RESUMEN

Las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a cortes histológicos y montajes totales de larvas de parásitos digeneos han permitido detectar la presencia y localización de glutamato y neuropeptidos aislados de vertebrados e invertebrados. En *Trichobilharzia ocellata* se observó inmunoreactividad (IR) en: 1) En el sistema nervioso de la miracidia con antisueros dirigidos a Glutamato, Catch relaxing peptide (CARP), FMRFamida, APGWamida, Péptido α de las células caudodorsales (α-CDCP), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, Oxitocina, Dinorfina, y Hormona α estimulante de los melanocitos (α-MSH). En las células germinales se detectó IR a Met-encefalina. 2) En el esporocisto madre se observó IR en las células germinales con un antisuero contra Met-encefalina. 3) En la cercaria se encontró IR en el sistema nervioso con antisueros en contra de Glutamato, CARP, FMRFamida, Péptido cardíaco pequeño (SCPB), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, Prolactina y Substancia P. Algunas neurosubstancias fueron localizadas en células no neuronales en esta especie de cercaria: FMRFamida en las glándulas de escape; APGWamida en células flamígeras; y Met-encefalina en células indiferenciadas precursoras de músculo, y en algunas células de los conglomerados germinales.

En la cercaria de *Schistosoma mansoni* se encontró IR en el sistema nervioso con antisueros dirigidos en contra de Glutamato, CARP, FMRFamida, α-CDCP, y colecistocinina (CCK). También fueron encontradas neurosubstancias en células no neuronales: FMRFamida en

las glándulas de escape; Somatostatina en células subtegumentales; y Met-encefalina en células indiferenciadas de la cercaria en desarrollo y de los conglomerados germinales.

En *Diplostomum spathaceum* se detectó IR en el sistema nervioso de: 1) La cercaria con antisueros en contra de CARP, FMRFamida, α-CDCP, Arg-Vasopresina, y Substancia P. IR a Met-encefalina se observó en la misma localización que en las dos especies de cercarias anteriores. 2) En la metacercaria IR en el sistema nervioso fue detectada con Glutamato, CARP, FMRFamida, APGWamida, SCPB, α-CDCP, Hormona de las células caudodorsales I (CDCH-I), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, y Substancia P. En esta última etapa larval es notoria la inervación peptidérgica del organo adhesivo-absortivo. Los resultados son discutidos con relación a las posibles funciones intrínsecas, y en relación a interacciones huésped-parásito.

A diferencia de los parásitos digeneos de la familia schistosomatidae, el suero de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum* no afecta la acción de la calfluxina sobre las mitocondrias de células de la glándula del albumen, lo que puede indicar que el parásito no ocasiona la liberación de esquistosomina del sistema nervioso central de su huésped intermediario.

INTRODUCCION

Los trematodos digeneos poseen los ciclos de vida mas complejos entre todos los miembros del reino animal. Muchas enfermedades de considerable importancia médica y económica son causadas durante las etapas parasíticas de estos organismos, ejemplos son: La esquistosomiasis, que afecta alrededor de 200 millones de personas en países de regiones tropicales (1) y, la diplostomiasis, que afecta a una amplia variedad de especies de peces (2,3).

Estos parásitos pertenecen al filo platelmintos, que son filogenéticamente los primeros organismos con centralizacion del sistema nervioso. En ausencia de glàndulas endocrinas y de un sistema circulatorio adecuado, el componente neurosecretorio (peptidérgico) parece jugar un papel integrativo muy importante en este grupo de organismos. Existen varios datos que así lo sugieren: 1) Fracciones neurosecretorias estimulan la síntesis de ARN y la mitosis; 2) Se ha observado material neurosecretorio relacionado a organelos sensoriales y en terminaciones nerviosas de uniones neuromusculares; 3) Parece tener un papel en la regulación de la maduración en las etapas larvales, y en la capacidad de regeneración en planarias; 4) Se ha observado que hay activación del material neurosecretorio durante el cambio de huésped (4-9,40,119,120). La identificación de substancias regulatorias endógenas en gusanos planos, principalmente en trematodos digeneos, puede dar información interesante acerca de estrategias adaptativas, y desde el punto de vista medico y económico.

