-609829	674790	832207-631855	705023	957576-68741	814905
VO-VV/Long.	0,226-0,182	0,204	0,211-0,168	0,190	0,209-0,164	0,185

Tabla 6 B) Brachylaima ruminae: evolución morfométrica de adultos experimentales obtenidos en Mus musculus (continuación); dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Edad	7 días		8 días		9 días	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	2454,5-1727	2085	2181,5-1591	1938	2181-1727	2012,1
Anch. máx.	730,5-447,5	576,2	581,5-447,5	495,2	566,5-417,5	500,2
Vent. oral	217,5-187,5/202,5-169	199,7/186,2	214-172,5/202,5-150	196,6/179,9	214-184/202,5-165	199,9/186,9
Acetábulo	206-169/187,5-161,5	187,1/174,5	206-180/187,5-169	190,9/174,5	202-169/187,5-157,5	186,2/171,5
Rel. VO/VV	1,26-1,04	1,14	1,20-0,80	1,07	1,30-1,02	1,17
Faringe	109-86,5/116,5-101,5	95,8/111,8	101-86/131-109	90,7/118,1	101-82,5/124-101	90,6/111,5
Test. I	240-135/232,5-120	203,1/182,5	247,5-161/232,5-124	208,7/179,5	255-139/225-135	209,7/183,7
Test. II	281,5-169/244-139	231,7/190,6	307,5-157,5/206-120	239,2/171,4	289-139/191-116	229,4/170,7
Ovario	199-135/169-116,5	169,4/142,8	221-146/184-131	180,7/146,9	206-142,5/150-120	178,3/140,4
Huevos	33,7-26,2/22,5-15	28,1/18,3	30-26,2/15-13,1	27,4/14,9	30-26,2/15-13,1	28,7/14,9
Dist. VO-VV	462-283,5	319,1	402,5-253,5	326,9	387,5-298	344,3
Dist. VV-TI	790-507	654,9	760,5-537	614,1	775,5-566,5	679
Superf. VO	33382-24874	29227	30886-20311	27863	34017-23832	29420
Superf. VV	29290-21689	25665	28701-23879	26151	29290-20894	25105
Sup. corp.	1350674-606673	959002	850645-614476	753258	905201-566002	747022
VO-VV/Long.	0,201-0,156	0,181	0,192-0,136	0,168	0,183-0,152	0,171

Tabla 6 C) Brachylaima ruminae: evolución morfométrica de adultos experimentales obtenidos en Mus musculus (continuación); dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Edad	12 días		15 días		18 días		21 días	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	2590,5-2181,5	2337,4	3045-2318	2602,5	2954,5-1909	2679,7	3863-2681,5	3088,4
Anch. máx.	692-462	553,7	596,5-477	526,9	641-432,5	558,5	633-432,5	536,7
Vent. oral	221,5-180/191,5-169	201,6/175,8	225-172,5/214-154	203,8/187,1	221,5-202,5/214-176	209,4/194,2	225-195/210-161,5	210,1/187,3
Acetábulo	206,5-169/191,5-169	192,4/181,2	210-187,5/199-154	194,7/182	210-180/202,5-157,5	198,2/185,4	225-187,5/202,5-165	203/186,7
Rel. VO/VV	1,21-0,92	1,01	1,32-0,92	1,07	1,29-0,99	1,11	1,24-0,81	1,04
Faringe	101,5-79/124-101,5	92,5/115,6	112,5-90/127,5-109	98,2/117,6	116,5-90/124-112,5	100,1/119,2	105-90/124-109	99,1/117,9
Test. I	281,5-225/247,5-214	254,5/233,1	352,5-229/274-191,5	270,4/240,4	289-161,5/266,5-124	254,2/228,2	330-240/262,5-210	271,2/237,1
Test. II	345-244/281,5-176,5	290,6/217,7	326,5-236,5/281,5-169	288,8/242,2	307,5-150/296,5-131,5	266,9/236,4	311,5-247,5/289-210	281,7/250,2
Ovario	225-187,5/172,5-150	198,1/158,9	221,5-176,5/172,5-139	207,9/156,7	206,5-112,5/191,5-101,5	185,1/155,5	214-157,5/184-131,5	188,7/158,3
Huevos	30-26,2/18,7-15	29,5/17,5	30-26,2/18,7-15	26,7/15,5	30-26,2/18,7-15	27,1/15,5	30-23,2/16,7-12,9	26,2/15,3
Dist. VO-VV	522-313	396,6	596,5-328	433,7	537-328	444,9	501,5-432,5	508,5
Dist. VW-TI	924,5-715,5	828,6	1386,5-939,5	1115,8	1193-671	1051,2	1640-1058,5	1315,1
Superf. VO	33297-22819	27876	37797-20853	30082	37209-26228	31704	37797-24721	30992
Superf. VV	30394-20701	26836	31568-25389	27968	33382-24603	28884	34441-26947	29783
Sup. corp.	1382494-816007	1019685	1318264-814284	1121264	1440870-648129	1131343	1582941-1003089	1292555
VO-VV/Long.	0,201-0,132	0,169	0,182-0,120	0,159	0,192-0,151	0,166	0,180-0,143	0,165

I  
5  
3  
0  
I

Tabla 6 D) Brachylaima ruminae: evolución morfométrica de adultos experimentales obtenidos en Mus musculus (continuación y fin); dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Siempre que dispongamos de material adecuado efectuaremos un estudio comparativo con metacerarias control y adultos control, que nos permitirá resaltar aquellos caracteres que han experimentado una evolución o bien una regresión.

### 5.3.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS

Hemos indicado anteriormente que consideramos monofásicos a aquellos medios de cultivo contituídos por una única fase, que en nuestro caso es líquida. Unicamente cabe destacar que se ha incorporado a algunos de estos medios líquidos, una pequeña cantidad de macerado tipo 1 y tipo 2. A pesar de esta circunstancia, y considerando que carecen de una fase sólida continua que pueda actuar como soporte de los vermes en cultivo, se ha optado por estudiarlos como monofásicos.

#### 5.3.1.1.- MEDIO A + MACERADO TIPO 1

##### 5.3.1.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio monofásico presenta una composición relativamente sencilla, siendo aquél en que la proporción de factores de crecimiento es menor respecto al medio químicamente definido que actúa como base y que es M 199. El medio A está constituido por M 199 con un 20% de suero bovino fetal (FCS), habiéndose adicionado 0,2 ml de macerado tipo 1 por cada 5 ml de medio A. Este macerado está integrado por suero bovino neonatal (NBBS) y solución salina Hanks. Hemos de indicar que el macerado fué añadido tras haber transcurrido 24 horas de cultivo.

##### 5.3.1.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Los cultivos son sometidos a observación diaria bajo un microscopio invertido que está situado en el interior de una pequeña cámara, cuya tempera-

tura se mantiene constante a 37 °C, evitando así cambios bruscos de temperatura a los cultivos.

Las metacercarias fueron inoculadas inicialmente en medio A sin macerado. Observadas tras las primeras 24 horas, se presentan vivas y activas, pudiendo observarse la presencia de medio ingerido en el interior de los ciegos intestinales de las mismas.

Transcurridas las primeras 24 horas de cultivo, se adiciona al medio A un 4% de macerado tipo 1. Las observaciones siguientes se llevan a cabo cada 24 horas y hasta el final del cultivo, que se prolonga por espacio de 23 días. Las metacercarias muestran una disminución paulatina de actividad a lo largo de los sucesivos días de cultivo, si bien un espécimen concreto presenta una notable actividad. El contenido de los ciegos intestinales es fácilmente distinguible, ya que se observa en su interior partículas sólidas de macerado. Este contenido es alto durante los primeros días de cultivo, pero disminuye paulatinamente a lo largo del mismo. A partir del día 7 de cultivo se constata la presencia de 3 especímenes probablemente muertos. A partir del día 9 aparece una cierta degeneración en algunos individuos, presentándose irregularidades en su tegumento.

A partir del día 13, la inactividad de todos los individuos es prácticamente total. No se observa, en ninguno de ellos, aparición de contenido vitelino en glándulas vitelógenas, ni desarrollo gonadal apreciable. El cultivo se da por finalizado a los 23 días de su inicio, pero no se fija ningún individuo, debido a su total inactividad que denuncia su muerte y a una elevada degeneración tegumentaria que impide la correcta fijación de los mismos, pues prácticamente se deshacen al intentar manipularlos.

Hemos de apuntar que las metacercarias cultivadas en este medio habían sido tratadas previamente con pepsina.

#### 5.3.1.2.- MEDIO B

Dada la composición de este medio, que exponemos a continuación, podemos considerarlo como control, en cuanto a los medios monofásicos se refiere.

#### 5.3.1.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio B presenta una composición muy sencilla, estando constituido por M 199 al que se ha adicionado un 60% de suero bovino fetal (FCS). En otras palabras, el único factor de crecimiento que presenta este medio es FCS, si bien podemos indicar que se encuentra en una proporción tres veces superior a aquella en que este factor entra en la composición del medio anteriormente estudiado (Medio A + macerado tipo 1).

#### 5.3.1.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

La observación del cultivo, transcurridas 24 horas desde su inicio, mediante microscopio invertido, nos muestra individuos en estado muy similar al indicado para el medio anteriormente estudiado, Medio A + macerado tipo 1. Las metacercarias se mantienen vivas y regularmente activas presentando medio ingerido en el interior de los ciegos intestinales, los cuales desarrollan movimientos de contracción continuos. Algunos vermes se encuentran fuertemente adheridos entre sí mediante sus ventosas.

Transcurridos 2 días de cultivo y tras observar que todos los vermes están vivos y muestran una aceptable actividad, se opta por extraerlos del medio de cultivo y practicar sobre ellos una tinción con aceto-orceína al objeto de establecer si se ha iniciado algún tipo de maduración en gónadas. Esta observación indicará la conveniencia de ensayar o no nuevos medios de cultivo más complejos, que potencien el inicio de una evolución en gónadas. La decisión adoptada implica la pérdida de un valioso material de cultivo, pero se hace necesaria, pues procura una información de capital importancia para la continuación de las experiencias.

#### 5.3.1.2.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

Los especímenes procedentes de medio B son sometidos, como se ha indicado en el apartado anterior, a tinción con aceto-orceína. Esta tinción se practica directamente sobre los vermes vivos sin someterlos a fijación pre-

via, siguiendo la técnica ya descrita en capítulos anteriores (véase apartado 2.2.6.7).

La observación al microscopio de las preparaciones extemporáneas obtenidas revela una total ausencia de inicio de maduración en gónadas. No se observa ningún tipo de organización en la cromatina nuclear de los espermatogonios ni tampoco en la cromatina nuclear de los oogonios. El material procedente de estas preparaciones extemporáneas es procesado cuidadosamente, tal y como se ha descrito con anterioridad (véase apartado 2.2.6.7), para conseguir preparaciones permanentes del mismo. Aunque la posterior observación microscópica de las mismas es algo dificultosa, puede proporcionarnos datos de interés sobre la morfoanatomía de los vermes. Estudiamos detalladamente dichos vermes, indicando aquellas características de interés.

#### A) TEGUMENTO

El tegumento aparece perfectamente conformado, no observándose alteraciones apreciables al microscopio óptico. Hemos de considerar, además, que los especímenes estudiados no han sido sometidos a fijación, por lo que si bien se aprecia en su tegumento una débil espinulación en algunos de ellos, no es observable en otros, siendo ésto imputable en muchos casos, no tanto a la ausencia de la misma, como a un posible deterioro debido a los procesos previos a que han sido sometidos estos individuos. Sin embargo, en ningún caso se observa la aparición de "burbujas" en el tegumento ni de alteraciones estructurales intrínsecas.

#### B) PARENQUIMA

El parénquima ofrece un aspecto normal, sin vacuolizaciones ni alteraciones apreciables en microscopía óptica. En algunos individuos, que han estado fuertemente adheridos entre sí mediante sus ventosas, se aprecia concavidades a manera de "mordiscos" situadas preferentemente en los bordes laterales del cuerpo. Exceptuando esta circunstancia, la apariencia del parénquima es absolutamente comparable a la del de metacercarias o adultos sometidos a tinción con aceto-orceína y montados posteriormente.

*C) VENTOSAS*

Los órganos de fijación presentan unas características idénticas a las propias de vermes obtenidos en animales de experimentación. El mantenimiento de su poder de fijación queda de manifiesto cuando se observa la fuerte adherencia que ejercen sobre el cuerpo de otros individuos, llegando incluso a abrir orificios en sus parénquimas.

*D) APARATO DIGESTIVO*

Los órganos más característicos del aparato digestivo, como son la faringe y los ciegos intestinales, se presentan perfectamente conformados. La faringe mantiene su conformación característica, no observándose irregularidades o alteraciones en su musculatura. Los ciegos intestinales no presentan una dilatación excesiva, ni alteraciones en su conformación apreciables en microscopía óptica, extendiéndose a lo largo de todo el cuerpo del verme.

*E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO*

Si bien la observación microscópica de preparaciones permanentes obtenidas a partir de vermes teñidos con aceto-orceína presenta considerables dificultades, podemos indicar que los testículos no han sufrido degeneración alguna, no presentando ningún tipo de vacuolización o anomalía. El contenido testicular es continuo, con límites perfectamente definidos y su aspecto es comparable al presentado por los testículos de metacercarias o de adultos control. La bolsa del cirro no ha sufrido degeneración aparente. Los conductos eferentes no son observables.

*F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

El ovario presenta las características morfológicas propias del verme, siendo su contenido continuo y no advirtiéndose signos de degeneración. Las glándulas vitelógenas son de aspecto similar a las propias de las metacerca-

rias, no observándose en las mismas desarrollo folicular ni presencia de contenido vitelino, tanto en ellas como en los viteloductos. El útero se extiende normalmente, alcanzando la bifurcación de los ciegos intestinales, sin mostrar alteraciones en su morfología, ni presentar indicios de ningún tipo de contenido uterino.

#### 5.3.1.2.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

Establecemos en este apartado un estudio comparativo entre los individuos procedentes del medio B, que han estado sometidos a cultivo durante 2 días, y las metacercarias que hemos denominado control, es decir, metacercarias procedentes del caracol segundo hospedador intermediario. Asimismo, estudiaremos aquellos individuos teniendo en cuenta las características que presentan los especímenes de igual edad, 48 horas, obtenidos experimentalmente mediante infestación del hospedador definitivo en el Laboratorio.

Basamos nuestro estudio, fundamentalmente, en medidas morfométricas realizadas sobre el material procedente de cultivo, que quedan expuestas en la Tabla 7 y que relacionamos o comparamos con las correspondientes mediciones efectuadas sobre las metacercarias control y sobre los adultos de 48 horas obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos (véase Tablas 5 y 6 A respectivamente).

#### A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL

Teniendo en cuenta que los individuos procedentes de cultivo han sido sometidos a tinción con aceto-orceína para ser observados en preparaciones extemporáneas, a partir de las cuales se ha confeccionado las preparaciones permanentes sobre las que se ha llevado a cabo las medidas, consideramos oportuno efectuar el estudio morfométrico comparativo de estos individuos respecto a las metacercarias control que han sido procesadas de igual modo, es decir, sometidas a tinción con aceto-orceína. Desechamos en este caso, la comparación con las metacercarias de referencia teñidas con Carmín Borácico de Grenacher por considerar más adecuado efectuar el estudio comparativo entre individuos sometidos a iguales procesos y tinciones.

Medio de cultivo	Medio B	
	2 días	
	Aceto-orceina n=5	
Tiempo de cultivo	V.E.	$\bar{x}$
Tinción		
Long. corp.	1636-1103,5	1326,1
Anch. máx.	591-373	500,2
Vent. oral	199-131,5/191,5-131,5	169,7/162,9
Acetábulo	195-124/191,5-112,5	160,7/153,8
Rel. VO/VV	1,30-0,98	1,14
Faringe	101,5-82,5/124-82,5	92,7/102,1
Test. I	79-45/ 75-37,5	60,2/53,4
Test. II	86,5-45/82,5-41,5	60,9/53,3
Ovario	64-41,5/60-37,5	53,4/48,8
Huevos	-	-
Dist. VO-VV	373-179	259,5
Dist. VV-TI	492-298	375,7
Superf. VO	29915-13574	22166
Superf. VV	29313-10950	20062
Sup. corp.	717011-327502	529604
VO-VV/Long.	0,228-0,158	0,193

Tabla 7.- Brachylaima ruminiae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Medio B durante 2 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
	Edad 14 meses		Tiempo 2 días		Edad 2 días
Medio B	Aceto orceina		Aceto orceina		Carmin de Grenacher
	n=5		n=5		n=15
Long. corp.	1139,6	<	1326,1	<	1610,4
Anch. máx.	426,1	<	500,2	>	466,6
∅ máx. VO	159,8	<	169,7	<	199,6
∅ mín. VO	152,4	<	162,9	<	182,4
∅ máx. VV	155,4	<	160,7	<	179,1
∅ mín. VV	145,7	<	153,8	<	169,6
Rel. VO/VV	1,09	<	1,14	<	1,20
Long. faringe	78,9	<	92,7.	>	89,9
Anch. faringe	94,6	<	102,1	<	109,3
∅ máx. test. I	67,6	>	60,2	<	116,7
∅ mín. test. I	51,6	<	53,4	<	91,6
∅ máx. test. II	67,6	>	60,9	<	125,9
∅ mín. test. II	53,6	>	53,3	<	96,2
∅ máx. ovario	67,6	>	53,4	<	94,6
∅ mín. ovario	47,9	<	48,8	<	78,4
Dist. VO-VV	208,8	<	326,5	>	259,5
Dist. VV-TI	299,6	<	375,7	>	450,3
Superf. corp.	385694	<	529605	<	591926

Tabla 8.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Medio B durante 2 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

Así, los datos expuestos en la Tabla 7 referidos a los especímenes sometidos a cultivo durante 2 días son comparados con los expuestos en la Tabla 5 referidos a metacercarias control. A partir de los datos antedichos confeccionamos la Tabla 8 en la que exponemos los valores medios de las medidas tomadas sobre los vermes cultivados y sobre las metacercarias control, expresando en dicha Tabla las relaciones de superioridad o inferioridad existentes entre ellas.

#### *B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

En el estudio morfométrico comparativo de los especímenes cultivados en Medio B durante 2 días, respecto a individuos de esta misma edad obtenidos en los hospedadores definitivos, hemos de emplear individuos control teñidos con Carmin Borácico de Grenacher, por no disponer de vermes de referencia sometidos a tinción con aceto-orceína, siendo esta tinción la que presentan los vermes cultivados en estudio. No obstante esta circunstancia, podemos efectuar un estudio morfométrico que nos proporciona datos de gran importancia para la evaluación del medio de cultivo en estudio.

La Tabla 7 expone los datos morfométricos tomados sobre los vermes sometidos a cultivo durante 2 días y la Tabla 6 A presenta las medidas correspondientes a los individuos de referencia. A partir de los valores medios respectivos confeccionamos la Tabla 8 en la que comparamos dichos valores, expresando en ella las relaciones de superioridad o inferioridad que se deduce.

#### 5.3.1.3.- MEDIO B + MACERADO TIPO 2

##### 5.3.1.3.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio monofásico es aquél que presenta una mayor proporción de factores de crecimiento dentro de los medios de este grupo. Está constituido fundamentalmente por M 199 con 60% FCS, habiéndose añadido a esta fase líquida una pequeña cantidad de un macerado en cuya composición se incluye suero bovino neonatal (NBBS), extracto de embrión bovino (BEE<sub>50</sub>) y solución sa-

lina Hanks. Presenta un factor de crecimiento no utilizado hasta el momento en los anteriores medios monofásicos de que hemos tratado, siendo éste el extracto de embrión bovino que está presente en el macerado. Se trata, pues, del medio monofásico ensayado que presenta el mayor número de factores de crecimiento diferentes y aquél en el que estos factores están en mayor proporción. Dicho macerado fué añadido a los medios de cultivo transcurridas 24 horas desde el inicio de los ensayos.

#### 5.3.1.3.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

La observación diaria de los cultivos utilizando un microscopio invertido e iniciada 24 horas después de iniciados los ensayos, nos sitúa ante especímenes vivos todos ellos y muy activos, mostrando movimientos de contracción y relajación corporales casi continuos. Asimismo, se observa movimientos muy bruscos de contracción y relajación de los ciegos intestinales. Algunos individuos se presentan fuertemente adheridos a otros mediante sus ventosas.

La observación realizada una vez transcurridas 48 horas desde el inicio del cultivo, nos muestra vermes muy activos, siendo semejante su grado de actividad al mostrado en la observación anterior. Todos los vermes se mantienen vivos y presentan partículas de macerado en el interior de sus ciegos intestinales, indicando este hecho que han ingerido activamente dichas partículas procedentes del medio de cultivo.

En observaciones posteriores llevadas a cabo cada 24 horas y durante los 23 días a lo largo de los cuales se desarrolla el cultivo, los vermes presentan una sensible disminución de su actividad. Asimismo, el contenido de los ciegos intestinales va siendo paulatinamente más escaso, no observándose contracciones de los mismos. No obstante, los vermes se mantienen vivos, manifestándose este hecho por una ligera actividad corporal que permanece hasta el término del cultivo, acompañada por movimientos perceptibles de los ciegos intestinales, si bien dichos movimientos son muy suaves y no muestran el carácter brusco que presentaban en las observaciones realizadas durante los primeros días de cultivo. No se aprecia ningún tipo de desarrollo gonadal, pero en la observación realizada el día 17 de cultivo aparece, en un individuo, contenido vitelino en el interior de las glándulas vitelógenas, las cuales

adquieren una coloración parda perfectamente visible mediante microscopio invertido.

#### 5.3.1.3.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

Transcurridos 23 días de cultivo, los vermes procedentes de Medio B + macerado tipo 2 son sometidos a tinción con aceto-orceína y observados extemporáneamente al microscopio, tras lo cual se confecciona, con este material, preparaciones permanentes. La observación microscópica de preparaciones extemporáneas nos sitúa ante individuos que no presentan ningún tipo de maduración en gónadas. No se observa organización en la cromatina nuclear de los espermatogonios, ni en la cromatina nuclear de los oogonios. El aspecto que ofrecen las gónadas de estos vermes es muy similar al presentado por las gónadas de las metacercarias procedentes del caracol segundo hospedador intermediario y sometidas a tratamiento con aceto-orceína. La observación de las preparaciones permanentes de vermes cultivados durante 23 días en el medio en estudio nos permite apreciar, aunque con dificultad, las características morfoanatómicas que exponemos a continuación.

#### A) TEGUMENTO

El tegumento, observado al microscopio óptico, mantiene una espinulación muy débil, visible preferentemente en el extremo anterior del verme y comparable a la exhibida por el tegumento de las metacercarias procedentes del segundo hospedador intermediario, pero en modo alguno se observa las fuertes y bien diferenciadas espinas presentes en los vermes de 21 días de edad obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos. Por otra parte, el tegumento presenta, en algunos individuos, alteraciones a manera de "burbujas" en algunos lugares, donde, sin dejar de ser continuo, delimita un pequeño espacio vacuolizado.

### B) PARENQUIMA

El parénquima se manifiesta profundamente alterado, mostrando un aspecto totalmente diferente del presentado por las metacercarias procedentes del caracol segundo hospedador intermediario teñidas con aceto-orceína. En estas metacercarias se observa un parénquima continuo y uniforme en el que las células parenquimáticas se evidencian perfectamente con la aceto-orceína, apareciendo bien individualizadas y siendo observables sin dificultad. Por el contrario, en el parénquima de los vermes procedentes de medio de cultivo en estudio no son diferenciables las células parenquimáticas, siendo su aspecto muy poco definido e incluso se aprecia, en la mayoría de individuos, zonas vacuolizadas o discontinuas. Estas apreciaciones parecen indicar que han tenido lugar profundas alteraciones en el parénquima, si bien no han llegado a ocasionar la muerte de los vermes, pues todos ellos se mantenían vivos al dar por finalizado el cultivo.

### C) VENTOSAS

La ventosa oral presenta, en todos los individuos, un aspecto, observada al microscopio óptico, comparable al presentado por la ventosa oral de las metacercarias control teñidas con aceto-orceína. Sus límites son bien definidos y no se observa irregularidades de ningún tipo. El acetábulo es, asimismo, normal en todos los individuos, exceptuando un único verme en que la ventosa ventral aparece degenerada, no siendo observables sus límites externos. En los restantes individuos es perfectamente observable su musculatura estriada radialmente.

### D) APARATO DIGESTIVO

La faringe no muestra ningún tipo de degeneración o alteración apreciables mediante observación microscópica. Su configuración es comparable a la de las metacercarias control, con límites bien definidos. Los ciegos intestinales no quedan bien evidenciados mediante tinción con aceto-orceína. No obstante, podemos indicar que su longitud y características morfológicas los ha-

cen muy similares a los que presentan las metacercarias control. Se observa en su interior partículas de macerado ingerido durante el cultivo, si bien el contenido de los ciegos intestinales disminuye paulatinamente durante el transcurso del mismo.

#### *E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO*

Los testículos aparecen considerablemente degenerados, no observándose en ellos ningún tipo de maduración. Estas gónadas presentan un tamaño muy reducido si las comparamos con las gónadas de individuos obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos. Su aspecto se aproxima más al correspondiente a las gónadas de las metacercarias control que al propio de individuos de 23 días de edad, presentando un contenido testicular retraído. Sus límites se presentan difusos y poco definidos. No son funcionales pues no se ha observado esperma mediante tinción con aceto-orceína. Los conductos eferentes no son perceptibles, pero sí lo es la bolsa del cirro, que muestra un aspecto aparentemente normal, si bien su tamaño es reducido y no corresponde al tamaño propio de vermes adultos de 23 días de edad.

#### *F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

El ovario se presenta degenerado con un tamaño y un aspecto impropios de vermes que habrían de ser adultos tras 23 días de cultivo. El contenido ovárico no aparece bien definido mediante tinción con aceto-orceína, pero podríamos indicar que se presenta alterado. Las glándulas vitelógenas han experimentado una evolución considerable, pues se ha observado, como ya se ha indicado, contenido vitelino en su interior en vermes en cultivo. En estos mismos vermes, tras tinción con aceto-orceína, podemos observar que las glándulas vitelógenas son mucho más aparentes que en las metacercarias control, extendiéndose desde un nivel acetabular hasta el borde anterior del primer testículo. El contenido vitelino, si bien es perceptible con toda exactitud, no es muy abundante y no corresponde al contenido vitelino presentado por individuos adultos sexualmente maduros. Ahora bien, este hecho indica que ha ocurrido una evolución en los vermes en cultivo, los cuales han sido capaces

de sintetizar la sustancia vitelina propia de las glándulas vitelógenas. En un verme se observa contenido vitelino en los viteloductos, pero en ningún caso se aprecia dicho contenido en el reservorio vitelino.

El útero presenta un recorrido muy similar al mostrado por dicho órgano en las metacercarias control. No se observa alteraciones morfológicas, pero sí podemos destacar que los límites del tubo uterino son muy difusos y no destacan las células parenquimáticas que los rodean. No se visualiza ningún tipo de contenido uterino.

#### 5.3.1.3.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

Comparamos, en este apartado, los vermes procedentes del Medio B + macedado tipo 2 que han estado sometidos a cultivo durante 23 días con las metacercarias control, tanto aquellas sometidas a tinción con Carmín Borácico de Grenacher, como, y principalmente, con las metacercarias control sometidas a tinción con aceto-orceína. Son estas últimas quienes nos proporcionan datos más estrictamente comparables con los vermes procedentes de cultivo, por haber sido sometidas a las mismas manipulaciones que han sufrido dichos vermes, es decir, tinción con aceto-orceína. Asimismo, empleamos en nuestro estudio comparativo los adultos de referencia de una edad de 21 días, que es la más próxima a la de los vermes cultivados, estando dichos adultos control, teñidos con Carmín Borácico de Grenacher.

Las medidas morfométricas que constituyen el fundamento del estudio comparativo quedan expuestas, por lo que se refiere a los individuos procedentes de cultivo, en la Tabla 9. La Tabla 5 refleja las mediciones llevadas a cabo sobre metacercarias control teñidas con Carmín Borácico de Grenacher, y también en esta Tabla 5 exponemos las medidas correspondientes a metacercarias de referencia teñidas con aceto-orceína. Las medidas de los individuos adultos de 21 días de edad procedentes del hospedador definitivo son indicadas en la Tabla 6 D.

*A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL*

El estudio morfométrico comparativo entre los individuos cultivados durante 23 días y las metacercarias control nos lleva a comparar los datos expuestos en la Tabla 9 referidos a los individuos procedentes de cultivo con los expresados en la Tabla 5 referentes a las metacercarias control. A partir de estos datos confeccionamos la Tabla 10 , donde establecemos un análisis comparativo de los mismos.

*B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

El estudio morfométrico comparativo de los individuos cultivados durante 23 días con los adultos control de 21 días de edad, obtenidos en los hospedadores definitivos y cuyas medidas son expresadas en la Tablas 9 y 6 D respectivamente, nos conduce a comparar los valores medios de dichas medidas para lo cual presentamos la Tabla 10 .

5.3.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS

Como hemos expuesto anteriormente, los medios bifásicos ensayados por nosotros presentan dos fases bien diferenciadas: una fase sólida y una fase líquida. La fase sólida es común a todos los medios bifásicos estudiados y está constituida por un factor de crecimiento, suero bovino neonatal (NBBS) coagulado. Las técnicas utilizadas en la preparación de esta fase sólida han sido ya descritas en capítulos anteriores (véase apartado 2.2.6.1.4 B)). Por lo que se refiere a la fase líquida, hemos ensayado cinco tipos distintos que presentan diversas modificaciones en su composición. Tres de estas fases líquidas presentan en su composición el medio químicamente definido denominado M 199 al que se ha adicionado, en un caso, un 20% de suero bovino fetal (FCS), en tanto que en las dos fases líquidas restantes este factor de crecimiento está en una proporción del 60% respecto al medio M 199. En estos dos últimos casos las fases líquidas presentan, además, una pequeña cantidad (aproximadamente 4%) de macerado que, en una de ellas es de tipo 1, en tanto que en la otra es de tipo 2. Las dos fases líquidas restantes presentan el medio quími-

Medio de cultivo	Medio B + macerado tipo 2	
	23 días	
	Aceto-orceina	
Tiempo de cultivo	n=3	
Tinción	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	1073,5-954	1018,8
Anch. máx.	387-328	362,5
Vent. oral	157,5-146,5/139-124	152,6/134
Acetábulo	150-146,5/150-142,5	148,3/146,3
Rel. VO/VV	0,95-0,87	0,91
Faringe	79-67,5/94-82,5	73,8/87,6
Test. I	49-45/45-34	46,3/ 38,8
Test. II	52,5-41,5/30-26,5	46,2/28,8
Ovario	52,5-49/41,5-37,5	51,3/47,7
Huevos	-	-
Dist. VO-VV	223,5-164	193,7
Dist. VV-TI	313-232,5	272,7
Superf. VO	16804-14260	15532
Superf. VV	17663-16388	17025
Sup. corp.	313905-289820	301862
VO-VV/Long.	0,208-0,172	0,190

Tabla 9.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Medio B + macerado tipo 2 durante 23 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses		Tiempo 23 días		Edad 21 días
	Aceto orceina		Aceto orceina		Carmín de Grenacher
	n=5		n=3		n=10
Long. corp.	1139,6	>	1018,8	<	3088,4
Anch. máx.	426,1	>	362,5	<	536,7
∅ máx. VO	159,8	>	152,6	<	210,1
∅ mín. VO	152,4	>	134,0	<	187,3
∅ máx. VV	155,4	>	148,2	<	203,0
∅ mín. VV	145,7	<	146,2	<	186,7
Rel. VO/VV	1,09	>	0,91	<	1,04
Long. faringe	78,9	>	73,8	<	99,1
Anch. faringe	94,6	>	87,6	<	117,9
∅ máx. test. I	67,6	>	46,3	<	271,2
∅ mín. test. I	51,6	>	38,8	<	237,1
∅ máx. test. II	67,6	>	46,2	<	281,7
∅ mín. test. II	53,6	>	28,8	<	250,2
∅ máx. ovario	67,6	>	51,3	<	188,7
∅ mín. ovario	47,9	>	47,7	<	158,3
Dist. VO-VV	208,8	>	193,7	<	508,5
Dist. VV-TI	299,6	>	272,7	<	1315,1
Superf. corp.	385694	>	301862	<	1292555

Tabla 10.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Medio B + macerado tipo 2 durante 23 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

camente definido denominado CMRL 1066, adicionándose, en un caso, un 60% de suero bovino fetal y macerado tipo 2, en tanto que la otra fase presenta un 20% de suero bovino fetal y macerado tipo 1. Las técnicas de preparación de las fases líquidas, así como de los macerados ensayados, han quedado descritas anteriormente (véase apartados 2.2.6.1.4 A) y B)).

#### 5.3.2.1.- FASE SOLIDA + MEDIO A

##### 5.3.2.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Todos los medios bifásicos ensayados, incluido el medio aquí estudiado, presentan como fase sólida suero bovino neonatal coagulado. La fase líquida propia de este medio presenta, en su composición, el medio químicamente definido M 199 al que se ha adicionado suero bovino fetal en una proporción de 20% respecto al medio M 199. Como consecuencia, el medio bifásico resultante únicamente contiene dos factores de crecimiento, suero bovino neonatal y suero bovino fetal. Estos dos factores se encuentran en una proporción inferior a aquella en que entran a formar parte de los restantes medios estudiados, por lo que este medio, que estudiamos en los apartados siguientes, es el más sencillo de los medios bifásicos ensayados. Únicamente cabe destacar que su composición es igual a la presentada por el medio que estudiaremos a continuación (Fase sólida + Medio B), difiriendo únicamente en la proporción en que el suero bovino fetal es adicionado al medio M 199, proporción que es tres veces inferior en el medio constituido por fase sólida + Medio A que en el integrado por fase sólida + Medio B.

Hemos de indicar que el cultivo en el medio constituido por fase sólida + Medio A se inicia en Medio A únicamente y transcurridas 24 horas se transfiere tanto el medio como los individuos en cultivo sobre un sustrato o fase sólida constituido por NBBS, por lo que, si bien el cultivo se inicia en un medio monofásico, transcurre posteriormente en un medio bifásico.

#### 5.3.2.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Los individuos cultivados en el medio constutuido por fase sólida + Medio A lo son por espacio de 23 días. Se lleva a cabo observaciones de los vermes en cultivo mediante un microscopio invertido, cada 24 horas.

La primera observación realizada tras 24 horas de cultivo, nos presenta individuos vivos, muy activos, mostrando frecuentes contracciones corporales, así como de las ventosas. Se observa una cierta tendencia de los vermes a permanecer fuertemente adheridos entre sí mediante sus ventosas. Transcurridos 2 días de cultivo, se observa algún individuo adherido a la fase sólida del medio, en tanto que la mayor parte de ellos se mantienen fuertemente adheridos entre sí. Todos los vermes están vivos y presentan un nivel aceptable de actividad. Esta situación se modifica ligeramente cuando han transcurrido 6 días desde el inicio del cultivo, observándose en este momento una cierta disminución en la actividad de los vermes, que siguen firmemente unidos entre sí y presentan un contenido intestinal reducido.

La observación de los cultivos en el día 8 del mismo nos presenta un individuo degenerado y el resto vivos, pero con su actividad disminuída y manteniéndose adheridos entre sí. 24 horas después aparecen varios individuos degenerados y el resto poco activos, no observándose en ellos ningún desarrollo de las gónadas. Esta situación permanece durante los siguientes días de cultivo, a lo largo de los cuales se observa un número creciente de individuos degenerados, inmóviles, replegados sobre sí mismos y que adquieren una tonalidad oscura.

La observación realizada cuando han transcurrido 16 días de cultivo nos muestra un único individuo que parece presentar una pequeña cantidad de sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas, en tanto que el resto de los vermes están degenerados, inmóviles y aparentemente muertos. Transcurridos 23 días desde el inicio de los cultivos, todos los vermes aparecen degenerados, inmóviles, con ciegos intestinales anormalmente dilatados algunos de ellos, y han adquirido un color oscuro o bien presentan manchas oscuras. No se conserva ningún espécimen pues, al intentar fijarlos, prácticamente se deshacen.

#### 5.3.2.2.- FASE SOLIDA + MEDIO B

##### 5.3.2.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio bifásico presenta la fase sólida común a todos ellos, estando constituida por suero bovino neonatal coagulado. La fase líquida tiene una composición muy sencilla, estando integrada por M 199 como medio químicamente definido, al que se ha adicionado suero bovino fetal en una proporción de 60% respecto al medio M 199. Así, los factores de crecimiento presentes en este medio bifásico son únicamente suero bovino neonatal y suero bovino fetal. Esto hace que pueda ser considerado como medio control respecto al conjunto de medios bifásicos ensayados, si bien hemos de considerar que el suero bovino fetal se encuentra aquí en una proporción muy superior a aquella en que este mismo factor entra a formar parte del medio anteriormente estudiado, constituido por fase sólida + Medio A (véase apartado 5.3.2.1).

##### 5.3.2.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

El cultivo en el medio en estudio, se desarrolla durante el transcurso de 20 días. Las observaciones llevadas a cabo cada 24 horas, mediante un microscopio invertido nos presentan, durante los cuatro primeros días de cultivo, individuos con gran actividad que efectúan continuas y bruscas contracciones corporales. Se observa, asimismo, un movimiento continuo, tanto en la ventosa oral como en el acetábulo, pero ningún verme se encuentra adherido al sustrato sólido. Por el contrario, como ya hemos indicado en el caso de otros medios, observamos la presencia de grupos de individuos fuertemente adheridos entre sí. Los ciegos intestinales presentan un alto contenido de medio ingerido en su interior, fácilmente apreciable debido a que las contracciones de la musculatura de los ciegos provocan rápidos desplazamientos del contenido intestinal, siendo esta actividad intestinal muy considerable.

A partir del quinto día de cultivo, la actividad de los vermes va disminuyendo paulatinamente, observándose una disminución de los movimientos

corporales de los individuos, así como también una disminución en el contenido de los ciegos intestinales y en su actividad muscular.

Transcurridos 11 días de cultivo, se observa la aparición de contenido vitelino en el interior de las glándulas vitelógenas en tres individuos. El día 15 de cultivo, son ya seis los individuos que presentan contenido vitelino en sus glándulas vitelógenas. Tras 19 días de cultivo, se observa contenido vitelino en el reservorio vitelino y en el inicio del útero en dos individuos. No obstante estos hechos, que parecen indicar una evolución de los vermes en cultivo, se observa también la presencia de vermes que sufren una degeneración paulatina a lo largo del cultivo, presentándose totalmente inactivos, muy frecuentemente replegados sobre sí mismos e incluso adquieren una coloración negruzca.

#### 5.3.2.2.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

Transcurridos 20 días desde el inicio del cultivo en este medio se da por finalizado el mismo y se procede a la extracción de los vermes. Antes de proceder a su fijación para posterior tinción, los vermes son lavados en solución Hanks y situados entre portaobjetos y cubreobjetos para ser observados al microscopio in vivo. En un individuo se consigue visualizar muy distintamente el receptáculo seminal situado por encima del segundo testículo y entre éste y el ovario, presentándose en su interior una gran cantidad de espermatozoides en continuo movimiento. Este hecho indica que ha habido una evolución en los testículos, los cuales se revelan como funcionales. Asimismo, es perfectamente observable el abundante contenido vitelino de las glándulas vitelógenas, el cual llena por completo el reservorio vitelino y es apreciable, también, en los viteloductos y en el inicio del útero. Sin embargo, no se observa en absoluto presencia de huevos en el útero. En los restantes vermes, observados de igual modo in vivo, no se identifica el receptáculo seminal, aunque, en todos ellos, se observa abundante contenido vitelino en las glándulas vitelógenas, en el reservorio vitelino e incluso en el inicio del útero. Los vermes, observados in vivo, se manifiestan muy activos, presentando movimientos continuos de la musculatura corporal, así como de los ciegos intestinales y gónadas, siendo observable incluso la vesícula excretora que presenta movimientos de contracción continuos y los cilios vi-

brátiles de los canales colectores del aparato excretor en continuo movimiento.

Estos individuos que inicialmente son observados in vivo, son posteriormente fijados y teñidos, en primer lugar con Red Fast B Salt y, posteriormente con Carmín de Gower para ser observados al microscopio. Las técnicas de fijación y tinción utilizadas han sido ya descritas (véase apartado 2.2.6.7 ). Su estudio microscópico revela las características morfoanatómicas que indicamos a continuación.

#### A) TEGUMENTO

El tegumento aparece perfectamente conformado en todos los individuos, presentándose continuo y exento de vacuolizaciones u otras alteraciones intrínsecas apreciables al microscopio óptico. A pesar de haber estado sometidos los vermes a observación in vivo y a posterior fijación seguida de dos tinciones sucesivas, el tegumento no ha sufrido alteraciones aparentes. El tegumento presenta una espinulación muy fuerte y perfectamente visible, extendiéndose las espinas desde el extremo anterior del verme hasta nivel acetabular aproximadamente. Las espinas son perfectamente comparables a las presentes en el tegumento de vermes adultos de 21 días de edad obtenidos experimentalmente en el hospedador definitivo, siendo mucho más grandes y fuertes que las espinas presentes en el tegumento de las metacercarias control. Este hecho parece indicar que ha ocurrido una evolución en el tegumento de los individuos cultivados en el medio de cultivo bifásico en estudio, el cual ha adquirido las características morfológicas que se observan en los individuos adultos.

#### B) PARENQUIMA

Los individuos cultivados durante 20 días presentan un parénquima aparentemente normal. No se observa en él ningún tipo de vacuolizaciones ni alteraciones estructurales apreciables en microscopía óptica y su aspecto es comparable al que ofrece el parénquima de individuos adultos control teñidos con Carmín Borácico de Grenacher y al presentado por las metacerca-

rias de referencia, sometidas a la misma tinción.

### C) VENTOSAS

La ventosa oral se muestra morfológicamente muy similar a la propia de individuos de 21 días obtenidos en animales de experimentación. Presenta unos límites muy bien definidos y se aprecia bien su musculatura estriada radialmente. La ventosa ventral se presenta también bien definida y muy evidente, con límites precisos y una musculatura radial muy manifiesta. Su poder de fijación queda manifestado por la fuerte adherencia que algunos individuos ejercen sobre otros.

### D) APARATO DIGESTIVO

La faringe ofrece unas características morfológicas que son las propias que dicho órgano presenta en los individuos control. Su forma es igual a la de la faringe de las metacercarias de referencia y de los adultos control, presentando límites precisos y paredes musculosas muy evidentes. Los ciegos intestinales de los individuos precedentes de cultivo, tras su bifurcación, se extienden paralelamente a los bordes corporales hasta el final del cuerpo, tal y como ocurre en los adultos control. Las paredes de los ciegos intestinales presentan un aspecto perfectamente comparable al ofrecido por las de los adultos de referencia y sabemos que su musculatura es funcional por las observaciones in vivo realizadas previamente a la fijación y tinción del material procedente de cultivo.

### E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Los testículos aparecen muy reducidos si son comparados con los presentados por los individuos adultos tomados como control. No obstante, las observaciones llevadas a cabo in vivo nos mostraron un espécimen con abundantes espermatozoides en el receptáculo seminal, como hemos indicado anteriormente, por lo que, por lo menos en dicho individuo, los testículos son

funcionales. En material precedente de cultivo, los testículos muestran límites poco definidos. Respecto al contenido testicular, hemos de indicar que, dado que este material de cultivo no se ha observado mediante tinción con aceto-orceína sino sobre ejemplares fijados y teñidos con Red Fast B Salt y con Carmín de Gower, el aspecto del mismo no proporciona datos de interés sobre su funcionamiento, por lo que hemos de remitirnos a la información obtenida en observaciones llevadas a cabo sobre material in vivo, a las que ya nos hemos referido.

Los conductos eferentes no son visibles en los especímenes estudiados. La bolsa del cirro no presenta ninguna degeneración morfológica aparente y el poro genital se abre a nivel anterior del primer testículo.

#### *F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

El ovario de los especímenes precedentes de cultivo presenta un contenido uniforme y continuo sin mostrar, morfológicamente, indicio alguno de haber sufrido una degeneración, aunque su tamaño es reducido si se compara con los individuos de referencia de 21 días de edad obtenidos en los hospedadores definitivos, siendo más próximo al propio de las metacercarias control. Los límites de ovario no se presentan perfectamente definidos. Las glándulas vitelógenas, como ya se indicó en las observaciones realizadas durante el transcurso del cultivo, se revelan funcionales, presentando un alto contenido de sustancia vitelina, la cual es puesta en evidencia mediante la tinción con Red Fast B Salt practicada sobre estos individuos. Este contenido vitelino es relativamente abundante aunque no llega a ser comparable al presentado por los adultos control de 21 días. La tinción con Red Fast B Salt evidencia, asimismo, la presencia de un abundante contenido vitelino en el reservorio vitelino que se extiende incluso al inicio del útero. El útero presenta un recorrido similar al mostrado por dicho órgano en las metacercarias de referencia, no observándose un aumento en sus circunvoluciones y, por tanto en su longitud total. Los límites del tubo uterino son satisfactoriamente apreciables.

#### 5.3.2.2.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

Los vermes cultivados en el medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B durante un período de tiempo de 20 días son estudiados morfológicamente y son comparados con las metacercarias de referencia. Teniendo en cuenta que el estudio morfológico de los vermes cultivados se realiza sobre material previamente fijado y teñido con Red Fast B Salt y con Carmin de Gower, consideramos procedente realizar el estudio comparativo con metacercarias control fijadas y teñidas con Carmin Borácico de Grenacher, pues las manipulaciones previas que han sufrido ambos tipos de individuos están más próximas entre sí que de aquellas necesarias para llevar a cabo un estudio con aceto-orceína, el cual fué practicado en otras metacercarias de referencia. Los adultos control que serán empleados en el estudio comparativo con los vermes cultivados son individuos de 18 días de edad obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos.

Las mediciones correspondientes a los individuos procedentes de cultivo quedan expuestas en la Tabla 11. Las medidas tomadas sobre metacercarias control son indicadas en la Tabla 5, en tanto que las referentes a individuos adultos de referencia lo son en la Tabla 6 D.

##### *A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL*

Este estudio nos lleva a comparar las medidas referentes a los vermes cultivados durante 20 días, expuestas en la Tabla 11 con las tomadas sobre metacercarias control, indicadas en la Tabla 5. Los valores medios de dichas medidas correspondientes a ambos grupos de vermes son expuestos en la Tabla 12, indicando en ella las relaciones de inferioridad o superioridad existentes entre los mismos.

##### *B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

Llevamos a cabo este estudio comparando los datos morfológicos correspondientes a los vermes cultivados durante 20 días, y expuestos en la Tabla 11, con los referentes a los adultos control, indicados en la Tabla 6 D.

Medio de cultivo	Fase sólida + Medio B	
	20 días	
	Red Fast Salt B + Carmin de Gower	
Tinción	n=3	
	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	1073,5-820	959,5
Anch. máx.	373-298	343
Vent. oral	172,5-146,5/161,5-139	163,8/147,7
Acetábulo	184-157,5/161,5-135	170,2/148,8
Rel. VO/VV	1,10-0,83	0,96
Faringe	101,5-82,5/112,5-97,5	88,8/105
Test. I	79-41,5/60-30	55,2/41,3
Test. II	79-34/49-30	56,5/39,5
Ovario	52,5-49/52,5-49	50,7/50,7
Huevos	-	-
Dist. VO-VV	210-164	184,3
Dist. VV-TI	298-179	238,5
Superf. VO	21869-15985	19050
Superf. VV	23327-16691	19972
Sup. corp.	314326-191822	260987
VO-VV/Long.	0,218-0,153	0,195

Tabla 11.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B durante 20 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B	Edad 14 meses Carmín de Grenacher n=14		Tiempo 20 días Red Fast Salt B + Carmín de Gower n=2		Edad 18 días Carmín de Grenacher n=12
Long. corp.	1334,3	>	959,5	<	2679,7
Anch. máx.	507,0	>	343,0	<	558,5
∅ máx. VO	173,3	>	163,8	<	209,4
∅ mín. VO	168,6	>	147,7	<	194,2
∅ máx. VV	156,5	<	170,2	<	198,2
∅ mín. VV	150,9	>	148,8	<	185,4
Rel. VO/VV	1,23	>	0,90	<	1,11
Long. faringe	88,8	>	75,6	<	100,1
Anch. faringe	105,0	>	102,2	<	119,2
∅ máx. test. I	70,1	>	55,2	<	252,2
∅ mín. test. I	49,1	>	41,3	<	228,2
∅ máx. test. II	80,0	>	56,5	<	266,9
∅ mín. test. II	50,2	>	39,5	<	236,4
∅ máx. ovario	60,6	>	50,7	<	185,1
∅ mín. ovario	49,7	>	50,7	<	155,5
Dist. VO-VV	283,8	>	184,3	<	449,9
Dist. VV-TI	362,1	>	238,5	<	1051,2
Superf. corp.	531993	>	260988	<	1131342

Tabla 12.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B durante 20 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

En la Tabla 12 exponemos los valores medios de las medidas contenidas en las tablas anteriormente mencionadas, lo cual permite destacar las relaciones existentes entre ellos.

#### 5.3.2.3.- FASE SOLIDA + MEDIO B + MACERADO TIPO 1

##### 5.3.2.3.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio bifásico presenta, como fase sólida, suero bovino neonatal coagulado, siendo dicha fase común a todos los medios bifásicos ensayados. La fase líquida presenta una composición algo compleja estando constituida por M 199 como medio químicamente definido, al que se ha adicionado suero bovino fetal en una proporción del 60% respecto a dicho medio M 199 y además una pequeña cantidad (aproximadamente un 4%) de macerado tipo 1 en cuya composición se encuentra suero bovino neonatal y solución fisiológica salina Hanks. Así, en este medio, introducimos únicamente dos factores de crecimiento por lo que, en este aspecto, no difiere del medio anteriormente estudiado (fase sólida + Medio B), pero hemos de considerar que la introducción del macerado en la fase líquida conlleva la presencia de partículas sólidas de pequeño tamaño, que pueden ser ingeridas por los vermes en cultivo, hecho éste que bien puede ejercer una cierta influencia en el desarrollo de dichos vermes y que hace que este medio sea sustancialmente diferente.

##### 5.3.2.3.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Se mantiene el cultivo en este medio a lo largo de 20 días, llevándose a cabo observaciones al microscopio invertido cada 24 horas. La primera de dichas observaciones, realizada transcurridas 24 horas desde el inicio del cultivo, nos muestra individuos vivos, muy activos, presentando movimientos corporales continuos y potentes con frecuentes y repetidas contracciones corporales. Se observa un individuo fuertemente adherido a una partícula sólida del macerado adicionado a la fase líquida del medio, así como individuos fuertemente adheridos entre sí mediante sus ventosas, pero en nin-

gún caso se observa especímenes adheridos a la fase sólida. La faringe y los ciegos intestinales se muestran muy activos, detectándose la presencia de partículas sólidas de macerado en el interior de dichos ciegos, en cantidad importante. Los ciegos intestinales presentan un movimiento continuo mediante contracciones de la musculatura de su pared, lo cual imprime un incesante movimiento al contenido de los mismos.

Transcurridos 4 días desde el inicio de los cultivos se aprecia un cierto desarrollo de las gónadas en algunos individuos, con un aparente aumento en su tamaño, por lo que se procede a la extracción de dos individuos de uno de los tubos de cultivo para someterlos a tinción con aceto-orceína y observarlos extemporáneamente al microscopio. En uno de estos individuos se aprecia un inicio de contenido vitelino en glándulas vitelógenas, si bien no apreciable en el microscopio invertido y, asimismo, un inicio de maduración en testículos, observándose la aparición de esperma, aunque en cantidad muy reducida. A partir de este material se confecciona preparaciones permanentes, la observación de las cuales nos llevará a determinar datos morfológicos que serán expuestos en el apartado siguiente.

La observación realizada tras 5 días de cultivo nos sitúa ante individuos que mantienen un nivel de actividad muy similar al apreciado en la primera observación de los cultivos, realizada una vez transcurridas 24 horas desde el inicio de los mismos. Se observa varios individuos adheridos a partículas de macerado y un alto contenido de las mismas en el interior de los ciegos intestinales. Las gónadas ofrecen un desarrollo importante, presentando testículos muy aparentes. Sin embargo, en las mismas condiciones, se observa la presencia de individuos prácticamente degenerados, inmóviles, replegados sobre sí mismos y que adquieren una tonalidad oscura.

En la observación realizada 24 horas después, se descubre la presencia de contenido vitelino en las glándulas vitelógenas de algunos especímenes. No obstante este dato, que parece indicar la existencia de una evolución en el material de cultivo, se constata una reducción en la actividad corporal y en el movimiento en la mayoría de individuos, así como una disminución del contenido de los ciegos intestinales.

Las observaciones llevadas a cabo en días sucesivos muestran individuos vivos, con una actividad corporal importante y con un contenido en los ciegos intestinales que se mantiene a un nivel constante. Es de destacar el he-

cho de que se observa contenido vitelino en las glándulas vitelógenas de un número creciente de individuos.

Transcurridos 15 días desde el inicio de los cultivos se adiciona una pequeña cantidad de sangre de conejo a uno de los tubos con el fin de observar si la introducción de este nuevo componente impulsa el desarrollo de los individuos en cultivo. El medio de cultivo resta completamente opaco, por lo que este tubo no puede ser observado posteriormente mediante el microscopio invertido. Se mantiene este cultivo 4 días más y los individuos procedentes del mismo son fijados y teñidos para la confección de preparaciones permanentes.

En los restantes cultivos, las observaciones realizadas en los días 18, 19 y 20 nos presentan individuos vivos, activos, en los que se observa contenido vitelino abundante en el interior de las glándulas vitelógenas, extendiéndose dicha sustancia vitelina al reservorio vitelino e inicio del útero. Los cultivos se dan por finalizados tras haber transcurrido 18, 19 y 20 días desde su inicio.

Una vez finalizados dichos cultivos, se observa in vivo algunos especímenes provenientes de los mismos, situándolos entre portaobjetos y cubreobjetos. Así, la observación de individuos de 18 días de edad, sin haber sido sometidos a ningún tipo de tinción, nos presenta un abundante contenido vitelino en el interior de las glándulas vitelógenas, del reservorio vitelino e incluso en el inicio del útero. Uno de los especímenes de esta edad, teñido con aceto-orceína, presenta pequeñas cantidades de esperma en los testículos, indicando esta observación la funcionalidad de los mismos. La observación de individuos de 19 días de edad in vivo muestra, tal y como hemos indicado anteriormente, abundante contenido vitelino en las glándulas vitelógenas, en el reservorio vitelino y en el inicio del útero. Todos los vermes se presentan muy activos manifestándose esta actividad en frecuentes movimientos de la musculatura corporal, de los ciegos intestinales y de las gónadas. Es observable, también, el aparato excretor, principalmente la vesícula excretora y los canales colectores principales, cuyos cilios se encuentran en movimiento.

#### 5.3.2.3.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

El estudio morfoanatómico de los individuos procedentes de cultivos lle-

vados a cabo en el medio constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 es algo complejo, pues disponemos de datos proporcionados por especímenes cultivados durante distintos intervalos de tiempo y que han sido sometidos a distintas tinciones. Adf, hemos de indicar que las características morfoanatómicas que exponemos a continuación están basadas en aquellos especímenes en que es posible llevar a cabo una observación óptima de las mismas, independientemente de la tinción a que han sido sometidos, siempre que dispongamos de individuos de una misma edad teñidos según técnicas diferentes. Teniendo en cuenta que disponemos de individuos cultivados durante 4, 18, 19 y 20 días, estudiaremos separadamente aquellos especímenes de 4 días de los especímenes de 18, 19 y 20 días, los cuales, por mediar entre ellos intervalos de tiempo muy reducidos, no presentarán características morfoanatómicas muy alejadas entre sí.

#### A) TEGUMENTO

El tegumento, en los vermes cultivados durante 4 días, se presenta continuo, sin alteraciones aparentes y no se observa en él vacuolizaciones ni ningún tipo de discontinuidad. El tegumento presenta una espinulación muy débil, visible preferentemente en el extremo anterior del verme y en los bordes laterales del cuerpo hasta el nivel faríngeo aproximadamente. Esta espinulación es muy similar a la presentada por las metacercarias control teñidas con acero-orceína, si bien parece ser algo más destacada en los adultos de esta misma edad obtenidos en los hospedadores definitivos. El grosor del tegumento de los individuos procedentes de cultivo es algo inferior al propio de dicho tegumento en los individuos obtenidos en los hospedadores definitivos, siendo más similar al presentado por el tegumento de las metacercarias de referencia.

En los vermes cultivados durante 18, 19 ó 20 días, y teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, el tegumento presenta un aspecto muy similar en todos ellos. Dicho tegumento recubre el cuerpo de estos individuos de una manera continua y no se observa en él ningún tipo de alteración visible en microscopía óptica, no presentando discontinuidades si no son las debidas a las manipulaciones a que han sido sometidos los individuos. El tegumento exhibe una espinulación muy aparente en todos los vermes, perfectamente visi-

ble y destacada que se extiende desde el extremo anterior del verme hasta el nivel acetabular medio. Esta espinulación es comparable a la presentada por los adultos de edades próximas a las aquí estudiadas, obtenidos en los hospedadores definitivos, siendo mucho más ostensible que la espinulación observada en las metacercarias de referencia teñidas con Carmín Borácico de Grenacher. El grosor del tegumento, en los vermes procedentes de cultivo, es superior al del tegumento propio de las metacercarias control, siendo comparable al del tegumento propio de los individuos adultos obtenidos en los hospedadores definitivos.

#### *B) PARENQUIMA*

Los individuos provenientes de cultivo, de 4 días de edad, presentan un parénquima aparentemente normal, continuo, sin observarse en él ningún tipo de vacuolización ni de alteraciones estructurales apreciables mediante microscopía óptica. El aspecto del mismo es muy similar al ofrecido por el parénquima de los vermes de esta edad obtenidos en los hospedadores definitivos.

El parénquima de los vermes cultivados durante 18, 19 ó 20 días ofrece un aspecto normal y no se aprecia en él ningún tipo de alteración intrínseca visible mediante microscopía óptica. Este parénquima es, pues, comparable al que presentan los individuos de una edad próxima obtenidos en los hospedadores definitivos.

#### *C) VENTOSAS*

En individuos cultivados durante 4 días, tanto la ventosa oral como el acetábulo se presentan perfectamente conformados. Ambas ventosas muestran límites muy bien definidos y una musculatura radial muy evidente. Morfológicamente estas ventosas son comparables a las mostradas por los individuos de 4 días obtenidos en los hospedadores definitivos.

Las ventosas de los individuos cultivados durante 18, 19 ó 20 días presentan unas características muy similares a las anteriormente expuestas. Es decir, en estos vermes, tanto la ventosa oral como el acetábulo presentan ca-

racterísticas morfológicas normales, observándose en ellas una musculatura radial muy manifiesta y bordes bien definidos, sin presentar ningún tipo de alteración.

#### D) APARATO DIGESTIVO

Los individuos cultivados durante 4 días presentan una faringe bien conformada, con una configuración propia de dichos vermes, y con paredes musculares muy gruesas y aparentemente superponibles a las presentadas por la faringe de individuos de esta misma edad obtenidos en los hospedadores definitivos. Los ciegos intestinales ofrecen también un aspecto normal, extendiéndose hasta el final del cuerpo y presentando unos bordes bien definidos.

En los individuos cultivados durante 18, 19 ó 20 días se observa una faringe morfológicamente normal con fuertes paredes musculares, cuya funcionalidad fué perfectamente apreciada durante las observaciones llevadas a cabo con estos vermes in vivo entre portaobjetos y cubreobjetos, ya que la faringe presentaba continuos movimientos de contracción de sus paredes. Los ciegos intestinales presentan una bifurcación y una extensión normales en todos los individuos, si bien en alguno de ellos se observa una dilatación anormal. Ofrecen unos bordes laterales bien definidos e incluso se aprecia, en algún individuo, grandes partículas de macerado ingerido y presente en el interior de dichos ciegos. Su funcionalidad fué observada durante las observaciones in vivo practicadas sobre este material, donde los ciegos presentaron movimientos musculares continuos de contracción y relajación.

#### E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Los testículos de los vermes cultivados durante 4 días muestran unas características morfológicas muy similares a las presentadas por los testículos de las metacercarias control. El contenido testicular es continuo, no observándose ningún tipo de degeneración. Los límites testiculares son definidos y bien evidentes. La observación de estos individuos in vivo, reveló, como ya hemos indicado, la presencia de esperma en testículos, aunque en cantidades mínimas. Los conductos eferentes no son apreciables, visualizándose

únicamente el inicio del conducto eferente correspondiente al testículo posterior. La bolsa del cirro no presenta ninguna degeneración aparente, si bien se presenta reducida respecto a la propia de los adultos control. La situación del poro genital es difícilmente observable, pero se intuye a nivel del borde anterior del primer testículo.

Por lo que se refiere al aparato reproductor masculino de los vermes cultivados durante 18, 19 ó 20 días, los testículos aparecen bien conformados en todos ellos, presentando límites testiculares definidos y continuos, no observándose degeneraciones morfológicas en ellos, si bien su tamaño es reducido respecto al presentado por los testículos de los individuos adultos utilizados como control. El contenido testicular muestra, en la mayor parte de estos vermes, un aspecto lagunar, caracterizado por la presencia de agrupaciones o "islotos" de células, separados entre sí por espacios aparentemente vacíos donde se sitúan, en condiciones normales, los espermatozoides. La presencia de estas características testiculares parece indicar que ha ocurrido una maduración de los testículos con, probablemente, producción de espermatozoides, si bien esta producción ha de ser forzosamente reducida dado el tamaño anormalmente pequeño de los testículos, si se tiene en cuenta el largo tiempo durante el cual estos individuos han permanecido en cultivo. Los conductos eferentes no son apreciables, aunque en algunos vermes se puede observar el inicio del conducto eferente del testículo posterior. La bolsa del cirro aparece normalmente conformada, aunque su longitud es inferior a la observada en los adultos control. El poro genital es apreciable en algunos individuos y se sitúa a nivel del borde anterior del primer testículo.

#### *F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

El ovario de los vermes cultivados por espacio de 4 días muestra un aspecto comparable al ofrecido por los vermes de referencia. Su contenido es continuo y, aparentemente, no presenta degeneraciones. Sus límites son bien definidos. Las glándulas vitelógenas presentan contenido vitelino, pero éste es tan escaso que no fué detectado en las observaciones realizadas durante el desarrollo de los cultivos mediante microscopio invertido. Este contenido vitelino fué observado, empero, al ser estudiados los vermes mediante tinción con aceto-orceína. No se observa ningún tipo de contenido en el útero

el cual presenta un desarrollo comparable al mostrado por el útero de las metacercarias control.

Los vermes procedentes de cultivo de 18, 19 ó 20 días de edad muestran un ovario normalmente conformado. Su contenido es continuo y sus límites se presentan perfectamente definidos. En ningún caso se observa una degeneración del mismo. Las glándulas vitelógenas contienen, en todos los individuos, una cantidad relativamente elevada de sustancia vitelina, aunque siempre inferior a la que presentan las glándulas vitelógenas de los adultos control de una edad similar. El reservorio vitelino aparece, también, repleto de contenido vitelino y éste se extiende hacia el útero, siendo muy abundante en el inicio del mismo e incluso asciende por el interior del tubo uterino llegando, en algunos individuos, hasta un nivel próximo al acetábulo. Este contenido vitelino presente en el interior del útero no es continuo, sino que se presenta discontinuo, adoptando la forma típica de los huevos de estos vermes. El tubo uterino presenta unas características morfológicas normales y aumenta el número de sus circunvoluciones, mostrándose más replegado sobre sí mismo que en las metacercarias control, aunque no llega a alcanzar en modo alguno las circunvoluciones que se observa en los individuos adultos de referencia.

#### 5.3.2.3.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

El estudio morfométrico comparativo de los vermes cultivados en el medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B + maceraco tipo 1 comporta la comparación de los datos morfométricos correspondientes a individuos cultivados durante 4 días, 18 días, 19 días y 20 días, con los datos morfométricos correspondientes a las metacercarias control y con las medidas tomadas sobre adultos de referencia de edades aproximadas.

Teniendo en cuenta que los adultos cultivados durante 4 días han sido teñidos con aceto-orceína, sus medidas, (expuestas en la Tabla 13 ), serán comparadas con las referentes a metacercarias control teñidas, asimismo, con aceto-orceína (expresadas en la Tabla 5 ), pues ambos tipos de vermes han estado sometidos a los mismos procesos. Por lo que se refiere a los adultos de referencia, se toma como tales los individuos de 4 días de edad obtenidos

en los hospedadores definitivos y cuyas medidas se indica en la Tabla 6 B. Los individuos cultivados durante 18, 19 ó 20 días son fijados y teñidos, bien con Carmín Borácico de Grenacher, bien con Red Fast B Salt, y sus medidas son expuestas en las Tablas 13 y 14, siendo dichas medidas comparadas con las tomadas sobre metacercarias control fijadas y teñidas con Carmín Borácico de Grenacher, pues las tinciones citadas conllevan manipulaciones similares de los ejemplares. Los adultos tomados como referencia son los individuos de 18 días de edad obtenidos en los hospedadores definitivos, fijados y teñidos con Carmín Borácico de Grenacher, por ser esta edad la que se ajusta más a las edades de los individuos cultivados.

#### *A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL*

Las medidas corporales correspondientes a los vermes cultivados durante 4 días y expuestas en la Tabla 13, son comparadas con las propias de las metacercarias de referencia que indicamos en la Tabla 5. Los valores medios de ambos grupos de medidas nos permiten confeccionar la Tabla 15, donde comparamos dichos valores, destacando las relaciones existentes entre ellos.

Los datos morfométricos tomados sobre los individuos cultivados durante 18 días y teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower son expuestos en la Tabla 13 y son comparados con las medidas tomadas sobre las metacercarias de referencia indicadas en la Tabla 5, las cuales han sido teñidas con Carmín Borácico de Grenacher. En la Tabla 16 explicitamos los valores medios de los datos morfométricos correspondientes a ambos grupos de vermes, permitiendo su comparación.

Las medidas correspondientes a los vermes cultivados a lo largo de 19 días y teñidos con Fast Red B Salt y Carmín de Gower, son expuestas en la Tabla 13 y serán estudiadas comparativamente con las correspondientes a las metacercarias control, fijadas y teñidas con Carmín Borácico de Grenacher y expresadas en la Tabla 5. Los valores medios de las medidas correspondientes a ambos grupos de vermes son comparados en la Tabla 17.

Los vermes cultivados durante 20 días son sometidos a dos tinciones diferentes, una de ellas mediante Carmín de Grenacher y la otra mediante Red Fast B Salt y Carmín de Gower. Las medidas correspondientes a ambos grupos

de vermes son expuestas en la Tabla 14 , pero únicamente compararemos con las correspondientes a las metacercarias control, expresadas en la Tabla 5 , las mediciones realizadas sobre los vermes procedentes de cultivo teñidos con Carmin de Grenacher, por ser esta tinción la empleada en las metacercarias control. Así, los valores medios de las medidas corporales correspondientes a los vermes cultivados y a las metacercarias control son expuestos en la Tabla 18 , facilitando su comparación.

#### *B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

Los datos morfométricos tomados sobre los individuos cultivados a lo largo de 4 días y expuestos en la Tabla 13 son comparados con las medidas correspondientes a los vermes de esta misma edad obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos, expresadas en la Tabla 6 B. En la Tabla 15 indicamos los valores medios de las medidas corporales correspondientes a ambos grupos de vermes para su comparación.

Los individuos cultivados a lo largo de 18 días y teñidos con Red Fast B Salt y Carmin de Gower ofrecen los datos morfométricos expuestos en la Tabla 13 , que serán comparados con las medidas correspondientes a los adultos experimentales de 18 días de edad, obtenidos en los hospedadores definitivos, que son indicadas en la Tabla 6 D. Los valores medios de estas mediciones referidas a ambos grupos de vermes son expuestos en la Tabla 16 para su mejor comparación.

Los datos morfométricos correspondientes a los vermes cultivados durante 19 días y teñidos con Red Fast B Salt y Carmin de Gower, son expuestos en la Tabla 13 y comparados con las medidas referentes a los adultos experimentales de 18 días de edad, expuestas en la Tabla 6 D. En la Tabla 17 indicamos los valores medios de las medidas corporales referidos a los vermes antedichos, al objeto de facilitar su comparación.

Los vermes cultivados durante 20 días y teñidos con Carmin de Grenacher presentan las medidas corporales indicadas en la Tabla 14 , siendo comparadas dichas medidas con las propias de los adultos de referencia de 18 días de edad, expuestas en la Tabla 6 D. En la Tabla 18 indicamos los valores medios de las mediciones practicadas sobre ambos grupos de vermes.

Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1

Medio de cultivo	4 días		18 días		19 días	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Tiempo de cultivo						
Tinción						
Long. corp.	1272,5-939,5	1106	1227-1000	1094,4	1058,5-985	1021,7
Anch. máx.	402,5-298,5	350,5	522-350	443,6	447,5-387,5	417,5
Vent. oral	105-127,5/120-105	116,2/112,5	180-169/169-139	171,4/158,2	161,5-157,5/154-150	159,5/152
Acetábulo	135-109/120-101,5	122/110,7	172,5-140/165-136,5	160,2/150,1	169-150/146,5-127,5	159,5/137
Rel. VO/VV	1,00-0,94	0,97	1,23-0,95	1,10	1,30-0,95	1,12
Faringe	79-52,5/79-56,5	65,7/67,7	105-79/124-94	92,6/107	94-86,5/79-75	90,2/77
Test. I	75-37,5/67,5-34	56,2/50,7	97,5-64/75-52,5	78,8/63,8	56,5-49/41,5-26,5	52,7/34
Test. II	71,5-41,5/67,5-30	56,5/48,7	94-60/79-45	79,5/58,9	56,5-49/45-37,5	52,7/41,2
Ovario	64-41,5/56,5-34	52,7/45,2	82,5-60/64-52,5	71,3/59,6	67,5-45/56,5-41,5	56,2/49
Huevos	-	-	-	-	-	-
Dist. VO-VV	268,5-253,5	261	328-164	231,2	223,5-179	201,2
Dist. VV-TI	417,5-253,5	335,5	328-238,5	275,8	253,5-194	223,7
Superf. VO	12010-8654	10332	23879-18440	21313	19523-18545	19034
Superf. VV	12717-8684	10700	22343-15001	19457	19435-15013	17224
Sup. corp.	402062-220146	311104	502787-286839	382766	346018-321982	334000
VO-VV/Long.	0,270-0,211	0,240	0,328-0,157	0,212	0,211-0,152	0,196

Tabla 13.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 durante 4, 18 y 19 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

Medio de cultivo	Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1			
	Carmín de Grenacher		Red Fast Salt B + Carmin de Gower	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Tiempo de cultivo	20 días			
Tinción	n=2		n=4	
Long. corp.	1727-1500	1613,5	1545,5-1044	1306,4
Anch. máx.	447,5-402,5	425	447,5-394	430,4
Vent. oral	180-176,5/176,5-172,5	178,2/174,7	180-157,5/157,5-150	170,6/154,7
Acetábulo	184-176,5/172,5-169	180,2/170,7	174,5-154/165-150	168/157,5
Rel. VO/VV	1,02/1,00	1,01	1,07-0,95	1,00
Faringe	94-90/124-112,5	92/118,2	97,5-79/124-90	84,7/107
Test. I	94-90/75-49	92/62	94-79/75-64	84,5/65,7
Test. II	120-82,5/75-45	101,2/60	82,5-79/75-41,5	81,6/60,1
Ovario	90-75/74-64	82,5/69	79-71,5/71,5-52,5	75,1/61
Huevos	-	-	-	-
Dist. VO-VV	373-313	343	417,5-194	294,6
Dist. VV-TI	537-447,5	492,2	462-253,5	372,7
Superf. VO	24939-23900	24419	21760-19472,9	20707
Superf. VV	24410-23900	24155	22343-18133	20773
Sup. corp.	545667-526931	536299	524716-322898,7	443402
VO-VV/long.	0,216-0,209	0,212	0,270-0,186	0,180

Tabla 14.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 durante 20 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1	Edad 14 meses		Tiempo 4 días		Edad 4 días
	Aceto orceina		Aceto orceina		Carmin de Grenacher
	n=5		n=2		n=13
Long. corp.	1139,6	>	1106,0	<	1869,8
Anch. máx.	426,1	>	350,5	<	491,1
Ø máx. VO	159,8	>	116,2	<	209,0
Ø mín. VO	152,4	>	112,5	<	181,5
Ø máx. VV	155,4	>	122,0	<	182,4
Ø mín. VV	145,7	>	110,7	<	177,8
Rel. VO/VV	1,09	>	0,97	<	1,17
Long. faringe	78,9	>	65,7	<	92,8
Anch. faringe	94,6	>	67,7	<	115,5
Ø máx. test. I	67,6	>	56,2	<	170,5
Ø mín. test. I	51,6	>	50,7	<	145,5
Ø máx. test. II	67,6	>	56,5	<	189,7
Ø mín. test. II	53,6	>	48,7	<	147,5
Ø máx. ovario	67,6	>	52,7	<	147,8
Ø mín. ovario	47,9	>	45,2	<	127,3
Dist. VO-VV	208,8	<	261,0	<	382,0
Dist. VV-TI	299,6	<	335,5	<	540,2
Superf. corp.	385694	>	311104	<	674791

Tabla 15.- Brachylaima ruminae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida+Medio B+macerado tipo 1 durante 4 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1	Edad 14 meses  Carmin de Grenacher  n=14		Tiempo 18 días  Red Fast Salt B + Carmin de Gower  n=6		Edad 18 días  Carmin de Grenacher  n=12
Long. corp.	1334,3	>	1094,4	<	2679,7
Anch. máx.	507,0	>	443,6	<	558,5
∅ máx. VO	173,7	>	171,4	<	209,4
∅ mín. VO	168,6	>	158,2	<	194,2
∅ máx. VV	156,5	<	160,2	<	198,2
∅ mín. VV	150,9	>	150,1	<	185,4
Rel. VO/VV	1,23	>	1,10	<	1,11
Long. faringe	75,6	<	92,6	<	100,1
Anch. faringe	102,2	<	107,0	<	114,2
∅ máx. test. I	70,1	<	78,8	<	254,2
∅ mín. test. I	49,1	<	63,8	<	228,2
∅ máx. test. II	80,0	>	79,5	<	266,9
∅ mín. test. II	50,2	<	58,9	<	236,4
∅ máx. ovario	60,6	<	71,3	<	185,1
∅ mín. ovario	49,7	<	59,6	<	155,5
Dist. VO-VV	283,8	>	231,2	<	444,9
Dist. VV-TI	362,1	>	275,8	<	1051,2
Superf. corp.	531993	>	382767	<	1131343

Tabla 16.- Brachylaima ruminæ: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 durante 18 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1	Edad 14 meses  Carmín de Grenacher  n=14		Tiempo 19 días  Red Fast Salt B + Carmín de Gower  n=2		Edad 18 días  Carmín de Grenacher  n=14
Long. corp.	1334,3	>	1021,7	<	2679,7
Anch. máx.	507,0	>	417,5	<	558,5
Ø máx. VO	173,7	>	159,5	<	209,4
Ø mín. VO	168,6	>	152,0	<	194,2
Ø máx. VV	156,5	<	159,5	<	198,2
Ø mín. VV	150,9	>	137,0	<	185,4
Rel. VO/VV	1,23	>	1,12	>	1,11
Long. faringe	75,6	<	77,0	<	100,1
Anch. faringe	102,2	>	90,2	<	119,2
Ø máx. test. I	70,1	>	52,7	<	254,2
Ø mín. test. I	49,1	>	34,0	<	228,2
Ø máx. test. II	80,0	>	52,7	<	266,9
Ø mín. test. II	50,2	>	41,2	<	236,4
Ø máx. ovario	60,2	>	56,2	<	185,1
Ø mín. ovario	49,7	>	49,0	<	155,1
Dist. VO-VV	283,8	>	201,2	<	444,9
Dist. VV-TI	362,1	>	223,7	<	1051,2
Superf. corp.	531993	>	334000	<	1131343

Tabla 17.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida+Medio B+macerado tipo 1 durante 19 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1	Edad 14 meses  Carmin de Grenacher  n=14		Tiempo 20 días  Red Fast Salt B + Carmin de Gower  n=2		Edad 18 días  Carmin de Grenacher  n=14
Long. corp.	1334,3	<	1613,5	<	2679,7
Anch. máx.	507,0	>	425,0	<	558,5
Ø máx. VO	173,7	<	178,2	<	209,4
Ø mín. VO	168,6	<	174,5	<	194,2
Ø máx. VV	156,5	<	180,2	<	198,2
Ø mín. VV	150,9	<	170,7	>	185,4
Rel. VO/VV	1,23	>	1,01	<	1,11
Long. faringe	75,6	>	92,0	<	100,1
Anch. faringe	102,2	<	118,2	<	119,2
Ø máx. test. I	70,1	<	92,0	<	254,2
Ø mín. test. I	49,1	<	62,0	<	228,2
Ø máx. test. II	80,0	<	101,2	<	266,9
Ø mín. test. II	50,2	<	60,0	<	236,4
Ø máx. ovario	60,6	<	82,5	<	185,1
Ø mín. ovario	49,7	<	69,0	<	155,5
Dist. VO-VV	283,8	<	343,0	<	444,9
Dist. VV-TI	362,1	<	492,2	<	1051,2
Superf. corp.	531993	<	536299	<	1131393

Tabla 18.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 durante 20 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

#### 5.3.2.4.- FASE SOLIDA + MEDIO B + MACERADO TIPO 2

##### 5.3.2.4.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

La fase sólida común a todos los medios de cultivo bifásicos ensayados está constituida únicamente por suero bovino neonatal coagulado y es ésta la empleada en el medio que aquí estudiamos. La fase líquida presenta en su composición el medio químicamente definido denominada M 199 al que se adiciona suero bovino fetal en una proporción de 60% respecto al medio M 199, así como una pequeña cantidad de macerado tipo 2 (aproximadamente un 4%) constituido por suero bovino neonatal, extracto de embrión bovino y solución salina fisiológica Hanks. El medio resultante es el más complejo de los medios bifásicos ensayados, por cuanto que presenta en su composición tres tipos distintos de factores de crecimiento, siendo aquél en que éstos intervienen en mayor proporción. Es el único medio bifásico que presenta extracto de embrión bovino, el cual entra a formar parte del macerado. La presencia de este macerado, como ya hemos indicado en el medio anteriormente estudiado (véase apartado 5.3.2.2.1), pone a disposición de los vermes en cultivo partículas sólidas de pequeño tamaño que pueden ser ingeridas por dichos vermes.

##### 5.3.2.4.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Los cultivos llevados a cabo en el medio constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 se desarrollan por espacio de 11, 15, 18 ó 20 días. Los cultivos son observados diariamente mediante un microscopio invertido, hasta su finalización. Hemos de indicar que en la fase sólida de uno de los tubos se ha practicado unos orificios mediante una pipeta Pasteur estéril.

En la primera observación, llevada a cabo tras 24 horas del inicio de los cultivos, apreciamos vermes todos ellos vivos y muy activos, manifestándose su actividad corporal en continuas y bruscas contracciones y relajaciones corporales. Las ventosas presentan también movimientos bastante frecuentes, que se manifiestan por contracciones de su musculatura. La faringe y los ciegos intestinales presentan una actividad constante, observándose un alto contenido de partículas sólidas de macerado en el interior de los ciegos, los

cuales imprimen a dicho contenido un movimiento continuo mediante contracciones de la musculatura de su pared.

En la observación realizada tras 4 días de cultivo, apreciamos una ligera disminución en la actividad de los vermes, aunque todos ellos se mantienen vivos. El contenido intestinal disminuye ligeramente en algunos individuos, pero se mantiene alto en la mayoría. Los testículos se hacen más aparentes en algunos vermes. Transcurridas 24 horas, los vermes se presentan vivos en su mayoría, pero algunos de ellos han sufrido una evidente degeneración, apareciendo replegados sobre sí mismos, inactivos y con manchas en su tegumento. Algunos individuos se encuentran adheridos a las partículas sólidas de macerado mediante su ventosa oral.

Transcurridos ya 6 días desde el inicio del cultivo, observamos un inicio de contenido vitelino en las glándulas vitelógenas de algunos individuos. Los vermes se mantienen vivos en su mayoría, mostrando un aceptable nivel de actividad y un contenido en ciegos intestinales bastante alto. Los testículos son progresivamente más aparentes y esto ocurre en un número sucesivamente mayor de individuos. Estos datos parecen indicar que ha tenido lugar una evolución de los vermes en cultivo. Sin embargo, simultáneamente y en el mismo cultivo, podemos observar individuos muy activos, con un alto contenido en ciegos intestinales, presentando contenido vitelino en las glándulas vitelógenas y testículos aparentes junto a individuos absolutamente degenerados, inmóviles y algunos con ciegos muy dilatados. Las observaciones realizadas en los días 7 y 8 de cultivo nos presentan una situación muy similar a la descrita en líneas anteriores, en la que son progresivamente más numerosos los individuos que muestran sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas, así como gónadas aparentes, presentando estos individuos un notable nivel de actividad y un contenido en ciegos muy aceptable.

Once días después de iniciados los cultivos, se da por terminado en uno de los tubos que es abierto. Los vermes son extraídos del medio de cultivo, lavados en solución Hanks, algunos de ellos, sometidos a tinción con acetorceína y observados extemporáneamente. Se observa en ellos pequeñas cantidades de esperma en los testículos, indicando este hecho que las gónadas masculinas son funcionales.

Las observaciones continúan en los restantes tubos de cultivo, apreciándose un mayor número de individuos que presentan contenido vitelino en las

glándulas vitelógenas, si bien dicha sustancia no llega a estar presente en todos los individuos. Transcurridos 15 días desde el inicio del cultivo, se observa la aparición de contenido vitelino en el inicio del útero de algunos individuos de un determinado tubo de cultivo. Este tubo es abierto y extraídos los individuos cultivados en él. Algunos de ellos son sometidos a tinción con aceto-orceína y observados extemporáneamente, apreciándose pequeñas cantidades de espermatozoides en los testículos. La observación de algunos especímenes in vivo entre portaobjetos y cubreobjetos nos sitúa ante individuos vivos, muy activos, que presentan una gran cantidad de sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas, en el reservorio vitelino y en el inicio del útero.

Las observaciones de los tubos de cultivo continúan en aquellos no finalizados hasta el momento apareciendo en ellos individuos con contenido vitelino en inicio del útero en el día 18 de cultivo. Transcurridos 19 días de cultivo se finaliza el mismo en un nuevo tubo de cultivo y los vermes extraídos del mismo presentan un contenido vitelino en el útero más o menos abundante según los individuos. Son vermes vivos y muy activos. 24 horas más tarde se da por finalizados todos los cultivos en que se ensaya el medio constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2.

#### 5.3.2.4.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

Los individuos procedentes de los cultivos en que se ha utilizado el medio integrado por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 son estudiados morfoanatómicamente según su edad de cultivo. Disponemos de especímenes cultivados durante 11, 15, 19 y 20 días, por lo que estudiaremos independientemente los individuos de 11 días de edad de los de 15 días de edad, ya que podemos esperar que presenten características morfoanatómicas diferentes entre sí, dado el distinto intervalo de tiempo durante el cual han sido cultivados. Los individuos cultivados durante 19 ó 20 días serán tratados conjuntamente, pues sus tiempos de cultivo son suficientemente próximos entre sí como para no esperar diferencias morfoanatómicas notables entre los mismos, en el bien entendido de que si las hubiere serían destacadas. Siempre que dispongamos de individuos de una misma edad sometidos a tinciones diversas, el estudio morfoanatómico se llevará a cabo sobre aquellos individuos en que las características morfoanatómicas sean óptimamente observables, independientemente de su tinción.

#### A) TEGUMENTO

Los vermes cultivados durante 11 días presentan un tegumento que aparece bien conformado y que cubre todo el cuerpo del verme, no observándose discontinuidades. No aparecen "burbujas" ni ningún otro tipo de alteraciones estructurales, siendo sus características morfológicas comparables a las presentadas por el tegumento de los individuos control de una edad próxima. El tegumento presenta una fuerte espinulación perfectamente observable, principalmente en individuos teñidos con Red Fast B Salt, que se extiende desde el extremo anterior del verme hasta el nivel posterior del acetábulo. Esta espinulación es comparable a la presentada por los adultos control, siendo mucho más marcada que la mostrada por las metacercarias de referencia. El grosor del tegumento es, asimismo, más próximo al propio de los adultos de referencia.

Los vermes cultivados por espacio de 15 días presentan un tegumento cuyas características morfológicas son perfectamente comparables con las descritas en líneas anteriores para vermes de 11 días de edad, es decir, continúa, sin alteraciones y con una espinulación evidente. En algunos individuos sometidos a observación in vivo y a dos tinciones sucesivas, no se aprecia el tegumento en su mitad anterior, aunque sí en la mitad posterior del cuerpo de los mismos, lo cual es posiblemente debido a que no han sido bien extendidos al confeccionar las preparaciones permanentes o bien a las manipulaciones a que han sido sometidos.

El tegumento de los vermes de 19 ó 20 días de cultivo presenta las mismas características ya mencionadas, si bien, como también ocurre en el caso anterior, aparece algo deteriorado en vermes sometidos a varias manipulaciones, permaneciendo intacto en otros individuos sometidos a distinto tipo de fijación y de tinción.

#### B) PARENQUIMA

El parénquima de los vermes cultivados durante 11 días es aparentemente normal, pudiendo ser comparado con el parénquima de los adultos control. Una situación similar se presenta, tanto en los individuos cultivados por espacio de 15 días, como en aquellos sometidos a cultivo durante 19 ó 20 días.

No se aprecia, mediante microscopía óptica, ningún tipo de degeneración en el parénquima de estos individuos. Presenta un aspecto continuo, exento de vacuolizaciones y aparece perfectamente teñido, tanto en individuos teñidos con aceto-orceína como en aquellos teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, al igual que en los vermes teñidos con Carmín Borácico de Grenacher. En estos últimos las células parenquimáticas son muy evidentes, siendo su aspecto absolutamente comparable al presentado por las células parenquimáticas de los adultos control sometidos a la misma tinción.

#### C) VENTOSAS

Por lo que se refiere a la ventosa oral y al acetábulo, ambos órganos de fijación presentan las características morfológicas que les son propias, tanto en los individuos cultivados durante 11 días, como en aquellos que lo han sido por espacio de 15, 19 ó 20 días. En todos estos individuos, tanto la ventosa oral como la ventosa ventral presentan unos límites bien definidos y continuos y una musculatura radial muy evidente. En ningún caso estas ventosas aparecen degeneradas ni presentan alteraciones estructurales apreciables mediante microscopía óptica. Su poder de adhesión se manifiesta durante los cultivos por presentarse, en algunos casos, individuos fuertemente adheridos entre sí mediante dichas ventosas. Morfológicamente, pues, estos órganos de los vermes cultivados son perfectamente comparables a las ventosas propias de los adultos control.