Los estudios dirigidos a identificar la naturaleza de las neurosubstancias de platelmintos han detectado la presencia de acetilcolina y aminas biogénicas en muchas especies de gusanos planos, y del aminoácido glutamato en una especie de cestodos (10-17). Estudios similares, con técnicas de inmunocitoquímica han mostrado la localización en el sistema nervioso de cerca de 30 neuropéptidos de vertebrados (18,19,21). Sin embargo, el papel fisiológico y la estructura molecular - actualmente solo el neuropeptido F ha sido aislado y completamente sequenciado (20) - de estos neuropeptidos permanece desconocida. Estudios con anticuerpos dirigidos en contra de neuropeptidos de especies más relacionadas filogenéticamente podrían ayudar en la identificación de elementos regulatorios de platelmintos. A la fecha, solo tres neuropeptidos aislados de invertebrados han sido reportados en este filo, FMRFamida y Péptido cardiáco pequeño B (SCPB) en las tres clases de platelmintos, y SALMFamida en turbelarios y cestodos (21-29).

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado también la presencia de neuropeptidos en células no neuronales de platelmintos: Péptido intestinal vasoactivo, somatostatina y prolactina en células tegumentales, y substancia P, polipeptido YY, y FMRFamida en células de la prostata (85-87,89,118). Estas substancias semejantes a neuropeptidos en localización extraneuronal, especialmente en células tegumentales y en células flamígeras, podrían ser secretadas dentro del huésped y jugar algun papel en las interacciones huésped-parásito. De hecho, se ha demostrado que algunas larvas del ciclo de vida de platelmintos producen y

secretan material con características similares a las neurosubstancias de vertebrados: Las etapas plerocercoides de cestodos secretan una substancia homóloga a la hormona de crecimiento de mamíferos (24). Esta tiene un peso molecular similar y muestra inmunoreactividad a cuatro anticuerpos monoclonales específicos para cuatro diferentes determinantes antigénicos de la hormona de crecimiento humana (25). Se puede unir a receptores de la hormona de crecimiento de mamíferos y mostrar efectos sobre el crecimiento del huésped y el sistema inmune simulando a la hormona producida por el huésped (26,27).

Los trematodos digeneos utilizan caracoles de agua dulce como uno de sus huéspedes intermediarios, alrededor de la semana 5 postinfección causan en éstos una drástica reducción ó una inhibición total de la fecundidad (castración parasítica) y, cuando son infectados en etapas juveniles, una estimulación del crecimiento corporal (crecimiento gigante) (28). Estos efectos parecen ser causados por el neuropéptido esquistosomina, derivado del caracol (29), el cual antagoniza los efectos de las hormonas gonadotropicas del caracol sobre los órganos del aparato reproductor femenino (30-33). Un factor producido por la cercaria parece ser el responsable de la liberación de esquistosomina por el sistema nervioso central (SNC) del caracol (29), sin embargo, la naturaleza de este factor es desconocida. Neuropeptidos, aminoácidos, esteroides, entre otros, son posibles candidatos.

La esquistosomina, causante de la castración parasítica en caracoles infectados, ha sido aislada y caracterizada recientemente de el cerebro del caracol *L. stagnalis*, resultando ser una proteina

de 79 aminoácidos con un peso molecular de 8780 daltons (34). Fue primeramente detectada en la hemolinfa de *Lymnaea stagnalis* infectado con *Trichobilharzia ocellata*, posteriormente ha sido detectada en la hemolinfa de caracoles infectados con trematodos de la misma familia schistosomatidae. Sin embargo, no se conoce si la presencia de esta molécula es un fenómeno general en caracoles infectados con trematodos digeneos. El efecto inhibitorio de esquistosomina sobre una de las hormonas gonadotropicas femeninas, la calfluxina (CaFl), puede ser demostrado por una técnica ultracitoquímica empleando antimoniato de potasio, para demostrar depositos de calcio. La CaFl estimula la entrada de calcio en la mitocondria de la glándula del albumen, una de las glándula sexuales femeninas de caracoles (48). El porcentaje de mitocondrias con depositos de calcio puede ser tomado como una medida del efecto estimulante de la CaFl. la esquistosomina inhibe el efecto de la CaFl (90-91,114).