#### D) APARATO DIGESTIVO

En los vermes cultivados durante 11 días, la faringe aparece normalmente conformada, tanto por lo que respecta a su forma externa, como a sus paredes, que se manifiestan musculosas y muy evidentes. Es, pues, absolutamente comparable a la que presentan los individuos adultos control. Los ciegos intestinales presentan una extensión normal en todos los vermes cultivados, alcanzando el extremo posterior del cuerpo en todos ellos. Presentan unos bordes laterales bien definidos y evidentes y no se observa en ellos dilataciones anormales.

Los vermes cultivados durante 15 días presentan una situación similar en su aparato digestivo. La faringe está normalmente conformada en todos los individuos, apreciándose bien la musculatura de sus paredes y los ciegos intestinales muestran un recorrido normal y están exentos de alteraciones morfológicas.

En los vermes cultivados por espacio de 19 días, la faringe aparece bien conformada, así como los ciegos intestinales en la mayoría de ellos, observándose, en algunos individuos, un alto contenido intestinal constituido por partículas sólidas de macerado. Uno de estos individuos presenta unos ciegos intestinales anormalmente dilatados, con bordes difusos, poco definidos, y una gran cantidad de partículas sólidas de macerado de gran tamaño en su interior.

Los vermes, procedentes de cultivo de 20 días de edad, muestran una faringe con características morfológicas normales y los ciegos intestinales aparecen con un recorrido normal, pero se observa una dilatación excesiva de la región final de los mismos.

#### *E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO*

Los vermes cultivados por espacio de 11 días presentan, en su mayoría, testículos morfológicamente normales, con límites continuos y bien definidos, aunque su tamaño es reducido. En algunos vermes, el contenido testicular es lagunar, presentándose acúmulos a manera de islotes de células, separados por espacios que parecen vacíos, donde se sitúan los espermatozoides ya formados. De hecho, las observaciones de individuos cultivados durante 11 días y teñidos con acero-orceína, muestran la aparición de pequeñas cantidades de espermatozoides en los testículos, por lo que éstos son funcionales. Ahora bien, las características lagunares de los testículos no se observan en las preparaciones permanentes obtenidas a partir del material teñido con Carmín Borácico de Grenacher. La bolsa del cirro aparece bien evidente en estos mismos individuos, presentándose el poro genital a nivel del borde anterior del primer testículo.

Los testículos de los vermes mantenidos en cultivo durante 15 días presentan límites continuos, aunque su tamaño es notablemente inferior al que presentan dichos órganos en los adultos control. En la mayor parte de los individuos, el contenido testicular es lagunar como ocurría en los vermes cultivados durante 11 días, siendo esta característica observable, tanto en vermes teñidos con Carmín de Grenacher, como en los teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, pero no es observable en el material teñido con acetoorceína, cuyo estudio extemporáneo mostró una pequeña cantidad de espermatozoides en los testículos, indicando este hecho que estos órganos son funcionales. Algunos individuos presentan testículos con contenido continuo, no lagunar, coincidiendo siempre esta circunstancia en aquellos vermes menos desarrollados. Los conductos eferentes no son observables. Únicamente en un individuo se observa el inicio de este conducto correspondiente al testículo posterior. La bolsa del cirro está bien conformada.

Los vermes de 19 y 20 días de edad muestran testículos con límites continuos, definidos y con un contenido de apariencia lagunar en la mayor parte de los individuos, si bien hemos de indicar que los vermes de 20 días de edad teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, presentan una tinción tan suave que los testículos no aparecen excesivamente destacados, siendo difícil precisar las características morfológicas de su contenido, aunque son apreciables los límites del mismo que se presentan continuos. Los conductos eferentes no son visibles en ninguno de los vermes en estudio. La bolsa del cirro, visible en algunos individuos de 19 días de edad, aparece normal.

#### *F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

La mayor parte de los vermes que se han cultivado durante 11 días presentan un ovario muy evidente, con límites muy definidos y con un contenido continuo. No se observa ningún tipo de degeneración en el contenido del ovario. Las glándulas vitelógenas son funcionales en la mayor parte de los individuos y muestran un alto contenido de sustancia vitelina en su interior, así como en el interior del reservorio vitelino, pero únicamente en un individuo se observa contenido vitelino en el inicio del útero, si bien esta cantidad es mínima y prácticamente imperceptible si no se practica una tinción con Red Fast B Salt. El útero presenta una trayectoria normal en todos los

individuos, no observándose en él alteraciones morfológicas ni ningún tipo de contenido en su interior. No se aprecia un aumento en las circunvoluciones uterinas, si comparamos el útero de estos individuos con el de las metacercarias control.

Los vermes mantenidos en cultivo por espacio de 15 días muestran un ovario bien conformado en la mayoría de ellos, con límites definidos y un contenido continuo. No se presenta alterado ni muestra degeneraciones, aunque en algunos individuos presenta un tamaño muy inferior al presentado en otros. Las glándulas vitelógenas presentan una gran cantidad de contenido vitelino en la mayoría de los vermes. Esta sustancia vitelina llena el reservorio vitelino y se extiende por el útero, llegando, en algunos vermes, hasta el nivel acetabular. La sustancia vitelina presente en el útero no es continua, sino que presenta discontinuidades tales que cada uno de los acúmulos delimitados adopta una forma que recuerda a un huevo de estos vermes.

Los individuos cultivados durante 19 días presentan un ovario muy evidente, con límites definidos y contenido continuo en la mayor parte de los vermes, aunque en otros su tamaño es muy reducido. Las glándulas vitelógenas aparecen funcionales, con un elevado contenido vitelino en su interior, el cual llena también los viteloductos y el reservorio vitelino. El útero también presenta sustancia vitelina en su interior, siendo ésta discontinua y presentando el mismo aspecto descrito en líneas anteriores para vermes de 15 días de edad. En los individuos cultivados durante 20 días, que fueron teñidos con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, la tinción se presenta muy débil de tal modo que el ovario no es bien distinguible en ellos, apreciándose, no obstante, sus límites continuos y definidos. Se observa bien la abundante sustancia vitelina situada en el interior de las glándulas vitelógenas, que llena también los viteloductos, pero no es apreciable en el interior del útero de estos individuos.

#### 5.3.2.4.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

Los datos morfométricos, aportados para los vermes procedentes del medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 y cultivados por espacio de 11, 15 y 19 días, son estudiados comparativamente con

los correspondientes a las metacercarias control y con las medidas tomadas sobre adultos experimentales de edades aproximadas obtenidos en los hospedadores definitivos.

Los vermes cultivados a lo largo de 11 días son sometidos a tres tinciones distintas: aceto-orceína, Red Fast B Salt y Carmín de Grenacher. Los datos morfométricos correspondientes a los vermes teñidos con aceto-orceína son comparados con las medidas correspondientes a las metacercarias control sometidas a esta misma tinción. Los datos morfométricos referentes a los vermes cultivados teñidos con Carmín de Grenacher son comparados con los propios de las metacercarias control y de los adultos control de 12 días de edad, sometidos a la misma tinción.

Los vermes cultivados por espacio de 15 días son sometidos a tinción con aceto-orceína, con Carmín de Grenacher y con Red Fast B Salt y Carmín de Gower. Las medidas referentes a los vermes teñidos con aceto-orceína son comparadas con las ofrecidas por las metacercarias control teñidas también con aceto-orceína. Los datos morfométricos correspondientes a los vermes cultivados teñidos con Carmín de Grenacher son comparados con las medidas propias de las metacercarias control y de los vermes de referencia de 15 días de edad, estando estos dos grupos de vermes teñidos con Carmín de Grenacher.

Los vermes cultivados a lo largo de 19 días son teñidos, bien con Carmín de Grenacher o bien con Red Fast B Salt y Carmín de Gower. Hemos de considerar que esta última tinción se lleva a cabo selectivamente sobre los vermes de mayor tamaño por lo que serán los datos morfométricos correspondientes a todos los vermes los que son comparados con las medidas de las metacercarias control y con las propias de los adultos control de 18 días de edad, estando teñidos estos dos grupos de vermes con Carmín de Grenacher.

Estudiaremos independientemente las situaciones presentadas por los grupos de vermes de distintas edades, 11, 15 y 19 días, pues consideramos que las características morfométricas presentadas por cada grupo de vermes de la misma edad mantienen una individualidad propia.

#### *A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL*

Los datos morfométrico correspondientes a los individuos cultivados du-

rante 11 días y teñidos con aceto-orceína, con Carmín de Grenacher o con Red Fast B Salt son expuestas en la Tabla 19 . Los valores medios de los datos correspondientes a los vermes teñidos con aceto-orceína son comparados con los valores medios de las medidas corporales de las metacercarias control sometidas a esta misma tinción y expuestas en la Tabla 5 . A partir de ambos grupos de valores confeccionamos la Tabla 22 , que permite su comparación. Por otra parte, los valores medios de las mediciones corporales referidas a los vermes teñidos con Carmín de Grenacher (expuestos en la Tabla 19 ) son comparados con los valores medios de las medidas correspondientes a las metacercarias control igualmente teñidas, que son indicadas en la Tabla 5 . La comparación de estos dos últimos grupos de valores se lleva a cabo en la Tabla 23 .

Las medidas corporales tomadas sobre los vermes cultivados por espacio de 15 días y teñidos con aceto-orceína o con Carmín de Grenacher son expuestas en la Tabla 20 . Los valores medios de dichas medidas referidos a los vermes teñidos con aceto-orceína son comparados con los valores medios de las medidas corporales referidas a las metacercarias control expuestas en la Tabla 5 y a partir de estos dos grupos de valores se confecciona la Tabla 24 que facilita su comparación. Separadamente, son comparados los valores medios de las mediciones realizadas sobre los vermes cultivados teñidos con Carmín de Grenacher con los valores medios de las medidas corporales correspondientes a las metacercarias control sometidas a esta misma tinción, indicados en la Tabla 5 . La comparación se lleva a cabo en la Tabla 25 .

Los vermes cultivados durante 19 días teñidos con Carmín de Grenacher o con Red Fast B Salt presentan las medidas corporales expuestas en la Tabla 21 . En este caso son los valores medios de las medidas de todos los individuos, independientemente de su tinción, los que son comparados con los datos aportados por las metacercarias de referencia teñidas con Carmín de Grenacher, que son expuestas en la Tabla 5 . La comparación de ambos grupos de valores medios nos lleva a confeccionar la Tabla 26 que facilita su comparación.

#### *B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

Los datos morfométricos correspondientes a los vermes cultivados a lo largo de 11 días y teñidos con Carmín de Grenacher son expuestos en la Tabla

Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2

11 días

Medio de cultivo	Aceto-orceina		Carmín de Grenacher		Red Fast Salt B	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	1275,5-739,5	1117,4	1136,5-939,5	1038	1014-879,5	946,7
Anch. máx.	447-387,5	417,5	462	462	417,5-320	372,7
Vent. oral	180-150/176,5-146,5	165/159,7	187,5-169/180-146,5	178,2/163,2	157,5-131/150-131	144,2/140,5
Acetábulo	180-139/169-135	157/151,8	172,5-150/150-130	161,2/142,5	161,5-131/124-86,5	146,2/105,2
Rel. VO/VV	1,17-1,02	1,11	1,30-1,22	1,26	1,51-1,18	1,34
Faringe	116,5-75/139-94	91,6/109	90-79/105-94	84,5/99,5	97,5-75/90-79	86,2/84,5
Test. I	75-52,5/67,5-41,5	63,8/48,8	90-56,5/52,5-34	73,2/43,2	60-52,5/52,5-37,5	56,2/45
Test. II	90-49/71,5-45	71,4/56,4	86,5-52,5/37,5-34	69,5/35,7	56,5-42/45-37,5	49,2/41,2
Ovario	94-52,5/75-52,5	73,7/60	79-49/67,5-49	64/58,2	75-42/56,5-37,5	58,5/47
Huevos	-	-	-	-	-	-
Dist. VO-VV	209-149	182	194-149	171,5	194-164	179
Dist. VV-TI	387,5-179	304,2	313-253,5	283,2	223,5-194	208,7
Superf. VO	24939-17250	20777	26493-19435	22964	18545-13471	16008
Superf. VV	22884-14730	18849	29311-15896	18104	15720-8895	12307
Sup. corp.	417045-330034	363592	412174-340728	376451	332325-226453	279389
VO-VV/Long.	0,222-0,141	0,165	0,171-0,158	0,164	0,191-0,186	0,188

Tabla 19.- Brachylaima ruminiae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 durante 11 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2

15 días

Medio de cultivo	Carmin de Grenacher		Aceto-orceina		Red Fast Salt B + Carmin de Gower	
	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$	V.E.	$\bar{x}$
Tiempo de cultivo						
Tinción						
Long. corp.	1632-769	1292,7	1409-1272,5	1340,7	1591-1133	1362
Anch. máx.	500-373	443	447,5-373	410,2	477-409	443
Vent. oral	199-150/187,5-142,5	174,9/160,6	150-139/142,5-131,5	144,5/137	169/169-142,5	169/155,7
Acetábulo	191,5-142,5/184-127,5	171,1/159,1	169-142/150-139	155,5/144,5	172,5/162-150	172,5/156
Rel. VO/VV	1,18-0,87	1,04	0,93-0,84	0,88	1,10-0,86	0,98
Faringe	121,5-71,5/135-90	94,7/117	75/90	75/90	97,5-86,5/112,5-105	92/108,7
Test. I	112,5-41,5/90-30	71,4/57,1	94-79/75	86,5/75	82,5-64/56,5	73,2/56,5
Test. II	94-49/86,5-30	64,6/52,6	90-60/67,5-41,5	75/54,5	94-64/56,5	79/56,5
Ovario	101,5-37,5/79-34	65,3/51,1	82,5-60/67,5-56,5	71,2/62	75-71,5/60	73,2/60
Huevos	-	-	-	-	-	-
Dist. VO-VV	328-194	262,5	253,5-238,5	246	298-238,5	268,2
Dist. VV-TI	492-253,5	375,8	447,5-402,5	439,7	492-298	395
Superf. VO	29290-16779	22254	16779-14348	15564	22420-18904	20662
Superf. VV	27660-14262	21609	19899-15494	17697	21936-20311	21123
Sup. corp.	640560-292512	457362	494964-372594	433779	518814-424246	471530
VO-VV/Long.	0,224-0,183	0,205	0,199-0,169	0,184	0,218-0,187	0,202

1 594 1

Tabla 20.- Brachylaima ruminiae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 durante 15 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

Medio de cultivo	Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	
	19 días	
	Carmin de Grenacher	
Tiempo de cultivo	n=6	
Tinción	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	1363,5-1237,5	1290
Anch. corp.	402,5-373	387,7
Vent. oral	184-157,5/169-135	170,7/155,2
Acetábulo	172,5-154/157,5-131,5	164,5/150,1
Rel. VO/VV	1,27-0,82	1,10
Faringe	101,5-75/112,5-101,5	89,5/123,8
Test. I	75-64/64-41,5	70,1/53,8
Test. II	86,5-60/71,5-45	73,3/53,9
Ovario	79-49/71,5-37,5	65,1/55,7
Huevos	-	-
Dist. VO-VV	298-223,5	254,6
Dist. VV-TI	760-298	459,7
Superf. VO	24410-16691	20876
Superf. VV	20894-17226	19373
Sup. corp.	428761-362346	392653
VO-VV/Long.	0,218-0,170	0,197

Tabla 21.- Brachylaima ruminae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 durante 19 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses		Tiempo 11 días
	Aceto orceina		Aceto orceina
	n=5		n=5
Long. corp.	1139,6	>	1117,4
Anch. máx.	426,1	>	417,5
∅ máx. VO	159,8	<	165,0
∅ mín. VO	152,4	<	159,7
∅ máx. VV	155,4	<	157,0
∅ mín. VV	145,7	<	151,8
Rel. VO/VV	1,09	<	1,11
Long. faringe	78,9	<	91,6
Anch. faringe	94,6	<	109,0
∅ máx. test. I	67,6	>	63,8
∅ mín. test. I	51,6	>	48,8
∅ máx. test. II	67,6	<	71,4
∅ mín. test. II	53,6	<	56,4
∅ máx. ovario	67,6	<	73,7
∅ mín. ovario	47,9	<	60,0
Dist. VO-VV	208,8	>	182,0
Dist. VV-TI	299,6	<	304,2
Superf. corp.	385694	>	363592

Tabla 22.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Medio B + macerado tipo 2 durante 11 días con las correspondientes a metacercarias control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses  Carmin de Grenacher  n=14		Tiempo 11 días  Carmin de Grenacher  n=2		Edad 12 días  Carmin de Grenacher  n=14
Long. corp.	1334,3	>	1038,0	<	2337,7
Anch. máx.	507,3	>	462,0	<	553,7
Ø máx. VO	173,7	>	178,2	<	201,6
Ø mín. VO	168,6	>	163,2	<	175,8
Ø máx. VV	156,5	<	171,2	<	192,4
Ø mín. VV	150,9	>	142,5	<	181,2
Rel. VO/VV	1,23	<	1,26	>	1,01
Long. faringe	75,6	<	84,5	<	92,5
Anch. faringe	102,2	>	99,5	<	115,6
Ø máx. test. I	70,1	<	73,2	<	254,5
Ø mín. test. I	49,1	>	43,2	<	233,1
Ø máx. test. II	80,0	>	69,5	<	290,6
Ø mín. test. II	50,2	<	35,7	<	217,7
Ø máx. ovario	60,6	>	64,0	<	198,1
Ø mín. ovario	49,7	<	58,2	<	158,9
Dist. VO-VV	283,8	>	171,5	<	396,6
Dist. VV-TI	362,1	>	283,2	<	828,6
Superf. corp.	531993	>	376451	<	1019686

Tabla 23.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida+macerado tipo 2 durante 11 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses		Tiempo 15 días
	Aceto orceina		Aceto orceina
	n=5		n=2
Long. corp.	1139,6	<	1340,7
Anch. máx.	426,1	>	410,2
Ø máx. VO	159,8	>	144,5
Ø mín. VO	152,4	>	137,0
Ø máx. VV	155,4	<	155,5
Ø mín. VV	145,7	>	145,5
Rel. VO/VV	1,09	>	0,88
Long. faringe	78,9	>	75,0
Anch. faringe	94,6	>	90,0
Ø máx. test. I	67,6	<	86,5
Ø mín. test. I	51,6	<	75,0
Ø máx. test. II	67,6	<	75,0
Ø mín. test. II	53,6	<	54,5
Ø máx. ovario	67,6	<	71,2
Ø mín. ovario	47,9	<	62,0
Dist. VO-VV	208,8	<	246,0
Dist. VV-TI	299,6	<	439,7
Superf. corp.	385694	<	433779

Tabla 24.- Brachylaima ruminiae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 durante 15 días con las correspondientes a metacercarias control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses  Carmin de Grenacher  n=14		Tiempo 15 días  Carmin de Grenacher  n=5		Edad 15 días  Carmin de Grenacher  n=12
Long. corp.	1334,3	>	1292,7	<	2602,9
Anch. máx.	507,0	>	443,0	<	526,9
Ø máx. VO	173,7	<	174,9	<	203,8
Ø mín. VO	168,6	>	160,6	<	187,1
Ø máx. VV	156,5	<	171,1	<	194,7
Ø mín. VV	150,9	<	159,1	<	182,0
Rel. VO/VV	1,23	>	1,04	<	1,07
Long. faringe	75,6	<	94,7	<	98,2
Anch. faringe	102,2	<	117,0	<	117,6
Ø máx. test. I	70,1	<	71,4	<	270,4
Ø mín. test. I	49,1	<	57,1	<	240,4
Ø máx. test. II	80,0	>	64,6	<	288,8
Ø mín. test. II	50,2	<	52,6	<	242,2
Ø máx. ovario	60,6	<	65,3	<	207,9
Ø mín. ovario	49,7	<	51,1	<	156,7
Dist. VO-VV	283,8	>	262,5	<	375,8
Dist. VV-TI	362,1	<	375,8	<	1115,8
Superf. corp.	531993	>	457362	<	1121265

Tabla 25.- Brachylaima ruminae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida+Medio B+macerado tipo 2 durante 15 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2	Edad 14 meses  Carmín de Grenacher  n=14		Tiempo 19 días  Carmín Grenacher + Red Fast Salt B + Carmín de Gower  n=6		Edad 18 días  Carmín de Grenacher  n=12
Long. corp.	1334,3	>	1290,1	<	2679,7
Anch. máx.	507,0	>	387,7	<	558,5
Ø máx. VO	173,7	>	170,7	<	209,4
Ø mín. VO	168,6	>	155,2	<	194,2
Ø máx. VV	156,5	>	164,5	<	198,2
Ø mín. VV	150,9	>	150,1	<	185,4
Rel. VO/VV	1,23	>	1,10	<	1,11
Long. faringe	75,6	<	89,5	<	100,1
Anch. faringe	102,2	<	123,8	>	119,2
Ø máx. test. I	70,1	=	70,1	<	254,2
Ø mín. test. I	49,1	<	53,8	<	228,2
Ø máx. test. II	80,0	>	73,3	<	266,9
Ø mín. test. II	50,2	<	53,9	<	236,4
Ø máx. ovario	60,6	<	65,1	<	185,1
Ø mín. ovario	44,7	<	55,7	<	155,5
Dist. VO-VV	283,8	>	254,6	<	459,7
Dist. VV-TI	362,1	<	459,7	<	1051,2
Superf. corp.	531993	>	392653	<	1131342

Tabla 26.- Brachylaima ruminae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 durante 19 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

19 y son comparados con los proporcionados por los individuos experimentales de 12 días de edad obtenidos en los hospedadores definitivos, expuestos en la Tabla 6 D . En este estudio comparativo únicamente intervienen los datos correspondientes a los individuos cultivados teñidos con Carmín de Grenacher, por ser esta tinción la empleada en los adultos control. Los valores medios de las medidas corporales correspondientes a ambos grupos de vermes nos permiten confeccionar la Tabla 23 para su comparación.

Los individuos cultivados a lo largo de 15 días y teñidos con Carmín de Grenacher presentan unas medidas corporales que quedan indicadas en la Tabla 23 y que son comparadas con las propias de los adultos experimentales de 15 días de edad obtenidos en los hospedadores definitivos, expresadas en la Tabla 6 D. Los valores medios de las medidas corporales correspondientes a ambos grupos de vermes son expuestos en la Tabla 25 para su mejor comparación.

Los vermes cultivados durante 19 días y sometidos, tanto a tinción con Carmín de Grenacher como a tinción con Red Fast B Salt y Carmín de Gower, presentan unas dimensiones medias, expuestas en la Tabla 21 , que son comparadas con los valores medios de las medidas corporales de los adultos de 18 días de edad obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos, las cuales están indicadas en la Tabla 6 D. Ambos grupos de valores medios son expuestos en la Tabla 26 para su más fácil comparación.

#### 5.3.2.5.- FASE SOLIDA + MEDIO C ó MEDIO D + MACERADO TIPO 2

Incluimos en este apartado aquellos medios bifásicos en cuya fase líquida introducimos el medio químicamente definido denominado CMRL 1066, que sustituye al medio M 199 empleado en todos los medios de cultivo estudiados anteriormente. Hemos de indicar que, en los medios de cultivo de los que ahora nos ocupamos, únicamente nos es posible proporcionar algunos datos correspondientes al desarrollo de los cultivos durante 6 días, ya que a partir de este momento todos ellos aparecen contaminados, circunstancia que determina la finalización de la experiencia.

La aparición de contaminación en estos medios de cultivo puede presentar orígenes diversos. Entre ellos hemos de considerar, en primer lugar, la

posibilidad de haber introducido dicha contaminación durante el curso de los procesos de preparación de los medios de cultivo. Así, pudiera haberse contaminado el medio CMRL 1066 en el transcurso de las operaciones llevadas a cabo para reconstruir este medio líquido a partir de su presentación comercial en polvo, pero, como ya se ha indicado anteriormente (véase apartado 2.2.6.1.1), estos medios de cultivo, tras su preparación, son incubados a 37 °C durante un período de tiempo prudencial antes de ser utilizados, para ratificar su esterilidad. Por otra parte, el suero bovino fetal que se adiciona al medio CMRL 1066 no presenta contaminación en su frasco de almacenaje y el macerado tipo 2 que entra a formar parte de los medios de cultivo tampoco desarrolla ningún tipo de contaminación en su frasco de almacenaje. El suero bovino neonatal que constituye la fase sólida de los medios bifásicos ha sido empleado simultáneamente en otros cultivos que no han desarrollado contaminación.

En estas condiciones podemos suponer que dicha contaminación proviene del material de cultivo, es decir, de las metacercarias procedentes del caracol segundo hospedador intermediario que, aunque sometidas a lavados previos (véase apartado 2.2.6.4), se han mantenido contaminadas. Otra posible vía de contaminación pudiera ser la manipulación de los tubos de cultivo ya preparados para practicar, en su fase sólida, una serie de agujeros que son realizados con una pipeta Pasteur supuestamente estéril.

Como consecuencia, en los dos apartados siguientes, nos hemos de limitar a describir brevemente la composición de los medios de cultivo y las observaciones llevadas a cabo durante los 6 días a lo largo de los cuales se desarrolla la experiencia.

#### 5.3.2.5.1.- COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Son utilizados dos medios de cultivo bifásicos, cuyas fases sólidas están constituidas, ambas, por suero bovino neonatal coagulado. En la composición de sus fases líquidas se introduce el medio químicamente definido denominado CMRL 1066, que es algo más complejo que el medio M 199 hasta aquí utilizado (véase apartado 2.1.2.3.1). Se adiciona a este medio CMRL 1066, suero bovino fetal en una proporción del 60% (Medio C) o bien del 20% (Medio D)

y una pequeña cantidad (aproximadamente un 4%) de macerado tipo 2, en cuya composición intervienen suero bovino neonatal, extracto de embrión bovino y solución salina fisiológica Hanks.

Estos medios presentan una complejidad máxima, si consideramos la composición de todos los medios bifásicos ensayados. Los factores de crecimiento que en ellos intervienen son comunes a algunos de los restantes medios bifásicos, pero en ellos se utiliza el medio CMRL 1066, que presenta una composición más compleja, como ya hemos indicado.

#### 5.3.2.5.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Transcurridas 24 horas desde el inicio del cultivo, se lleva a cabo la primera observación del mismo, que nos presenta individuos vivos, la mayor parte de los cuales se encuentran en el interior de los agujeros practicados en la fase sólida. Estos individuos aparecen muy activos, mostrando frecuentes contracciones corporales y movimientos de las ventosas y de los ciegos intestinales. Tras 3 días de cultivo la mayor parte de individuos siguen en el interior de los agujeros, observándose una disminución en la actividad de los mismos, así como la presencia de dilataciones anormales en los ciegos intestinales de algunos vermes. Observados los cultivos tras 6 días de desarrollo de los mismos, hemos de indicar que todos los individuos se encuentran absolutamente inmóviles, habiendo adquirido una tonalidad oscura. La mayor parte de ellos están replegados sobre sí mismos. Realizada esta observación, se finaliza el cultivo.

#### 5.3.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS

Los medios de cultivo semisólidos ensayados por nosotros están constituidos principalmente por yema y albúmina de huevo de gallina. Estas sustancias presentan unas características fisico-químicas tales que confieren al medio de cultivo en cuya composición entran, una cierta consistencia muy superior, obviamente, a la que presenta un medio líquido pero que, simultáneamente permite el movimiento de los vermes en él cultivados. Ahora bien, el examen del medio de cultivo mediante un microscopio invertido es dificultoso

pues el medio no es transparente. La principal desventaja que presentan, tanto la yema como la albúmina de huevo de gallina, estriba en que su composición bioquímica es extremadamente compleja y su fraccionamiento, para determinar cuales de sus componentes podrían ser necesarios para el crecimiento de los vermes, es extremadamente difícil. El origen de estas sustancias, así como la preparación de los medios de cultivo semisólidos, han sido expuestos en capítulos anteriores (véase apartados 2.2.1.6.3 y 2.2.6.1.4. C)).

#### 5.3.3.1.- MEDIO E

##### 5.3.3.1.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio de cultivo semisólido presenta en su composición yema y albúmina de huevo de gallina, adicionándose a estas sustancias un factor de crecimiento, extracto de embrión bovino, y una cierta cantidad de Medio D, el cual está constituido por el medio químicamente definido CMRL 1066, al que se ha adicionado suero bovino fetal en una proporción del 20%. El medio presenta los componentes enumerados en una proporción de 2:1:1:3 respectivamente. Se trata, pues, de un medio de cultivo muy complejo, en el que intervienen varios factores de crecimiento que se presentan también en los medios de cultivo bifásicos, tales como suero bovino fetal y extracto de embrión bovino, no estando presente suero bovino neonatal, que sí lo estaba en todos los medios bifásicos, como constituyente único de sus fases sólidas. Además, el medio semisólido presenta yema y albúmina de huevo de gallina como componentes originales.

##### 5.3.3.1.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

El cultivo en este medio semisólido se desarrolla por espacio de 7 días al cabo de los cuales no se observa ningún tipo de actividad en los vermes en cultivo, por lo que éste se da por finalizado. El cultivo se observa cada 24 horas mediante un microscopio invertido, si bien hemos de indicar que dicha observación es dificultosa por la relativa opacidad del medio.

La primera observación, realizada 24 horas después del inicio del cultivo, nos sitúa ante vermes vivos en su totalidad y activos, mostrando movimientos corporales aparentes. El contenido de los ciegos intestinales no es distinguible. Esta situación se mantiene hasta el día 3 de cultivo, durante el cual se observa una sensible disminución de la actividad de los individuos en cultivo. Dicha actividad disminuye paulatinamente a lo largo de los siguientes días de cultivo, para llegar a observarse una total inactividad en todos los vermes al ser alcanzado el día 7 de cultivo.

#### 5.3.3.1.3.- OBSERVACION MICROSCOPICA DE ESPECIMENES FIJADOS Y TEÑIDOS

Transcurridos 7 días desde el inicio del cultivo, se da por finalizado el mismo y los vermes son extraídos del medio y lavados en solución salina fisiológica Hanks. La observación de estos vermes al microscopio in vivo, entre portaobjetos y cubreobjetos, nos sitúa ante individuos vivos, pero con una actividad disminuida, tanto en los movimientos corporales como en los movimientos de los ciegos intestinales, en cuyo interior se observa la presencia de un cierto contenido, que no era apreciable por observación directa de los cultivos. Estos vermes son posteriormente fijados y teñidos con Red Fast B Salt y sus características morfológicas expuestas a continuación.

##### A) TEGUMENTO

El tegumento presentado por estos vermes ofrece un aspecto, en general, normal, si bien en un individuo se observa una cierta alteración puntual del mismo, presentando una protuberancia que rodea a un pequeño espacio algo alterado. En el extremo anterior de estos vermes y lateralmente, hasta el nivel acetabular, el tegumento exhibe una espinulación bastante aparente y más semejante a la presentada por los adultos que a la propia de las metacercarias.

##### B) PARENQUIMA

El parénquima de los vermes cultivados presenta un aspecto normal, apre-

ciándose bien las células parenquimáticas mediante la tinción empleada. No se observa alteraciones estructurales mediante microscopía óptica.

#### C) VENTOSAS

Las ventosas, tanto oral como ventral, están bien estructuradas y presentan límites muy definidos, continuos y una musculatura radial perfectamente apreciable, en la que no se observa alteraciones estructurales en microscopía óptica.

#### D) APARATO DIGESTIVO

Los vermes en estudio presentan una faringe bien conformada, con límites continuos y definidos. Su forma es la típica de estos vermes, tanto de las metacercarias como de los adultos, y se aprecia una musculatura normal en sus paredes. Los ciegos intestinales se extienden hasta el extremo posterior del cuerpo como era de esperar, y sus bordes son evidentes, continuos, sin presentar alteraciones morfológicas apreciables ni dilataciones anormales. La observación in vivo de estos individuos, entre portaobjetos y cubreobjetos, permitió detectar la presencia de un cierto contenido en los ciegos intestinales, que no es ya observable en los vermes teñidos.

#### E) APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Los testículos se presentan muy reducidos en tamaño y poco evidentes, aunque sus límites son continuos. El contenido testicular es uniforme y no se observa la presencia de "islotos" de células como hemos destacado en vermes procedentes de otros medios de cultivo. Este hecho, y teniendo en cuenta que no se ha practicado tinción con aceto-orceína, parece indicar que no ha habido maduración en las gónadas masculinas, si bien estos órganos no presentan ningún tipo de degeneración morfológica apreciable mediante microscopía óptica. Los conductos eferentes no son observables. La bolsa del cirro presenta un tamaño reducido, si se compara con la propia de individuos adultos

de esta edad obtenidos en los hospedadores definitivos.

#### *F) APARATO REPRODUCTOR FEMENINO*

Los vermes procedentes del medio de cultivo en estudio muestran un ovario reducido, pero fácilmente observable, con límites continuos y con un contenido aparentemente normal. Las glándulas vitelógenas no parecen ser funcionales, pues no se ha observado ningún tipo de contenido vitelino en sus folículos que, en caso de existir, hubiera sido bien evidenciado mediante la tinción practicada con Red Fast B Salt. No existe tampoco ningún tipo de contenido vitelino en el reservorio vitelino ni en el útero. El tubo uterino manifiesta un recorrido normal con escasísimas circunvoluciones, por lo que resulta más similar al presentado por las metacercarias control que por los adultos de referencia, aunque no aparece ningún tipo de alteración morfológica.

#### 5.3.3.1.4.- ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO

En este apartado estudiamos comparativamente los datos morfométricos aportados por los vermes cultivados en el medio semisólido constituido por yema + albúmina + BEE<sub>50</sub> + Medio D (CMRL 1066 + 20% FCS). Estos vermes son sometidos a tinción con Red Fast B Salt y Carmín de Gower y sus medidas corporales son comparadas con las aportadas por las metacercarias de referencia teñidas con Carmín de Grenacher, así como con las medidas tomadas sobre los adultos de 7 días de edad obtenidos experimentalmente en los hospedadores definitivos, también teñidos con Carmín de Grenacher.

#### *A) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON METACERCARIAS CONTROL*

Compararemos aquí únicamente los datos morfométricos correspondientes a los vermes cultivados durante 7 días, que son expresados en la Tabla 27, y los correspondientes a las metacercarias control que quedan indicados en la Tabla 5. A partir de los valores medios de las mediciones referidas a am-

bos grupos de vermes construímos la Tabla 28 que permite su comparación.

#### *B) ESTUDIO MORFOMETRICO COMPARATIVO CON ADULTOS CONTROL*

En este apartado nos referimos a los datos morfométricos proporcionados por los individuos cultivados durante 7 días, que son expuestos en la Tabla 27 y que se compara con las medidas mostradas por los adultos experimentales de 7 días de edad obtenidos en los hospedadores definitivos, las cuales quedan indicadas en la Tabla 6 C. Los valores medios de las medidas corporales de ambos grupos de vermes son expuestos en la Tabla 28 para facilitar su comparación.

#### 5.3.3.2.- MEDIO F

##### 5.3.3.2.1.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Este medio semisólido está constituido por yema y albúmina de huevo de gallina, habiéndose adicionado a estas sustancias una cierta cantidad de medio D, en cuya composición se encuentra el medio químicamente definido denominado CMRL 1066, al que se ha adicionado suero bovino fetal en una proporción del 20%. El medio semisólido presenta los componentes que hemos enumerado en una proporción de 1:2:3 respectivamente. En este medio semisólido se incluye un único factor de crecimiento, suero bovino fetal, ya que no está presente el otro factor de crecimiento que interviene en el medio semisólido anteriormente estudiado, extracto de embrión bovino.

##### 5.3.3.2.2.- OBSERVACION MICROSCOPICA DIRECTA DE ESPECIMENES EN CULTIVO

Desarrollamos el cultivo en este medio semisólido únicamente por espacio de 3 días, al cabo de los cuales no se observa ningún tipo de actividad en los vermes en cultivo, por lo que éste se da por finalizado. Se lleva a cabo observaciones diarias del cultivo, que entrañan cierta dificultad, debido a

Medio de cultivo	Medio E	
	7 días	
	Red Fast Salt B + Carmín de Gower	
Tinción	n=2	
	V.E.	$\bar{x}$
Long. corp.	999-907,5	954,2
Anch. máx.	462-417,5	439,7
Vent. oral	161,5-157,5/154-150	159,5/152
Acetábulo	169-142,5/142,5	155,7/142,5
Rel. VO/VV	1,16-1,03	1,09
Faringe	75-64/86,5-82,5	69,5/84,5
Test. I	41,5-30/30	35,7/30
Test. II	41,5-30/34-26,5	35,7/30,2
Ovario	41,5-30/30-26,5	35,7/28,5
Huevos	-	-
Dist. VO-VV	164-149	156,5
Dist. VV-TI	253,5-235,5	246
Superf. VO	19523-18545	19034
Superf. VV	18904-15940	17422
Sup. corp.	329848-327409	328629
VO-VV/Long.	0,164	0,164

Tabla 27.- Brachylaima ruminiae: dimensiones en  $\mu\text{m}$  de los vermes cultivados en Medio E durante 7 días (superficies en  $\mu\text{m}^2$ ).

MEDIO DE CULTIVO	METACERCARIAS CONTROL		VERMES CULTIVADOS		ADULTOS CONTROL
	Edad 14 meses		Tiempo 7 días		Edad 7 días
Medio E	Carmin de Grenacher		Ped Fast Salt B + Carmin de Gower		Carmin de Grenacher
	n=14		n=2		n=14
Long. corp.	1334,3	>	954,2	<	2085,0
Anch. máx.	507,0	>	439,7	<	576,2
∅ máx. VO	173,3	>	159,5	<	199,7
∅ mín. VO	168,6	>	152	<	186,2
∅ máx. VV	156,5	>	155,7	<	187,1
∅ mín. VV	159,9	>	142,5	<	174,5
Rel. VO/VV	1,23	>	1,09	<	1,14
Long. faringe	75,6	>	69,5	<	95,8
Anch. faringe	102,2	>	84,5	<	111,8
∅ máx. test. I	70,1	>	35,7	<	203,1
∅ mín. test. I	49,1	>	30,0	<	182,5
∅ máx. test. II	80,0	>	35,7	<	231,7
∅ mín. test. II	50,2	>	30,2	<	190,6
∅ máx. ovario	60,6	>	35,7	<	169,4
∅ mín. ovario	49,7	>	28,5	<	142,8
Dist. VO-VV	283,8	>	156,5	<	246,0
Dist. VV-TI	362,1	>	246,0	<	654,9
Superf. corp.	531993	>	328629	<	959002

Tabla 28.- Brachylaima ruminae: comparación de las dimensiones corporales de los vermes cultivados en Medio E durante 7 días con las correspondientes a metacercarias y adultos control; dimensiones en  $\mu\text{m}$  y superficies en  $\mu\text{m}^2$ .

la opacidad del medio.

En la observación llevada a cabo una vez transcurridas 48 horas desde el inicio del cultivo, se presentan individuos vivos, pero ya muy poco activos, algunos de los cuales muestran los ciegos intestinales anormalmente dilatados, siendo indistinguible el contenido de los mismos. Transcurridas 24 horas desde la anterior observación, los individuos se muestran absolutamente inmóviles, con ciegos dilatados y totalmente inactivos, dándose por finalizado el cultivo.

#### 5.4.- ESTUDIO COMPARATIVO GENERAL

En los apartados anteriores hemos expuesto los resultados obtenidos en cada uno de los medios de cultivo ensayados. Disponemos de los datos aportados por la observación diaria del desarrollo de todos los cultivos mediante un microscopio invertido, los cuales nos proporcionan una valiosa información sobre el comportamiento de los vermes en cultivo, es decir, sobre su actividad corporal, actividad de los ciegos intestinales, contenido de los mismos, aparición de sustancia vitelina en glándulas vitelógenas, etc. Asimismo, disponemos de vermes procedentes de la mayor parte de los distintos medios de cultivo que han sido fijados y teñidos, el estudio microscópico de los cuales aporta importantes datos sobre las características morfológicas de sus diversos órganos, permitiéndonos conocer el mayor o menor desarrollo de los mismos y la evolución presentada por dichos órganos. La información procurada por estas dos vías viene completada por el estudio morfométrico llevado a cabo sobre los individuos procedentes de los distintos medio ensayados, que nos permite compararlos con las metacercarias y los adultos utilizados como control. Todos los datos así obtenidos nos permiten evaluar cada uno de los medios de cultivo ensayados.

En los apartados siguientes estudiaremos globalmente las informaciones referidas a aquellos medios de cultivo cuya composición presenta unas características similares, Así, trataremos de evaluar conjuntamente, en primer lugar todos los medios monofásicos, continuando con los medios bifásicos, para concluir con los medios semisólidos. En cada uno de estos apartados intentaremos dilucidar cuál es el medio que ha proporcionado mejores resultados,

atendiendo a todos los datos de que disponemos. Por último, estudiaremos comparativamente los resultados obtenidos en medios monofásicos, en bifásicos y en semisólidos para llegar a proponer aquel medio que presenta resultados óptimos.

#### 5.4.1.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO MONOFASICOS

Hemos ensayado tres medios de cultivo monofásicos diferentes. El primero de ellos, Medio A (M 199 + 20% FCS) + macerado tipo 1 (NBBS + Hanks), incluye dos factores de crecimiento, suero bovino fetal y suero bovino neonatal, de los cuales el primero se presenta en una proporción inferior a aquella en que se incluye en los dos medios monofásicos restantes. Los individuos cultivados en este medio y observados mediante un microscopio invertido presentan un importante nivel de actividad durante los primeros días de cultivo e incluso un alto contenido de partículas sólidas de macerado en el interior de sus ciegos intestinales. Ahora bien, tanto la actividad corporal como el contenido intestinal de estos vermes, disminuyen paulatinamente a lo largo de los siguientes días de cultivo y transcurridos 7 días desde el inicio del mismo se observa, no únicamente un nivel mínimo de actividad, sino el inicio de procesos de degeneración en la mayoría de los individuos, de tal modo que a partir del día 13 de cultivo la inactividad de los vermes es total. A lo largo de los 23 días durante los cuales se desarrolla el cultivo en este medio, no se observa ningún desarrollo gonadal ni aparición de sustancia vitelina en ninguno de los vermes en cultivo.

Los datos anteriores parecen indicar que el medio monofásico en estudio no es adecuado para la consecución de un mantenimiento de los vermes cultivados. Este medio no parece provocar la muerte de los vermes en un período de tiempo corto e incluso permite a estos individuos mantener un nivel de actividad aceptable durante un cierto período de tiempo, pero no parece proporcionar el soporte adecuado para un mantenimiento de dichos vermes durante períodos de tiempo largos. Los individuos en cultivo no únicamente cesan totalmente en su actividad corporal al cabo de un período de tiempo largo de cultivo, sino que se presentan degenerados, mostrando un aspecto externo muy distinto al que les es propio.

El Medio A + macerado tipo 1 no constituye, en modo alguno, un medio adecuado para conseguir una evolución de los vermes en cultivo. Así, las metacercarias inoculadas en dicho medio no presentan un desarrollo gonadal observable, aunque al no disponer de tinciones en aceto-orceína de estos individuos, no nos encontramos en condiciones de afirmar o negar taxativamente que pueda ocurrir una cierta maduración en gónadas. Las glándulas vitelógenas no parecen sufrir ningún tipo de evolución, ya que, como hemos indicado, no se observa ningún tipo de sustancia vitelina en su interior, así como tampoco es observable ningún tipo de contenido en el reservorio vitelino.

Teniendo en cuenta, además, que todos los vermes aparecen muertos al concluir el cultivo e incluso degenerados, hasta el punto de que es imposible conseguir la fijación y tinción de los mismos, nos es posible afirmar que el Medio A + macerado tipo 1 no sólo no proporciona los requerimientos nutricionales necesarios para la evolución de las metacercarias, ni tampoco aquellos que pudieran ser necesarios para su mantenimiento, sino que incluso provoca la total degeneración y muerte de los individuos en él cultivados.

El segundo medio de cultivo monofásico ensayado, Medio B, incluye en su composición únicamente el medio químicamente definido M 199, al que se adiciona un 60% de suero bovino fetal, siendo este último el único factor de crecimiento presentado por dicho medio. Los vermes son cultivados en este medio durante un período de tiempo muy corto, 2 días, tras el cual son sometidos a tinción con aceto-orceína para evidenciar la presencia o ausencia de maduración gonadal. A lo largo del corto período de tiempo de cultivo, los vermes aparecen vivos y activos, aunque firmemente adheridos entre sí mediante sus ventosas. Las características morfológicas de estos vermes, en los que se refiere a su tegumento, parénquima, ventosas, aparato digestivo, aparato reproductor masculino y aparato reproductor femenino, son absolutamente normales, no apreciándose ningún tipo de degeneración en los órganos estudiados. El examen extemporáneo de los mismos, sometidos a tinción con aceto-orceína, no pone de manifiesto ningún tipo de maduración en la cromatina gonadal. Las glándulas vitelógenas no presentan ningún tipo de contenido vitelino, siendo su aspecto muy similar al presentado por las glándulas vitelógenas de las metacercarias de referencia.

El estudio morfométrico comparativo de los vermes evidencia que éstos han experimentado un crecimiento en longitud y en anchura corporales, respec-

to a las metacercarias control, pero sus gónadas presentan un tamaño muy similar al presentado por los testículos y el ovario de dichas metacercarias control. Sin embargo, hemos de destacar que los vermes cultivados presentan unas dimensiones corporales algo inferiores a las correspondientes a los individuos control de 2 días de edad. Los testículos de los individuos cultivados muestran una espectacular reducción respecto a las gónadas masculinas de los individuos de referencia y ocurre algo similar con el ovario, si bien en este caso la reducción experimentada por dicho órgano, en los individuos cultivados, no es tan intensa como la experimentada por los testículos.

Considerando las observaciones expuestas en líneas anteriores podemos indicar que el Medio B permite llevar a cabo un cierto mantenimiento de los vermes, si bien nuestra experiencia se limita a un período de tiempo muy corto y bien pudiera presentarse una cierta degeneración durante períodos de cultivo más dilatados. Este medio de cultivo permite un crecimiento de los vermes respecto a las metacercarias de partida, pero estos vermes no llegan a adquirir las dimensiones corporales propias de los individuos de su misma edad obtenidos en los hospedadores definitivos. Por otra parte, no se manifiesta ningún tipo de crecimiento en gónadas, sino que, por el contrario, tanto los testículos como el ovario de los vermes en cultivo presentan una importantísima reducción en su tamaño, si se compara con el tamaño presentado por estos órganos en los individuos control de 2 días de edad, aunque el tamaño de las gónadas de los vermes cultivados es muy similar al presentado por las gónadas de las metacercarias. Esto parece indicar que el medio de cultivo permite un mantenimiento del tamaño de las gónadas, aunque siempre respecto a un período de tiempo muy corto, pero no soporta el crecimiento de dichos órganos. El Medio B no permite conseguir una evolución de las metacercarias inoculadas en el mismo ya que no hay maduración gonadal ni aparición de sustancia vitelina, si bien hemos de tener en cuenta que el período de cultivo ha sido extremadamente corto.(Fig. 133).

El último medio de cultivo monofásico ensayado, Medio B (M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 2 (NBBS + BEE<sub>50</sub> + Hanks), presenta la composición más compleja empleada en el grupo de los medios monofásicos. El factor de crecimiento suero bovino fetal entra en una proporción igual a la presentada por el medio anterior, Medio B, pero en una proporción tres veces superior a aquella que presenta el primer medio de que hemos tratado, Medio A + macerado ti-

po 1. El suero bovino neonatal es común al medio en estudio y a este último medio, pero el factor de crecimiento extracto de embrión bovino únicamente está presente en el macerado tipo 2.

Los vermes son cultivados en este medio a lo largo de 23 días. Estos vermes muestran una gran actividad corporal durante los primeros días de cultivo acompañada por una considerable actividad de los ciegos intestinales que presentan un alto contenido en partículas de macerado ingeridas. La actividad de los vermes y su contenido intestinal disminuyen paulatinamente, pero los vermes se mantienen vivos hasta el final del cultivo. Los individuos cultivados presentan algunas alteraciones tegumentarias y parenquimáticas, pero las características morfológicas de sus ventosas, aparato digestivo y aparatos reproductores masculino y femenino son las propias de dichos vermes. No se observa ningún tipo de maduración en gónadas mediante tinción con aceto-orceína, pero sí ha tenido lugar una evolución en las glándulas vitelógenas, pues en algunos individuos se observa contenido vitelino en su interior.

El estudio morfométrico comparativo de los vermes con las metacercarias control revela que los individuos cultivados presentan unas dimensiones muy inferiores a las de las metacercarias control y por supuesto, muy inferiores a las dimensiones propias de adultos control de 21 días.

Teniendo en cuenta estos datos hemos de destacar que el medio monofásico Medio B + macerado tipo 2 no permite el mantenimiento de los vermes por un período de tiempo largo, ya que provoca en los mismos una degeneración tegumentaria y de parénquima, si bien no llega a producir la muerte de dichos individuos. Este medio, obviamente, no soporta ningún tipo de evolución en testículos, sino que, por el contrario, provoca una reducción testicular muy importante, con lo cual los testículos de los vermes cultivados son inferiores incluso a las gónadas masculinas de las metacercarias control. El Medio B + macerado tipo 2 provoca, asimismo, una reducción en el ovario de gran importancia y no consigue ningún tipo de evolución en este órgano. Ahora bien, algunos vermes cultivados en este medio presentan una evolución en sus glándulas vitelógenas, pues aparece en ellas sustancia vitelina, hecho que implica la existencia en el medio de cultivo de los requerimientos nutricionales adecuados para la síntesis de esta sustancia por parte de los vermes en cultivo e implica, igualmente, que dichos factores nutritivos se encuentran en el medio de cultivo en la forma adecuada para ser absorbidos por los individuos.

Así, hemos de destacar que el Medio A + macerado tipo 1 es el medio monofásico que ofrece condiciones menos favorables para el desarrollo de los vermes, no siendo recomendable utilizarlo como medio de mantenimiento ni mucho menos como medio de evolución de los vermes, pues provoca la muerte de los mismos en períodos de tiempo suficientemente largos. Por lo que se refiere al Medio B, únicamente disponemos de datos referidos a un tiempo de cultivo muy corto, durante el cual los vermes no sufren ningún tipo de regresión en las dimensiones de sus órganos e incluso experimentan un cierto crecimiento en su longitud corporal, por lo que este medio podría ser utilizado como medio de mantenimiento, aunque siempre durante un tiempo breve. El tercer medio monofásico ensayado, Medio B + macerado tipo 2, es el único de estos medios en que los vermes experimentan una cierta evolución pues desarrollan sustancia vitelina en el interior de las glándulas vitelógenas, si bien es necesario mantener a dichos individuos en cultivo durante un largo período de tiempo (17 días) antes de que ésto suceda. Este hecho parece indicar que las sustancias incluidas en la composición de dicho medio son necesarias para impulsar o iniciar la evolución de las glándulas vitelógenas. Sin embargo, no se observa ningún tipo de evolución en las gónadas de los individuos cultivados en este medio, quienes, por el contrario, sufren una importante regresión en el tamaño de sustestículos y ovario que llegan a ser inferiores, en sus dimensiones, a las gónadas de las metacercarias de partida. Además, los individuos inician una degeneración en su tegumento y en su parénquima. Todo ésto nos lleva a considerar al Medio B + macerado tipo 2 como el punto de partida necesario para llegar a un medio de cultivo óptimo, que procure los requerimientos nutricionales para conseguir la evolución de las metacercarias a adultos. Ahora bien, hemos de tener en cuenta que los datos obtenidos respecto al Medio B nos indican que dicho medio puede constituir, asimismo, un punto de partida para el cultivo de los vermes, pero no conocemos cómo evolucionarían éstos en él a lo largo de un período de cultivo suficientemente prolongado.

#### 5.4.2.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO BIFASICOS

Todos los medios bifásicos ensayados presentan una fase sólida común y difieren entre sí en la composición de sus respectivas fases líquidas. Únicamente consideramos en este apartado, los resultados obtenidos en aquellos me-

dios bifásicos cuya fase líquida incluye el medio químicamente definido M 199, ya que hemos ensayado dos medios bifásicos en cuya fase líquida el medio M 199 es sustituido por el medio CMRL 1066, pero estos medios presentan contaminación, como ya indicamos anteriormente (véase apartado 5.3.2.5), y no consideramos válidas las observaciones realizadas en ellos.

El medio bifásico más sencillo, fase sólida + Medio A (M 199 + 20% FCS), incluye dos factores de crecimiento: suero bovino neonatal como único constituyente de la fase sólida y suero bovino fetal que entra a formar parte del Medio A. Los individuos cultivados en este medio mantienen un nivel de actividad aceptable a lo largo de los seis primeros días de cultivo, transcurridos los cuales esta actividad disminuye paulatinamente. En el día ocho de cultivo aparecen ya los primeros vermes degenerados, cuyo número va aumentando progresivamente. A pesar de que en el día 16 de cultivo apareciera sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas de un verme, todos los individuos se presentan muertos al dar por finalizado el cultivo, habiendo transcurrido 23 días desde su inicio.

Considerando los anteriores resultados, podemos indicar que el medio bifásico de que tratamos no soporta un mantenimiento correcto de los vermes durante períodos de tiempo prolongados si bien parece permitir que dichos individuos mantengan un nivel aceptable de actividad durante períodos de tiempo cortos (6 días), sobrepasados los cuales parecen iniciarse procesos degenerativos en los vermes cultivados.

El medio constituido por fase sólida + Medio A no parece permitir una evolución de las gónadas de los vermes en él cultivados, ya que las observaciones realizadas en el transcurso de los cultivos no permitieron apreciar en ningún momento un desarrollo gonadal. No obstante, dado que no disponemos de vermes cultivados en este medio fijados y teñidos, no podemos afirmar ni negar rotundamente este hecho. Ahora bien, aunque el medio en estudio permite la aparición de fenómenos degenerativos en la mayor parte de los vermes en cultivo, hemos observado que, simultáneamente, este medio induce una evolución en las glándulas vitelógenas de algún individuo, pues aparece sustancia vitelina, aunque en cantidades muy escasas, en su interior.

Así, y aunque el medio de que tratamos no pueda ser considerado como un medio en el que ocurre una evolución de los individuos en él cultivados, hemos de tener en cuenta que este medio ofrece la posibilidad de que esta evo-

lución se inicie, aún cuando sea necesario un período de cultivo largo. Ahora bien, parece ocurrir que el medio no proporciona a los vermes los requerimientos nutricionales que les son indispensables para mantenerse durante el largo período de cultivo previo al inicio de dicha evolución en sus glándulas vitelógenas, con lo cual los vermes sufren procesos degenerativos. Por otra parte hemos de considerar que los vermes mueren antes de dar por finalizado el cultivo, evidenciando así que las condiciones de carácter nutricional que el medio de cultivo les ofrece no son las adecuadas, no sólo para que tenga lugar una evolución progresiva en los mismos, sino incluso para su mantenimiento durante un período de tiempo prolongado.

El medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS), incluye los mismos factores de crecimiento que el anteriormente estudiado, fase sólida + Medio A (M 199 + 20% FCS), siendo estos factores de crecimiento suero bovino neonatal como constituyente único de la fase sólida y suero bovino fetal que entra a formar parte de la fase líquida, si bien este factor se encuentra en una proporción tres veces superior a aquellas en que aparece en la fase líquida del medio anteriormente estudiado.

Los individuos cultivados en este medio durante 20 días presentan un nivel de actividad muy alto durante los primeros días de cultivo, actividad que va disminuyendo paulatinamente a partir del día 5 de cultivo. El día 11 de cultivo aparece el primer individuo que presenta sustancia vitelina en las glándulas vitelógenas y a partir de este momento va aumentando el número de individuos que desarrollan esta sustancia hasta llegar a aparecer vermes que presentan sustancia vitelina en el reservorio vitelino e incluso en el inicio del útero. La observación in vivo de estos individuos entre portaobjetos y cubreobjetos nos ha permitido visualizar en un individuo el receptáculo seminal que aparece repleto de espermatozoides, indicando este hecho que ha ocurrido una evolución de las gónadas, al menos en este individuo. Las características morfológicas de los vermes cultivados en este medio son las propias de su especie, en lo que se refiere a su tegumento, parénquima, ventosas, aparato digestivo y aparatos reproductores masculino y femenino.

El estudio morfométrico comparativo de los individuos cultivados muestra que éstos han sufrido una regresión en sus dimensiones corporales, siendo muy inferiores a los adultos de referencia e incluso se muestran inferiores a las propias metacercarias de partida en cuanto a su longitud, anchura corporales,

ventosas, faringe y testículos. Por lo que se refiere al ovario, este órgano no ha sufrido una regresión tan importante como la experimentada por los testículos respecto a las metacercarias control.

Teniendo en cuenta los resultados indicados en líneas anteriores podemos apuntar que el medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B no permite un buen mantenimiento de los vermes a lo largo de períodos de tiempo prolongados, ya que causa una regresión muy importante en las medidas corporales de estos vermes. Sin embargo, este medio soporta un nivel de actividad aceptable en dichos vermes durante períodos de tiempo cortos (5-6 días). El medio en estudio parece aportar los requerimientos nutricionales necesarios para que los individuos en él cultivados inicien un proceso evolutivo en sus gónadas, llegando incluso a que sus gónadas masculinas produzcan espermatozoides. Asimismo, dicho medio induce una importante evolución en las glándulas vitelógenas de gran parte de los vermes en cultivo, las cuales presentan cantidades considerables de sustancia vitelina, evidenciando así su funcionalidad. El medio aporta a los individuos los factores nutritivos adecuados y en cantidad suficiente como para que la sustancia vitelina sintetizada por los mismos llegue a llenar el reservorio vitelino, presentándose incluso en el inicio del útero de algunos vermes. Este proceso evolutivo requiere, empero, un período de cultivo considerablemente largo.

Así, este medio bifásico, fase sólida + Medio B, soporta un cierto grado de evolución en los vermes cultivados pero, simultáneamente, ocurre una importante regresión en las dimensiones corporales de los mismos, por lo que este hecho parece indicar que, o bien el medio no aporta los requerimientos nutricionales que son necesarios a los vermes para conseguir un crecimiento general y una evolución sexual al mismo tiempo, o bien, aunque los aporte, no lo hace en cantidad suficiente para que los vermes desarrollen adecuadamente ambos procesos, crecimiento y evolución, con lo cual obliga a los individuos en cultivo a llevar a cabo uno de dichos procesos en detrimento del otro. Así, los vermes en cultivo parecen presentar una cierta tendencia a conseguir su evolución sexual aún a costa de experimentar, no únicamente un alto en su crecimiento, sino incluso una disminución muy patente de sus dimensiones corporales (Figs. 134, 135 y 136).

El medio de cultivo bifásico, constituido por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 1 (NBBS + Hanks), presenta los mismos facto-

res de crecimiento ya incluidos en la composición de los anteriores medios estudiados. Estos factores son suero bovino neonatal que constituye la fase sólida y entra a formar parte del macerado y suero bovino fetal que se adiciona al medio M 199. Ahora bien, la introducción de macerado en el medio proporciona a los vermes en cultivo la posibilidad de ingerir partículas sólidas de tamaño adecuado. En uno de los cultivos son extraídos algunos vermes una vez transcurridos 4 días de cultivo y tras 15 días de cultivo de los restantes individuos se adiciona sangre a dicho cultivo, manteniéndose el mismo durante 4 días más. En los restantes cultivos de este medio se prolonga el mismo por espacio de 18 y 20 días, transcurridos desde el inicio de los mismos.

Los vermes cultivados en este medio bifásico fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 presentan un nivel de actividad muy aceptable durante los cinco primeros días del mismo, con alto contenido de partículas de macerado en sus ciegos intestinales. En días sucesivos, tanto la actividad de los vermes como su contenido intestinal descienden muy ligeramente, pero se mantienen a lo largo de los restantes días de cultivo. En individuos de 4 días teñidos con aceto-orceína se detecta ya pequeñas cantidades de espermatozoides en sus testículos, observándose también esta misma circunstancia en individuos cultivados durante 19 días y teñidos con aceto-orceína. A partir del día 6 de cultivo se presenta sustancia vitelina en el interior de las glándulas vitelógenas de algunos especímenes, presentándose estos vermes en número creciente en los siguientes días, para llegar a observarse individuos con abundante contenido vitelino en el reservorio vitelino e inicio del útero a partir del día 18 de cultivo. Los individuos cultivados presentan unas características morfológicas en su tegumento, parénquima, ventosas, aparato digestivo y aparatos reproductores masculino y femenino que son los propios de dichos vermes. El tegumento parece experimentar una cierta evolución, pues los vermes cultivados durante 4 días muestran en él una espinulación débil, que pasa a ser más evidente en los vermes mantenidos en cultivo durante 18, 19 ó 20 días.

El estudio morfométrico de los vermes cultivados resulta algo complejo, pues disponemos de individuos de 4, 18, 19 y 20 días. En principio hemos de destacar el hecho de que todas las medidas presentadas por estos vermes, sea cual sea el período de tiempo durante el cual han sido cultivados, son inferiores a los datos morfométricos ofrecidos por los adultos experimentales,

obtenidos en los hospedadores definitivos y de una edad aproximada a la que presentan respectivamente los vermes cultivados. Por otra parte, los vermes cultivados durante 4 días presentan unas dimensiones corporales inferiores a las mostradas por las metacercarias control, con las únicas excepciones de las distancias medias entre ventosas y entre acetábulo y primer testículo, que son superiores en los vermes cultivados. Los vermes cultivados durante 18 días muestran los diámetros medios de sus gónadas ligeramente superiores a los presentados por las gónadas de las metacercarias control, pero hemos de destacar que esta superioridad se acentúa en lo que se refiere a las dimensiones del ovario. Las restantes medidas corporales son menores en los vermes cultivados que en las metacercarias de referencia. Los individuos cultivados durante 19 días presentan todas sus dimensiones corporales inferiores a las que muestran las metacercarias control y hemos de destacar que el ovario de aquellos vermes presenta unas dimensiones superiores a las de las gónadas masculinas. No olvidaremos que estos vermes proceden del cultivo concreto al que se adicionó sangre transcurridos 15 días desde su inicio, por lo que han permanecido bajo estas nuevas condiciones durante 4 días. Los vermes cultivados durante 20 días presentan todas sus dimensiones corporales superiores a las dimensiones de las metacercarias control, con la única excepción de la anchura corporal media, que es ligeramente superior en dichas metacercarias.

Las consideraciones expuestas parecen indicar que el medio de cultivo contituído por fase sólida + Medio B +macerado tipo 1 permite a los vermes mantener un nivel de actividad aceptable durante períodos de cultivo relativamente largos, sin olvidar que esta actividad es mucho más intensa en los cinco primeros días de cultivo. Este medio no parece permitir un mantenimiento correcto de los vermes en el mismo, por lo menos durante períodos de cultivo cortos, pues los vermes cultivados durante 4 días muestran una considerable regresión en la mayor parte de sus dimensiones corporales. Sin embargo, el medio permite un cierto crecimiento de los vermes, si estos se cultivan durante períodos de tiempo prolongados (20 días), ya que estos individuos muestran un sensible aumento de todas sus dimensiones corporales respecto a las propias de las metacercarias de partida. Por el contrario, podemos indicar que la adición de sangre a este medio de cultivo no parece favorecer el crecimiento de los vermes, ya que los individuos cultivados durante 4 días en estas condiciones y sometidos a un período de cultivo total de 19 días, muestran una regresión en sus dimensiones corporales respecto a las metacercarias de par-

tida y los diámetros medios de sus gónadas son sensiblemente inferiores a los de los individuos cultivados durante 18 días y muy inferiores a las dimensiones de las gónadas de individuos cultivados durante 20 días.

El medio de cultivo parece aportar los factores nutritivos requeridos por los vermes para iniciar un proceso evolutivo en sus testículos, ya que, tras un período de cultivo relativamente corto (4 días), se observa individuos que presentan espermatozoides en sus testículos, aunque en cantidad muy escasa. Al mismo tiempo, el medio de cultivo incluye en su composición las sustancias necesarias para conseguir un proceso evolutivo importante en las glándulas vitelógenas de los individuos en él cultivados, ya que éstos son capaces de sintetizar sustancia vitelina en cantidad importante y tras un período de cultivo relativamente corto (6 días) y transcurrido ya un período de cultivo más largo (18 días) se observa sustancia vitelina en el inicio del útero de gran parte de los individuos cultivados. Así, pues, este medio de cultivo presenta los factores nutricionales necesarios para iniciar procesos de evolución importantes en las gónadas masculinas y en las glándulas vitelógenas de los vermes y estos factores nutricionales están presentados en la forma adecuada para ser asimilados y utilizados por los vermes. Ahora bien, no se produce simultáneamente un proceso de crecimiento importante en los vermes cultivados, aunque sí ocurre un ligero aumento de sus dimensiones corporales, por lo que hemos de considerar que los vermes presentan requerimientos nutricionales más complejos que los ofrecidos por el medio de cultivo para conseguir un crecimiento y una evolución adecuados, o bien que, aun siendo adecuados los factores nutritivos presentados por el medio, no están en cantidad suficiente e incluso no se encuentran en su forma óptima. No hemos de olvidar que el suero bovino neonatal, incluido tanto en la fase sólida como en el macerado, lo está siempre en estado sólido, es decir, coagulado, y no entra a formar parte del medio de cultivo en estado líquido. Asimismo, el suero bovino fetal que entra a formar parte de la fase líquida se incluye siempre en este estado y no se presenta en estado sólido (Figs. 137, 138 y 139).

El último medio bifásico ensayado está constituido por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 2 (NBBS + BEE<sub>50</sub> + Hanks) y es el medio bifásico más complejo de los estudiados. Presenta tres factores de crecimiento tales como suero bovino neonatal, incluido en la fase sólida y en el macerado, suero bovino fetal, presente en la fase líquida como constituyente

del Medio B y extracto de embrión bovino que entra a formar parte del macerado. Este último factor entra a formar parte únicamente de este medio bifásico y no está presente en ninguno de los medios bifásicos anteriores.

Los vermes cultivados en este medio presentan un notable nivel de actividad corporal y un alto contenido de partículas de macerado en sus ciegos intestinales durante los seis primeros días de cultivo. A lo largo de los restantes días de cultivo y hasta el final del mismo, los vermes mantienen un nivel de actividad alto, así como un contenido de partículas de macerado en sus ciegos intestinales muy apreciable. Transcurridos 6 días desde el inicio del cultivo se observa sustancia vitelina en el interior de las glándulas vitelógenas de algunos individuos, cuyo número aumenta progresivamente a lo largo de los siguientes días de cultivo. Ya en el día 15 de cultivo aparecen los primeros vermes que muestran un importante contenido vitelino en su tubo uterino. Este contenido vitelino es discontinuo y determina unas estructuras intrauterinas que presentan una forma externa muy similar a la propia de los huevos de estos vermes, progresando dichos acúmulos de sustancia vitelina a lo largo del útero para llegar a alcanzar un nivel acetabular e incluso superior al mismo. Tanto en los individuos cultivados durante 11 días como en los cultivados durante 15 días, se aprecia pequeñas cantidades de espermatozoides en sus testículos, evidenciándose así la funcionalidad de dichas gónadas. Las características morfológicas mostradas por los individuos cultivados son las propias de los vermes de su especie, en los que se refiere a su tegumento, parénquima, ventosas, aparato digestivo y aparatos reproductores masculino y femenino. La espinulación ofrecida por el tegumento de estos especímenes es muy evidente y más semejante a la propia de los adultos que a la presentada por las metacercarias, circunstancia que parece indicar la existencia de una cierta evolución en el tegumento a lo largo del cultivo.

El estudio morfométrico de los vermes cultivados durante 11, 15 y 19 días nos muestra, en primer lugar, que todos ellos presentan unas dimensiones corporales muy inferiores a las medidas ofrecidas por los adultos experimentales, obtenidos en los hospedadores definitivos y de edades aproximadas a las de los vermes cultivados.

Los vermes cultivados durante 11 días teñidos con aceto-orceína presentan una longitud y una anchura corporales algo inferiores a las mostradas por las metacercarias sometidas a esta misma tinción. Ahorabien, las restantes me-

didias corporales son mayores en los vermes cultivados que en las metacercarias control, exceptuándose las correspondientes al primer testículo, órgano que experimenta una reducción en los vermes cultivados. Si comparamos los vermes cultivados teñidos con Carmín de Grenacher con las metacercarias control igualmente teñidas, podemos observar que aquellos presentan unas dimensiones corporales inferiores, en general, a las propias de dichas metacercarias, si bien hemos de destacar que el ovario de los vermes cultivados ha experimentado un cierto crecimiento y que las dimensiones del primer testículo son muy aproximadas en ambos grupos de vermes.

Los vermes procedentes de cultivo de 18 días de edad teñidos con aceto-orceína, presentan unas dimensiones corporales superiores a las que presentan las metacercarias control teñidas con aceto-orceína, exceptuándose las ventosas, tanto oral como ventral, que muestran un tamaño algo menor en los vermes cultivados que en las metacercarias control. Vermes procedentes del mismo cultivo teñidos con Carmín de Grenacher muestran un crecimiento en su acetábulo y faringe respecto a las metacercarias control sometidas a la misma tinción. Asimismo, el primer testículo ha experimentado un aumento en su tamaño y lo mismo ha ocurrido con el ovario. Es destacable también el hecho de que la distancia entre acetábulo y primer testículo ha experimentado un aumento en los vermes cultivados.

Los especímenes cultivados durante 19 días muestran, al igual que en el caso anterior, un crecimiento en su acetábulo y en su faringe, respecto a las metacercarias de partida. El primer testículo ha experimentado también un ligero aumento en sus dimensiones y se presenta esta misma situación en lo que se refiere al ovario, si bien el crecimiento mostrado por la gónada femenina es algo superior. Los vermes cultivados muestran un aumento en la distancia entre su acetábulo y primer testículo respecto a las metacercarias de partida.

Estos hechos nos llevan a considerar que el medio de cultivo bifásico integrado por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 permite que los individuos en él cultivados permanezcan vivos durante períodos relativamente largos (20 días). Este medio soporta, además, el mantenimiento de un nivel de actividad corporal aceptable en dichos vermes a lo largo de todo el tiempo de cultivo aunque hemos de indicar que esta actividad es mucho más intensa durante los primeros días de cultivo (6 días). No obstante, el medio de cultivo en estudio no permite el mantenimiento correcto de los vermes durante un

período de tiempo prolongado ya que dichos individuos sufren una considerable regresión en algunas de sus dimensiones corporales, generalizándose en ellos una disminución en su longitud y en su anchura principalmente, así como en su ventosa oral y en la distancia entre ventosas, en todos los períodos de cultivo estudiados. Los factores nutritivos presentes en este medio de cultivo parecen iniciar, empero, un crecimiento en algunos órganos de los vermes cultivados. Así, es destacable el hecho de que el ovario de los vermes cultivados, tanto durante 11 como durante 18 y 19 días, experimenta un crecimiento respecto al ovario de las metacercarias de partida y además el primer testículo de los individuos cultivados durante 11 días mantiene prácticamente sus dimensiones, en tanto que presenta un aumento en sus dimensiones en los vermes cultivados durante períodos más largos. El medio de cultivo consigue, asimismo, iniciar un crecimiento en el acetábulo, faringe y distancia entre acetábulo y primer testículo en estos últimos vermes.

Los vermes cultivados en este medio parecen encontrar en él los factores nutritivos que les son necesarios para iniciar un importante proceso evolutivo en sus glándulas vitelógenas y llegar a sintetizar sustancia vitelina en cantidades importantes, al cabo de un período de cultivo relativamente corto (6 días), llegando a presentar sustancia vitelina en el reservorio vitelino y en el inicio del útero en un período de tiempo inferior al necesitado por los vermes en los restantes medios de cultivo (15 días). Simultáneamente, el medio incluye en su composición aquellos factores nutritivos que los vermes precisan para iniciar una evolución en sus testículos, ya que tanto los vermes cultivados durante 11, como durante 15 días, revelan pequeñas cantidades de espermatozoides en sus gónadas masculinas, evidenciando así la funcionalidad de las mismas. No podemos precisar el período de tiempo mínimo requerido por este medio de cultivo para iniciar la maduración de los testículos de los individuos en él cultivados, ya que no disponemos de datos a este respecto, correspondientes a períodos de cultivo más cortos.

Como consecuencia de los resultados expuestos, parece indicado afirmar que el medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 soporta el inicio de procesos evolutivos importantes, tanto en las gónadas masculinas como en las glándulas vitelógenas de los individuos en él cultivados, por lo que, necesariamente, incluye en su composición los factores nutritivos precisados por los vermes para la consecución de los mismos, estan-

do dichos factores en forma no utilizable y asimilable por dichos vermes. No obstante, el medio de cultivo no parece satisfacer totalmente los requerimientos nutricionales de los vermes, por cuanto que los procesos evolutivos iniciados por ellos no vienen acompañados por procesos de crecimiento destacados, quedando éstos relegados a un discreto crecimiento de algunos órganos, que parece afectar selectivamente a ovario, primer testículo, acetábulo, faringe y distancia entre acetábulo y primer testículo. El medio de cultivo no induce ningún tipo de aumento en las restantes dimensiones corporales de los vermes, sino que, por el contrario, permite que éstas sufran una importante regresión. Así, pues, hemos de considerar que los requerimientos nutricionales exigidos por los vermes son superiores a los ofrecidos por este medio de cultivo, bien cualitativamente, bien cuantitativamente, sin desechar la posibilidad de que uno o varios de los factores precisados por los vermes se encuentren en el medio de cultivo y en cantidad suficiente pero no en el modo adecuado para ser absorbido y utilizado por los vermes cultivados.

Hemos ensayado cuatro medios de cultivo bifásicos que difieren entre sí en sus fases líquidas. El medio más sencillo, fase sólida + Medio A (M 199 + 20% FCS) es aquél que presenta los peores resultados, teniendo lugar una grave degeneración de los vermes que finaliza con la muerte de los mismos. No obstante, algunos individuos inician procesos de evolución en sus glándulas vitelógenas, sintetizando sustancia vitelina. El medio integrado por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) difiere del anterior únicamente en que el suero bovino fetal se presenta aquí en una proporción tres veces superior. Este aumento en la cantidad de suero bovino fetal presente en el medio de cultivo mejora extraordinariamente los resultados obtenidos, ya que permite a los vermes mantenerse vivos a lo largo de todo el cultivo e incluso presentar una evolución más rápida en sus glándulas vitelógenas, con producción de sustancia vitelina cinco días antes del momento en que ésta se hacía evidente en el medio anterior. Sin embargo, esto no impide a los vermes presentar una regresión muy importante en sus dimensiones corporales.

El medio bifásico constituido por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) + macerado tipo 1 (NBBS + Hanks) no introduce en su composición ningún factor que no esté ya presente en los medios anteriores. Únicamente presenta el suero bovino neonatal en una proporción superior a aquella en que se presenta en los medios anteriores, por entrar a formar parte tanto de la fase sólida

da como del macerado. La presencia de este macerado implica que el suero bovino neonatal forma parte de partículas sólidas que son ingeribles por parte de los vermes, siendo así esta sustancia más fácilmente asimilable por los individuos en cultivo que si únicamente contituye la fase sólida del medio. La introducción de este macerado en el medio de cultivo proporciona resultados muy superiores a los que presentaba el medio integrado por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) y exento, por tanto, de dicho macerado. Los vermes no únicamente se mantienen vivos a lo largo del período de cultivo, sino que tanto su actividad corporal como el contenido en partículas de macerado de sus ciegos intestinales son importantes a lo largo del mismo. Este medio acelera considerablemente el proceso evolutivo de las glándulas vitelógenas de los vermes cultivados, induciendo la aparición de sustancia vitelina tras un período de cultivo que resulta ser la mitad del requerido por el medio de cultivo exento de este macerado. El medio de cultivo induce la evolución de los testículos de los vermes en un período de cultivo muy corto (4 días), llegando éstos a producir pequeñas cantidades de espermatozoides. Los vermes cultivados en este medio presentan unas dimensiones corporales superiores a las propias de los vermes procedentes de los medios de cultivo a que hemos aludido anteriormente. Esta circunstancia pone de manifiesto que la introducción del macerado en el medio de cultivo ejerce una notable influencia sobre el crecimiento de los vermes. Por lo tanto, el medio de cultivo integrado por fase sólida + Medio B + macerado tipo 1 es muy superior a los anteriores medios de cultivo, tanto en lo que se refiere a sus posibilidades de inducir procesos evolutivos en las estructuras sexuales de los vermes, como por sus posibilidades de lograr un crecimiento general de los mismos.

El medio bifásico ensayado que presenta una complejidad máxima es el constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2, que incluye en su composición un factor que no está presente en el medio anteriormente estudiado. Este factor es extracto de embrión bovino que entra a formar parte del macerado tipo 2, pero no está presente en el macerado tipo 1. El medio en estudio presenta unos resultados muy similares a los ofrecidos por el medio de cultivo anteriormente estudiado. Así, induce el inicio de un proceso evolutivo en las glándulas vitelógenas de los vermes tras un período de cultivo igual al requerido por el medio exento de extracto de embrión bovino, pero la producción de sustancia vitelina parece tener lugar en cantidades superiores, con lo cual esta sustancia se presenta en el inicio del útero de dichos ver-

mes un día antes de su aparición en el anterior medio de cultivo. Asimismo, dicha sustancia es más abundante en el interior del tubo uterino de los vermes cultivados en presencia de extracto de embrión bovino. Sin embargo, la disponibilidad de esta sustancia por parte de los vermes no se traduce en un aumento de sus dimensiones corporales respecto a las de los vermes que no disponen de ella, aunque parece tener lugar un mayor incremento en la distancia entre acetábulo y primer testículo. Así, pues, el extracto de embrión bovino parece ejercer una mayor influencia sobre los procesos evolutivos de las glándulas vitelógenas de los vermes, que sobre sus procesos de crecimiento. (Figs. 141, 142, 143 y 144).

Por lo tanto, es evidente que los medios de cultivo bifásicos, que incluyen macerado de uno y otro tipo en su composición, son muy superiores a aquellos que no lo presentan, pero la superioridad de uno y otro tipo de macerado es algo más difícil de establecer según los resultados obtenidos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la inclusión de extracto de embrión bovino en el macerado parece favorecer los procesos evolutivos de los individuos cultivados, nos inclinamos por considerar que el medio constituido por fase sólida + Medio B + macerado tipo 2 ofrece los mejores resultados.

#### 5.4.3.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS DE CULTIVO SEMISÓLIDOS

Los dos medios de cultivo semisólidos ensayados están constituidos por yema y albúmina de huevo de gallina, así como por Medio D, en cuya composición entra el medio químicamente definido CMRL 1066 con un 20% de suero bovino fetal. Estos componentes son comunes a ambos medios y difieren únicamente en que en uno de ellos, el Medio E, se incluye además otro factor de crecimiento, extracto de embrión bovino, que no está presente en el Medio F.

Los individuos cultivados durante 7 días en el medio semisólido E muestran una actividad aceptable a lo largo de los tres primeros días de cultivo, que va disminuyendo paulatinamente hasta cesar por completo en el día 7 de cultivo, aunque estos individuos se mantienen vivos, ya que observados in vivo entre portaobjetos y cubreobjetos evidencian una cierta actividad corporal. Las características morfológicas de estos individuos correspondientes a

su tegumento, parénquima, ventosas, aparato digestivo y aparatos reproductores masculino y femenino son normales y no se aprecia ningún tipo de malformación o degeneración en sus órganos. Los vermes cultivados no experimentan ningún tipo de evolución en sus glándulas vitelógenas, ya que no es observable ningún tipo de contenido vitelino en el interior de las mismas. Dado que no hemos sometido a estos vermes a tinción con aceto-orceína, no nos encontramos en situación de afirmar ni negar rotundamente que haya o no ocurrido algún tipo de evolución en las gónadas de los vermes, aunque no parece plausible que ésta haya tenido lugar. El tegumento de los vermes cultivados muestra una espinulación muy evidente, más semejante a la propia de los adultos que a la de las metacercarias, por lo que ha podido ocurrir una cierta evolución en el tegumento.

El estudio morfométrico de los vermes cultivados muestra que éstos han experimentado una considerable regresión en todas sus dimensiones corporales, respecto a las dimensiones propias de las metacercarias de partida y, más aún, respecto a las dimensiones propias de los adultos de 7 días obtenidos en los hospedadores definitivos.

Así, pues, este medio semisólido no soporta un mantenimiento correcto de los vermes en él cultivados, ya que induce en los mismos una pérdida de su actividad en períodos de cultivo cortos (3 días). Aunque el medio en estudio no parece ocasionar procesos degenerativos ni muerte de los vermes durante el período de tiempo (7 días) en que éstos son cultivados, tampoco soporta ningún tipo de crecimiento de estos individuos, ya que, por el contrario, sufren una regresión considerable en sus dimensiones corporales. A pesar de la gran riqueza de factores nutritivos aportados por este medio, no soporta ningún tipo de evolución en las glándulas vitelógenas de los individuos cultivados y, probablemente, tampoco en sus gónadas (Fig. 140).

Los individuos cultivados en el medio semisólido F que difiere del anterior únicamente por carecer de extracto de embrión bovino, aparecen, al cabo de 3 días de cultivo, no únicamente inactivos e inmóviles, sino además degenerados y con sus ciegos intestinales anormalmente dilatados.

Los resultados anteriores parecen indicar que los dos medios de cultivo semisólidos ensayados son inadecuados para el cultivo de los vermes. Estos medios, a pesar de su gran complejidad derivada de la introducción en los mis-

mos de sustancias tan complejas como son la yema y la albúmina de huevo de gallina y no obstante la presencia de suero bovino fetal en ambos y de extracto de embrión bovino en uno de ellos, no permiten ni tan sólo un mínimo desarrollo de los vermes cultivados. Así, pues, o bien no proporcionan a los vermes los requerimientos nutricionales que los son necesarios, o bien éstos están incluidos en forma inadecuada para ser absorbidos por dichos vermes. Hemos de considerar que estos medios de cultivo semisólidos presentan unas características fisico-químicas muy especiales derivadas de la propia naturaleza de la yema y albúmina de huevo de gallina que intervienen en su composición.

Ahora bien, el medio que presenta extracto de embrión bovino (Medio E) parece ofrecer a los vermes unas condiciones de cultivo notablemente superiores a las que proporciona a los mismos el Medio F exento de este factor, por cuanto que los vermes cultivados en aquél medio, si bien no presentan ningún tipo de crecimiento ni evolución, tampoco parecen sufrir los procesos degenerativos que experimentan los vermes cultivados en el Medio F. Por otra parte, hemos de considerar que la supresión del extracto de embrión bovino en el Medio F comporta un aumento en la concentración de los restantes componentes, hecho que puede ejercer una cierta influencia sobre los resultados del cultivo.

#### 5.4.4.- EVALUACION GLOBAL DE RESULTADOS

Hemos llevado a cabo, en los apartados anteriores, una evaluación pormenorizada de los resultados obtenidos en cada uno de los distintos tipos de medio de cultivo ensayados que hemos denominado medios monofásicos, bifásicos y semisólidos.

Los medios de cultivo monofásicos ensayados ofrecen resultados muy poco satisfactorios. Es el más complejo de ellos, constituido por Medio B M 199 + 60% FCS) + 4% macerado tipo 2 (NBBS + BEE<sub>50</sub> + Hanks), el que parece ofrecer a los vermes en cultivo los requerimientos nutricionales que les son necesarios para iniciar un proceso evolutivo en sus glándulas virelógicas, si bien éste tiene lugar tras un período de cultivo muy prolongado, a lo largo del cual se produce degeneraciones tegumentarias y parenquimáticas en los vermes cultivados.

La adecuación de los factores nutritivos contenidos en el medio monofásico indicado para inducir procesos evolutivos en los vermes queda ratificada por los resultados obtenidos en los medios de cultivo bifásicos. En estos medios, es el constituido por fase sólida + Medio B (M 199 + 60% FCS) + 4% macerado tipo 2 (NBBS + BEE<sub>50</sub> + Hanks), el que presenta resultados óptimos principalmente respecto a la iniciación de procesos evolutivos en las glándulas vitelógenas de los individuos cultivados. La fase líquida de este medio de cultivo bifásico presenta la misma composición, tanto cualitativa como cuantitativa, que el medio monofásico en el que se ha obtenido los mejores resultados y dichos resultados no sólo han sido igualados sino incluso largamente superados por el medio bifásico. Esta circunstancia pone de manifiesto, asimismo, la gran influencia ejercida por la presencia de la fase sólida, constituida por suero bovino neonatal coagulado, sobre los resultados de cultivo. Así, considerando que la única diferencia existente entre el medio de cultivo monofásico que presenta los mejores resultados y el medio de cultivo bifásico óptimo, es la presencia de suero bovino neonatal como único integrante de su fase sólida, podemos considerar que este factor es el único responsable de la obtención de resultados muy superiores en el medio de cultivo bifásico. Es decir, ejerce una notable influencia sobre los procesos evolutivos de índole sexual que ocurren en las glándulas vitelógenas y en las gónadas de los vermes cultivados, reduciendo el período de cultivo necesario para que estos procesos se inicien y, asimismo, interviene en los procesos de crecimiento general de los vermes, haciéndolos posibles.