En etapas tempranas de infección *T. ocellata* afecta al sistema de defensa inmune de su huésped intermediario *L. stagnalis*, ocasionando primeramente un incremento en la actividad fagocítica de los hemocitos, por un factor derivado del parásito, y posteriormente una supresión de la actividad fagocítica, por un factor derivado del sistema nervioso del caracol. Un factor derivado del esporocisto madre parece inducir la liberación de este factor (95,36). Se ha planteado la hipótesis de que estos factores activadores y supresores de la actividad fagocítica son péptidos derivados de precursores de péptidos opioides, debido a que ha sido demostrado que estos péptidos afectan la conformación, migración y

adherencia de hemocitos de moluscos (97,98). Duvaux-Miret y col. (99) encontraron que dos oligonucleótidos con secuencias específicas para precursores de péptidos opioides mostraban hibridización significante con el ADN de *Schistosoma mansoni*. Además, con radioinmunoensayos encontraron inmunoreactividad para α-MSH, ACTH y β-Endorfina. Estudios inmunocitoquímicos a la fecha únicamente han detectado inmunoreactividad a Leu-Encefalina en trematodos (6,119).

HIPOTESIS

A) ALGUNAS SUBSTANCIAS REGULADORAS PRESENTES EN LAS ETAPAS LARVALES DEL CICLO DE VIDA DE LOS PARASITOS DIGENEOS SON SIMILARES A LAS DE VERTEBRADOS Y OTROS INVERTEBRADOS FILOGENETICAMENTE SUPERIORES A PLATELMINTOS.

B) *DIPLOSTOMUM SPATHACEUM*, UN PARASITO DIGENEO, OCASIONA LA LIBERACION DE ESQUISTOSOMINA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE *LYMNAEA STAGNALIS*, AL IGUAL QUE DIGENEOS DE LA FAMILIA SCHISTOSOMATIDAE.

OBJETIVOS

OBTENER ETAPAS LARVALES DE PARASITOS DIGENEOS:

- LARVAS DE *T. ocellata:*
  - Miracidias a partir de el huésped definitivo (*Anas platyrrhynchos*).
  - Esporocistos madre, obtenidos ocasionando la transformación in vitro de las miracidias.
  - Conglomerados germinales, cercarias en desarrollo, y cercarias libres a partir de el huésped intermediario (*Lymnaea stagnalis*).
- LARVAS DE *S. mansoni:*
  - Conglomerados germinales, cercarias en desarrollo, y cercarias libres a partir de el huésped intermediario (*Biomphalaria glabrata*).
- LARVAS DE *D. spathaceum:*
  - Conglomerados germinales, cercarias en desarrollo, y cercarias libres a partir de el huésped intermediario (*L. stagnalis*).
  - Metacercarias a partir de el huésped intermediario (*Lebistes reticulatis*).

DETECTAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCION DE NEUROSUBSTANCIAS EN ETAPAS LARVALES DE PARASITOS DIGENEOS POR METODOS INMUNOCITOQUIMICOS:

- AMINOACIDOS, NEUROPEPTIDOS AISLADOS DE VERTEBRADOS Y NEUROPEPTIDOS AISLADOS DE INVERTEBRADOS.
  - En esporocistos hijo, etapas cercariales en desarrollo, y cercarias libres de *T. ocellata*, *S. mansoni*, y *D. spathaceum*.
  - En metacercarias de *D. spathaceum*, y miracidias de *T. ocellata*.
- PEPTIDOS DERIVADOS DE PRECURSORES OPIOIDES.
  - En miracidia y esporocistos madre de *T. ocellata*.

DETECTAR LA PRESENCIA DE ESQUISTOSOMINA EN LA HEMOLINFA DE *L. STAGNALIS* INFECTADO CON *D. SPATHACEUM* POR METODOS MORFOLOGICO-BIOQUIMICOS.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE ETAPAS LARVALES DE PARASITOS A PARTIR DE SUS HUESPEDES.

Obtención de miracidias de los parásitos.

Huevos de *Schistosoma mansoni* (cepa Puerto Rico) fueron obtenidos de hígado de ratón (*Mus musculus*): Ratones (cepa CD1) fueron infectados con cercarias del digeneo (las colas fueron sumergidas por 10 min. en 50 ml. de agua con aproximadamente 200 cercarias). Después de sacrificar a los ratones por dislocación cervical, el hígado fue obtenido y homogenizado, centrifugado (5000rpm/3min), lavado dos ocasiones más en suero fisiológico, y posteriormente dos veces en agua libre de cobre. Todo el proceso a 4 °C. Los huevos aislados fueron colocados en agua libre de cobre, a una temperatura de 25 °C, con una fuente de luz de 100 watts. Después de dos horas las miracidias pudieron ser obtenidas.