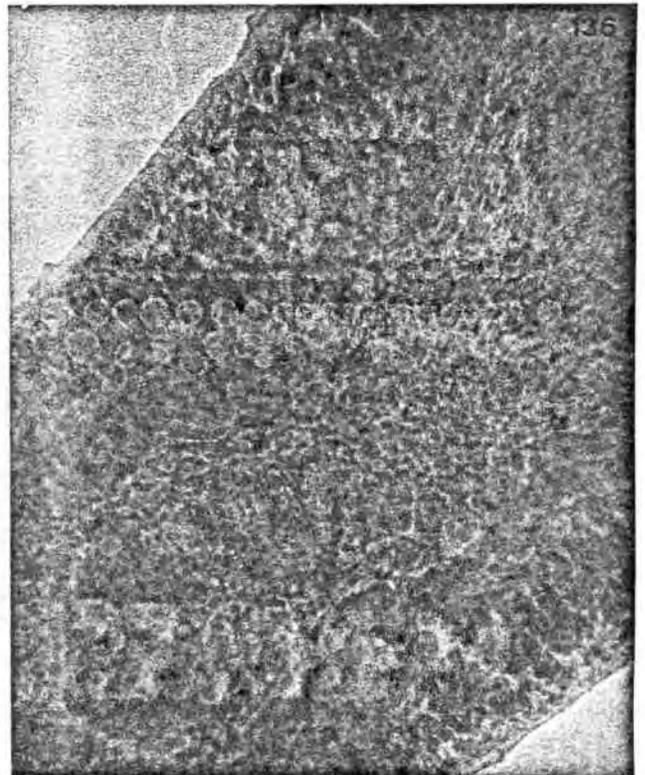
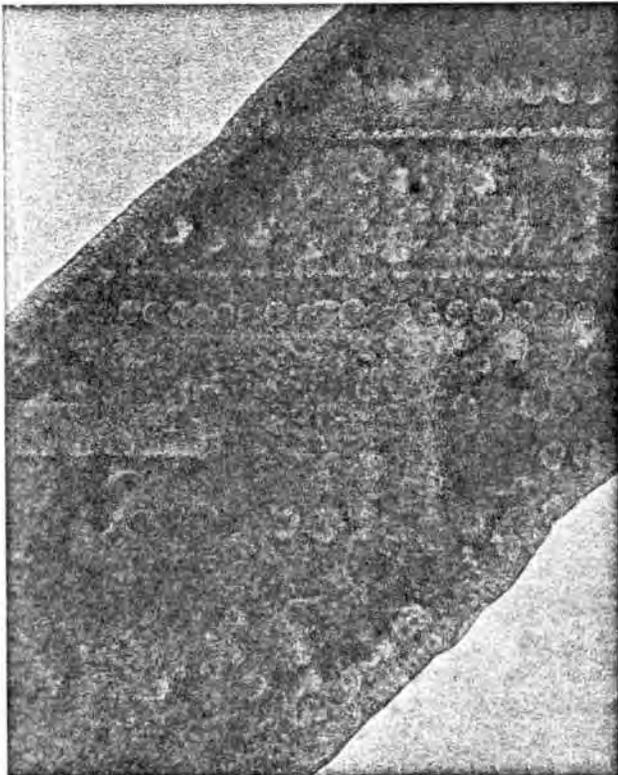
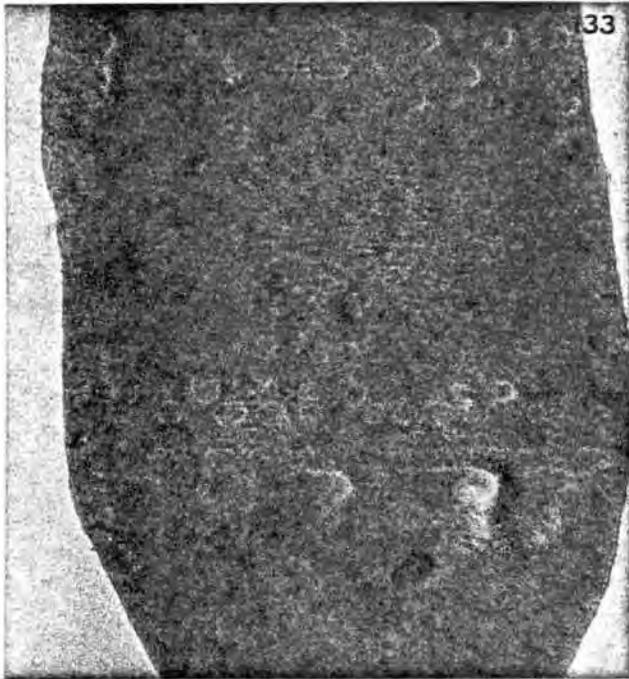
Los medios de cultivo semisólidos presentan unos resultados inferiores incluso a los ofrecidos por los medios de cultivo monofásicos. El medio de cultivo en cuya composición intervienen yema y albúmina de huevo de gallina, extracto de embrión bovino y Medio D (CMRL 1066 + 20% FCS) (2:1:1:3) es el responsable de la obtención de los mejores resultados en los medios semisólidos, pero estos resultados son muy poco satisfactorios, ya que los vermes no presentan ningún tipo de evolución y llegan a presentarse totalmente inactivos tras un corto período de cultivo. Parece que el extracto de embrión bovino ejerce una influencia positiva sobre los vermes, ya que su supresión en el medio de cultivo ocasiona resultados inferiores en el mismo.

Fig. 133.- Especímen cultivado durante 2 días en el medio monofásico constituido por M 199 + 60% FCS.

Fig. 134.- Especímen cultivado durante 20 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS.

Fig. 135.- Especímen cultivado durante 20 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS

Fig.- 136.- Especímen cultivado durante 11 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS.



- Fig. 137.- Especímen cultivado durante 4 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 1.
- Fig. 138.- Especímen cultivado durante 18 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 1.
- Fig. 139.- Especímen cultivado durante 20 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 1.
- Fig. 140.- Especímen cultivado durante 7 días en el medio semisólido constituido por yema + albúmina + Medio D + BEE.

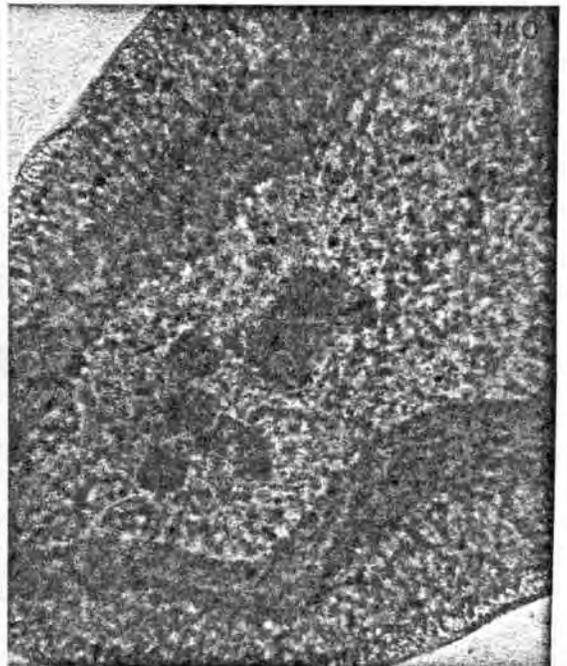
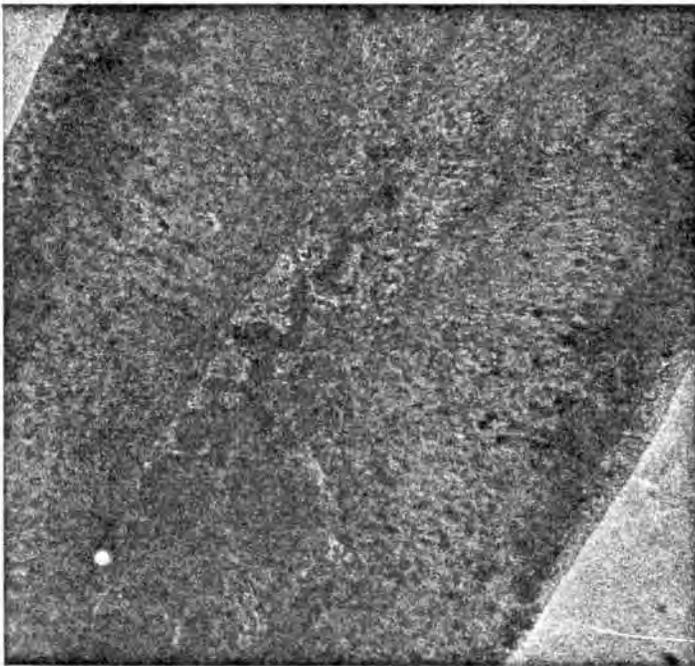
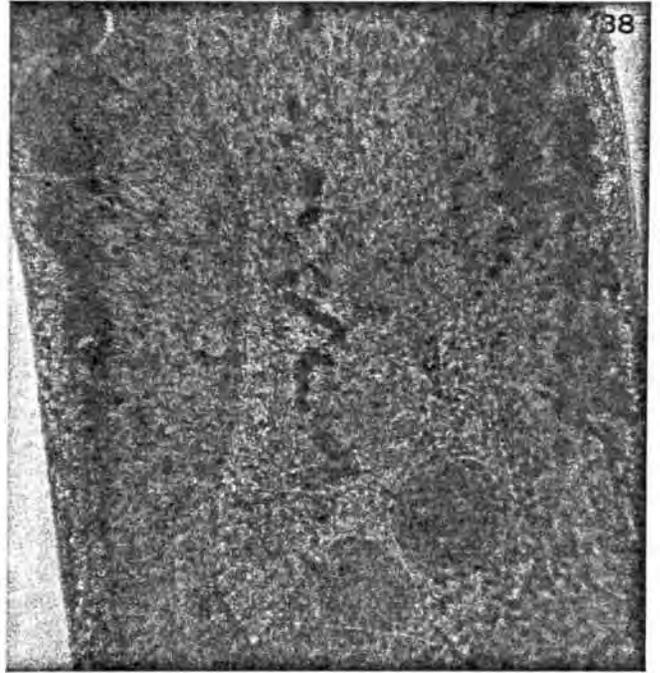
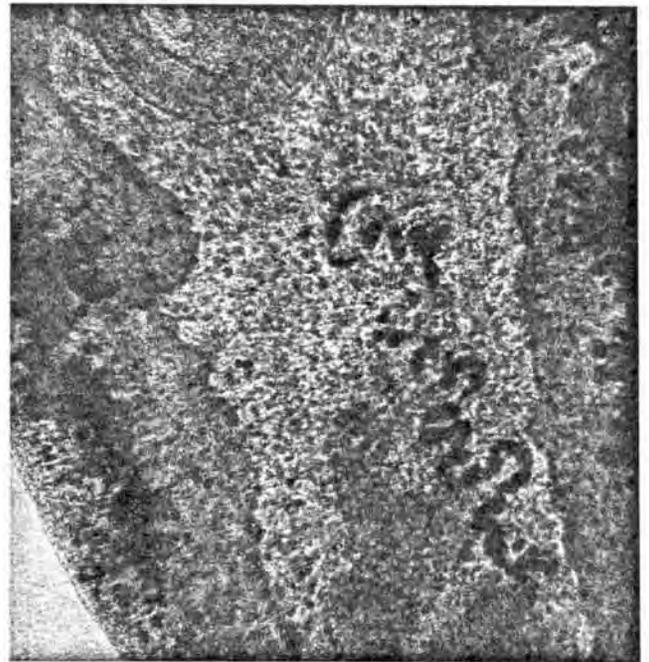
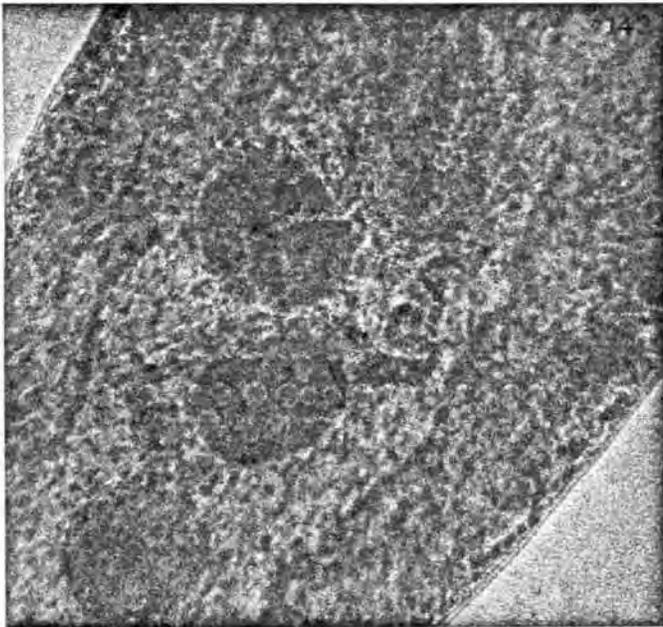
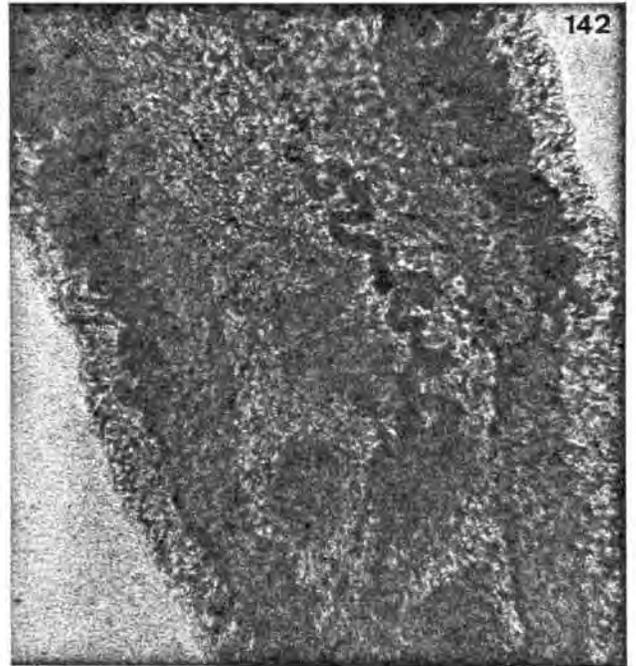
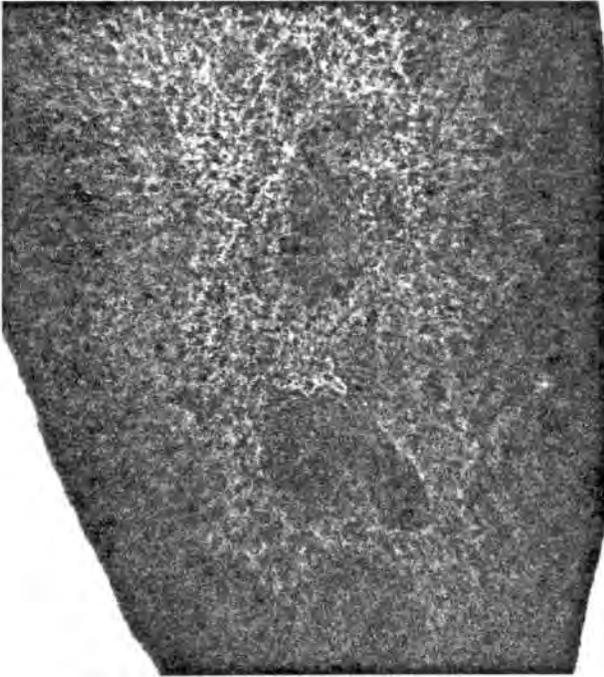


Fig. 141.- Especímen cultivado durante 11 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 2.

Fig. 142.- Especímen cultivado durante 15 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 2.

Fig. 143.- Especímen cultivado durante 15 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 2.

Fig. 144.- Especímen cultivado durante 19 días en el medio bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macer. 2.



*CAPITULO SEXTO*

DISCUSION  
Y  
CONCLUSIONES

## 6.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Pasaremos seguidamente, en este último capítulo de la Tesis Doctoral, a exponer los hechos establecidos y las conclusiones alcanzadas en nuestros estudios sobre la especie de Digénido Brachylaima ruminiae. No debemos olvidar, empero, que los aspectos de este Trematodo que hemos procedido a estudiar se refieren a puntos de su biología que bien poco tienen que ver unos con otros. Por ello, hemos considerado oportuno distinguir, también aquí, tres apartados para los tres aspectos en cuestión. Como es lógico, se procede en cada caso al obligado análisis comparado de nuestros datos con los conocimientos que sobre cada uno de los tres aspectos se dispone hoy en día en el campo de los Digenea, todo ello formando parte de una discusión en la que se hace referencia ordenada de los resultados de otros autores según sus especies de Digénidos se encuentren más o menos emparentadas con nuestra especie. En otras palabras, el análisis comparado se dirige inicialmente siempre a los Brachylaimidae, para gradualmente alejarnos en el análisis de otros Digénidos según su mayor o menor parentesco.

### 6.1.- REFERENTES A LA CRONOBIOLOGIA DE LA EMISION CERCARIANA

#### 6.1.1.- DISCUSION

El interés sanitario de los Trematodos Digénidos es bien conocido en lo que se refiere a especies capaces de parasitar y originar las consiguientes enfermedades tanto en el Hombre como en animales domésticos. En el caso de estos helmintos es de destacar al respecto la existencia, a nivel de parásitos adultos, de una especificidad ecológica y etológica, manifestándose una en general escasa especificidad fisiológica y filogenética. En otras palabras, la posibilidad de infestación del hospedador definitivo está relacionada principalmente con la ecología y comportamiento tanto de las formas larvarias infestantes (y de los respectivos hospedadores intermediarios caso de haberlos) como del mismo hospedador definitivo. Desde el punto de vista epidemiológico y epizootiológico resulta pues de importancia primordial el conocer el ciclo biológico completo y al detalle de las especies parásitas y los medios (medio ex-

terno; medio hospedador) y las vías de transmisión que en el mismo se suceden.

Dentro de los Digénidos cabe distinguir, según los ecosistemas en que los ciclos se desarrollan y las vías de transmisión respectivas, tres grandes grupos: ciclos completamente acuáticos, ciclos completamente terrestres, y ciclos mixtos (casos en los que el ciclo se desarrolla en dos o más ecosistemas: acuático, terrestre, aéreo). En el caso de los ciclos mixtos es de destacar que en general el ciclo inicia su desarrollo en el ecosistema acuático, para pasar luego al terrestre o al aéreo.

En los casos de especies de Digénidos que inician sus ciclos en el medio acuático, las formas larvarias emitidas por el Gasterópodo acuático o anfíbio primer hospedador intermediario son cercarias siempre acuáticas. Estudios llevados a cabo con numerosas especies han venido a demostrar que existe un número muy considerable de factores capaces de influir en la emisión de sus respectivas cercarias (ERASMUS, 1972), factores lógicamente de enorme interés en lo que respecta a la infestación del Hombre y animales domésticos (véase COMBES & THERON, 1977). Es evidente que los ritmos de emisión de cercarias serán decisivos en cuanto a los índices de parasitación de los hospedadores que hayan de intervenir subsiguientemente en el ciclo.

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios efectuados hasta la fecha, restan aún muchos fenómenos y hechos desconocidos. Una muestra de nuestros desconocimientos en cuanto a estos fenómenos biológicos la encontraremos en las especies de Digénidos en ciclo completamente terrestre. En estos casos la carencia de datos es total y absoluta.

Todos estos hechos obligan ineludiblemente a un estudio controlado de los ciclos de estos parásitos en sus hospedadores y de la influencia que ejercen los distintos factores ambientales (humedad, temperatura, luz, pH, salinidad, etc.), estudios que antes de llevarse a cabo en la Naturaleza deben ser dilucidados en el Laboratorio, donde pueden ser controlados experimentalmente. Sólo así podrá ser posible realizar luego tales estudios en condiciones naturales.

Los estudios llevados a cabo y expuestos en la presente memoria están destinados a descifrar la naturaleza del patrón de emergencia de cercarias de una especie de Trematodo Digénido de la familia Brachylaimidae, Brachylaima ruminiae. La cepa objeto de estudio procede de la isla de Formentera.

El interés principal de este estudio experimental estriba en el hecho de que los resultados obtenidos representan ya no únicamente los primeros conocimientos sobre cronobiología de emisión de cercarias de la familia de Digénidos aludida, sino también los primeros sobre cercarias terrestres en general, cuestión de indudable importancia dados los diferentes tipos de ritmos de emergencia conocidos en las cercarias acuáticas (véase THERON, 1975; COMBES & THERON, 1977) y los distintos y numerosos factores que inciden en los mismos (véase ERASMUS, 1972).

No debe olvidarse, empero, que las condiciones en que se desarrollaron los ensayos y se tomaron las muestras fueron completamente experimentales y en consecuencia las conclusiones que de ellos pueden sacarse deberán aplicarse o, mejor dicho, presuponerse para la Naturaleza con las precisas e inevitables reservas. Se nos antoja difícil aceptar que en la Naturaleza un caracol de la especie Rumina decollata esté dispuesto a permanecer durante 5 días seguidos, por ejemplo (condiciones experimentales de la experiencia M), ininterrumpidamente sobre una película de agua, en condiciones de elevada humedad y sin ingerir alimento alguno.

Además, nuestros estudios han sido enfocados exclusivamente en el sentido de dilucidar las influencias de la luz y fotoperíodo, temperatura y termoperíodo, y tiempo (tanto duración de la fase de emisión como de los intervalos previos de emisión y no emisión) sobre la emergencia de las cercarias de Brachylaima ruminae. En otras palabras, en nuestras experiencias sólo hemos incidido con los factores luz, temperatura y tiempo, poniendo siempre la película de agua a disposición continua de los individuos emisores, y ello no quiere decir que en la Naturaleza no haya otros factores que influyen también en la emisión.

Evidentemente las conclusiones que aquí se extraen sólo son a priori válidas, y con todas las reservas antedichas, para la especie de Trematodo en cuestión. De todos modos, y salvo excepciones, teniendo en cuenta la idéntica naturaleza del ciclo biológico, en sus grandes líneas, en los Brachyláimidos en general, cabe presuponer que las cercarias de las distintas especies de la familia habrán de seguir el mismo patrón cronobiológico de emergencia o uno similar.

A nuestro entender no cabe extender en modo alguno las conclusiones aquí

obtenidas con cercarias del Brachyláimido en cuestión a las cercarias terrestres en general. Piénsese que en los Dicrocélidos, por ejemplo, otra familia o grupo de Digénidos en la cual se presentan cercarias de vida terrestre (ciclo completamente terrestre, con todos los hospedadores, intermediarios y definitivos, terrestres) existen modos de emisión distintos (emisión de cercarias simultáneamente en mayor o menor número e incluidas dentro de sacos; emisión de cercarias en agrupaciones con mucus; etc.) y los segundos hospedadores intermediarios no son nunca Gasterópodos como en los Brachyláimidos (en la familia Dicrocoelidae se trata preferentemente de Insectos, más raramente Arácnidos). Estos dos hechos deben incidir indudablemente de modo decisivo en cuanto a la naturaleza del patrón de emergencia de las cercarias de especies de dicha familia.

Pasemos seguidamente a discutir los resultados concretos obtenidos en las distintas experiencias efectuadas, siguiendo el mismo orden que el de la exposición analítica del tercer capítulo en la que se refiere a los factores incidentes estudiados, tras discutir las características generales del patrón de emergencia.

#### 6.1.1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA EMISION

El primer punto a destacar en la emisión de cercarias terrestres de la especie de Brachyláimido en cuestión es el hecho de que la adaptación de estas cercarias a la vida terrestre no ha sido lo suficiente como para llegar a poder prescindir de la presencia de agua. Las cercarias son susceptibles de desecación en el medio externo, por lo que precisan ser emitidas en medio acuoso (película de agua sobre el sustrato; humedad suficiente; etc.).

Cabe preguntarse si las cercarias son capaces de ser emitidas, y lo son en realidad en la Naturaleza, en ausencia de agua (o humedad suficiente) disponible. Aunque así fuera, dudamos que el mucus del propio caracol emisor sea suficiente para posibilitar la viabilidad de las cercarias y su desplazamiento hasta contactar con el caracol segundo hospedador intermediario. Quizás en la Naturaleza puedan llevarse a cabo tales transmisiones con éxito en ausencia de agua, de un modo esporádico, en aquellos casos en los que el individuo emisor se encuentre lo suficientemente cerca, próximo o en contacto con el se-

gundo hospedador intermediario receptor.

La disponibilidad de agua se nos antoja pues como el indudable factor vital e imprescindible para que en especies de Brachyláimidos los individuos primeros hospedadores intermediarios conteniendo esporocistos empiecen a descargar cercarias en proceso de emisión normal. En otras palabras, sin agua disponible no tiene lugar emisión cercariana.

Las experiencias llevadas a cabo y en condiciones lo más dispares posibles han mostrado en todos los casos que la naturaleza de la emisión es individual, que depende del individuo emisor. En los distintos cuadros y gráficas se observa perfectamente como las emisiones difieren en todos los casos, a veces ostensiblemente, según los individuos emisores. Incluso en ciertos casos es posible observar como un individuo se ha mostrado como el máximo emisor en una determinada experiencia, para dejar de serlo en otras.

La variabilidad de la emergencia no atañe no sólo a las características de las emisiones de un mismo caracol emisor según las experiencias y momentos de las mismas, sino también a las características de las emisiones de un mismo caracol emisor según las experiencias y momentos de las mismas, sino también a las características de las curvas de cercarias pero por distintos individuos emisores dentro de una misma experiencia (y por tanto bajo idénticas condiciones). Y a pesar de no haber efectuado ensayos al respecto, es indudable que ninguno de los individuos emisores volvería a emitir cercarias en un ensayo repetido ni en la misma cantidad, ni siguiendo idéntica curva que las mostradas en el ensayo inicial.

Como datos anecdóticos añadamos aquí que en nuestras experiencias los valores extremos del número de cercarias emitidas por un caracol son de 1-2834 por hora (excluimos aquí lógicamente las emisiones horarias nulas) y de 1-20106 por día. Y nos parece razonable suponer que los valores máximos anteriores pueden incluso verse algo incrementados en casos de caracoles muy infestados.

Todo ello sugiere, evidentemente, la influencia de tres hechos o factores:

- número de los esporocistos contenidos en el interior del individuo emisor;
- dimensiones de los esporocistos contenidos en el interior del individuo emisor;

- el comportamiento y actividad del individuo de caracol emisor.

Resulta lógico presuponer que los individuos mayores emisores, los que emiten en general mayor cantidad de cercarias por hora, por experiencia o por 24 horas de emisión, sean precisamente aquellos cuyo número y dimensiones de los esporocistos sean mayores. Inversamente, aquellos caracoles que emiten menor cantidad habrán de ser los que ostenten esporocistos en menor número y dimensiones.

El probable paralelismo existente y la extensión de la relación entre niveles de infestación de los caracoles emisores con esporocistos, su número y dimensiones, y las cantidades de cercarias emitidas y sus ritmos de emergencia constituyen fenómenos que pretendemos estudiar en un futuro próximo. Piénsese, por ejemplo, en la influencia decisiva del número de huevos ingeridos por el caracol, que determinará sin duda el mayor o menor número de esporocistos. Considérese también la probable relación con la duración de la infestación del individuo emisor (edad de los esporocistos).

El comportamiento y la actividad del individuo emisor han de incidir lógicamente también en las emisiones del propio caracol.

En lo que se refiere a la alimentación, por ejemplo, se sabe incide decisivamente en una mayor o menor emisión de cercarias acuáticas (ERASMUS, 1972). La cuestión de si los caracoles mejor nutridos (mayor cantidad de alimento; mayor regularidad en la alimentación; mejor calidad del alimento) son los capaces de desarrollar mayores o más numerosos esporocistos y por tanto con mayor poder de producción y emisión cercarianas, y los caracoles peor nutridos lo inverso, es un hecho a estudiar también en el futuro.

Lo que sí hemos podido observar es la emisión simultánea, conjuntamente con los excrementos, de aglomeraciones más o menos numerosas de cercarias, que en estos casos acceden, pues, al exterior en gran parte de un modo pasivo. En estos casos nos ha sido posible observar siempre que dichos tipos de emisión "pasiva" incrementaban muy considerablemente el número de cercarias emitidas por el caracol en la hora ensayada.

La actividad del individuo emisor debe incidir también decisivamente en la naturaleza de la emisión. Si bien en nuestras experiencias hemos podido comprobar que los Gasterópodos emitían cercarias, en presencia de una peli-

cula de agua, aún y sin salir de sus conchas, este número de cercarias debe de aumentar en aquellos casos en que el caracol se encuentra completamente evaginado e incluso en movimiento y contacto directo con la película acuosa, a la que las cercarias accederán consiguientemente con muchas menos dificultades. Cabe presuponer que en la Naturaleza la actividad del caracol emisor, en lo que a desplazamientos se refiere, debe ser vital en cuanto a la búsqueda de lugares con agua o suficiente humedad que posibiliten una emisión de cercarias viable.

Como ejemplo de la probable incidencia de la actividad del caracol emisor, podemos citar los picos detectados en las curvas de emisión de las distintas experiencias cada vez que en la experiencia se variaba algún factor, sobre todo si el cambio era favorable a la estimulación de la evaginación, movimiento o desplazamiento del individuo emisor. Estos hechos son fácilmente observables en los cuadros y gráficas de las correspondientes experiencias cada vez que, por ejemplo, tras una fase de iluminación de 12 horas de duración, se entraba en una fase de oscuridad (experiencias C, D, M(I), M(II), M(III), M(IV); véase comentarios respecto a las influencias del fotoperiodo en el apartado 6.1.1.2) o en aquella en que tras una oscilación ascendente de temperatura se entraba en una fase de descenso de temperatura (experiencia K; véase comentarios respecto a las influencias del termoperiodo en el apartado 6.1.1.3). Tales fenómenos estarían relacionados con las costumbres de mayor actividad crepuscular y nocturna (oscuridad; menor temperatura) de los caracoles terrestres en cuestión.

#### 6.1.1.2.- INFLUENCIA DE LA ILUMINACION (FOTOPERIODO)

La influencia de la iluminación (fotoperiodo) puede deducirse principalmente de los resultados obtenidos en experiencias en las que las condiciones de iluminación y fotoperiodo fueron oportunamente modificadas, manteniéndose la temperatura constante. Nos referimos concretamente a las cuatro posibilidades desarrolladas en las experiencias de 24 horas: fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12 horas normal (LD 12:12: experiencias A, B, C, D, E, F, M(I), M(II), M(III), M(IV) y M(V)); fotoperiodo invertido (DL 12:12: experiencia G); iluminación constante (LL 12:12: experiencia M); y oscuridad constante

(DD 12:12: experiencia J).

En lo que se refiere al análisis comparado de las cuatro posibilidades de iluminación ensayadas, hay que tener en cuenta que mientras en las modalidades DL, LL, DD los datos a considerar son los obtenidos en las respectivas únicas experiencias G, H y J, todas ellas efectuadas a 15°C de temperatura, por lo que respecta a la modalidad LD disponemos de los datos de 11 experiencias de 24 horas (A, B, C, D, E, F, M(I), M(II), M(III), M(IV) y M(V)), siendo así que cuatro de ellas no fueron realizadas a 15°C (experiencias A y D a 10°C; experiencia C y F a 20°C), hecho que no debe olvidarse ante la posible influencia de la temperatura.

Trataremos de discernir, pues, cuál es la curva de emergencia más significativa y representativa de las obtenidas en todas las experiencias llevadas a cabo bajo un fotoperíodo de LD 12:12 y temperatura constante. A nuestro entender, los datos obtenidos en las experiencias A, B y C no son típicos y útiles para analizar la influencia de la iluminación, por cuanto, como veremos luego, las emisiones obtenidas se hallan claramente influenciadas por los escasos intervalos previos de no emisión. (I.P.N.E. de 8, 2 y 6 días respectivamente) y en la experiencia B incluso por la duración de la fase previa de emisión (I.P.E. de 10 días). Lo mismo puede decirse de las experiencias M(II), M(III), M(IV) y M(V).

En consecuencia, lo más lógico es tomar como representativa la curva de emisión obtenida en la experiencia M(I). La deducción de la influencia de la iluminación (fotoperíodo) la extraeremos, pues, comparando los resultados, datos y curvas de las experiencias M(I) (LD 12:12), G (DL 12:12), H (LL 12:12) y J (DD 12:12), todas ellas desarrolladas a 15°C de temperatura.

Un análisis comparado detenido de todos los resultados expuestos en cuadros, y gráficas se haría demasiado extenso aquí e incluso vendría a difuminar los puntos vitales a destacar, por lo que en esta discusión hemos optado por referirnos exclusivamente a aquellos hechos que nos han parecido más significativos desde el punto de vista biológico.

En nuestra opinión cabe destacar, en las cuatro experiencias en cuestión, en primer lugar la presencia en todas ellas de un claro pico máximo de emisión en las primeras 12 horas, en general tendente a localizarse entre las 3 y 6 horas. En segundo lugar, la existencia de un segundo pico, manifiestamente

menor que el anterior, en las segundas 12 horas de las dos experiencias en que hubo variación de fotoperíodo (experiencia M(I): LD; experiencia G: DL). Cabe observar también como este segundo pico se detecta antes tras el cambio de las 12 horas en la experiencia M(I) de fotoperíodo normal (LD) que en la experiencia G de fotoperíodo invertido (DL). Y finalmente que dicho pico menor de las segundas 12 horas desaparece en los dos casos en que la iluminación (experiencia H: LL) o la oscuridad (experiencia J: DD) se mantuvieron constantes. Estos hechos son bien evidentes y fácilmente observables en los valores relativos medios de las respectivas experiencias (véase cuadros y gráficas de valores relativos medios correspondientes a las experiencias M(I), G, H y J).

#### 6.1.1.3.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA (TERMOPERIODO)

Por lo que respecta a los ensayos destinados a dilucidar la posible influencia de la temperatura y termoperíodo sobre la emisión, podemos distinguir inicialmente entre las experiencias efectuadas bajo un fotoperíodo de LD 12:12, aquellas experiencias llevadas a cabo a distintas temperaturas constantes (experiencias A, B, C, D, E, F y M), y por otro lado aquellas verificadas con variación de temperatura (experiencias K y L).

Con el fin de que los datos obtenidos sean lo más comparables posibles y las conclusiones más significativas no conviene considerar aquí aquellas experiencias en que se hayan aplicado otros tipos de iluminación (experiencias G, H y J). Lo que resulta imposible es evitar aludir la consideración de la probable influencia de los intervalos previos de no emisión (I.P.N.E.) y fases previas de emisión (I.P.E.) en dichas experiencias. A pesar de ello, estimamos que los datos obtenidos son suficientes como para deducir unas primeras conclusiones sobre la influencia de la temperatura sobre la naturaleza de la emisión de las cercarias.

La posible influencia de la temperatura sobre la emisión la deduciremos, pues, esencialmente de los resultados obtenidos en las experiencias A, B, C, D, E, F y M (A y D a 10°C; B, E y J a 15°C; C y F a 20°C). El análisis comparado de dichos resultados parece indicar que pueden tener lugar algunas variaciones en la emisión relacionadas con la temperatura. En efecto, las cur-

vas de valores absolutos horarios medios de las experiencias A, B y C (en las que los I.P.N.E. e I.P.E., a pesar de no ser iguales, eran próximos) nos muestran emisiones claramente parejas, con números de cercarias emitidas en la totalidad de la experiencia evidentemente semejantes, pero en las experiencias D, E y F, en que los I.P.N.E. son iguales (6 días) y los I.P.E. muy próximos (12, 24 y 24 horas respectivamente), el número total de cercarias emitidas en la experiencia E es superior al obtenido en las dos restantes experiencias.

Los resultados de la experiencia M deben estimarse con cuidado, por cuanto en este caso la emisión, tanto en lo que se refiere a número de cercarias emitidas como a la naturaleza de la curva de emisión, estaba indudablemente influenciada por el notable valor del intervalo previo de no emisión (I.P.N.E. de 16 días) en lo que se refiere al primer día de emisión (M(I)) y con intervalos previos de no emisión nulos para los siguientes días (M(II), M(III), M(IV) y M(V)).

La influencia del termoperíodo en la emisión de cercarias de Brachylaima ruminæ puede deducirse, exclusivamente, de los resultados de las experiencias con termoperíodo mostrando una relación normal con el fotoperíodo (experiencia K) y con termoperíodo invertido (experiencia L). Los valores absolutos y relativos obtenidos en dichos dos ensayos permiten observar la presencia siempre de un pico en las primeras 12 horas de emisión y destacar la desaparición del pico nocturno en el ensayo con termoperíodo invertido. Quizás deba señalarse también la notable relativa intensidad de dicho segundo pico nocturno en la experiencia con termoperíodo normal.

#### 6.1.1.4.- INFLUENCIA DEL TIEMPO

El último de los factores influyentes analizados es el tiempo, habiéndose distinguido por un lado la duración de la emisión, y por otro lado las influencias de la duración del intervalo previo de no emisión (I.P.N.E.) y de la fase previa de emisión (I.P.E.).

En lo que respecta a la primera cuestión, deberemos referirnos exclusivamente a la experiencia M con sus 120 horas de duración. Esta experiencia es aquella cuyos resultados muestran, a nuestro entender, de un modo más ade-

cuado la naturaleza del patrón de emergencia de las cercarias de Brachylaima ruminiae.

Los cuadros y gráficas de valores absolutos de la experiencia M, considerada en su totalidad de 5 días de emisión continua e ininterrumpida, nos muestran como la emisión se caracteriza por presentar un gran pico o acrofase en las primeras 12 horas para luego ir descendiendo paulatinamente. Al final se llega a la total extinción en todos aquellos individuos que emiten en menor cantidad (presumiblemente aquellos cuyo número y dimensiones de los esporocistos son menores), llegándose a la extinción tanto antes cuanto menos emitían. De hecho, algunos de estos individuos emisores habían llegado a mostrar emisiones finales nulas incluso en experiencias de menor duración (de 26 o 24 horas). En cambio, los mayores emisores, esto es, aquellos que emitían un mayor número de cercarias (presumiblemente aquellos cuyo número y dimensiones de los esporocistos eran mayores) no llegaron a agotarse totalmente en 5 días.

Un segundo hecho de interés cabe destacar en los resultados obtenidos en esta experiencia. Dicho fenómeno es fácilmente observable en las gráficas de valores relativos de la experiencia M en cuestión, en la que se elimina matemáticamente las influencias del número y tamaño de los esporocistos. Nos referimos a los ligeros incrementos o picos que cabe detectar cada vez que se entra en una fase de oscuridad.

En esta experiencia M de 5 días es en la que los valores porcentuales alcanzan quizás su mayor interés, por cuanto nos vienen a demostrar claramente que la velocidad de emisión es mayor en las primeras 24 horas, para hacerse casi constante en los días restantes. Este hecho se muestra bien evidente en la gráfica que expone la curva seguida por los valores porcentuales horarios medios.

Añadamos finalmente respecto a la aludida experiencia M, que los resultados obtenidos en la misma son precisamente aquellos que se deben haber visto influenciados en mayor proporción por el hecho de tratarse de ensayos experimentales. Es evidente que en la Naturaleza ninguno de los caracoles permanecerá nunca en tales condiciones (continua e ininterrumpidamente sobre una película de agua, en atmósfera de gran humedad, y sin alimento alguno) durante 5 días seguidos. La prueba es que en las últimas fases del experimen-

to todos los individuos se encontraban casi completamente insensibles, extremadamente adormecidos, con musculatura muy relajada y extendida y sin fuerzas casi para desplazarse, esto es, por completo en condiciones anormales, semejantes o idénticas a las que suelen preceder a un fatal desenlace en los Gasterópodos. Y todo ello debe incidir indudablemente en las capacidades de producción y emisión de cercarias por parte de los esporocistos.

Respecto de la segunda cuestión, las influencias de la duración del intervalo previo de no emisión (I.P.N.E.) y de la fase previa de emisión (I.P.E.), debemos tener en cuenta lo ya apuntado anteriormente y que conviene repetir aquí de nuevo.

No hay que olvidar que cada una de las fases de emisión se intercala en una secuencia de emisiones. La secuencia de estas fases de emisión muestra en nuestras experiencias una notable irregularidad, en lo que se refiere a la duración de las fases de emisión y los intervalos de no emisión entre dos fases experimentales de emisión, irregularidad inducida por los condicionantes del Laboratorio y posibilidades de experimentación. Sin embargo, debemos tener presente que en la Naturaleza dicha secuencia mostrará una regularidad mayor o menor, pero siempre determinada por condicionantes abióticos (lluvias por ejemplo) sujetos a su vez a ritmos de distintas características (cadencia de lluvias según las estaciones anuales, según el lugar geográfico, etc.). Todo ello deberá ejercer indudablemente sus influencias sobre las emisiones cercarianas, de tal modo que resulta esencial, no sólo estimar la naturaleza de la emisión cercariana en una fase de emergencia determinada, sino tener en cuenta siempre, además, el momento en que dicha emisión tiene lugar, esto es, el punto de la secuencia de emisiones en que tiene lugar, o más concretamente, las características abióticas que han prevalecido en el biotopo determinado antes de iniciarse la emisión.

Resulta muy difícil especular sobre hasta que punto en el tiempo debemos retroceder para tener la seguridad de abarcar todos aquellos hechos que hayan podido desarrollarse y hayan podido ejercer alguna influencia en la emisión. En nuestro caso, y con mero ánimo simplificador, hemos considerado únicamente dos factores temporales, que a nuestro entender son suficientes en estas primeras prospecciones para entrever si lo acaecido previamente incide luego y en que manera en la naturaleza de la fase de emisión cercariana. Nos referimos, tal y como hemos apuntado antes, a la duración del inter-

valo previo de no emisión y a la duración de la fase previa de emisión.

Los ensayos efectuados muestran como, en términos generales, a mayor intervalo previo de no emisión, mayor es también el número medio de cercarias emitidas por caracol por hora (véase Tabla 4 y apartado 3.4.2.) El intervalo previo de no emisión también parece guardar relación con el pico máximo de emisión horaria media, de tal modo que estos valores máximos fueron siempre muy poco notables y de aparición retrasada dentro del día del ensayo (en general entre las segundas 12 horas del mismo) cuando el intervalo previo de no emisión fué escaso, mientras que el pico en cuestión se presentaba siempre en las primeras 12 horas (entre las 4 y 6 horas) y con valores marcadamente altos de cercarias emitidas cuando los intervalos previos de no emisión fueron elevados, a excepción hecha de la experiencia A.

Respecto a los intervalos o fases previas de emisión, cabe decir que no parecen guardar relación alguna con el número medio de cercarias emitidas por caracol por hora en aquellos casos en que el intervalo previo de no emisión fué lo suficientemente grande, mientras que en aquellas experiencias en que éste fué mínimo o nulo sí cabe detectar una relación directa clara. Así, a mayor intervalo previo de emisión, menor es el número medio de cercarias emitidas por caracol por hora (véase Tabla 4 y apartado 3.4.2.).

#### 6.1.2.- CONCLUSIONES

De todo lo expuesto hasta aquí pueden extraerse, resumidamente, las siguientes conclusiones generales sobre la naturaleza de la emisión de cercarias de Brachylaima ruminae por parte de Rumina decollata de Formentera:

- la emisión no parece estar directamente relacionada con la luz o la oscuridad; sin embargo, los pequeños picos detectados en la entrada en toda fase de oscuridad parecen estar relacionados con la estimulación de la actividad de los Pulmonados en la misma;
- la temperatura no parece guardar relación directa con la liberación de cercarias por parte de los esporocistos, pero sí debe influir a través de los requerimientos de los Gasterópodos

- (intervalos óptimos de temperatura para las especies hospedadoras); no cabe deducir por el momento la probable influencia de la temperatura sobre la capacidad de los procesos de producción y maduración cercariana dentro de los esporocistos, pero es indudable que su influencia existe por cuanto que a temperaturas superiores los Gasterópodos experimentalmente infestados con huevos tardan menos tiempo en emitir las primeras cercarias, por lo que los procesos anteriores se deben ver acelerados;
- la duración de una emisión continua depende de la disponibilidad de agua exterior como factor imprescindible, de las dimensiones y número de esporocistos dentro de los individuos emisores y de la intensidad del pico en las primeras 12 horas; el hecho de que tras este pico el número de cercarias decrezca gradualmente hasta la total extinción significa, o bien que la velocidad de emisión es mayor que la velocidad de producción y maduración de cercarias dentro de los esporocistos, o bien que éstos detienen dichos procesos durante las fases de emisión;
  - la naturaleza de toda fase de emisión viene determinada por la duración del intervalo previo de no emisión y la duración de la última fase de emisión:
    - la duración del intervalo de no emisión entre dos fases de emergencia está claramente relacionada con la intensidad del pico máximo del número de cercarias emitidas en las primeras 12 horas de la nueva fase de emisión, lo cual significa que, durante dicho intervalo, el esporocisto se dedica a producir cercarias y a almacenarlas a la espera de emitir las;
    - toda fase de emisión representa una descarga de cercarias y el consiguiente descenso del número de las mismas en el interior de los esporocistos, de tal modo que según la duración de la fase de emisión se precisará de un intervalo subsiguiente de no emisión, mayor o menor, para alcanzar la total recuperación del esporocisto, hasta hallarse de nuevo completamente repleto de cer-

carias; la posterior fase de emisión se verá, por tanto, determinada por el momento en que ella misma se inicie, al establecerse entonces el final del intervalo previo de no emisión (comienzo de la emisión en las condiciones de recuperación en las que en aquel momento se hallan los esporocistos);

- este tipo de emisión sigue un patrón cronobiológico nuevo, diferente a todos los hasta ahora conocidos en las cercarias acuáticas (véase ERASMUS, 1972; THERON, 1975; COMBES & THERON, 1977); representa una indudable adaptación al medio terrestre y a la naturaleza de los segundos hospedadores intermediarios (otros caracoles terrestres); el único factor sincronizador parece ser la presencia de agua permitiendo la viabilidad de la fase cercariana de vida libre y estimulando la actividad de los Pulmonados; la irregularidad de este ritmo infradiano debe estar pues relacionada fundamentalmente con la secuencia de lluvias a lo largo del año.