Huevos de *Trichobilharzia ocellata* fueron obtenidos de excremento de pato (*Anas platyrrhynchos*), como fue descrito por Mellink y Van den Bovenkamp (41). Las miracidias fueron estimuladas a emerger de los huevos aplicandoles una fuente de luz (100 watts).

Huevos de *Diplostomum spathaceum* obtenidos de gaviotas (*Larus argentatus*), fueron enviados desde la Universidad de Aberdeen, Escocia, por el doctor L. H. Chappell. Los huevos fueron incubados de 8 a 12 días a 25 °C, con cambio de agua continuo. Despues de este período las miracidias fueron estimuladas a emerger de los

huevos aplicadoles una fuente de luz (100 watts).

Infección.

Caracoles, *Lymnaea stagnalis*, con caparazones de 10 mm fueron infectados con 10 miracidias de *T. ocellata*.

Caracoles, *Lymnaea stagnalis*, con caparazones de 6 mm fueron infectados con 6 miracidias de *D. spathaceum*.

Caracoles, *Biomphalaria glabrata*, con caparazones de 10 mm fueron infectados con 10 miracidias *S. mansoni*.

El proceso de infección fue llevado a cabo en cámaras de cultivo de 25 cubos. Los caracoles fueron incubados con las miracidias por 3 hrs. a 25 °C, en 3 ml de agua libre de cobre.

Caracoles infectados fueron alimentados con lechuga (*L. stagnalis*) ó con alimento para peces (*B. glabrata*), *ad libitum*, y mantenidos a un período de 12 hrs luz - 12 hrs obscuridad, con continuo cambio de agua (agua libre de cobre), y a una temperatura de 20 °C.

Obtención de esporocistos madre.

Miracidias de *T. ocellata* fueron selectivamente aisladas e incubadas en medio de cultivo a 21 °C, para su transformación in vitro en esporocistos madre, de acuerdo al método de Schallig y colaboradores (42).

Obtención de esporocistos hijo y cercarias libres.

Después de 8 a 12 semanas postinfección, la emergencia de cercarias fue estimulada exponiendo los caracoles a una fuente de luz, como fue descrito por Sluiters y col. (43). Se obtuvieron glándulas digestivas de caracoles infectados, en esta región se encuentran

esporocistos hijo conteniendo conglomerados germinales y cercarias en desarrollo. En el caso de caracoles infectados con *D. spathaceum* fue tomado el caracol completo, debido a que los esporocistos hijo de esta especie se encuentran distribuidos en todo el cuerpo del molusco.

Obtención de metacercarias.

Cercarias del gusano del ojo (*D. spathaceum*) fueron obtenidos para infectar guppies (*Lebistes reticulatis*). Los peces fueron colocados en recipientes con 50 ml de agua con cercarias, y fueron incubados por 3 hrs a 25 °C. Posteriormente fueron colocados en peceras, con continua provisión de aire, y alimentados con Tetra-Min. Entre 3 y 7 meses postinfección, los cristalinos de los ojos de los peces fueron disecados para obtener las metacercarias.

INMUNOCITOQUIMICA.

CORTES.

Las miracidias de *T. ocellata*, el tejido de caracoles conteniendo esporocistos hijo de las tres especies de parásitos, y las cercarias libres de las tres especies de trematodos, fueron procesados por tres tipos de fijación: 1) Fijador de Bouin, 16 hrs a 4 °C; 2) Glutaraldehido al 1% por 2 hrs a 4 °C; 3) Congelados sumergiendo los especímenes en freón-22, enfriado en nitrógeno líquido, después el material fue criosecado a -45 °C por 40 hrs y fijado en vapor de paraformaldehido por 2 hrs a 60 °C. El material fijado fue transferido a parafina líquida (punto de fusión 54 °C). Los cortes fueron hechos de 5 ó 7 micras, de las miracidias ó cercarias, respectivamente.

Las inmunotinciones con anticuerpos se hicieron con la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (44). Después de desparafinar los cortes, la actividad de peroxidasas endógenas fue inhibida con peróxido de hidrógeno diluido en metanol (0.1%). Luego los cortes fueron hidratados en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4 + 0.1% de detergente Tween 20 (b-tween). La incubación con el primer anticuerpo (vea la tabla 1), diluido en b-tween, fue por 16 hrs a 4 °C, lavados dos veces (5 min) en b-tween, é incubados con el segundo anticuerpo (DAKO Immunocytochemical Products, Dinamarca) - anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano: cerdo-anticonejo, conejo-antiratón, ó rata-anticonejo - diluido 1:200 en b-tween. La actividad de peroxidasa fue detectada con diaminobenzidina 0.05% (Sigma D5637) con peróxido de hidrógeno 0.04% en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4.

Montaje total

Las miracidias y esporocistos madre de *T. ocellata*, cercarias libres de las tres especies y metacercarias de *D. spathaceum*, se fijaron en paraformaldehido al 4% en HEPES 0.05M, pH 7.4, por 4 hrs a 4 °C. Después se lavaron por 16 hrs en HEPES a 4 °C, y se incubaron con el primer anticuerpo (vea Tabla 1) diluido en HEPES 0.05M, pH 7.4, más 0.3% de Triton-X100, más 1% de albumina serica bovina, más 0.2% de azida de sodio (buffer HEPES-T), por 48 hrs a 4 °C. Posteriormente fueron lavados 24 hrs en HEPES-T, é incubados en el segundo anticuerpo (DAKO Immunocytochemical Products, Dinamarca) - anticuerpos conjugados a isotiocianato de fluoresceína: Cerdo-anticonejo ó conejo-antiratón - diluido 1:200 en HEPES-T.

Después de lavarlos en HEPES, fueron montados en glicerol al 80% más 1% de ethilenamida.

Controles:

(a) Omisión del antisuero primario; (b) Incubación en suero no inmune; (c) Absorción en fase líquida con el antígeno homólogo; (d) Incubación del antisuero primario con la proteína acarreadora (en aquellos casos en que fue usada).

Tabla 1: Antisueros usados.

ANTISUERO	FUENTE**
Acido γ-aminobutírico(GABA)	A
Acido γ-aminobutírico(GABA)	E
Anti-*Lymnaea*-Monoclonal-Antibodies 6 (ALMA6)*	C
APGWamida*	C
Calfluxina(CaF1)*	C
Catch relaxing peptide(CARP)*	I
Colecistocinina(CCK)	A
Colecistocinina(CCK)	E
4H5monoclonal*	C
Dinorfina	G
Dopamina	A
α-Endorfina	B
β-Endorfina	B
Factor de crecimiento epidermal(EGF)	D
Factor de crecimiento fibroblástico(FGF)	D
Factor liberador de corticotropina(CRF)	A
FMRFamida*	C
Glutamato	A
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(1-24)	E
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(25-39)	E
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(4-10)	E
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(10-13)	E
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(11-17)	E
Hormona adrenocorticotropica(ACTH)(18-24)	E
Hormona concentradora de melanocitos(MCH)	G
Hormona de crecimiento (humana) (hGH)	F
Hormona de las células caudodorsales I(CDCHI)(21-36)*	C
Hormona de las células caudodorsales II(CDCHII)(34-41)*	C
Hormona de las células caudodorsales I monoclonal(CDCHIm)(33-36)*	C
Hormona del cuerpo dorsal(DBH)*	C
Hormona α estimulante de melanocitos(α-MSH)	G
Hormona α estimulante de melanocitos(α-MSH)	H
Hormona foliculo estimulante(FSH)	C
Hormona gonadotropica (salmon) (GTH)	H

Tabla 1. (Continuación).

Hormona gonadotropica (carpa) (GTH)	H
Hormona liberadora de gonadotropina(GnRH)	H
Hormona liberadora de la hormona luteinizante(LHRH)	E
Hormona liberadora de la hormona luteinizante(LHRH)	H
Hormona luteinizante(LH)	C
Insulina (salmon)	J
Met-encefalina	C
Neurofisina	E
Neuropeptido Y	A
Neuropeptido Y	H
Oxitocina	A
Péptido α de las células caudodorsales(α-CDCP)(3-11)*	C
Péptido β de las células caudodorsales(β-CDCP)*	C
Péptido cardiaco pequeño B(SCPB)*	K
Péptido de molusco relacionado a insulina B(MIPB)*	C
Péptido de molusco relacionado a insulina C(MIPC)*	C
Péptido intestinal vasoactivo(VIP)	A
Péptido intestinal vasoactivo(VIP)	E
Polipéptido pancreático (bovino) (bPP)	J
Prolactina	E
Prolactina	G
Somatostatina	A
Substancia P	A
Substancia P	D
Substancia P	E
Arg-Vasopresina	A
Arg-Vasotocina	A

* = Neuropeptidos dirigidos en contra de neuropeptidos nativos de invertebrados.