## 6.2.- REFERENTES AL MORFOFUNCIONALISMO DEL APARATO GENITAL EN EL PASO DE METACERCARIA INFESTANTE A ADULTO GRAVIDO

El confucionismo existente en la descripción de los aparatos reproductores masculino y femenino de especies de Digénidos incluidas en la familia Brachylaimidae dificulta enormemente cualquier intento de discusión comparada. La antigüedad de las descripciones de algunas especies y la imprecisión de las mismas son hechos que han determinado directamente el confucionismo actualmente reinante en la citada familia. En la actualidad, autores como BROOKS, O'GLADY & GLEN (1985) quieren clarificar esta confusa situación, a nuestro parecer sin éxito, mediante el empleo de modelos matemáticos aplicados a la sistemática, consiguiendo, únicamente, la proposición de taxones sistemáticos basados en criterios morfológicos que ignoran totalmente los factores biológicos y ecológicos propios de cada especie.

Ante estas circunstancias, la tarea de comparar los resultados obtenidos por nosotros en nuestros estudios sobre la morfología y la funcionalidad de los aparatos reproductores masculino y femenino de Brachylaima ruminæ, con los presentados por otros autores acerca de especies de la misma familia, aparece prácticamente inabordable. Compararemos los resultados por nosotros obtenidos con aquellos referentes a las especies más representativas de la familia, cuyas descripciones muestren una cierta precisión, subrayando aquellas descripciones presumiblemente erróneas.

### 6.2.1.- DISCUSION

#### 6.2.1.1.- OOGENOTOPO

La particular complejidad de las estructuras que conforman el oogenotopo de los Digénidos incluidos en el género Brachylaima sensu lato y el solapamiento de sus trayectorias, así como el enmascaramiento de las mismas por los huevos acumulados en el inicio del útero en ejemplares muy grávidos causan, en ocasiones, dificultades en la observación correcta y en el esclarecimiento detallado de la configuración del oogenotopo.

SINIT SIN (1931) describe detalladamente las características generales del oogenotopo de la familia Harmostomidae. Este autor indica que el oviducto emerge del ovario y confluye con el canal de Laurer que se abre al exterior en la superficie dorsal del verme, presentando en la región central de su recorrido una zona dilatada que constituye el receptáculo seminal. Tras esta confluencia el oviducto recibe al conducto vitelino común y se dilata posteriormente para conformar el ootipo, a partir del cual emerge el útero. Sin embargo, JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID, (1934) indican que el receptáculo seminal está ausente en la familia Harmostomidae y apuntan la fácil confusión del ootipo con dicho receptáculo, circunstancia ésta que no deja de ser sorprendente a nuestro parecer. Esta diferencia de opinión entre autores tan representativos no hace sino aumentar el confusionismo en lo que se refiere a la sistemática de la familia. Contrariamente a la opinión de JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (loc. cit.) son muy numerosos los autores que coinciden con SINIT SIN (1931) en la existencia de un receptáculo seminal en la familia Harmostomidae. En este sentido se pronuncia YAMAGUTI (1935) en su descripción de Harmostomum syrmatici, destacando la presencia de un oogenotopo totalmente coincidente con el establecido por SINIT SIN (1931) y también LEWIS (1969) en su excelente descripción del oogenotopo de Brachylaemus oesophagei está de acuerdo en líneas generales con SINIT SIN, si bien hemos de indicar que el autor destaca la no existencia de receptáculo seminal en esta especie, aunque sus dibujos muestran la presencia de una dilatada en el canal de Laurer. TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN (1969) describen en gran número de especies que incluyen en la subfamilia Brachylaiminae e indican la presencia de receptáculo seminal en los subgéneros Brachylaemus (Brachylaemus), Brachylaemus (Centrodos) y Brachylaemus (Maxtrema), pero no para el género Glyphyrostomum en dos de cuyas especies indican que el receptáculo seminal está ausente.

ULMER (1951) describe el oogenotopo de Postharmostomum helicis que muestra el patrón típico de los Brachyláimidos, ya indicado por SINIT SIN (1931), y en este sentido se pronuncia también ROBINSON (1949) sobre esta misma especie. El oogenotopo de especies incluidas en los géneros Endosiphonus y Ectosiphonus, dentro de la familia Harmostomidae, presenta, según SINIT SIN (1931), la configuración típica de la familia. La detallada descripción del oogenotopo de la especie Scaphiostomum palearcticum llevada a cabo por MAS-COMA, ES-

TEBAN & VALERO (en prensa) revelan que sigue el patrón propio de la familia Brachylaimidae, si bien cabe destacar que la confluencia del canal de Laurer y del conducto vitelino común con el oviducto están muy próximas entre sí, teniendo lugar en el orden indicado.

SINITZIN (1931) y KRULL (1935 c) consideran que el oogenotopo de las especies incluidas en el género Panopistus no presenta modificaciones respecto del propio de la familia de que tratamos. BIOCCA & FERRETTI (1958) no describen con detalle el oogenotopo de Dollfusinus frontalis, pero sí lo hacen MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a), autores que muestran para esta especie un oogenotopo cuya estructuración general es la típica de la familia Brachylaimidae. Los mismos autores, MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa b), en sus estudios sobre el ciclo evolutivo de Pseudoleucochloridium pericardicum, destacan la descripción completa del oogenotopo de la especie, que, asimismo, sigue el patrón típico de la familia.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios relativos a la constitución del oogenotopo de Brachylaima ruminae nos permite indicar que dicho oogenotopo encaja perfectamente dentro del tipo descrito por SINITZIN (1931) para la familia Harmostomidae. Cabe únicamente destacar que hemos podido observar la presencia en el oviducto de una región inicial más dilatada que el resto del conducto y la situación laterodorsal del receptáculo seminal respecto de al ovario, así como la situación ventral del receptáculo vitelino y del conducto vitelino común respecto al ootipo y respecto a la confluencia del oviducto con el conducto procedente del receptáculo seminal.

#### 6.2.1.2.- CONDUCTOS TERMINALES DE LOS APARATOS GENITALES MASCULINO Y FEMENINO

La trayectoria y configuración de los conductos terminales del aparato genital masculino, incluyendo en ellos a los conductos eferentes, el conducto deferente y el cirro no parecen mostrar dentro de la familia Brachylaimidae la uniformidad que caracteriza al oogenotopo. Una gran parte de las descripciones de las especies llevadas a cabo por distintos autores no presentan la trayectoria exacta de dichos conductos y en muchas ocasiones resulta confusa.

SINITITSIN (1931) únicamente detalla la emergencia de los conductos eferentes en su descripción de Harmostomum migrans, especie en la que el eferente posterior emerge del tercio anterior del segundo testículo y el eferente anterior emerge de la región mediolateral del primer testículo, confluyendo aproximadamente a este nivel. Sin embargo, esta situación no es la más común para las especies cuyo poro genital está situado aproximadamente a nivel del margen anterior del primer testículo. En ellas, el conducto eferente posterior emerge de la superficie anterior del segundo testículo y el conducto eferente anterior emerge aproximadamente del margen anterior del primer testículo, confluyendo ambos a este nivel para originar el conducto deferente.

En este sentido, se pronuncian autores como JOHNSTON (1912) en su descripción de Harmostomum dasyuri, MASON (1953) para Brachylaima dolochodirus, KRUIDENIER & GALLICCHIO (1959) para Brachylaime rauschi, LEWIS (1969) para Brachylaimus oesophagei, así como MAS-COMA, ESTEBAN & VALERO (en prensa) para Scaphiostomum palearcticum. Similar disposición de los conductos eferentes es la indicada por ROBINSON (1949) para Postharmostomum helicis, pero en esta especie el conducto eferente anterior emerge de la región media del primer testículo y en este sentido se pronuncia ULMER (1951) para la misma especie.

FISCHTHAL & KUNTZ (1976) indican que en Glaphyrostomum taiwanense el conducto eferente posterior parte del margen anterior del segundo testículo y el eferente anterior emerge del borde posterior del testículo anterior. Estas mismas características son observadas por DAVIES (1932) en Ityogonimus lorum y por SINITITSIN (1931) y KRULL (1935 c) en el adulto y metacercaria, respectivamente, de Panopistus pricei. MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a) indican que el conducto eferente posterior emerge de la superficie anterior del segundo testículo y el eferente anterior del margen posterior del primer testículo, confluyendo a nivel del borde anterior del segundo testículo, en la especie Dollfusinus frontalis. Estos autores (MAS-COMA & MONTOLIU, en prensa b) destacan la misma situación en cuanto a emergencia de los conductos eferentes pero con la confluencia a nivel del ovario en Pseudoleucochloridium pericardicum.

En lo que se refiere a Brachylaima ruminiae nuestras observaciones concuerdan con las destacadas por los autores para las especies incluidas en el

género, si bien hemos de destacar que en nuestro material, el conducto eferente anterior emerge del primer testículo a un nivel variable entre su margen anterior y el tercio anterior del mismo.

El conducto deferente originado por la confluencia de los dos conductos eferentes muestra una gran variabilidad en su constitución dentro de la familia Brachylaimidae, variabilidad que, en ocasiones, bien pudiera atribuirse a observaciones poco detalladas por parte de algunos autores a pesar de la extensión de la bibliografía al respecto: JOHNSTON (1912) en Harmostomum das-yuri, GUBERLET (1928) en Harmostomum (Postharmostomum) hawaiiensis, WERBY (1928) en Harmostomum (Harmostomum) pellucidum, SINITSIN (1931) en Harmostomum migrans, JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1934) en Brachylaemus fuscatus, BALOZET (1937) en Brachylaemus suis, KRUIDENIER & GALLICCHIO (1959) en Brachylaime rauschi, NASIR & RODRIGUEZ (1966) en Brachylaima degiustii, UBELAKER & DAILEY (1966) en Brachylaima chiapensis, LEWIS (1969) en Brachylaimus oesophagei, TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN (1969) en Brachylaemus (Brachylaemus) advena, CABALLERO DELOYA (1970) en Brachylaemus (Brachylaemus) bravoae, FISCHTHAL & KUNTZ (1974) en Brachylaima (Brachylaima) sabahense, PEISLEY & HOWELL (1975) en Brachylaime antechini, KAMIYA & MACHIDA (1977) en Brachylaima ishigakiense.

Bien es cierto que la detección de una vesícula seminal externa es común a la mayor parte de las especies incluidas en el género Brachylaima, así como a especies incluidas en Postharmostomum (ULMER, 1951), en Glaphyrostomum (TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN, 1969), en Scaphiostomum (MASCOMA, ESTEBAN & VALERO, en prensa) y en Panopistus (VAUCHER & DURETTE-DESSET, 1978). En este sentido nuestras observaciones sobre Brachylaima ruminae nos permiten indicar que el conducto deferente, tras un corto trayecto en que aparece como un conducto estrecho, se ensancha y dilata enormemente, almacenando en su interior una gran cantidad de espermatozoides, por lo que pudiera denominarse vesícula seminal externa en esta región (al llevar a cabo evidentemente la función de almacenaje de esperma), concordando así estas observaciones con las enunciadas por un gran número de autores.

Ahora bien, no son tan numerosos los autores que detectan la presencia de una zona bien diferenciada situada entre el final del conducto deferente y el inicio de la bolsa del cirro, presente en Brachylaima ruminae, y que hemos denominado prebolsa, presentándose esta estructura rodeada por abundantes

células de apariencia glandular. En este sentido cabe destacar únicamente las observaciones de ROBINSON (1949) en Postharmostomum helicis, especie en la que destaca la presencia de células prostáticas rodeando la última porción del conducto deferente, pero estas observaciones no son ratificadas por ULMER (1951) en dicha especie. JOYEUX, BAER & TIMON-DAVID (1934) describen la presencia de un bucle rodeado de células en la región final de la vesícula seminal en Brachylaemus fuscatus. BALOZET (1937) detecta en Brachylaemus suis la presencia de células glandulares en la región terminal de la vesícula seminal y LEWIS (1969) indica la existencia de una pars prostatica externa a la bolsa del cirro, y en este sentido se pronuncian FISCHTHAL & KUNTZ (1974) en Brachylaima (B.) sabahense, PEISLEY & HOWELL (1975) en Brachylaima antechini, KAMIYA & MACHIDA (1977) en Brachylaima ishigakiense, FISCHTHAL & KUNTZ (1976) en Glaphyrostomum taiwanense y DAVIES (1932) en Ityogonimus lorum. Las observaciones de MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa a y b) acerca de Dollfusinus frontalis y Pseudoleucochloridium pericardicum incluyen la existencia de una bolsa diferenciada en la región distal del conducto deferente y son, por tanto, superponibles a las detectadas por nosotros en Brachylaima ruminiae.

La presencia de una bolsa del cirro conteniendo un cirro inerme y la ausencia de glándulas prostáticas intrabursales son hechos bien establecidos en la familia Brachylaimidae, teniendo en cuenta la presencia de un cirro espinoso exclusivamente en la única especie conocida en el subgénero Brachylaemus (Centrodus) según TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN (1969), así como en Glaphyrostomum taiwanense según FISCHTHAL & KUNTZ (1976) y la existencia de una bolsa del cirro rudimentaria en el subgénero Brachylaemus (Mazzantia) según los mismos autores brasileños. Otras excepciones son las citadas por VAUCHER & DURETTE-DESSET (1978) destacando la ausencia de bolsa de cirro en Panopistus pricei y en Entosiphonus thompsoni y por ULMER (1951) que no observa bolsa del cirro en Postharmostomum helicis, en tanto que ROBINSON (1949) la describe en esta especie. TRAVASSOS, TEIXEIRA DE FREITAS & KOHN (1969) indican la presencia de una bolsa del cirro poco desarrollada en Postharmostomum commutatum. En Brachylaima ruminiae encontramos una bolsa del cirro bien conformada, musculosa, que alberga un cirro inerme. En este cirro se distingue una zona inicial dilatada y una zona posterior estrecha, muy musculosa que constituye el conducto eyaculador, no observándose glándulas prostáticas en el interior de la bolsa del cirro, pero sí un gran número de células cro-

mófilas rodeando a la bolsa.

A este respecto hemos de indicar que únicamente ULMER (1951) describe la presencia de dos regiones en el cirro separadas por una constricción, refiriéndose a Postharmostomum helicis. BALOZET (1937) indica la presencia de células glandulares rodeando la bolsa del cirro en Brachylaima suis. MAS-COMA & MONTOLIU (en presa a y b) destacan la presencia de glándulas que rodean la bolsa del cirro en Dollfusinus frontalis y en Pseudoleucochloridium pericardicum.

En lo que se refiere al conducto terminal del aparato genital femenino, el metratermo o porción distal engrosada del útero, su presencia es general en todas las especies de la familia Brachylaimidae. Brachylaima ruminæ no constituye una excepción en este sentido y presenta un metratermo muy evidente, de paredes gruesas y musculosas, en forma de C, iniciándose a un nivel superior al poro genital para curvarse hacia abajo y ascender nuevamente al poro. Esta última característica ha sido destacada por numerosos autores, entre los que cabe citar a ROBINSON (1949) y ULMER (1951) en Postharmostomum helicis, LEWIS (1969) en Brachylaimus oesophagi entre otros. BALOZET (1937) describe la misma trayectoria para el metratermo de Brachylaemus suis y FISCHTHAL & KUNTZ (1973) indican que el metratermo tiene forma de C en Brachylaima fuscatus.

#### 6.2.1.3.- CRONOLOGIA DE LA MORFOFUNCIONALIDAD DE LAS ESTRUCTURAS GENITALES

Hemos indicado en apartados anteriores que la ausencia de datos relativos a la secuencia cronológica funcional seguida principalmente por los testículos y el ovario, en el pase de metacercaria infestante a adulto grávido, es prácticamente total en la familia Brachylaimidae. Únicamente podemos referirnos a los datos proporcionados por investigadores que llevan a cabo ciclos evolutivos experimentales dentro de esta familia y estos datos están referidos rutinariamente al tiempo transcurrido entre la infestación del hospedador definitivo con metacercarias y la eliminación de huevos maduros en las heces del mismo. Ahora bien, este intervalo de tiempo no coincide con el necesario para la aparición de los primeros huevos en el útero de los vermes y

no proporciona ningún tipo de información sobre la secuencia funcional de las gónadas del verme.

En este sentido ULMER (1951) indica que en Postharmostomum helicis los primeros huevos en el útero del verme aparecen tras 8 ó 9 días de la infestación del hospedador definitivo (Peromyscus maniculatus), en tanto que DEIANA & ARRU (1968) destacan que la metacercaria de Postharmostomum commutatum necesita 30 días para transformarse en adulto productor de huevos en pollos. JOURDANE (1976) muestra que la maduración de metacercarias de Pseudoleucochloridium soricis en musarañas tiene lugar en 24-36 horas y MAS-COMA & MONTOLIU (en prensa b) indican que la obtención experimental de adultos de Pseudoleucochloridium pericardicum en musarañas tiene lugar tras 48 horas de su infestación experimental.

La disparidad del intervalo de tiempo requerido por las metacercarias de las distintas especies de la familia Brachylaimidae para conseguir el estadio adulto, mostrada por los datos anteriormente citados, nos impide establecer un patrón general de evolución cronológica de las gónadas en dicha transformación y no nos permite comparar nuestros resultados con los pocos datos conocidos, ya que no disponemos de datos correspondientes a ninguna especie incluida en el grupo de Digénidos que nos ocupa.

Ante estas circunstancias cabe únicamente comparar los resultados obtenidos in vivo sobre la cronología de la funcionalidad de las estructuras genitales de Brachylaima ruminæ con los resultados obtenidos en el cultivo in vitro de esta misma especie y expuestos por nosotros en el presente estudio. Así, podemos indicar que la observación de espermatozoides en los testículos de individuos adultos de 4 días, obtenidos experimentalmente en ratones, coincide en el tiempo con la producción de espermatozoides por los testículos de individuos cultivados en el medio bifásico constituido por fase sólida + M199 + macerado (NBBS + Hanks).

La producción de sustancia vitelina por los individuos obtenidos in vivo se inicia al cabo de 2 días de infestación de los hospedadores y es ya intensa al cabo de 3 días, pero en individuos cultivados in vitro no se detecta si no es al cabo de 6 días de cultivo en el medio anteriormente indicado.

Es de destacar el hecho de que la detección prácticamente simultánea de

espermatozoides en testículos y de oocitos maduros en el ovario de individuos de 4 días de edad obtenidos in vivo no permite apoyar las opiniones emitidas por algunos autores sobre el carácter protándrico de algunas especies de Digénidos por lo menos en lo que se refiere a la especie Brachylaima ruminæ, si bien existe una falsa protandria de carácter morfométrico, por cuanto que los testículos muestran un incremento en sus dimensiones superior al mostrado por el ovario para un mismo intervalo de tiempo. A nuestro entender este hecho se deriva directamente de la propia naturaleza de los procesos de espermatogénesis que tienen lugar en los testículos y de los procesos de oogénesis ocurrientes en el ovario. En efecto, la producción de espermatozoides implica una serie de eventos de multiplicación celular por los cuales a partir de una célula única (espermátogonio primario) se obtiene un conjunto de treinta y dos espermáticas a partir de las que se originan los espermatozoides, presentando dichas agrupaciones de espermáticas un volumen muy superior al del elemento celular que las origina y determinando así un gran aumento de tamaño en los testículos. Los procesos de oogénesis, si bien implican la formación de un elemento celular (oocito maduro), no determinan un incremento tan importante en el volumen celular como el que tiene lugar en los procesos de espermatogénesis y este hecho tiene un reflejo directo en el incremento de las dimensiones del ovario que será, así, inferior al que experimentan los testículos.

#### 6.2.2.- CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo mediante la observación de individuos de Brachylaima ruminæ obtenidos experimentalmente in vivo y montados in toto, así como mediante la observación de cortes histológicos practicados sobre los mismos, nos permite establecer los hechos y alcanzar las conclusiones que enumeramos a continuación:

- el oogenotopo de Brachylaima ruminæ se ajusta exactamente, en su conformación general, al propio de la familia Brachylaimidae, cuyos representantes parecen ostentar una uniformidad y homogeneidad totales en este aspecto;

- este oogenotopo está constituido por un oviducto que emerge del nivel medio del ovario y de la cara ventral del mismo y describe una trayectoria aproximadamente horizontal y lateroventral, confluyendo con el conducto procedente del receptáculo seminal (laterodorsal respecto al ovario y localizado entre el margen posterior de éste y el margen anterior del testículo posterior), de cuyo extremo opuesto emerge el canal de Laurer (situado entre el ovario y el testículo posterior) que desemboca en la superficie dorsal del verme (eje medio del verme y a nivel del margen anterior del testículo posterior); posteriormente el oviducto confluye con el conducto vitelino común (ventral respecto a la anterior confluencia) que procede de un reservorio vitelino triangular (situado a nivel medio-posterior del ovario) en el que confluyen los dos viteloductos procedentes de las glándulas vitelógenas que emergen extracecalmente y por encima de los folículos posteriores de las mismas; el oviducto, tras esta confluencia (margen anterior del ovario), se dilata constituyendo el ootipo (ventral respecto al ovario y a nivel del borde superior del mismo), rodeado por la glándula de Mehlis constituida por dos tipos celulares distintos, a partir del cual se origina el útero;
  
- el conducto eferente posterior emerge del eje medio de la superficie anterior del testículo posterior y emprende una trayectoria ascendente recorriendo la cara ventral del ovario, dirigiéndose hacia la superficie internoanterior del primer testículo, donde emerge el conducto eferente anterior, confluyendo ambos conductos eferentes a este nivel;
  
- el conducto deferente presenta un primer tramo ascendente de diámetro reducido (conducto deferente inicial) y se ensancha abruptamente (a nivel medio de la bolsa del cirro), constituyendo el conducto deferente posterior (ensanchado y repleto de espermatozoides) que continúa con una trayectoria ascendente hasta sobrepasar ampliamente el inicio de la bolsa del cirro, des-

cribiendo un giro amplio sobre sí mismo, para descender nuevamente replegado. En su extremo distal sufre una contracción, tras la cual se distiende para constituir una curiosa prebolsa de paredes gruesas, rodeada por células de aspecto glandular que desembocan en su luz, de función momentáneamente desconocida (nunca detectada o descrita en otras familias de Digénidos según nuestros conocimientos, pero que ha sido también descrita con exactitud en algunos pocos representantes de la misma familia Brachylaimidae como Scaphiostomum, Pseudoleucochloridium y Dollfusinus) y que antes de entrar en la bolsa del cirro sufre una nueva contracción;

- la bolsa del cirro, bien desarrollada y notablemente alargada, encierra en su interior únicamente un conducto eyaculador que en su tramo inicial aparece dilatado y con luz muy evidente, presentando después una contracción muy brusca, transformándose en un conducto de luz estrecha cuyo extremo distal constituye el cirro (musculoso e inerme) que desemboca al exterior en el poro genital (situado a nivel del margen anterior del primer testículo y rodeado por órganos sensoriales tegumentarios abundantes); la bolsa del cirro aparece rodeada por células muy numerosas, de aspecto glandular;
- el metratermo es musculoso, bien conformado y se inicia por encima del poro genital, describiendo después una trayectoria descendente curva hasta un nivel inferior al poro genital, al cual accede tras una corta trayectoria curva; este metratermo está rodeado externamente por abundantes células metratérmicas de presumible naturaleza glandular;
- los testículos de los vermes de 24 horas de edad presentan espermatogonios (primarios, secundarios y terciarios), que originan espermátocitos primarios en los individuos de 48 horas, y espermátocitos secundarios en vermes de 3 días, que a su vez constituyen espermátidas y espermatozoides en especímenes de 4 días de edad; el ovario de los especímenes de 24 y 48 horas está

constituido por oogonios primarios, los cuales originan oocitos primarios en vermes de 3 días de edad y oocitos maduros en vermes de 4 días de edad; las glándulas vitelógenas inician la producción de sustancia vitelina en los especímenes de 2 días de edad;

- la detección simultánea de espermatozoides en los testículos y de oocitos maduros en el ovario de especímenes de 4 días no nos permite hablar de una protandria propiamente dicha en Brachylaima ruminæ, dada la comprobada simultaneidad en la puesta en marcha de la funcionalidad y actividad de las gónadas masculina y femenina;
- el receptáculo seminal se hace evidente en individuos de 2 días de edad y su volumen aumenta, detectándose sustancia vitelina en su interior en especímenes de 4 días; el conducto deferente posterior se inicia a niveles progresivamente más cercanos al borde anterior del primer testículo en vermes de edades crecientes; la prebolsa aparece bien delimitada ya en vermes de 24 horas y es en los especímenes de 3 días donde su luz aparece dilatada y son observables los límites internos de sus paredes.

### 6.3.- REFERENTES AL CULTIVO IN VITRO A PARTIR DEL ESTADIO DE METACERCARIA INFESTANTE

Son muy numerosos los autores que han llevado a cabo trabajos sobre cultivo in vitro de distintas especies de Digénidos, si bien en su mayor parte se refieren a los estadios larvarios y adulto de Schistosoma mansoni, especie que ha merecido especial atención por parte de los investigadores. Otras especies, tales como Schistosoma haematobium y recientemente Schistosoma japonicum han sido también objeto de estudios profundos, principalmente en lo que se refiere a los estadios larvarios de esta última (véase apartado 1.3.6.1).

En orden de importancia, cabe destacar también, los repetidos intentos de cultivar los estadios larvarios y adulto de Fasciola hepatica con resultados dispares (véase apartado 1.3.6.2.). Dentro de los Strigeidos, cobra especial interés el hecho de haber sido conseguida la continuación experimental del ciclo de Cotylurus lutzi a partir de huevos eliminados por adultos obtenidos in vitro por evolución de tetracotilos. Los estadios larvarios de esta especie y el estadio larvario de metacercaria de otras especies de Cotylurus han sido también cultivados, aunque con menor éxito (véase apartado 1.3.6.3.). Asimismo, la familia Diplostomatidae incluye algunas especies como Diplostomum phoxini y Diplostomum spathaceum cuyo estadio de metacercaria ha sido repetidamente cultivado in vitro (véase apartado 1.3.6.4.). Dentro de la familia Microphallidae han sido cultivados algunos estadios larvarios de especies como Gynaecotyla adunca, Microphallus pygmaeus y Microphallus similis (véase apartado 1.3.6.10.).

Los restantes datos bibliográficos referentes a cultivo in vitro de especies pertenecientes a otras familias constituyen intentos aislados dentro de las mismas, no habiéndose llevado a cabo el cultivo in vitro de más de una especie de ellas (véase apartados 1.3.6.6, 1.3.6.8, 1.3.6.9, 1.3.6.11 y 1.3.6.13), si bien en la familia Troglotrematidae cabe destacar el cultivo de especies como Paragonimus miyazakii y Paragonimus ohirai, además del cultivo de Paragonimus westermani como especie más estudiada.

Hemos de indicar la total ausencia de datos bibliográficos referentes al cultivo de especies de la familia Brachyalimidae, en la que incluimos la especie Brachylaima ruminiae sobre la que nosotros hemos trabajado, hecho que

nos impedirá la comparación de nuestros resultados con datos relativos al cultivo de especies de esta misma familia. Así, si bien FRIED & CONTOS (1973) en su trabajo sobre el cultivo in vitro de Leucochloridiomorpha constantiae y SCHNIER & FRIED (1980) en sus investigaciones sobre el cultivo de Amblosoma suwaense parecen admitir que estas especies se encuentran incluidas en la familia Brachylaimidae, MAS-COMA & GALLEGO (1975) apuntan la conveniencia de considerar que los géneros Leucochloridiomorpha y Amblosoma pertenecen a la familia Leucochloridiomorphidae, situando ambas familias dentro de la misma superfamilia Brachylaimoidea. Por tanto, las antedichas especies, aunque son las más próximas a Brachylaima ruminæ que han sido objeto de estudios de cultivo, no pertenecen a la misma familia (véase apartado 1.3.6.7).

Como consecuencia, la discusión de los resultados obtenidos en el cultivo in vitro de Brachylaima ruminæ estará referida, principalmente a los obtenidos para Leucochloridiomorpha constantiae y Amblosoma suwaense como especies más próximas, si bien aludiremos al cultivo de otras especies al objeto de conseguir una óptima comprensión de la problemática de que tratamos, haciendo especial hincapié en aquellas especies cultivadas in vitro y que in vivo son parásitas del intestino de un mamífero, al igual que sucede con Brachylaima ruminæ (similar biología: idéntico microhábitat de parasitación y hospedador definitivo semejante).

### 6.3.1.- DISCUSION

#### 6.3.1.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Los esfuerzos de algunos investigadores han estado dirigidos hacia la consecución de un medio de cultivo útil para el cultivo in vitro de especies próximas y que, a través de modificaciones en algunos de sus componentes respondiera a los requerimientos nutricionales de las mismas. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que las dificultades, en este sentido, son prácticamente insuperables, ya que especies muy próximas entre sí han presentado unos requerimientos nutricionales in vitro muy dispares, en tanto que,

en algunas ocasiones, la utilización de medios de cultivo muy similares ha permitido la consecución de buenos resultados en especies no estrechamente relacionadas entre sí.

Ahora bien, hemos de destacar que el empleo de medios de cultivo químicamente definidos tales como M 199, NCTC 135, etc., sí puede considerarse de utilización general por parte de un gran número de autores, aunque dichos medios han de ser modificados, ligeramente en algunos casos y profundamente en otros, por la adición de determinadas sustancias, en su mayoría de carácter orgánico, tales como distintos tipos de sueros, yema y albúmina de huevo, o bien de carácter inorgánico, siendo éste el caso de la adición de sales minerales, cuando no se hace necesario el empleo de un sustrato sólido o la utilización de cultivos monoxénicos que introducen una gran complejidad en la composición del medio de cultivo. En este sentido, la discusión de los resultados por nosotros obtenidos en el cultivo de Brachylaima ruminæ atenderá tanto al medio de cultivo básico empleado, como a los distintos factores de crecimiento adicionados. No hemos de olvidar la influencia que las condiciones de cultivo, tales como pH, atmósfera de cultivo, agitación y temperatura ejercen sobre los resultados obtenidos por lo que serán, asimismo, objeto de discusión en los apartados siguientes.

En nuestros estudios hemos tratado únicamente del paso de metacercaria infestante a adulto en Brachylaima ruminæ y este hecho nos conduce a no considerar en nuestra discusión aquellos trabajos relativos al cultivo de otros estadios larvarios tales como miracidio, esporocisto, redia y cercaria que han sido llevados a cabo por los investigadores en este campo, por considerar que los requerimientos implicados en las transformaciones que tienen lugar en el paso de uno a otro de estos estadios larvarios se alejan considerablemente de aquellos que pueden imperar en el paso de metacercaria a adulto, en la mayoría de las especies. Asimismo, el microhábitat intestinal en el que tiene lugar el paso de metacercaria a adulto en Brachylaima ruminæ delimita aún más las características de su cultivo in vitro y, en este sentido, los resultados obtenidos por otros autores relativos al cultivo de vermes intestinales serán aquellos que, en principio, consideraremos más próximos. Así, el cultivo de especies de Schistosoma, Fasciola, Paragonimus westermani, Isoparorchis hypselobagri en las que los microhábitats en que tiene lugar la evolución de

metacercaria a adulto o de schistosómulo a adulto en el caso de Schistosoma, son muy diferentes del intestinal, no será considerado en nuestra discusión.

#### 6.3.1.1.1.- MEDIOS BASICOS

VOGE & JEONG (1971) emplean NCTC 135 o bien TEM (Medio Triple Eagle) como medios básicos en el cultivo de Cotylurus lutzi, a los que adicionan una serie de factores de crecimiento en distintas proporciones. En sus resultados, estos autores, no obtienen ningún tipo de crecimiento en aquellos cultivos en que utilizan el medio TEM pero esta situación mejora considerablemente con el empleo de NCTC 135. Posteriormente, este medio básico NCTC 135 es utilizado por BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973) en el cultivo de la misma especie con excelentes resultados.

MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) indican que tanto el medio básico NCTC 135 como el medio M 199 igualmente suplementados con factores de crecimiento, proporcionan buenos resultados en el cultivo de Cotylurus erraticus. FRIED, BARBER & BUTLER (1978) emplean únicamente medio NCTC 135 en el cultivo de Cotylurus strigeoides como medio básico.

BELL & HOPKINS (1956), en su trabajo sobre el cultivo de Diplostomum phoxini, emplea simplemente soluciones salinas fisiológicas, principalmente Tyrode y Hanks, como base para el cultivo, con resultados deficientes. WYLLIE, WILLIAMS & HOPKINS (1960) utilizan soluciones salinas fisiológicas, principalmente Hanks, en sus cultivos de la citada especie pero no como medios básicos, sino preferentemente como aditivos a medios semisólidos. KANNANGARA & SMYTH (1974) ensayan una amplia gama de medios de cultivo para Diplostomum phoxini y Diplostomum spathaceum e introducen únicamente el medio químicamente definido NCTC 135 como componente básico en algunos de ellos y como aditivo en otros.

BERNTZEN & MACY (1969) emplean NCTC 109 y M 115 en el cultivo de Sphaeridiotrema globulus e indican la inferioridad de este último, en iguales condiciones de suplementación.

FRIED & CONTOS (1973) cultivando Leucochloridiomorpha constantiae y SCHNIER & FRIED (1980) en sus trabajos sobre Amblosoma suwaense emplean solu-

ciones salinas fisiológicas como Locke y Hanks en la preparación de medios de cultivo pero obtienen los mejores resultados en medios que contienen NCTC 135 como componente básico.

YASURAOKA, KAIHO, HATA & ENDO (1974) ensayan una amplia variedad de medios químicamente definidos en el cultivo de Parvatrema timondavidi, tales como solución Krebs-Ringer, Medio Mínimo Esencial Eagle, Medio 199 y NCTC 109 y obtienen los mismos resultados en estos dos últimos, siendo superiores a los obtenidos en Krebs-Ringer y en MME Eagle.

YASURAOKA & KOJIMA (1970) emplean únicamente el medio NCTC 109 en el cultivo de Metagonimus yokogawai. DAVIES & SMYTH (1979) emplean NCTC 135 como medio básico para la obtención de una amplia gama de medios de cultivo ensayados para Microphallus similis. FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977) destacan que el Medio Esencial Mínimo Eagle proporciona resultados superiores a NCTC 109, solos o con aditivos, en el cultivo de Microphalloides japonicus. HALTON & JOHNSTON (1983) únicamente ensayan medios de cultivo basados en NCTC 135 para el cultivo de Bucephaloides gracilescens.

Todos los medios de cultivo ensayados por nosotros en el cultivo de Brachylaima ruminae están basados en el medio químicamente definido M 199, que, como hemos indicado, ha sido también empleado por MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) proporcionando iguales resultados que el medio NCTC 135, más complejo, en el cultivo de Cotylurus erraticus. En este sentido se pronuncian también autores como YASURAOKA, KAIHO, HATA & ENDO (1974) quienes destacan la igual actividad de medios de cultivo basados en M 199 y en NCTC 109, siendo este último algo más complejo. Por el contrario, BERNTZEN & MACY (1969) destacan la superioridad de NCTC 109 respecto a M 115. En situaciones que podemos considerar como especiales, medios relativamente sencillos como el Medio Esencial Mínimo Eagle proporcionan resultados no iguales sino superiores a los correspondientes a medios más complejos tales como NCTC 109, siendo éste el caso del cultivo de Microphalloides japonicus en dichos medios, indicando los autores (FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977)), la no existencia de una explicación razonable para este hecho.

Como queda reflejado anteriormente, la mayoría de autores tienden a emplear medios químicamente definidos muy complejos, tales como NCTC 135 en la

confección de sus medios de cultivo en orden, posiblemente, a conseguir una optimización de los resultados y a asegurar la rápida consecución de los mismos, aunque quizás sería deseable el ensayo simultáneo de medios no tan complejos que si bien aseguran el aporte de algunos principios esenciales para el verme, permitan observar las posibles deferencias que tendrían lugar en el desarrollo de los mismos.

#### 6.3.1.1.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO

Los medios de cultivo empleados usualmente en el cultivo de Digénidos están constituidos básicamente por un medio químicamente definido, pero resulta prácticamente imprescindible, en el cultivo de la mayor parte de las especies, la adición de sustancias orgánicas o inorgánicas de naturaleza muy dispar y compleja, tales como sueros, extractos de hígado, de mucosa intestinal, yema o albúmina de huevo, hidrolizados de lactalbúmina, sales minerales, etc. En ocasiones el éxito o el fracaso de un cultivo in vitro puede depender no sólo de que el suero empleado sea homólogo o heterólogo respecto al hospedador definitivo donde se desarrolla la metacercaria en la Naturaleza, sino también de la proporción en que este suero entra a formar parte de los medios de cultivo, ya que un exceso del mismo podría inducir efectos inhibitorios sobre el desarrollo del verme. La inactivación por calor de los sueros previamente a su adición al medio de cultivo (30 minutos a 56 °C) parece ejercer, en términos generales, un efecto beneficioso sobre los resultados del cultivo y así lo indican autores tales como YASURAOKA, KAIHO, HATA & ENDO (1974) en el cultivo de Parvatrema timondavidi y FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977) en Microphalloides japonicus pero, por el contrario, SCHNIER & FRIED (1980) se pronuncian en el sentido opuesto, destacando que la inactivación del suero empleado en el cultivo de Amblosoma suwaense ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la metacercaria de esta especie, hecho posiblemente relacionado con la supuesta precipitación de componentes cuya actividad estaría dirigida a la impulsión del crecimiento de los vermes cultivados.

La procedencia comercial de algunos de los factores de crecimiento empleados rutinariamente en cultivo, tales como suero de caballo, pollo, etc.,

parece inducir variaciones en los resultados obtenidos debido a posibles diferencias existentes entre las propiedades de los sueros comerciales y en este sentido se pronuncian KANNANGARA & SMYTH (1974), autores que no consiguen la obtención de huevos en Diplostomum phoxini en medios con suero de caballo, en tanto que WYLLIE, WILLIAMS & HOPKINS (1960) obtienen huevos en un 5% de estos vermes cultivados en estos medios. Asimismo, DAVIES & SMYTH (1978) en el cultivo de Fasciola hepatica destacan las variaciones en los resultados obtenido en medios de cultivo iguales pero en los que el suero de pollo empleado corresponde a lotes comerciales diferentes.

La utilización de factores de crecimiento tales como yema y albúmina de huevo de gallina en forma de macerados procura a los vermes la presencia de partículas sólidas cuyo tamaño parece presentar una influencia importante sobre los resultados obtenidos, hecho éste observado por KANNANGARA & SMYTH (1974) en el cultivo de Diplostomum phoxini.

Consecuentemente, en la evaluación de la posible acción que los factores de crecimiento ejercen sobre el cultivo in vitro de un helminto cabe tener presentes las anteriores consideraciones.

Los medios de cultivo monofásicos empleados en nuestro estudio para el cultivo de las metacercarias de Brachylaima ruminae están constituidos por M 199 como medio básico químicamente definido y el más sencillo, dentro de este grupo, presenta la adición de suero bovino fetal, (60% v/v). Este factor de crecimiento ha sido utilizado por KANNANGARA & SMYTH (1974) en el cultivo de Diplostomum phoxini y de Diplostomum spathaceum, adicionado a NCTC 135 en un 25% v/v, indicando los autores que en este medio los vermes muestran un ligero crecimiento y un inicio de formación de las estructuras genitales, manteniéndose en este estado durante 1-2 semanas. Dentro de una amplia gama de medios ensayados en el cultivo de Echinoparyphium serratum HOWELL (1968) adiciona suero bovino fetal pero no obtiene evolución de la metacercaria. DAVIES & SMYTH (1979) emplean un medio de cultivo constituido por NCTC 135 - 20% de suero bovino fetal en el cultivo de Microphallus similis y consiguen la producción de huevos en un 100% de los vermes en cultivo, indicando que los huevos normales se producen en el primero y segundo días de cultivo, en tanto que posteriormente tiene lugar la producción de huevos anormales. En medio NCTC 135 desprovisto de suero bovino fetal no tiene lugar la producción de huevos.

FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977) emplean un medio constituido por MME Eagle con un 20% de suero bovino en el cultivo de Microphalloides japonicus y en él los vermes inician la producción de huevos al cabo de 24 horas de cultivo, teniendo lugar esta producción más rápidamente que en medios desprovistos de suero bovino. En este mismo sentido se pronuncian YASURAOKA, KAIHO, HATA & ENDO (1974) quienes indican que la adición de un 20% de suero bovino al medio NCTC 109 incrementa la producción de huevos en el cultivo de Parvatrema timondavidi, teniendo lugar antes de 48 horas del inicio del mismo.

La adición de suero bovino fetal al medio M 199 (60% v/v) en nuestros cultivos de Brachylaima ruminiae, permite el mantenimiento de la actividad de los vermes y un cierto crecimiento corporal pero no gonadal, no observándose maduración en gónadas al cabo de 2 días de cultivo, por lo que la adición de suero bovino fetal no parece presentar, en este caso, una influencia tan marcada sobre la evolución de las metacercarias como la que destacan los autores mencionados para las especies Microphallus similis, Microphallus japonicus y Parvatrema timondavidi. Cabe indicar que estas tres especies producen huevos in vivo transcurridos solamente 2 días desde la infestación del hospedador definitivo y los procesos de gametogénesis y oogénesis tienen lugar ya a las 12-24 horas de infestación, en tanto que la producción de huevos por Brachylaima ruminiae in vivo se inicia a los 4 días de la infestación del hospedador definitivo. Nuestros resultados parecen, pues, estar más relacionados con los presentados por KANNANGARA & SMYTH (1974) para Diplostomum phoxini y Diplostomum spathaceum y por HOWELL (1968) para Echinoparyphium serratum.

Ahora bien, cabe destacar aquí que la adición de sueros animales distintos al suero bovino fetal a medios químicamente definidos ha sido ampliamente utilizada por numerosos autores con buenos resultados en muchos casos. En este sentido se pronuncian VOGEL & JEONG (1971) que consiguen adultos de Cotylurus lutzi productores de huevos no embrionados en un medio constituido por NCTC 135 + 50% de suero de pollo y, asimismo, BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973) quienes emplean este mismo medio para el cultivo de la citada especie y adicionan extracto de intestino delgado de pollo, consiguiendo huevos viables capaces de eclosionar y producir miracidios infestantes. FRIED, BARBER & BUTLER (1978) emplean los dos medios anteriormente citados, en el cultivo de

Cotylurus strigeoides obteniendo adultos con huevos aparentemente no embrioados con el segundo medio. MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) adicionan, también un 80% de suero de pollo a los medios NCTC 135 o M 199 para conseguir adultos grávidos de Cotylurus erraticus con huevos anormales. Estas especies son parásitos intestinales de aves por lo que, en principio la adición de suero de pollo al medio de cultivo ha de ser beneficiosa para el desarrollo del parásito.