Tabla 1. (Continuación).

**FUENTES DE LOS ANTICUERPOS:

(A)- Dr. R.M. Buijs, Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, Holanda.

(B)- Prof. Claude-Roland Marchand, Laboratorie de Zoologie et Embriologie, Besançon Cédex, Francia.

(C)- Prof. H.H. Boer y Dr. Jan Van Minnen, Department of Histology, Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda.

(D)- Dr. J. Baguña, Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, España.

(E)- Dr. F.J.H. Tilders y Dr. H.W. Steinbusch, Department of Pharmacology, Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda.

(F)- Prof. C.K. Phares, University of Nebraska, USA.

(G)- Prof. E. Roubos, Catholic University of Nijmegen, Nijmegen, Holanda.

(H)- Prof. R. Goos, Utrecht Universiteit, Holanda.

(I)- Dr. Y. Muneoka, Faculty of Integrates Arts & Sciences, University of Hiroshima, Japon.

(J)- Dr. V. Kasakov, Pavlov Institute, Pelerburg, URSS.

(K)- Dr. S. Kempf, University of Auburn, Alabama, USA.

Suero de Caracoles.

Hemolinfa de *Lymnaea stagnalis* no infectado, infectado con *T. ocellata*, e infectado con *D. spathaceum*. fue colectada por el método descrito por Sminia y col. (45). La hemolinfa fue centrifugada (12000 rpm/20 min), para remover amebocitos y cercarias. El suero obtenido fue usado inmediatamente ó congelado a -70 °C, estudios previos han demostrado que la esquistosomina presente en el suero mantiene su actividad cuando es congelado (31).

Aislamiento de la hormona Calfluxina (CaFl).

Comisuras cerebrales - el área donde las células caudodorsales secretan la hormona calfluxina en la hemolinfa (46) - de 30 caracoles adultos (*L. stagnalis*) no infectados, de aproximadamente 25 mm, fueron disecadas. Las comisuras fueron colectadas en tubos Eppendorf y colocadas sobre CO_2 sólido. Se añadió ácido acético (0.1M), y fueron calentadas en agua hirviendo por 10 minutos. Se homogenizó el tejido, se sonicó, y se centrifugó (12000 rpm/10 min). El sobrenadante fue colectado. La píldora fue resuspendida dos veces más y tratada de la misma forma que el homogenado. Los sobrenadantes combinados fueron liofilizados 16 hrs. La hormona fue disuelta en solución de Ringer.

Incubaciones.

Glándulas del albumen de 25 caracoles, *L. stagnalis*, juveniles no infectados (19 mm) fueron disecadas, y preincubadas por 1 hr en

solucion de Ringer. Cada glándula fue cortada a la mitad, é incubadas por 20 min en las siguientes soluciones:

Grupo 1: Ringer.

Grupo 2: Ringer + CaFl.

Grupo 3: Suero de caracoles no infectados + CaFl.

Grupo 4: Suero de caracoles infectados con *T. ocellata* + CaFl.

Grupo 5: Suero de caracoles infectados con *D. spathaceum* + CaFl.

Demostración de depósitos de Calcio.

Después de la incubación, las mitades de las glándulas fueron cortadas en piezas de 1 mm^3, y fijadas en solución de Karnovsky – glutaraldehido al 2%, formaldehido al 2.5%, antimoniato de potasio al 2%, en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.6 – por 2 hrs a 21 °C. Acido tánico (0.1%) fue disuelto en el fijador antes de su uso (47,48). Las glándulas fueron lavadas en buffer de fosfatos con 2% de antimoniato de potasio (2 veces/5 minutos), y postfijadas en tetraóxido de osmio al 1%, en buffer de fosfatos con 2% de antimoniato de potasio, por 2 hrs a 4 °C. Posteriormente, las piezas fueron lavadas en buffer de fosfatos con antimoniato (5 minutos), y después en buffer de fosfatos sin antimoniato (30 min). Las piezas fueron posteriormente deshidratadas e incluídas en EPON 812.