Sin embargo, ésto no ocurre así en todas las especies cultivadas in vitro y corroboran este hecho las experiencias de cultivo de KANNANGARA & SMYTH (1974) con Diplostomum phoxini y Diplostomum spathaceum, en las que la adición de suero de pollo al medio de cultivo no proporciona buenos resultados, así como el cultivo de Echinoparyphium serratum por HOWELL (1968), autor que no consigue el desarrollo de la metacercaria en medios con suero de pollo o de pato y las experiencias de FRIED & CONTOS (1973) en el cultivo de Leucochloridiomorpha constantiae, cultivo en el que la adición de suero de pollo tampoco consigue el desarrollo de la metacercaria, aunque todas estas especies han sido descritas en Aves. Análogamente, HALTON & JOHNSTON (1983) en su cultivo de Bucephaloides gracilescens, parásito de peces, no consiguen un incremento en la evolución de la metacercaria in vitro mediante la adición de suero de peces.

En nuestros trabajos sobre el cultivo de Brachylaima ruminiae hemos ensayado dos medios de cultivo monofásicos además del anteriormente mencionado (M 199 + 60% FCS). Estos medios están constituidos por M 199 + 20% FCS + macerado (NBBS + Hanks) y por M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + BEE + Hanks). Su composición es más compleja que la presentada por el primer medio discutido pues presentan, además de suero bovino fetal, suero bovino neonatal el primero de ellos y extracto de embrión bovino como nuevo aditivo el segundo de ellos.

Los resultados obtenidos en el medio M 199 + 20% FCS + macerado (NBBS + Hanks) podemos resumirlos (véase apartado 5.4.1) indicando que las metacercarias han sido cultivadas durante 23 días sin mostrar ningún tipo de evolución y siendo, por el contrario, observable una degeneración progresiva de los vermes durante el transcurso del cultivo. Por tanto, cabe indicar que la presencia de suero bovino neonatal no ejerce una influencia positiva en el cultivo

de estos vermes, en las condiciones cualitativas y cuantitativas en que entra a formar parte del medio. No conocemos datos bibliográficos referentes al empleo de este aditivo por otros autores, si bien KANNANGARA & SMYTH (1974), aunque no incluyen suero bovino neonatal en sus medios de cultivo para Diplostomum phoxini y Diplostomum spathaceum, sí que adicionan suero fetal de ternera formando parte de un macerado, como componente minoritario del mismo, pero su complejidad no permite deducir la influencia de esta sustancia sobre los resultados obtenidos. Asimismo, HOWELL (1968), incluye suero bovino fetal macerado en sus medios de cultivo para Echinoparyphium serratum pero no obtiene una evolución metacercarial.

El medio monofásico más complejo ensayado en el cultivo de Brachylaima ruminiae (M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + BEE + Hanks)) es aquél en el que son obtenidos los mejores resultados, observándose la presencia de sustancia vitelina en los vermes al cabo de 17 días de cultivo, aunque no se detecta ningún tipo de evolución en gónadas y sí una importante reducción en las dimensiones de las mismas que son inferiores a las de las metacercarias de partida, al cabo de 23 días de cultivo (véase apartado 5.4.1). Dado que las diferencias entre la composición de este medio y la del anteriormente mencionado radican en la proporción en que se presenta el suero bovino fetal y en la introducción de extracto de embrión bovino, cabe indicar que son éstos los factores responsables de la consecución de mejores resultados con este medio.

Autores como VOGEL & JEONG (1971) han introducido extracto de embrión bovino en sus medios para el cultivo de Cotylurus lutzi pero sus resultados indican que este factor, por sí mismo, no consigue inducir el crecimiento ni la producción de huevos por los vermes en cultivo. KANNANGARA & SMYTH (1974) ensayan medios de cultivo constituidos por NCTC 135 y extracto de embrión bovino, para el cultivo de Diplostomum phoxini y de Diplostomum spathaceum, pero indican que las metacercarias no muestran más que un ligero crecimiento en estos medios. Estos resultados vienen corroborados por los obtenidos por BELL & HOPKINS (1956) en el cultivo de Diplostomum phoxini, indicando dichos autores que la inclusión de extracto de embrión bovino en medios con suero de caballo y solución Tyrode glucosada no induce la evolución gonadal y que la adición de dicha sustancia a medios de cultivo constituidos por solución Hanks únicamente, o bien adicionados con glucosa o suero de caballo o con estas dos úl-

timas sustancias simultáneamente, no incrementa la actividad nuclear de los vermes en cultivo. FRIED & CONTOS (1973) ensayan medios de cultivo constituidos por Locke, McCoy, Medio Mínimo Esencial Eagle, M 199 o hidrolizado de lactalbúmina con la adición de extracto de embrión de pollo en el cultivo de Leucochloridiomorpha constantiae e indican que los vermes se mantienen únicamente durante 4 ó 5 días en los mismos. DAVIES & SMYTH (1979) ensayan un medio de cultivo constituido por NCTC 135 con un 20% de suero bovino fetal y un 1% de extracto de embrión bovino para el cultivo de Microphallus similis obteniendo vermes con huevos únicamente anormales, en tanto que en el mismo medio, exento de extracto de embrión bovino, los vermes producen huevos normales por lo que este factor parece ejercer una influencia negativa sobre los resultados obtenidos. YASURAOKA & KOJIMA (1970) indican que la adición de extracto de embrión de pollo a un medio en el que intervienen NCTC 109 y suero humano mejora los resultados del cultivo consiguiendo la aparición de huevos en Metagonimus yokogawai. Así, pues, el extracto de embrión bovino no parece mejorar los resultados obtenidos en medios de cultivo exentos de este factor, aunque nuestros resultados nos sitúan ante una situación inversa. Sin embargo, no hemos de olvidar que la introducción de extracto de embrión bovino no es la única diferencia entre los dos últimos medios discutidos, ya que el suero bovino fetal se incrementa tres veces en el segundo medio y esta circunstancia puede presentar una cierta influencia sobre los resultados .

En lo que se refiere a los resultados obtenidos en este estudio en el cultivo de Brachylaima ruminiae empleando medios bifásicos, hemos de destacar que son estos medios los que permitan una mejor evolución in vitro de nuestra especie (véase apartado 5.4.2.). Todos los medios bifásicos empleados presentan suero bovino neonatal coagulado como fase sólida y distintas fases líquidas.

El medio constituido por fase sólida y M 199 + 20% FCS no proporciona buenos resultados ya que no soporta la evolución de las metacercarias, observándose, al cabo de 16 días de cultivo, un único individuo con una pequeña cantidad de sustancia vitelina en glándulas vitelógenas, en tanto que la mayor parte de los vermes aparecen degenerados al cabo de 23 días de cultivo. El medio constituido por fase sólida y M 199 con un 60% de suero bovino fetal presenta unos resultados muy superiores al anteriormente mencionado, presentán-

dose sustancia vitelina en glándulas vitelógenas al cabo de 15 días y en el reservorio vitelino y en inicio de útero en el día 19, así como espermatozoides en el reservorio seminal en individuos observados tras 20 días de cultivo, si bien tiene lugar una importante regresión en sus dimensiones corporales que llegan a ser inferiores incluso a las de las metacercarias de partida. Siendo la proporción de suero bovino fetal la única diferencia entre ambos medios, cabe considerar que la adición de esta sustancia en proporciones altas mejora los resultados obtenidos.

VOGE & JEONG (1971) ensayan medios bifásicos en el cultivo de Cotylurus lutzi, empleando agar sangre como fase sólida y TEM o NCTC 135 como fase líquida, pero no soportan el crecimiento del verme. KANNANGARA & SMYTH (1974) ensayan una amplia variedad de medios bifásicos en el cultivo de Diplostomum phoxini y de Diplostomum spathaceum, que presentan como fase sólida suero de caballo o yema de huevo coagulados y agar sangre o agar suero y como fase líquida diferentes combinaciones de NCTC 135 con sueros animales tales como suero bovino fetal, pero los autores indican que no hay una evolución de las metacercarias en estos medios. HOWELL (1968) en sus cultivos de Echinoparyphium serratum emplea un medio bifásico con suero bovino coagulado como fase sólida y suero bovino como fase líquida pero no consigue ningún tipo de evolución. DAVIES & SMYTH (1979) ensayan un medio bifásico constituido por suero bovino neonatal como fase sólida y NCTC 135 con un 20% de suero bovino fetal como fase líquida, obteniendo adultos de Microphallus similis productores de huevos, si bien el número medio de huevos anormales por verme es superior en este medio que en el medio constituido por la fase líquida del mismo. Observamos, pues, que DAVIES & SMYTH (loc. cit.) son los únicos autores que ensayan un medio bifásico similar a los ensayados por nosotros y obtienen buenos resultados, pero no superiores a los que obtenían empleando únicamente la fase líquida de dicho medio, siendo estos resultados distintos a los obtenidos por nosotros, ya que la introducción de la fase sólida parece potenciar la evolución de las metacercarias de Brachylaima ruminæ aún con una fase líquida muy sencilla en su composición (M 199 + 60% FCS), si bien el medio monofásico más completo de los ensayados (M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + BEE + Hanks)) apuntaba ya el inicio de esta evolución en los vermes en él cultivados.

El empleo de medios bifásicos más complejos en el cultivo de Brachylaima ruminiae mejora notablemente los resultados obtenidos (véase apartado 5.4.2), pero la ausencia de datos bibliográficos sobre experiencias de cultivo en las que intervengan medios bifásicos similares a los empleados por nosotros no permite la discusión comparativa de resultados. Únicamente KANNANGARA & SMYTH (1974) ensayan medios de cultivo bifásicos complejos en los que la fase sólida es suero de caballo o yema de huevo coagulados y agar sangre o agar suero y la fase líquida incluye un complejo macerado en el que se incluye suero bovino fetal, pero no obtienen buenos resultados en el cultivo de Diplostomum phoxini y de Diplostomum spathaceum.

Los dos medios de cultivo semisólidos empleados en el cultivo in vitro de Brachylaima ruminiae, constituidos por yema y albúmina de huevo de gallina, CMRL 1066 con un 20% de suero bovino fetal como sustancias comunes a ambos y extracto de embrión bovino en uno de ellos, no soportan ningún tipo de evolución en las metacercarias. Ahora bien, la inclusión de yema y albúmina de huevo en los medios de cultivo proporciona resultados muy dispares, en función de las especies cultivadas. Así, el empleo de medios constituidos por NCTC 135 con un 20 ó 30% de yema de huevo de gallina no permite la evolución de las metacercarias de Cotylurus erraticus según VOGÉ & JEONG (1971) y la inclusión de un 20% de yema de huevo de gallina en NCTC 135 inhibe el crecimiento de Cotylurus lutzi según BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973). Asimismo, el empleo de NCTC 135 con un 20% de yema de huevo y un 20% de suero bovino fetal provoca la muerte de Microphallus similis en cultivo y la adición de yema de huevo de gallina al medio constituido por NCTC 109, extracto de embrión de pollo y suero humano no mejora los resultados obtenidos en este medio por YASURAOKA & KOJIMA (1970) para Metagonimus yokogawai.

Por otra parte, son muy numerosos los autores que destacan la obtención de óptimos resultados en el empleo de medios con huevo de gallina. Es de destacar el trabajo de BERTZEN & MACY (1969) que consiguen adultos de Sphaeridiotrema globulus productores de huevos capaces de embrionar y eclosionar, en un medio constituido por NCTC 135 con un 20% de yema de huevo de gallina. BELL & HOPKINS (1956) emplean en medio de cultivo constituido por suero de pato y yema de huevo infértil de pato para el cultivo de Diplostomum phoxini consiguiendo la presencia de espermatozoides activos en 48 horas. KANNANGARA &

SMYTH (1974) ensayan una amplia variedad de medios en el cultivo de la anteriormente citada especie y de Diplostomum spathaceum e indican que los medios semisólidos constituidos por NCTC 135 al que se adiciona extracto de levadura, glucosa y yema y albúmina de huevo de gallina, y principalmente aquellos medios en que yema, albúmina o ambas coaguladas se adicionan a NCTC 135 con extracto de levadura, glucosa y suero bovino fetal, macerando la mezcla, procuran excelentes resultados, consiguiendo dichos autores una evolución de la metacercaria hasta la producción de huevos anormales. Autores tales como WYLLIE, WILLIAMS & HOPKINS (1960) y WILLIAMS, HOPKINS & WYLLIE (1961) intentan sustituir la yema de huevo por extracto de levadura en los medios empleados en el cultivo de Diplostomum phoxini consiguiendo la producción de huevos anormales en un medio constituido por albúmina de huevo, solución salina glucosada, suero de caballo y extracto de levadura. HOWELL (1968) indica que en su cultivo de Echinoparyphium serratum los medios están constituidos por yema y albúmina de huevo de gallina en Hanks. HALTON & JOHNSTON (1983) emplean también medios semisólidos en los que interviene NCTC 135, suero de pollo, yema y albúmina, en el cultivo de Bucephaloides gracilescens, obteniendo adultos con huevos no viables.

Cabe destacar que las dos especies más próximas a Brachylaima ruminæ, como son Leucochloridiomorpha constantiae y Amblosoma suwaense han sido cultivadas con éxito en medios conteniendo huevo. Así, FRIED & CONTOS (1973) cultivan Leucochloridiomorpha constantiae en medios de cultivo muy sencillos, constituidos por NCTC 135 con un 20% de yema de huevo, indicando los autores que concentraciones de huevo inferiores no soportan el desarrollo de los vermes y que concentraciones superiores al 40% no implican un impulso en el desarrollo. En estos medios los vermes presentan huevos al cabo de 4 días de cultivo, pero su viabilidad no ha sido determinada. SCHNIER & FRIED (1980) cultivan metacercarias de Amblosoma suwaense en NCTC 135 con un 20% de yema de huevo, obteniendo adultos grávidos en 4 días e indican que la superficie corporal media de los vermes cultivados durante 7 días decrece en un 20% respecto a la de las metacercarias pero las gónadas incrementan su superficie.

Estos resultados no parecen concordar con los obtenidos por nosotros en Brachylaima ruminæ, ya que esta especie no muestra ningún tipo de evolución en medios semisólidos, en los que interviene el huevo de gallina. Quizás la

naturaleza dispar de su hospedador definitivo tenga algo que ver en esta cuestión (se trata de Aves en los dos Leucochloridiomorphidos).

#### 6.3.1.2.- CONDICIONES DE CULTIVO

Los resultados obtenidos en el cultivo in vitro de helmintos no vienen únicamente influenciados por la composición del medio de cultivo, sino que aquellas condiciones establecidas en el cultivo, tales como pH, temperatura y atmósfera de cultivo muestran una influencia decisiva en muchos casos, sobre el desarrollo de los cultivos.

##### 6.3.1.2.1.- ATMOSFERA DE CULTIVO

La determinación del consumo de oxígeno por parte de algunas especies de helmintos ha sido llevada a cabo, pero en un número mínimo por lo que la ausencia de datos en este sentido es muy importante. Asimismo, los datos sobre la tensión de oxígeno de los microhábitats frecuentados por los parásitos son muy escasos. SILVERMAN (1963) y BERNTZEN (1966) indican que los helmintos requieren oxígeno a bajas tensiones pero estos conceptos están actualmente sometidos a revisión ya que actualmente gran número de autores opina que, en lo que se refiere a los helmintos intestinales, éstos se encuentran adyacentes a la mucosa intestinal donde disponen de oxígeno. En este sentido cabe destacar que algunos estudios llevados a cabo sobre el consumo de oxígeno por parte de Brachylaima microti permiten suponer la presencia de un metabolismo de tipo aerobico en esta especie, si bien su hábitat es pancreático y estos resultados no son, en principio, extrapolables a especies intestinales como Brachylaima ruminæ.

Nuestros cultivos de Brachylaima ruminæ han sido llevados a cabo de manera rutinaria, empleando aire como atmósfera de cultivo. Algunos autores han comprobado que el cultivo en condiciones aeróbicas impulsa la producción de huevos en los vermes, y en este sentido se pronuncian autores como VOGÉ & JEONG (1971) quienes observan que el aire como atmósfera de cultivo conduce a

resultados superiores a los observados en cultivos con atmósfera constituida por 95%N, 5%CO<sub>2</sub> o por 90%N, 5%CO<sub>2</sub> y 5%O<sub>2</sub> en Cotylurus lutzi y, asimismo, BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973) emplean aire como atmósfera de cultivo en sus estudios sobre la misma especie y MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) con Cotylurus erraticus, así como FRIED & CONTOS (1978) en Cotylurus strigeoides. BELL & HOPKINS (1956) emplean aire en el cultivo de Diplostomum phoxini y KANNANGARA & SMYTH (1974) indican que la utilización de aire o de 80%N<sub>2</sub>, 15% O<sub>2</sub> y 5%CO<sub>2</sub> proporciona los mismos resultados en el cultivo de la citada especie y de Diplostomum spathaceum. HOWELL (1968) emplea aire como atmósfera de cultivo de Echinoparyphium serratum cuando emplea medios con huevo. Según DAVIES & SMYTH (1979) el empleo de condiciones anaeróbicas en el cultivo de Microphallus similis, inhibe el desarrollo de los vermes y FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977) emplean aire en el cultivo de Microphalloides japonicus. En el cultivo de especies próximas a Brachylaima ruminiae, tales como Leucochloridiomorpha constantiae (FRIED & CONTOS, 1973) y Amblosoma suwaense (SCHNIER & FRIED, 1980) la atmósfera de cultivo es aire.

Por el contrario, BERNTZEN & MACY (1969) en el cultivo de Sphaeridiotrema globulus emplean varias fases gaseosas en las que hay un 10%O<sub>2</sub>, en tanto que las proporciones de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> varían juntamente con la cantidad de HCO<sub>3</sub>Na adicionado al medio, con el fin de lograr distintos pH de cultivo. YASURAOKA & KOJIMA (1970) en el cultivo de Metagonimus yokogawai y YASURAOKA, KAIHO, HATA & ENDO (1974) en el cultivo de Parvatrema timondavidi emplean como fase gaseosa aire con un 8% de CO<sub>2</sub>.

#### 6.3.1.2.2.- pH Y TEMPERATURA

Actualmente se admite que el microhábitat paramucosal propio de una gran parte de helmintos intestinales tiene un pH próximo a la neutralidad y, por tanto, una gran parte de los investigadores introducen este pH en sus medios de cultivo para helmintos principalmente intestinales. FRIED & CONTOS (1973) establecen un rango de pH comprendido entre 7,2 y 8,0 en sus medios e indican que, entre estos límites, el pH no influye sobre el desarrollo de Leucochloridiomorpha constantiae y en este sentido se pronuncian también BERNTZEN & MACY

quienes en sus cultivos de Sphaeridiotrema globulus establecen una serie de pH similar a la anterior indicando que únicamente pH inferiores a 7,2 inhiben el crecimiento de los vermes. En nuestros cultivos de Brachylaima ruminiae hemos fijado rutinariamente un pH próximo a la neutralidad (7,2-7,4).

La temperatura de cultivo viene dada directamente por la naturaleza del hospedador definitivo en el que tiene lugar la evolución del parásito que se intenta reproducir in vitro. Así, nuestros cultivos de Brachylaima ruminiae han sido llevados a cabo a  $37 \pm 1$  °C dado que el hospedador definitivo es un micromamífero perteneciente al grupo de los Roedores. SCHNIER & FRIED (1980) cultivan Amblosoma suwaense a 37,5 °C e indican que los adultos no han sido descritos en hospedadores experimentales ni naturales (aunque por parentesco cabe pensar lógicamente en un Ave). FRIED & CONTOS (1973) emplean temperaturas comprendidas entre 37,5 y 42 °C en el cultivo de Leucochloridiomorpha constantiae parásito de Aves y destacan que variaciones de temperatura comprendidas en el antedicho intervalo no influyen en el desarrollo de los vermes. BERNTZEN & MACY (1969) cultivan Sphaeridiotrema globulus, parásito de Aves, a 37 y 41 °C, e indican que se obtiene mejores resultados a esta última temperatura. VOGÉ & JEONG (1971) indican que la producción de huevos en Cotylurus lutzi es óptima a 39-41 °C y decrece a temperaturas inferiores, resultados concordantes con los obtenidos por BASCH, DICONZA & JOHNSON (1973) para esta especie. MITCHELL, HALTON & SMYTH (1978) y FRIED, BARBER & BUTLER (1978) recomiendan temperaturas de cultivo de 41 °C para Cotylurus erraticus y Cotylurus strigeoides, especies todas ellas descritas en Aves.

KANNANGARA & SMYTH (1974) y BELL & HOPKINS (1956) emplean temperaturas de cultivo de 39-41 °C para varias especies de Diolostomum, también parásitas de Aves. DAVIES & SMYTH (1979) cultivan Microphallus similis, descrito en gaviotas, a 38-41 °C, en tanto que FUJINO, HAMAJIMA, ISHII & MORI (1977) cultivan Microphalloides japonicus, descrito en ratas, a 37 °C y, por último, HALTON & JOHNSTON (1983), cultivan Bucephaloides gracilescens, descrito en peces, a 18 °C.

Observamos, pues, que es conveniente aproximar la temperatura de cultivo a aquella que es propia del hospedador donde tiene lugar la evolución que se intenta reproducir in vitro.

### 6.3.2.- CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo sobre el cultivo in vitro de Brachylaima ruminiae, desde el estadio de metacercaria infestante hasta el de adulto, nos permiten establecer los hechos y extraer las conclusiones que a continuación enumeramos de modo conciso:

- el medio de cultivo monofásico constituido por M 199 + 20% FCS + macerado (NBBS + Hanks) no permite ningún tipo de evolución de las metacercarias en él cultivadas e induce la degeneración de estos vermes al cabo de 23 días de cultivo;
- el medio de cultivo monofásico constituido por M 199 + 60% FCS soporta un ligero crecimiento somático pero no gonadal de las metacercarias y no impulsa la maduración de los testículos ni del ovario al cabo de 2 días de cultivo;
- el medio de cultivo monofásico constituido por M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + BEE + Hanks) permite la evolución de las glándulas vitelógenas de los vermes en cultivo, apareciendo en ellas sustancia vitelina al cabo de 17 días de cultivo, pero no tiene lugar ningún tipo de maduración en gónadas y los vermes muestran una considerable reducción en sus medidas corporales al cabo de 23 días de cultivo respecto a las propias de las metacercarias control;
- el medio de cultivo bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 20% FCS permite la aparición de fenómenos degenerativos en los vermes en él cultivados, al cabo de 6 días de cultivo pero, simultáneamente, soporta el inicio de la evolución de las glándulas vitelógenas, con producción de sustancia vitelina, aunque en cantidad muy escasa, al cabo de 16 días de cultivo en un único individuo;
- el medio de cultivo bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS induce la aparición de sustancia vitelina en las glándu-

las vitelógenas de los vermes al cabo de 11 días de cultivo, y en el reservorio vitelino e inicio del útero al cabo de 19 días de cultivo, así como la producción de espermatozoides por los testículos y su acumulación en el reservorio seminal, observadas al cabo de 20 días de cultivo;

- el medio de cultivo bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + Hanks) soporta la evolución de los testículos de las metacercarias con producción de espermatozoides al cabo de 4 días de cultivo, así como la evolución de las glándulas vitelógenas que inician la producción de sustancia vitelina en el día 6 de cultivo, presentándose dicha sustancia en el reservorio vitelino e inicio del útero a partir de día 18 de cultivo;
- el medio de cultivo bifásico constituido por fase sólida + M 199 + 60% FCS + macerado (NBBS + BEE + Hanks) permite la evolución de las glándulas vitelógenas de los vermes, apareciendo en ellas sustancia vitelina al cabo de 6 días de cultivo y en el reservorio vitelino e inicio del útero al cabo de 15 días de cultivo; en el interior del útero de los vermes, esta sustancia vitelina determina la formación de acúmulos no rodeados por ningún tipo de cubierta, pero de forma similar a la de los huevos de los vermes adultos, que progresan a lo largo del útero hasta un nivel prácticamente acetabular;
- los medios semisólidos constituidos por yema y albúmina de huevo de gallina + CMRL 1066 + 20% FCS con o sin BEE no permiten la evolución de las glándulas vitelógenas de los vermes, si bien no inducen la aparición de procesos degenerativos en los mismos a lo largo de 7 días de cultivo.

No queremos finalizar este apartado de conclusiones, alcanzadas en nuestros estudios experimentales sobre el cultivo in vitro de Brachylaima ruminiae, sin dejar constancia de un hecho especialmente interesante. Nos referimos a la peculiaridad, tantas veces aludida por los distintos autores, de la pronun-

ciada falta de especificidad mostrada por los estadios adultos de especies de la familia Brachylaimidae, y en especial del género Brachylaima sensu lato, en ensayos de infestación experimental de hospedadores definitivos pertenecientes a grupos zoológicos filogenéticamente muy dispares, tales como Roedores, Marsupiales y Aves. Esta especificidad había ya sido puesta en duda en cierto modo por MAS-COMA & MONTOLIU (Comunicación presentada en el IV Congreso Internacional de Parasitología, Toronto) al exponer una evolución resumida del grupo de Digénidos en cuestión, en la cual se establecía una relación clara entre los Brachylaimidos y sus hospedadores definitivos, relación que además parece ser aún más marcada de lo que se creía, de acuerdo con los últimos y recientes estudios de MAS-COMA y colaboradores en Valencia. Pues bien, si se piensa que una especificidad escasa implica unos requerimientos poco especializados, los resultados obtenidos en nuestros ensayos in vitro no parecen confortar tal idea. Así, aditivos procedentes de grupos zoológicos distintos como Aves y herbívoros del tipo de los Bóvidos no parecen dar resultados positivos, cuando no negativos (piénsese que nuestro Digénido pertenece al género Brachylaima sensu stricto, cuyo espectro de hospedadores definitivos actualmente conocido está constituido esencialmente por Insectívoros, Roedores y Aves y sólo esporádicamente por Marsupiales y Carnívoros, siendo de destacar la ausencia de los grandes herbívoros como Rumiantes Y Lagomorfos). Uno se pregunta cuantos pases generacionales sería capaz de soportar una especie de Brachylaima, parásita de Roedores, en Aves y sin darle la posibilidad de pasos intermedios en Roedores. Todo parece indicar, pues, que los Digénidos de la familia Brachylaimidae (las especies de otros géneros de la familia se muestran aún más restringidos y específicos en cuanto a hospedadores definitivos, siendo Brachylaima sensu stricto el menos especializado por ser evolutivamente el más moderno) son, a nivel de hospedador definitivo, más exigentes de lo que se ha venido pensando hasta la fecha.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

### A

- 1.- ALICATA (J.E.), 1938.- Life history of the cecal fluke, Postharmostomum gallinum. J. Parasit., 24 (Suppl.): 29.
- 2.- ALICATA (J.E.), 1940.- The life cycle of Postharmostomum gallinum, the cecal fluke of poultry. J. Parasit., 26 (2): 135-143.
- 3.- APPLETON (C.C.), 1983.- Studies on Australobilharzia terrigalensis (Trematoda: Schistosomatidae) in the Swan Estuary, Western Australia: observations on the biology of the cercaria. Int. J. Parasit., 13 (3): 239-247.
- 4.- ASCH (H.L.), 1972.- Rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata. Control of illumination. Exp. Parasit., 31: 350-355.

### B

- 5.- BAER (J.G.), 1932.- Contribution à la faune helminthologique de Suisse. Rev. Suisse Zool., 39 (1): 1-56.
- 6.- BAER (J.G.), 1971.- Trématodes de rongeurs récoltés en Côte d'Ivoire. Z. Parasitenkd., 37: 226-254.
- 7.- BAER (J.G.) & JOYEUX (Ch.), 1961.- Classe des Trématodes (Trematoda Rudolphi). En: Traité de Zoologie. Anatomie, Systematique, Biologie. Grassé, P.P., edit. Masson et Cie Edit., Paris, 4 (1): 561-692.
- 8.- BALOZET (L.), 1937.- Brachylaemus suis Mihi, 1936, trématode de l'intestin du porc. Rôle pathogène et cycle évolutif. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 26: 36-67.
- 9.- BARBOSA (F.S.), COELHO (M.V.) & DOBBIN (J.E.), 1954.- Qualidades de vetor dos hospedeiros de S. mansoni no nordeste do Brasil. II. Duração da infestação e eliminação de cercárias em A. glabratus. Publ. Avul. Inst. Aggeu Magalhães, 3: 78-93.
- 10.- BARLOW (C.H.), 1925.- The life cycle of the human intestinal fluke Fascio-

- lopsis buski (Lankester). Amer. J. Hyg., Monogr. ser, 4: 1-98.
- 11.- BARTOLI (P.), 1974.- Recherches sur les Gymnophallidae F.N. Morozow, 1955 (Digenea) parasites d'Oiseaux des Côtes de Camarques: systématique, biologie et écologie. Thèse Doct., Univ. des Sciences, Marseille. 338 p.
- 12.- BARUS (V.), RYSAVY (B.) & (GROSCHAFT (J.)), 1969.- The helminths of the turkey (Meleagris gallopavo f. dom.) in Cuba. Helminthologia, 10: 347-360.
- 13.- BASCH (P.E.), 1981 a.- Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. J. Parasit., 67 (2): 179-185.
- 14.- BASCH (P.F.), 1981 b.- Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. II. Production of infertile eggs by worms pairs cultured from cercariae. J. Parasit., 67 (2): 186-190.
- 15.- BASCH (P.F.) & DICONZA (J.J.), 1974.- The miracidium-sporocyst transition in Schistosoma mansoni: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. J. Parasit., 20: 935-941.
- 16.- BASCH (P.F.) & DICONZA (J.J.), 1975.- Cotylurus lutzi (Strigeidae): pre- and postadult stages cultures in vitro. J. Invert. Path., 26: 263-264.
- 17.- BASCH (P.F.) & HUMBERT (R.), 1981.- Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. III. Implantation of cultures worms into mouse mesenteric veins. J. Parasit., 67: 191-195.
- 18.- BASCH (P.F.), DICONZA (J.J.) & JOHNSON (B.E.), 1973.- Strigeid trematodes (Cotylurus lutzi) cultures in vitro: production of normal eggs with continuance of life cycle. J. Parasit., 59: 319-322.
- 19.- BAUMAN (P.M.), BENNETT (H.J.) & INGALLS (J.W.jr.), 1948.- The molluscan intermediate host and Schistosomiasis japonica. II. Observations on the production and rate of emergence of cercariae of Schistosoma japonicum from the molluscan intermediate host, Oncomelania quadrasi. Amer. J. Trop. Med., 28:567-576.
- 20.- BAYSSADE-DUFOUR (Ch.), 1979.- L'appareil sensoriel des cercaires et la systématique des Trématodes Digénétiques. Mém. Mus. Nat. Hist. Nat., sér. A, Zool., 113: 1-81.

- 21.- BELL (E.J.) & HOPKINS (C.A.), 1956.- The development of Diplostomum phoxini (Strigeidae, Trematoda). Ann. Trop. Med. Parasit., 50: 275-282.
- 22.- BELL (E.J.) & SMYTH (J.D.), 1958.- Cytological and histochemical criteria for evaluating development of Trematodes and Pseudophyllidean Cestodes in vivo and in vitro. Parasitology, 48: 131-148.
- 23.- BENEX (J.), 1966.- Les possibilités de la culture organotypique et milieu liquide dans l'étude des problèmes parasitaires. III. Le maintien en survie in vitro de Fasciola hepatica et de Dicrocoelium lanceolatum. Bull. Soc. Path. Exot., 59(1): 99-106.
- 24.- BENEX (J.) & JACOBELLI (G.), 1981.- Transformation of Schistosoma mansoni miracidia in vitro. Evolution in vitro des miracidiums de Schistosoma mansoni. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 56 (1): 57-61.
- 25.- BERNTZEN (A.K.), 1962.- In vitro cultivation of Tapeworms. II. Growth and maintenance of Hymenolepis nana (Cestoda: Cyclophyllidea). J. Parasit., 48: 785-797.
- 26.- BERNTZEN (A.K.), 1966.- A controlled culture environment for axenic growth of parasites. Ann. N.Y. Acad. Sci., 139: 176-189.
- 27.- BERNTZEN (A.K.) & MACY (R.W.), 1969.- In vitro cultivation of the digenetic trematode Spharidiotrema globulus (Rudolphi) from the metacercarial stage to eggs production. J. Parasit., 55 (1): 136-139.
- 28.- BIOCCA (E.) & FERRETTI (G.), 1958.- Un nuovo trematode: Dollfusinus frontalis gen. nov. et sp. nov., parassita dei seni naso frontali di Erinaceus europaeus. Rendic. Accad. Naz. Lincei, 24 (2): 171-175.
- 29.- BLANKESPOOR (H.D.), 1977.- Notes on the biology of Plagiorchis noblei Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae). Proc. Helm. Soc. Wash., 44: 44-50.
- 30.- BOFILL I POCH (A.) & AGUILAR-AMAT (J.B.), 1924.- Malacologia de les Illes Pitiuses. Trab. Mus. Cienc. Nat. Barcelona, 10 (3): 3-71.
- 31.- BROOKS (D.R.), O'GRADY (R.T.) & GLEN (D.YR.), 1985.- Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. Can. J. Zool., 63: 411-443.
- 32.- BROWN (F.A.), 1959.- Living clocks. Science, 130: 1535-1544.

- 33.- BROWN (F.A.), FREELAND (R.O.) & RALPH (V.L.), 1955.- Persistent rhythms of O<sub>2</sub> - consumption in potatoes, carrots and the seaweed fucus. Pl. Physiol., 30 (3): 280-292.
- 34.- BROWN (F.A.), HASTING (J.W.) & PALMER (J.D.), 1970.- The Biological Clock, Two Views. Academic Press, New York. 94 p.
- 35.- BUECHER (E.J.), PEREZ-MENDEZ (G.), HANSEN (G.) & YARWOOD (E.), 1974.- Sulfhydryl compounds under controlled gas in culture of Schistosoma mansoni sporocysts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 146: 1101-1105.
- 36.- BURTON (P.R.), 1962.- In vitro uptake of radioglucosa by frog lung fluke and correlation with the histochemical identification of glycogen. J. Parasit., 48: 874-882.
- 37.- BURTON (P.R.), 1967.- Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. I. Mehlis' gland and associated ducts. J. Parasit., 53: 540-555.

## C

- 38.- CABALLERO DELOYA (J.), 1970.- Descripción de Brachylaemus (Brachylaemus) bravoae n. sp. (Trematoda: Digenea), de Roedores del estado de Jalisco, México. An.Inst. Biol. Nal. Autón. México, 41, ser. Zool. (1): 39-44.
- 39.- CLEGG (J.A.), 1959.- Development of sperm by S. mansoni in vitro. Bull. Res. Counc. Israel, 8 E: 1-6.
- 40.- CLEGG (J.A.), 1961.- A continuous flow apparatus for culturing S. mansoni in vitro. Bull. Res. Counc. Israel, 9 E: 168-170.
- 41.- CLEGG (J.A.), 1965.- In vitro cultivation of Schistosoma mansoni. Exp. Parasitol., 16: 133-147.
- 42.- COIL (W.H.), 1965.- Observations on egg shell formation in Hydrophitrema gigantea Sandars, 1960 (Hemiuridae: Digenea). Z. Parasitenkd., 25: 510-517.
- 43.- COIL (W.H.), 1966.- Egg shell formation in the notocotylid trematode, Og-mocotyle indica (Bhaleras, 1942) Ruiz, 1946. Z. Parasitenkd., 27: 205-209.

- 44.- COLES (G.C.), 1972.- Oxidative phosphorylation in adult Schistosoma mansoni. Nature, Lond., 240: 488-489.
- 45.- COMBES (C.) & THERON (A.), 1977.- Rythmes d'emergence des cercaires du Trematodes et leur interêt dans l'infestation de l'homme et des animaux. Excerta Parasitológica en memoria del Dr. Eduardo Caballero y Caballero (Instituto de Biología, Publicaciones Especiales), 4: 141-150.
- 46.- COMBES (C.), BAYSSADE-DUFOUR (Ch.) & CASSONE (J.), 1976.- Sur l'impregnation des cercaires pour l'étude chétotaxique. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 51 (3): 399-400.
- 47.- CORT (W.W.), 1922.- A study of the escape of cercariae from their hosts. J. Parasit., 8: 177-184.

## CH

- 48.- CHATTERJI (P.N.), 1957.- On a new avian trematode of the genus Brachylae-  
mus (Dujardin, 1843) Blanchard, 1847. Proc. Nat. Acad. Sci. India,  
sect. B, 27: 177-179.
- 49.- CHENG (T.C.), 1973.- General Parasitology. Academic Press. New York -  
San Francisco. 965 p.
- 50.- CHERNIN (E.), 1963.- Observations on hearts explanted in vitro from the  
snail Australorbis glabratus. J. Parasit., 49: 354-364.
- 51.- CHERNIN (E.), 1964.- Maintenance in vitro of larval S. mansoni in tissues  
from the snail A. glabratus. J. Parasit., 50: 531-545.
- 52.- CHOW (K) & CHIU (J.K.), 1972.- (Preliminary report of Schistosoma japoni-  
cum in vitro cultivation). Chin. J. Micr., 5: 131-132.
- 53.- CHURCHIL (H.M.) & CROWTHER (H.), 1961.- Survival of Haemotolechus spp.  
and Rhabdias bufonis in artificial media. J. Parasit., 47: 962.

## D

- 54.- DAVIES (E.), 1932.- On a trematode, Ityogonimus lorum (Duj., 1845), with  
notes on the occurrence of other trematodes parasites of Talpa euro-

- paea in the Abeystwyth Area. Parasitology, 24: 253-259
- 55.- DAVIES (C.J.) & SMYTH (J.D.), 1978.- In vitro cultivation of Fasciola hepatica metacercariae and of partially developed flukes recovered from mice. Int. J. Parasit., 8: 125-131.
- 56.- DAVIES (C.J.) & SMYTH (J.D.), 1979.- The development of the metacercariae of Microphallus similis in vitro and in the mouse. Int. J. Parasit., 9 (3): 261-267.
- 57.- DAWES (B.), 1940.- Notes on the formation of the egg capsules in the monogenetic trematode, Hexocotyle extensicauda Dawes, 1940. Parasitology, 32: 287-295.
- 58.- DAWES (B.), 1954.- Maintenance in vitro of Fasciola hepatica. Nature, Lond., 174: 654-655.
- 59.- DAWES (B.) & MULLER (R.), 1957.- Maintenance in vitro of Haplotrema cydracea. Nature, Lond., 180: 1217.
- 60.- DEIANA (S.) & ARRU (E.), 1963.- Il ciclo biologico di Postharmostomum commutatum (Dies., 1858) ricostruito sperimentalmente in Sardegna. Riv. Parassit., 24 (E): 163-177.
- 61.- DICONZA (J.J.) & BASCH (P.F.), 1974.- Axenic cultivation of Schistosoma mansoni daughter sporocysts. J. Parasit., 60 (5): 757-763.
- 62.- DICONZA (J.J.) & HANSEN (E.L.), 1973.- Cultivation of Schistosoma mansoni daughter sporocysts in arthropod tissue cultures. J. Parasit., 59: 211-212.
- 63.- DOLLFUS (R.Ph.), CALLOT (J.) & DESPORTES (C.), 1935.- Infestation expérimentale de Strigiformes par un Brachylaemus. Ann. Parasit. Hum. Comp., 13: 12-20.

## E

- 64.- ERASMUS (D.A.), 1972.- The Biology of Trematodes. Edward Arnold Publ., London. 312 p.
- 65.- EVELAND (L.K.) & MORSE (S.I.), 1975.- Schistosoma mansoni: in vitro conversion of cercariae to schistosomula. Parasitology, 71: 327-335.

## F

- 66.- FARIA DUARTE (M.J. de), 1980.- O ciclo evolutivo de Postharmostomum gallinum Witemberg, 1923, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda, Brachylaemidae). Rev. Brasil. Biol., 40 (4): 793-809.
- 67.- FAUST (E.C.) & HOFFMAN (W.A.), 1934.- Studies on Schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 1. The extra mammalian phases of the life cycle. J. Publ. Health Trop. Med., 10: 1-97.
- 68.- FERGUSON (M.S.), 1940.- Excystement and sterilization of metacercariae of the avian strigeid trematoda Posthodiplostomum minimum. J. Parasit., 26: 359-372.
- 69.- FERGUSON (M.S.), 1943.- Development of eye-flukes of fishes in lenses of frog, turtles, birds and mammals. J. Parasit., 29: 136-142.
- 70.- FISCHTHAL (J.H.) & KUNTZ (R.E.), 1973.- Brachylaimid and dicrocoeliid trematodes of birds from Palawan Island, Philippines. Proc. Helm. Soc. Wash., 40 (1): 11-22.
- 71.- FISCHTHAL (J.H.) & KUNTZ (R.E.), 1974.- Brachylaimid and Dicrocoeliid trematodes of birds from North Borneo (Malaysia). Proc. Helm. Soc. Wash., 41 (1): 94-104.
- 72.- FISCHTHAL (J.H.) & KUNTZ (R.E.), 1976.- Some digenetic trematodes of birds from Taiwan. Proc. Helm. Soc. Wash., 43 (1): 65-79.
- 73.- FORCART (L.), 1976.- Die Cochlicellinae und Helicellinae von Palästina und Sinai. Arch. Moll., 106 (4-6): 123-189.
- 74.- FOSTER (G.R.), 1970.- A suggested medium for maintaining Fasciola hepatica prior to in vitro experimentation. Z. Parasitenkd., 34: 177-178.
- 75.- FRANZEN (A.), 1956.- On spermiogenesis, morphology of the spermatozoa and biology of fertilization among invertebrates. Zool. Bidr. Uppsala, 31: 355-482.
- 76.- FRIED (B.) & CONTOS (N.), 1973.- In vitro cultivation of Leucochloridium morpha constantiae (Trematoda) from the metacercaria to the ovigerous adult. J. Parasit., 59: 936-937.
- 77.- FRIED (B.), BARBER (L.) & BUTLER (M.S.), 1978.- Growth and development

of the tetracotyle of Cotylurus strigeoides (Trematoda) in the chick, on the chorioallantois and in vitro. Proc. Helm. Soc. Wash., 45: 162-166.

- 78.- FRIEDL (F.E.), 1961 a.- Studies on larval Fascioloides magna. I. Observations on the survival of rediae in vitro. J. Parasit., 47: 71-75.
- 79.- FRIEDL (F.E.), 1961 b.- Studies on larval Fascioloides magna. II. In vitro survival of axenic rediae in amino acids and sugars. J. Parasit., 47: 244-247.
- 80.- FUJINO (T.), HAMAJIMA (F.), ISHII (Y.) & MORI (R.), 1977.- Development of Microphalloides japonicus (Osborn, 1919) metacercariae in vitro (Trematoda: Microphallidae). J. Helminth., 51: 125-129.

## G

- 81.- GASULL (L.), 1963.- Algunos moluscos terrestres y de agua dulce de Baleares. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 9 (1-4): 3-80.
- 82.- GASULL (L.), 1964.- Las Helicella (Xeroplexa) de Baleares. Gasteropoda Pulmonata. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 10 (1-4): 3-88.
- 83.- GASULL (L.), 1965.- Algunos moluscos terrestres y de agua dulce de Baleares. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 11 (1-4): 7-161.
- 84.- GASULL (L.), 1969.- Adiciones y rectificaciones a la fauna malacológica terrestre y de agua dulce de Baleares. Bol. Soc. Hist. Nat. Baleares, 15: 59-73.
- 85.- GASULL (L.), 1985.- Terrestrial and fresh-water Gastropods of the Pityusics (Eivissa and Formentera), excluding Trochoidea (Xerocrassa) Monterostato, 1892. En: Biogeography and Ecology of the Pityusic Islands. Kuhnert, H., Alcover, J.A. & Guerau d'Arellano, C. Tur C edit. Dr. W. Junk Publ., The Hague. p: 231-241.
- 86.- GIOVANNOLA (A.), 1936 a.- Some observations on the emission of cercariae of Schistosoma mansoni (Trematoda, Schistosomatidae) from Australorbis glabratus. Proc. Helm. Soc. Wash., 3: 60-61.
- 87.- GIOVANNOLA (A.), 1936 b.- Inversion in the periodicity of emission of

- cercariae from their snail hosts by reversal of light and darkness. J. Parasit., 22: 292-295.
- 88.- GIUSTI (F.), 1970.- L'Isola di Pianosa e lo Scoglio La Scola (Arcipelago Toscano). Notulae Malacologicae, 12: 59-142.
- 89.- GLAUDEL (R.J.) & ETGES (F.J.), 1973.- The effect of photoperiod inversion upon Schistosoma mansonii cercarial emergence from Biomphalaria glabrata. Int. J. Parasit., 3: 619-622.
- 90.- GOMES (D.C.), 1979.- Contribução ao conhecimento dos helmintos parasitos de marsupiais no Brasil, da coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz - Trematoda. Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro, 20: 33-43.
- 91.- GOMES (D.C.) & PINTO (R.M.), 1978.- Contribução ao conhecimento da fauna helmintológica da região amazônica - Trematodeos. Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro, 19 (1): 43-46.
- 92.- GOOD (N.E.), WINGET (G.D.), WINTER (W.), CONNOLLY (T.N.), IZAWA (S.) & SINGH (R.M.M.), - 1966.- Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem., 5: 467-477.
- 93.- GORDON (A.M.), DAVEY (T.H.) & PEASTON (H.), 1934.- The transmission of human bilharziasis in Sierra Leone, with an account of the life cycle of the schistosomes concerned, S. mansonii and S. haematobium. Ann. Trop. Med. Parasit., 28: 323-418.
- 94.- GRESSON (R.A.R.), 1964.- Oogenesis in the hermaphroditic Digenea (Trematoda). Parasitology, 54: 409-421.
- 95.- GRESSON (R.A.R.), 1965.- Spermatogenesis in the hermaphroditic Digenea (Trematoda). Parasitology, 55 (1): 117-126.
- 96.- GROSCHAFT (J.), VALLE (M.T. del) & HERNANDEZ (N.L.), 1969.- Postharmostomum gallinum Witemberg, 1923 (Trematoda: Brachylaemidae), un trematodo de las gallinas cubanas, con notas sobre el ciclo evolutivo. Torreia, n. ser., 12: 3-12.
- 97.- GUBERLET (J.E.), 1928.- Parasitic worms of hawaiian chickens with a description of a new trematode. Trans. Amer. Micr. Soc., 47 (4):443-453.
- 98.- GUILFORD (H.G.), 1961.- Gametogenesis, egg-capsule formation, and early miracidial development in the digenetic trematode Halipegus eccentricus.

cus Thomas. J. Parasit., 47: 757-764.

- 99.- GUMBLE (A.), OTORI (Y.), RITCHIE (L.S.) & HUNTER (G.W.), 1957.- The influence of pH, temperature and light on the emergence of the cercariae of Schistosoma japonicum from Oncomelania nosophora. J. Parasit., 39 (4), sect. 2: 19.
- 100.- GUPTA (B.C.), PARSHAD (V.R.) & GURAYA (S.S.), 1984.- Morphological and histochemical studies on the ovarian development and oogenesis in Paramphistomum cervi (Digenea: Paramphistomidae). Folia Parasit., 31 (2): 147-156.

## H

- 101.- HALBERG (F.) & REINBERG (A.), 1967.- Rythmes circadiens et rythmes de basses fréquences on physiologie humaine. J. Physiol., 59: 117-200.
- 102.- HALTON (D.W.), 1967.- Studies on phosphatase activity in Trematoda. J. Parasit., 53: 46-54.
- 103.- HALTON (D.W.) & JOHNSTON (B.R.), 1983.- Development in vitro of the metacercaria of Bucephaloides gracilescens (Trematoda: Bucephalidae). Int. J. Parasit., 13 (2): 157-164.
- 104.- HANSEN (E.L.), PEREZ-MENDEZ (G.), LONG (S.) & YARWOOD (E.), 1973.- Schistosoma mansoni: emergence of progeny-daughter sporocysts in monoxenic culture. Exp. Parasit., 33: 486-494.
- 105.- HANSEN (E.L.), PEREZ-MENDEZ (G.), YARWOOD (E.) & BUECHER (E.J.), 1974.- Second generation daughter sporocysts of Schistosoma mansoni in axenic culture. J. Parasit., 60: 371-372.
- 106.- HATA (H.), TAZAKI (T.), SUZUKI (Y.), TOKITA (K.), KOBOYASHI (M.), NIMIURA (M.) & YOKOGAWA (M.), 1982.- (In vitro cultivation of excysted metacercariae of Paragonimus miyazakii and P. ohirai). Jap. J. Parasit., 31 (Suppl.): 39.
- 107.- HAWKING (F.), 1975.- Circadian and other Rhythms of Parasites. Adv. Parasitol., 13: 123-182.
- 108.- HENDELBERG (J.), 1962.- Paired flagella and nucleus migration in the

spermatogenesis of Dicrocoelium and Fasciola (Digenea, Trematoda).  
Zool. Bidr. Uppsala, 35: 569-588.

- 109.- HENNEGUY (F.), 1904.- Les Insectes. Masson, Paris.
- 110.- HOBSON (A.D.), 1948.- Parasitology, 38: 183-227.
- 111.- HOEPLI (A.) & CHU (H.J.), 1937.- Studies on Clonorchis sinensis in vitro. Festch. Bernh. Nocht, p: 199-203.
- 112.- HOLLOWAY (H.L.jr.) & ETGES (F.J.), 1967.- A note on the occurrence and morphology of Panopistus pricei Sinitzin, 1931. Amer. Midl. Nat., 77 (1): 230-233.
- 113.- HOWELL (M.J.), 1968.- Excystament and in vitro cultivation of Echinoparyphium serratum. Parasitology, 58 (3): 583-597.
- 114.- HOWELL (M.J.) & BOURNS (T.K.R.), 1974.- In vitro culture of Trichobilharzia ocellata. Int. J. Parasit., 4: 471-476.
- 115.- HSU SHIH-Ê, 1974.- Culture of Schistosoma japonicum in vitro, with special reference to egg production and development. Acta Zool. Sinica, 20: 231-242.
- 116.- HUNTER (W.S.) & CHAIT (D.C.), 1952.- Notes on the excystament and culture in vitro of the microphallid trematode Gynaecotyle adunca. J. Parasit., 38: 87.

I

- 117.- ISOBE (M.), 1923.- Biological observations on the cercariae of the Japanese blood fluke. J. Med. Assoc. Formosa, 227: 93-105.

J

- 118.- JACQUELINE (E.) & BIGUET (J.), 1973.- Méthode simple pour l'isolement d'oeufs de Schistosoma mansoni aseptiques et infectieux. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 48: 623-626.
- 119.- JAECKEL (S.), 1952.- Die Mollusken der spanischen Mittelmeer-Inseln. Mitt. Zool. Mus. Berlin, 28: 55-143.

- 120.- JAECKEL (S.), 1954.- Nachtrag zu "Die Mollusken der spanischen Mittelmeer-Inseln". Mitt. Zool. Mus. Berlin, 30:
- 121.- JAW (C.Y.) & LO (C.T.), 1974.- In vitro cultivation of Echinostoma malayanum. Chin. J. Micr., 7 (4): 157-164.
- 122.- JENSEN (D.N.), 1972.- The life history of Scaphiostomum pancreaticum Mc Intosh, 1934 (Trematoda: Brachylaemidae). Can. J. Zool., 50: 201-204.
- 123.- JOHNSTON (S.J.), 1912.- On some trematode parasites of marsupials and a monotreme. Proc. Linn. Soc. N.S. Wales, 27: 727-740 + 2 pl.
- 124.- JOURDANE (J.), 1976.- Recherches sur le cycle biologique de Pseudoleucochloridium soricis (Soltys, 1952) dans les Pyrénées. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 51 (4): 421-432.
- 125.- JOYEUX (Ch.), BAER (J.G.) & TIMON-DAVID (J.), 1932.- Le développement du trématode Brachylaemus (Brachylaemus) nicolli (Witenberg). C. R. Séanc. Soc. Biol., 109: 464-466.
- 126.- JOYEUX (Ch.), BAER (J.G.) & TIMON-DAVID (J.), 1934.- Recherches sur les trématodes du genre Brachylaemus Dujardin (syn. Harmostomum Braun). Bull. Biol. France et Belgique, 68 (4): 385-418 + pl. XIV.

## K

- 127.- KAMIYA (H.) & MACHIDA (M.), 1977.- Brachylaima ishigakiense n. sp. (Trematoda, Brachylaimidae) from roof rat, Rattus rattus Linnaeus. Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo, ser A (Zool.), 3 (3): 125-129.
- 128.- KANNANGARA (D.W.W.), 1974.- In vitro cultivation of the metacercaria of the human lung fluke Paragonimus westermani. Int. J. Parasit., 4 (6): 675-676.
- 129.- KANNANGARA (D.W.W.) & SMYTH (J.D.), 1974.- In vitro cultivation of Diplostomum spathaceum and Diplostomum phoxini metacercariae. Int. J. Parasit., 4: 667-673.
- 130.- KAWANAKA (M.), 1985.- In vitro transformation of Schistosoma japonicum

- miracidia to young sporocysts in a culture system for egg maturation. J. Parasit., 71 (3): 368-370.
- 131.- KAWANAKA (M.), HAYASHI (S.) & OHTOMO (H.), 1983 a.- A minimum essential medium for cultivation of Schistosoma japonicum eggs. J. Parasit., 69 (5): 991-992.
- 132.- KAWANAKA (M.), HAYASHI (S.) & OHTOMO (H.), 1983 b.- Nutritional requirements of Schistosoma japonicum eggs. J. Parasit., 69 (5): 857-861.
- 133.- KAWASHIMA (H.), BLAS (B.L.) & SANTOS (A.T.), 1985.- The cercarial emergence of Schistosoma japonicum from Oncomelania quadrasi under outdoor conditions in the Philippines. J. Helminth., 59 (3): 225-231.
- 134.- KOMIYA (Y.) & ISHII (H.), 1954.- The shedding aspect of cercariae of Schistosoma japonicum from its snail host, Oncomelania nosophora, in Japan. Jap. J. Med. Sci. Biol., 7: 25-39.
- 135.- KOURI (P.) & NAUSS (R.W.), 1938.- Formation of the egg shell in Fasciola hepatica as demonstrated by histological methods. J. Parasit., 24: 291-310.
- 136.- KRUIDENIER (F.J.) & GALLICCHIO (V.), 1959.- The orthography of the Brachylaemidae (Joyeux et Foley, 1939); Brachylaime microti sp. nov.; B. rauschi Mc Intosh, 1950; and an addendum to Dollfus' (1935) list Brachylaime (Trematoda: Digenea). Trans. Amer. Micr. Soc., 78: 428-441.
- 137.- KRULL (W.H.), 1935 a.- Glaphyrostomum mcintoshi n. sp. (Trematoda: Brachylaemidae), with notes on its life history. Proc. Helm. Soc. Wash., 2 (2): 77.
- 138.- KRULL (W.H.), 1935 b.- Some observations on the life history of Brachylaemus virginiana (Dickerson) Krull, N. 1934. Trans. Amer. Micr. Soc., 54 (2): 118-134.
- 139.- KRULL (W.H.), 1935 c.- Studies on the life history of Panopistus pricei Sinitzin, 1931 (Trematoda). Parasitology, 27 (1): 93-100.
- 140.- KUNTZ (R.E.), 1947.- Effect of light and temperature on emergence of Schistosoma mansoni cercariae. Trans. Amer. Micr. Soc., 66: 37-49.

## L

- 141.- LA RUE (G.), 1957.- The classification of Digenetic Trematoda: a review and a new system. Exp. Parasit., 6 (3): 306-344.
- 142.- LANCASTRE (F.) & GOLVAN (Y.), 1973.- L'utilisation des cultures in vitro dans l'étude de Schistosoma mansoni. 1. Le maintien en survie des adultes. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 48: 307-313.
- 143.- LEIBOVITZ (A.), 1963.- Amer. J. Hyg., 78: 173.
- 144.- LENGY (J.), 1962.- Studies on Schistosoma bovis (Sonsino, 1876) in Israel. I. Larval stages from egg to cercaria. Bull. Res. Council of Israel, 10 E: 1-36.
- 145.- LEWIS (J.W.), 1969.- Studies on the life history of Brachylaimus oesophagei Shaldybin, 1953 (Digenea: Brachylaimidae). J. Helminth., 43 (1-2): 79-98.
- 146.- LO (C.T.) & CROSS (J.H.), 1974.- In vitro cultivation of Fasciolopsis buski. South. Asian J. Trop. Med. Publ. Health, 5: 252-257.
- 147.- LOHACHIT (C.), SRITABUTRA (P.) & BUTRCHAM (P.), 1980.- Pattern of emergence of Schistosoma mekongi cercariae from the beta race Lithoglyphopsis aperta. En: The Mekong schistosome. Bruce, J.I. & Sornmani, S. edit. Malac. Rev. (Suppl. 2): 47-51.
- 148.- LOPEZ-FUSTER (M.J.), 1978.- Sobre Mus musculus Linnaeus, 1758 en el Nordeste Ibérico. Tesina, Fac. Biología, Univ. Barcelona. 189 p.
- 149.- LUTTERMOSER (G.W.), 1955.- Studies on the chemotherapy of experimental schistosomiasis. III. Harvest of Schistosoma mansoni cercariae by forced nocturnal emergence from Australorbis glabratus. J. Parasit., 41: 201-208.

## M

- 150.- MACY (R.W.), 1960.- The life cycle of Plagiorchis vespertilionis parorchis n. ssp. (Trematoda: Plagiorchiidae), and observations on the effect of light on the emergence of the cercariae. J. Parasit., 46: 337-345.

- 151.- MALDONADO (J.F.), 1959.- The dayly emergence of the cercaria of Schistosoma mansoni. Bol. Asoc. Méd. Puerto Rico, 51: 336-339.
- 152.- MAO (C.P.), LI (L.) & WU (C.C.), 1949.- Studies on the emergence of cercariae of Schistosoma japonicum from their chinese snail host, Oncomelania hupensis. Amer. J. Trop. Med., 29: 937-944.
- 153.- MARGALEF (R.), 1974.- Ecología. Ed. Omega S.A. Barcelona. 951 p.
- 154.- MARTIN (S.) & VAZQUEZ (R.), 1984.- Biology and behaviour of the cercariae of a Sanguinicola sp. in the river Cilloruelo (Salamanca, Spain). Ann. Parasitol. Hum. Comp., 59 (3): 231-236.
- 155.- MAS-COMA (S.) & GALLEGO (J.), 1975.- Algunas consideraciones sistemáticas sobre las familias Brachylaemidae Joyeux y Foley, 1930 y Leucochloridiomorphidae Travassos y Kohn, 1966 (Trematoda: Brachylaemoidae). Rev. Ibér. Parasit., 35 (3-4): 339-354.
- 156.- MAS-COMA (S.) & MONTOLIU (I.), 1978 a.- Life cycle of Brachylaemus nitellae (Dujardin in Dollfus, 1968) on the island of Formentera (Balearics). IV Int. Cong. Parasit. (Warszawa), Sect. A (Biology, Genetics and Evolution of Parasitic Organisms), 1: 6.
- 157.- MAS-COMA (S.) & MONTOLIU (I.), 1978 b.- Estudio experimental del ciclo biológico de Brachylaemus nitellae (Dujardin in Dollfus, 1968) (Trematoda: Brachylaimidae). II Reun. Anual Asoc. Parasit. Españ. (Madrid), p. 92.
- 158.- MAS-COMA (S.) & MONTOLIU (I.), en prensa a.- The life cycle of Dollfusinus frontalis, a Brachylaimid Trematode of small mammals (Insectivora and Rodentia). Int. J. Parasit.
- 159.- MAS-COMA (S.) & MONTOLIU (I.), en prensa b.- The life cycle of Pseudo-leucochloridium pericardicum n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae) a parasite of shrews (Insectivora: Soricidae). J. Helminth.
- 160.- MAS-COMA (S.), ESTEBAN (J.G.) & VALERO (M.A.), en prensa.- The genus Scaphiostomum Braun, 1901 (Trematoda: Brachylaimidae): a systematic review and description of Scaphiostomum palearcticum n. sp. Syst. Parasitol.

- 161.- MASON (J.jr.), 1953.- Brachylaima dolichodirus n. sp. from a shrew, Blarina brevicauda. J. Tennessee Acad. Sc., 28 (1): 38-42.
- 162.- MAZGOUB (M.), 1973.- Recovery and in vitro cultivation of adult Schistosoma bovis from experimentally infected mice. J. Zool., 170: 139-170.
- 163.- MC CLELLAND (W.F.J.), 1967.- Production of Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni cercariae in Tanzania. Exp. Parasit., 20: 205-218.
- 164.- MC INTOSH (A.), 1934.- Two new species of trematodes, Scaphiostomum pancreaticum n. sp. and Postharmostomum laruei n. sp. from the chipmunk. Proc. Helm. Soc. Wash., 1 (1): 2-4.
- 165.- MC INTOSH (A.), 1937.- A new trematode, Postharmostomum noveboracensis n. sp. (Brachylaemidae), from a chipmunk. Proc. Helm. Soc. Wash., 4 (1): 23-24.
- 166.- MELLINK (J.J.) & VAN DEN BOVENKAMP (W.), 1985.- In vitro culture of intramolluscan stages of the avian shistosome Trichobilharzia ocellata. Z. Parasitenkd., 71: 337-351.
- 167.- MERCER (J.G.) & CHAPELL (H.), 1985.- Schistosoma mansoni: effect of maintenance in vitro on the physiology and biochemistry of adults worms. Parasitology, 90: 339-349.
- 168.- MICHAELS (R.M.) & PRATA (A.), 1968.- Evolution and characteristics of Schistosoma mansoni eggs laid in vitro. J. Parasit., 54: 921-930.
- 169.- MILLER (J.N.), 1939.- Observations on the rate of growth of the trematode Postharmostomum laruei Mc Intosh, 1934. J. Parasit., 25: 509-510.
- 170.- MITCHELL (J.B.), HALTON (D.W.) & SMYTH (J.D.), 1978.- Observations on the in vitro culture of Cotylurus erraticus (Trematoda: Strigeidae). Int. J. Parasit., 8: 389-397.
- 171.- MITCHELL (J.B.), LEES (E.) & MASON (A.R.), 1983.- Factors affecting the emergence of Gorgoderina vitelliloba cercariae in vivo and in vitro. J. Parasit., 69 (3): 615-616.
- 172.- MONTOLIU (I.), 1978.- Ciclo evolutivo de Brachylaemus nitellae Dujardin in Dollfus, 1968 (Trematoda: Brachylaemidae) en Formentera (Islas Pi-

tiusas). Tesina, Fac. Biología, Univ. Barcelona. 155 p.

- 173.- MONTOLIU (I.), 1984.- Revisión de la biología y ecología de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Digenea) con especial énfasis en las especies parásitas de mamíferos. Tesis Doct., Fac. Biología, Univ. Barcelona. 660 p.
- 174.- MUFTIC (M.), 1969.- Metamorphosis of miracidia into cercariae of Schistosoma mansoni in vitro. Parasitology, 59: 365-371.

## N

- 175.- NARDI (E.), 1958.- Tiflite emorragica del pollo sostenuta da Posthar-mostomum commutatum (Diesing, 1858). Vet. Ital., 9 (12): 977-982.
- 176.- NARDI (E.) & PUCCINI (V.), 1961.- Infestazione intestinale di Canis familiaris da Brachylaemus erinacei Blanchard, 1847. Vet. Ital., 12 (6): 378-382.
- 177.- NASIR (P.) & RODRIGUEZ (L.), 1966.- Brachylaima degiustii n. sp. from Columba livia in Venezuela. Proc. Helm. Soc. Wash., 33 (2): 110-122.
- 178.- NEWPORT (G.R.) & WELLER (T.H.), 1982 a.- Miracidia infective for snails derived from eggs laid by adult Schistosoma mansoni in vitro. Parasitology, 84: 481-490.
- 179.- NEWPORT (G.R.) & WELLER (T.H.), 1982 b.- Deposition and maturation of eggs of Schistosoma mansoni in vitro: importance of fatty acids in serum-free media. J. Trop. Med. Hyg., 31 (2): 349-359.
- 180.- NEWSOME (J.), 1957.- Storage of live schistosome eggs. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 51: 299-300.
- 181.- NIZAMI (W.A.) & SIDDIQI (A.H.), 1975.- Studies on in vitro survival of Isoparorchis hypselobragi (Digenea, Trematoda). Z. Parasitenkd., 45: 263-267.
- 182.- NOJIMA (H.) & SATO (A.), 1978.- The emergence of schistosome cercariae from the snails. I. Hourly response of cercarial emergence of Schistosoma mansoni and S. haematobium, and effect of light-out on their emergence. Jap. J. Parasit., 27: 197-213.

- 183.- NOJIMA (H.) & SATO (A.), 1982.- Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium: emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. Exp. Parasit., 53 (2): 189-198.
- 184.- NOJIMA (H.), SANTOS (A.T.), BLAS (B.) & KAMIYA (H.), 1980.- The emergence of Schistosoma japonicum cercariae from Oncomelania quadrasi. J. Parasit., 66: 1010-1013.

## O

- 185.- ODENING (K.), 1974.- Verwandtschaft, System und zyklus-ontogenetische Besonderheiten der Trematoden. Zool. Syst., 101: 345-396.
- 186.- OLIVIER (L.), 1951.- The influence of light on the emergence of Schistosomatium douthitii cercariae from their snail host. J. Parasit., 37: 201-204.
- 187.- OSAKA (K.), 1938.- Studies on the biological behaviour of the cercariae of Schistosoma japonicum. Part. 1. Observations on the escape of cercariae from their snail hosts. J. Med. Assoc. Formosa, 37: 1952-1964.
- 188.- OSUNA-CARRILLO (A.A.) & GUEVARA-POZO (D.), 1974.- Cultivo de helmintos parásitos. I. Primeros resultados con un medio básico para el cultivo in vitro de Fasciola hepatica L. Rev. Ibér. Parasit., 34: 137-140.

## P

- 189.- PARKER (R.C.), 1961.- Methods of tissue culture. 3rd ed. Pitman Medical Publishing Co. London.
- 190.- PASCOE (D.), RICHARDS (R.J.) & JAMES (B.L.), 1970.- The survival of the daughter sporocysts of Microphallus pygmaeus (Levinsen, 1881) in a chemically defined medium. The Veliger, 13: 157-162.
- 191.- PAUL (J.), 1965.- Cell and Tissue Culture. 3rd ed. E. & S. Livingstone Ltd.
- 192.- PAUL (J.), 1970.- Cell and Tissue Culture. 4th ed. Livingstone, Edinburgh and London.
- 193.- PAUL (C.R.C.), 1982.- An annotated check list of the non-marine Mollusca of the Pityuse Islands, Spain. J. Conchol., 31: 79-86.

- 194.- PEISLEY (E.) & HOWELL (M.J.), 1975.- A Brachylaimid trematode from marsupial mice with observations on its life cycle. Int. J. Parasit., 5 (4): 441-447.
- 195.- PELLEGRINO (J.) & DE MARIA (M.), 1966.- Results of exposing mice to natural pond water harbouring a colony of Australorbis glabratus, highly infected with Schistosoma mansoni. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 7: 374-381.
- 196.- PESIGAN (T.P.), HAIRSTON (N.G.), JAUREGUI (J.I.), GARCIA (E.G.), SANTOS (A.T.), SANTOS (B.C.) & BESA (A.A.), 1958.- Studies on Schistosoma japonicum infection in the Philippines. 2. Molluscan host. Bull. World Health Org., 18: 481-578.
- 197.- PITCHFORD (R.J.) & DU TOIT (J.F.), 1976.- The shedding pattern of three little known African schistosomes under outdoor conditions. Ann. Trop. Med. Parasit., 70: 181-187.
- 198.- PITCHFORD (R.J.), MELLING (A.G.), MELLING (J.) & DU TOIT (J.F.), 1969.- Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. Ann. Trop. Med. Parasit., 63: 359-371.
- 199.- PULLIN (R.S.V.), 1973.- Preliminary experiments with a defined culture medium for larval Fasciola hepatica. J. Helminth., 47: 181-189.

## R

- 200.- RAISHITE (D.J.), 1982.- (Daily shedding rhythm of Trichobilharzia ocellata cercariae). En: Aktual'nye problemy parazitologii v Pribaltike (Materialy k IX Nauchno - Koordinatsionnoi Konferentsii po problemam parazitologii v Pribaltike, 1-2 Iyulya 1982 g). Vilnius, USSR., Akademiya Nauk Litovskoi SSR, Institut Zoologii i Parazitologii, p: 166-170.
- 201.- RATCLIFFE (L.H.) & GUEVARA-POZO (D.) & LOPEZ-ROMAN (R.), 1969.- In vitro maintenance of Fasciola hepatica: a factorial approach based on egg production. Exp. Parasit., 26: 41-51.
- 202.- READ (C.P.), 1950.- The vertebrate small intestine as an environment for parasitic helminth. Rice Inst. Pamph., 37 (2): 1-94.

- 203.- READ (C.P.), 1955.- Intestinal physiology and the host-parasite relationship. En: Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism. Cole, W.H. edit. Rutgers Univ. Press. New Brunswick. p: 27-43.
- 204.- READ (C.P.), 1968.- Some aspects of nutrition in parasites. Amer. Zool., 8: 139-149.
- 205.- REES (G.), 1931.- Some observations and experiments on the biology of larval trematodes. Parasitology, 23: 428-440.
- 206.- REES (G.), 1948.- A study of the effect of light, temperature and salinity on the emergence of Cercariae purpurae Lebour from Nucella lapillus (L.). Parasitology, 38: 228-242.
- 207.- RICHARD (J.), 1971.- La chétotaxie des cercaires. Valeur systématique et phylétique. Mém. Mus. Nat. Hist. Nat., nouv. sér., sér. A, Zool., 67: 1-179.
- 208.- RICHARDS (R.J.), PASCOE (D.) & JAMES (B.L.), 1972.- Variations in the metabolism of the daughter sporocysts of Microphallus pygmaeus in a chemically defined medium. J. Helminth., 46: 107-116.
- 209.- ROBINSON (E.J.jr.), 1949.- The life history of Postharmostomum helicis (Leidy, 1847) n. comb. (Trematoda: Brachylaemidae). J. Parasit., 35 (5): 513-533.
- 210.- ROHRBACHER (B.M.), 1957.- Observations on the survival in vitro of bacteria-free adult common liver fluke, Fasciola hepatica. J. Parasit., 43: 9-18.
- 211.- ROJO-VAZQUEZ (F.A.) & SIMON-MARTIN (F.), 1985.- Algunos aspectos de la biología de las cercarias de Trichobilharzia sp. del río Cañedo (provincia de Salamanca, España). Rev. Ibér. Parasit., 45 (2): 141-148.
- 212.- ROWAN (W.B.), 1958.- Daily periodicity of Schistosoma mansoni cercariae in Puerto Rico. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 7: 374-381.

## S

- 213.- SCHILLER (E.L.), 1965.- A simplified method for the in vitro cultivation of the rat tapeworm, Hymenolepis diminuta. J. Parasit., 51: 516-518.

- 214.- SCHILLER (E.L.), BUEDING (E.), TURNER (V.M.) & FISHER (J.), 1975.- Aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism and egg production of Schistosoma mansoni in vitro. J. Parasit., 61: 385-389.
- 215.- SCHMIDT (G.D.) & ROBERTS (L.S.), 1985.- Foundations of Parasitology. Time/Mirror Mosby College Publishing. St. Louis. 775 p.
- 216.- SCHNIER (M.S.) & FRIED (B.), 1980.- In vitro cultivation of Amblosoma suwaense (Trematoda: Brachylaimidae) from the metacercaria to ovigerous adult. Int. J. Parasit., 10 (5-6): 391-395.
- 217.- SCHREIBER (F.G.) & SCHUBERT (M.), 1949.- Experimental infection of the snail A. glabratus with the trematode S. mansoni and the production of cercariae. J. Parasit., 35: 91-100.
- 218.- SCHRODER (F.), 1978.- Zur landschneckenfauna del Insel Formentera/Pityusen. Veröff. Oberseemuseum Bremen, reihe A, band 5: 49-56.
- 219.- SCHWARZ (E.) & SCHWARZ (H.K.), 1943.- The wild and commensal stocks of the house mouse, Mus musculus Linnaeus. J. Mammal., 24: 59-72.
- 220.- SENFT (A.W.), 1963.- Observations on amino acid metabolism of Schistosoma mansoni in a chemically defined medium. Ann. N. Y. Acad. Sci., 113: 272-288.
- 221.- SENFT (A.W.), 1965.- Recent developments in the understandig of amino acid and protein metabolism of Schistosoma mansoni in vitro. Ann. Trop. Med. Parasit., 59: 164.
- 222.- SENFT (A.W.) & SENFT (D.G.), 1962.- A chemically defined medium fro maintenance of Schistosoma mansoni. J. Parasit., 48: 551-554.
- 223.- SILVERMAN (P.H.), 1963.- In vitro cultivation and serological techniques in parasitology. En: Techniques in Parasitology. Taylor, A.E. edit. Blackwell, Oxford.
- 224.- SILVERMAN (P.H.), 1965.- In vitro cultivation procedures for parasitic helminths. Adv. Parasitol., 3: 159-222.
- 225.- SILVERMAN (P.H.) & HANSEN (E.), 1971.- In vitro cultivation procedures for parasitic helminths: recent advances. Adv. Parasitol., 9:227-258.
- 226.- SILVERMAN (P.H.), ALGER (N.E.) & HANSEN (E.), 1966.- Axenic helminth cultures and their use for the production of antiparasitic vaccines.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 139 (1): 124-142.

- 227.- SILVERMAN (P.H.), POYNTER (D.) & PODGER (K.R.), 1962.- Studies on larval antigens derived by cultivation of some parasitic nematodes in simple media: protection tests in laboratory animals. J. Parasit., 48:562-571.
- 228.- SIMON-VICENTE (F.), 1955.- Brachylaemus en infestación experimental y natural. Rev. Ibér. Parasit., 15 (4): 301-320.
- 229.- SINITSIN (D.), 1931.- Studien über die Phylogenie der Trematoden. V. Revision of Harmostominae in the light of new facts from their morphology and life history. Z. Parasitenkd., 3: 786-835.
- 230.- SKRJABIN (K.I.), 1947-1964.- (Trematodes of Animals and Man). USSR Academy of Science, Moscow. Vols. I-XXII.
- 231.- SMITH (M.H.), 1969.- Do intestinal parasites require oxygen? Nature, Lond., 223: 1129-1132.
- 232.- SMITH (M.H.) & TAYLOR (J.), 1964.- Microbial behaviour "in vivo" and "in vitro". Cambridge University Press.
- 233.- SMITH (M.H.), CLEGG (J.A.) & WEBBE (G.), 1976.- Culture of Schistosoma haematobium in vivo and in vitro. Ann. Trop. Med. Parasit., 70: Ann. Trop. Med. Parasit., 70: 101-108.
- 234.- SMYTH (J.D.), 1966.- The Physiology of Trematodes. Oliver & Boyd Ltd. Edinburgh. 256 p.
- 235.- SMYTH (J.D.), 1976.- Introduction to Animal Parasitology. Hodder & Stoughton Ltd. 466 p.
- 236.- SMYTH (J.D.) & HALTON (D.W.), 1983.- The Physiology of Trematodes. Cambridge University Press, Cambridge. 446 p.
- 237.- SPURR (A.R.), 1969.- A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26: 36-43.
- 238.- STEPHENSON (W.), 1947 a.- Physiological and histochemical observations on the adult liver fluke, Fasciola hepatica L. III. Eggshell formation. Parasitology, 38: 140-144.
- 239.- STEPHENSON (W.), 1947 b.- Physiological and histochemical observations

- on the adult liver fluke, Fasciola hepatica L. I. Survival in vitro. Parasitology, 38: 116-144.
- 240.- STIREWALT (M.A.) & UY (A.), 1969.- Schistosoma mansoni: cercarial penetration and schistosomule collection in vivo and in vitro system. Exp. Parasit., 26: 17-28.
- 241.- STIREWALT (M.A.), MINNICK (D.R.) & FREAGEAU (W.A.), 1966.- Definition and collection in quantity of schistosomules of Schistosoma mansoni. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 60: 352-360.
- 242.- STURROCK (R.F.), 1965.- Studies on the biology of Biomphalaria angulosa Mandahl-Barth and on its ability to act as an intermediate host of Schistosoma mansoni. Ann. Trop. Med. Parasit., 59: 1-9.
- 243.- SUN (T.), 1969.- Maintenance of adult Clonorchis sinensis in vitro. Ann. Trop. Med. Parasit., 63: 399-402.

## T

- 244.- TAYLOR (A.E.) & BAKER (J.R.), 1968.- The cultivation of parasites in vitro. Blackwell Scientific Publ. Oxford and Edinburgh. 377 p.
- 245.- TAYLOR (A.E.) & BAKER (J.R.), 1978.- Methods of cultivating parasites in vitro. Academic Press, London-New York-San Francisco. 301 p.
- 246.- THERON (A.), 1975.- Recherches sur les rythmes d'emergence des cercaires de Guadeloupe (parasites de Biomphalaria glabrata) et des Pyrénées. Thèse Doct., Univ. Sciences et Techniques Languedoc, Montpellier - Perpignan. 149 p.
- 247.- THERON (A.), 1982.- Le compartiment cercaire dans le cycle de Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Ecologie de la transmission bilharzienne en Guadeloupe. Thèse d'Etat, Univ. Perpignan. 505 p.
- 248.- TISCHLER (W.), 1955.- Synökologie der Landtiere. Fisher, Stuttgart.
- 249.- TRAVASSOS (L.), TEIXEIRA DE FREITAS (J.F.), KOHN (A.), 1969.- Trematodes do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 67 (1): 1-886.
- 250.- TURNER (H.M.) & MC KEEVER (S.), 1980.- Ityogonimus scalopi sp. n. (Trematoda: Brachylaemidae) from the eastern mole, Scalopus aquaticus (Linnaeus, 1758). J. Parasit., 66 (5): 823-824.

- 251.- TUTI (S.), VICHASRI (S.) & SIRISINHA (S.), 1982.- Effect of culture media on production of excretory-secretory products and egg output of Opistorchis viverrini in vitro. J. Parasit., 68 (5): 892-897.

## U

- 252.- UBELAKER (J.E.) & DAILEY (M.D.), 1966.- Taxonomy of the genus Brachylaima Dujardin (Trematoda: Digenea) with description of B. chiapensis sp. n. from Peromyscus guatemalensis in Mexico. J. Parasit., 52 (6): 1062-1065.
- 253.- UJIE (N.), 1936.- On the process of egg-shell formation of Clonorchis sinensis, a liver fluke. J. Med. Assoc. Formosa, 35: 1894-1896.
- 254.- ULMER (M.J.), 1949.- Life cycle of Postharmostomum laruei Mc Intosh, 1934 (Trematoda: Brachylaemidae). Science, (2819) 109: 13-14.
- 255.- ULMER (M.J.), 1951.- Postharmostomum helicis (Leidy, 1847) Robinson, 1949 (Trematoda), its life history and a revision of the subfamily Brachylaeminae. Trans. Amer. Micr. Soc., 70 (3): 189-238.

## V

- 256.- VALLE (C.M.), PELLEGRINO (J.) & ALVARENGA (N.), 1971.- Ritmo circadiano de emergencia de cercarias (Schistosoma mansoni - Biomphalaria glabrata). Rev. Brasil. Biol., 31: 53-63.
- 257.- VALLE (C.M.), PELLEGRINO (J.) & ALVARENGA (N.), 1973.- Rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata: influence of the temperature. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 15: 195-201.
- 258.- VAUCHER (C.) & DURETTE-DESSET (M.C.), 1978.- Nouvelles données sur les helminthes parasites de la musaraigne Blarina brevicauda (Say). Rev. Suisse Zool., 85 (2): 361-378.
- 259.- VILLELLA (J.B.), 1953.- The life history of Entosiphonus thompsoni Sinitzin, 1931 (Trematoda: Brachylaemidae). J. Parasit., 39 (4, sect. 2): 20.

- 260.- VILLELLA (J.B.), 1954.- The life history of Brachylaima rhomboideum (Sinitsin, 1931) (Trematoda; Brachylaematidae). Dissertation Abst. Int., 14 (4): 745-746.
- 261.- VOGÉ (M.), 1963.- Maintenance in vitro of Taenia crassiceps Cysticer-  
ci. J. Parasit., 49 (Suppl.): 59-60.
- 262.- VOGÉ (M.) & JEONG (K.), 1971.- Growth in vitro of Cotylurus lutzi Basch,  
1969 (Trematoda: Strigeida), from tetracotyle to patent adult. Int.  
J. Parasit., 1: 139-143.
- 263.- VOGÉ (M.) & SEIDEL (J.S.), 1972.- Transformation in vitro of miracidia  
Schistosoma mansoni and S. japonicum into young sporocysts. J. Pa-  
rasit., 58: 699-704.

## W

- 264.- WAGENBACH (G.E.) & ALLDREDGE (A.L.), 1974.- Effect of light on the emer-  
gence pattern of Plagiorchis micracanthos from Stagnicola exilis. J.  
Parasit., 60 (5): 782-785.
- 265.- WALLET (M.), THERON (A.) & LAMBERT (A.), 1985.- Rythme d'émission des  
cercaires de Bucephalus polymorphus Baer, 1827 (Trematoda, Bucéphal-  
lidae) en relation avec l'activité de Dreissena polymorpha (Lamelli-  
branche, Dreissenidae) premier hôte intermédiaire. Ann. Parasitol.  
Hum. Comp., 60(6): 675-684.
- 266.- WEBSTER (G.M.) & CAMERON (T.W.M.), 1963.- Some preliminary observations  
on the development of Echicoccus in vitro. Can. J. Zool., 41: 185-  
195.
- 267.- WERBY (H.J.), 1928.- On the trematode genus Harmostomum with the des-  
cription of a new species. Trans. Amer. Micr. Soc., 47: 68-81.
- 268.- WIKERHAUSER (T.), 1960.- A rapid method for determining the viability of  
Fasciola hepatica metacercariae. Amer. J. Vet. Res., 21: 895-897.
- 269.- WIKERHAUSER (T.) & CVETNIC (S.), 1967.- Survival of young and sexually  
mature adult Fasciola hepatica in various cell-free media with and  
without mammalian cell cultures. Exp. Parasit., 20: 200-204.
- 270.- WIKERHAUSER (T.), CVETNIC (S.) & BRUDNJAK (Z.), 1970.- Further study of

the survival of young Fasciola hepatica in cell cultures. En: H. D. Srivastave commemoration volume. Singh, K.S. & Tandan, B.K., edit. Izatnagar, U.P.: Indian Veter. Res. Inst., p: 279-281.

- 271.- WILLIAMS (C.L.) & GILBERTSON (D.E.), 1983.- Effects of alterations in the heartbeat rate and locomotor activity of Schistosoma mansoni - infected Biomphalaria glabrata on cercarial emergence. J. Parasit., 69 (4): 677-681.
- 272.- WILLIAMS (C.L.), WESSELS (W.S.) & GILBERTSON (D.E.), 1984.- Comparison of the rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata in different lighting regimens. J. Parasit., 70 (3): 450-452.
- 273.- WILLIAMS (M.), HOPKINS (C.) & WYLLIE (M.R.), 1961.- The in vitro cultivation of strigeid trematodes. III. Yeast as a medium constituent. Exp. Parasit., 11: 121-127.
- 274.- WILSON (R.A.), PULLIN (R.) & DENISON (J.), 1971.- An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of Fasciola hepatica into its snail host Lymnaea truncatula. Parasitology, 63: 491-506.
- 275.- WU (G.Y.), WU (C.H.), DUNN (M.A.) & KAMEL (R.), 1985.- Stimulation of Schistosoma mansoni oviposition in vitro by animal and human portal serum. Ann. J. Trop. Med. Hyg., 34 (4): 750-753.
- 276.- WYLLIE (M.A.), WILLIAMS (M.) & HOPKINS (A.), 1960.- The in vitro cultivation of strigeid trematodes. II. Replacement of a yolk medium. Exp. Parasit., 10: 51-57.

## Y

- 277.- YAMAGUTI (S.), 1935.- Studies on the helminth fauna of Japan. Part. 5. Trematodes of Birds, III. Jap. J. Zool., 6 (2): 159-182.
- 278.- YAMAGUTI (S.), 1958.- Systema Helminthum. Vol. I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates. Part I and II. Interscience Publishers. New York - London. 1575 p.

- 279.- YAMAGUTI (S.), 1971.- Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates.  
Vol. I y II. Keigaku Publishing Co., Tokyo.
- 280.- YASURAOKA (K.) & KOJIMA (K.), 1970.- In vitro cultivation of the hetero-  
phid trematode, Metagonimus yokogawai, from the metacercaria to adult.  
Jap. J. Med. Sci., 23: 199-210.
- 281.- YASURAOKA (K.), IRIE (Y.) & HATA (H.), 1978.- Conversion of schistosome  
cercariae to schistosomula in serum-supplemented media, and subse-  
quent culture in vitro. IV Int. Cong. Parasit. (Warszawa), sect. A  
(Biology, Genetics and Evolution of Parasitic Organisms): 64.
- 282.- YASURAOKA (K.), KAIHO (M.), HATA (H.) & ENDO (T.), 1974.- Growth in vi-  
tro of Parvatrema timondavidi Bartoli, 1963 (Trematoda: Gymnophalli-  
dae) from the metacercarial stage to egg production. Parasitology,  
68 (3): 293-302.
- 283.- YOKOGAWA (M.), OSHIMA (T.) & KIHATA (M.), 1955.- Studies to maintain ex-  
cysted metacercariae of Paragonimus westermani in vitro. J. Parasit.,  
41 (6), sect. 2 (Suppl.): 28.
- 284.- YOKOGAWA (M.), OSHIMA (T.) & KIHATA (M.), 1958.- Studies to maintain ex-  
cysted metacercariae of Paragonimus westermani in vitro. II. Develop-  
ment of the excysted metacercariae maintained in vitro at 37°C for  
203 days. Jap. J. Parasit., 7: 51-55.
- 285.- YOKOGAWA (M.), HATA (H.), TAZAKI (T.), KOBAYASHI (M.) & NIMURA (M.),  
1978.- (In vitro cultivation of excysted metacercariae of Paragoni-  
mus miyazakii). Jap. J. Parasit., 28 (Suppl.): 9.

## Z

- 286.- ZILCH (A.), 1959-1960.- Gastropoda, Teil 2 Euthyneura. Handb. Palaeo-  
zool., 5 (2): 1-834 + 12 pl.
- 287.- ZIMMERMANN (K.), 1949.- Zur kenntnis der mitteleuropäischen Hausmäu-  
sen. Zool. Jahrb. (Syst. Ökol. u. Geogr. der Tiere), 78 (3): 301-  
322.