Cortes finos, en rejillas cubiertas con una película de formvar, fueron impregnados con citrato de plomo y acetato de uranilo en un LKB 2168 Ultrastainer. Posteriormente fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Phillips EM 300. Cien mitocondrias con ó sin depósitos de calcio fueron contadas, una

glándula del albumen por caracol, cinco caracoles por grupo. Las mitocondrias fueron contabilizadas únicamente en células con núcleo y retículo endoplásmico bien conservado.

Análisis Estadístico.

Los datos, mitocondrias con ó sin dépositos de calcio, fueron confrontados por análisis de varianza de un nivel (49), comprobandosé que hubiera homogeneidad de varianzas, por la prueba de Bartlett (50) y normalidad (51). Posteriormente, se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan (52).

RESULTADOS

Neurosubstancias similares a péptidos aislados de vertebrados e invertebrados, y al aminoácido glutamato, estan presentes en etapas larvales de trematodos digeneos. Se observaron diferencias en la presencia de inmunoreactividad (IR) a neuropeptidos entre las diferentes especies, y en la localización, extraneuronal y neuronal.

Inmunoreactividad a glutamato fue observada en miracidias de *T. ocellata*, cercarias de *T. ocellata* y *S. mansoni*, y en la metacercaria de *D. spathaceum*. En la miracidia IR fue observada en el neuropilo central, asi como en los troncos nerviosos anteriores y posteriores (Fig.1). Tanto en la cercaria intraesporocística como en la cercaria libre de *T. ocellata* una gran IR fue detectada en el sistema nervioso, ésta estuvo presente en los ganglios centrales, la comisura principal, y en los troncos nerviosos anteriores y posteriores (Figs.2-5). En *S. mansoni*, menor IR fue observada en la cercaria libre, en la misma localización que la cercaria de *T. ocellata*. En la metacercaria IR fue observada en la comisura anterior, troncos nerviosos ventrales, cordones nerviosos anteriores, y en fibras nerviosas de la musculatura subtegumental (Figs.6-7).

La presencia de IR a neuropeptidos se ilustran en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Presencia de IR a péptidos derivados de precursores opioides en miracidia y esporocisto madre de *T. ocellata*.

ANTISUERO	MIRACIDIA	ESPOROCISTO MADRE
Dinorfina	+	-
α-Endorfina	-	-
β-Endorfina	-	-
ACTH(1-24)	-	-
ACTH(25-39)	-	-
ACTH(4-10)	-	-
ACTH(10-13)	-	-
ACTH(11-17)	-	-
ACTH(18-24)	-	-
α-MSH	+++	-
Met-Encefalina	+++	++

Tabla 3. Presencia de IR a neuropeptidos nativos de vertebrados e invertebrados en cercarias de *T. ocellata*, *S. mansoni* y *D. spathaceum*.

ANTISUERO	*T. ocellata*	*S. mansoni*	*D. spathaceum*
CARP	+++	+++	+++
α-CDCP	-	+	+
APGWamida	+++	-	-
FMRFamida	+++	+++	+++
SCPB	-	-	-
Vasotocina	+++	-	-
Vasopresina	++	-	+++
Oxitocina	-	-	-
Prolactina	++	-	-
Substancia P	++	-	+++
Colecistocinina	-	++	-
Somatostatina	-	+++	-
Met-encefalina	+++	+++	++

No se detectó IR en ninguna de las especies de cercaria con los demas antisueros tratados.

Tabla 4. Presencia de IR a neuropeptidos nativos de vertebrados e invertebrados en la miracidia de *T. ocellata* y en la metacercaria de *D. spathaceum*.

ANTISUERO	MIRACIDIA	METACERCARIA
ALMA 6	-	-
APGWamida	++	+++
CaF1	-	-
CARP	+++	+++
4H5m	-	-
FMRFamida	+++	+++
CDCH I	-	+
CDCH Im	-	-
CDCH II	-	-
DBH	-	-
MIP B	-	-
MIP C	-	-
α-CDCP	++	+
β-CDCP	-	-
SCPB	-	++
Vasotocina	++	+
Vasopresina	++	+++
Oxitocina	+	-
Substancia P	++	+++
Met-encefalina	+++	-

La distribución de la IR detectada para los neuropeptidos esta descrita por etapas larvales.

Miracidia de *T. ocellata*:

IR con antisueros en contra de CARP, α-CDCP, APGWamida, FMRFamida, Substancia P, Arg-Vasotocina, Arg-Vasopresina, y Oxitocina fueron observados en la masa central y en los troncos nerviosos anteriores y posteriores (Figs.8-9).

IR a α-MSH fue detectada en la masa central, en neuronas y en sus seis pares de terminaciones nerviosas ciliadas que se encuentran entre la primera y segunda hilera de placas ciliadas, estas neuronas se encuentran alrededor de el neuropilo central (Figs.10-14).

IR a α-MSH también fue observada en un par de papilas laterales localizadas entre la tercera y cuarta hileras de placas ciliadas (Fig.15).

IR a dinorfina fue observada únicamente en los seis pares de terminaciones nerviosas ciliadas, las mismas que mostraron IR a α-MSH.

IR a Met-encefalina fue observada en las células germinales (Figs.16-17).

Esporocisto madre de *T. ocellata*:

Celulas germinales de esta etapa larval mostraron IR a Met-encefalina (Figs.18-19).

Cercarias:

El componente peptidérgico de el sistema nervioso de cercarias de trematodos digenéticos, definido por la combinación de los diferentes neuropeptidos detectados, consiste de un par de ganglios, conectados por una comisura. De los ganglios nacen troncos nerviosos longitudinales anteriores y posteriores, estos últimos se continuan con dos pares de fibras nerviosas que corren a lo largo de la cola.

Cercaria de *T. ocellata*:

La cercaria intraesporocistica completamente desarrollada y la cercaria libre presentaron IR en el sistema nervioso con los siguientes antisueros: CARP, SCPB, FMRFamida, Arg-Vasotocina, Arg-Vasopresina, Prolactina y substancia P. La mas fuerte IR fue con antisueros en contra de FMRFamida y CARP, ésta fue observada en fibras nerviosas del neuropilo y de la comisura central, asi como en los troncos nerviosos longitudinales anteriores y posteriores. (Figs.20-21). Fibras nerviosas de la cola que terminan en la furca también mostraron IR con estos neuropeptidos nativos de invertebrados (Figs.22-24).

Con los otros neuropeptidos la IR estuvo restringida a la comisura central y a los nervios longitudinales (Figs.25-26).

IR a neuropeptidos localizada extraneuronalmente fue detectada en esta especie: IR con el antisuero en contra de APGWamida estuvo localizada en las celulas flamigeras de la cercaria libre , en la cercaria intraesporocistica totalmente desarrollada (Figs.31-35). Algunas celulas en la pared del esporocisto hijo tambien mostraron

IR con este tetrapéptido (Figs.27-31).

FMRFamida fue observado en las glándulas de escape y en sus conductos de la cercaria intraesporocística (Fig.32-35).

Met-encefalina fue observada en la cercaria en desarrollo, en células precursoras de células musculares. Estas se encuentran en la cola y en células del organo anterior. IR con este pentapéptido opioide tambien fue observada en algunas células de los conglomerados germinales (Figs.36-37).

Cercaria de *S. mansoni*:

La cercaria totalmente desarrollada presentó IR en el sistema nervioso con los siguientes antisueros: FMRFamida, CARP, α-CDCP, y CCK. De manera similar que la cercaria de *T. ocellata*, antisueros en contra de CARP y FMRFamida mostraron la mayor IR e igual distribución (Figs.38-40). IR a α-CDCP y CCK estuvo limitada a la comisura central y a los nervios longitudinales.

IR a somatostatina, FMRFamida y Met-encefalina estuvo presente en células no neuronales:

El antisuero en contra de somatostatina mostró IR en células subtegumentales distribuidas en todo el cuerpo de la cercaria. El tegumento cercarial no presentó inmunoreactividad con este antisuero. Algunas células parenquimatosas en la parte superior de las glándulas preacetabulares también fueron inmunoreactivas a este neuropeptido (Figs.41-44).

IR a FMRFamida estuvo presente en las glándulas de escape, y sus conductos, de la cercaria intraesporocística (Figs.45-47).

Met-encefalina mostró idéntica distribución que en las cercarias de

T. ocellata y *D. spathaceum* (Fig.48).

Cercaria de *D. spathaceum*:

La cercaria totalmente desarrollada presentó IR en el sistema nervioso con los siguientes antisueros: FMRFamida, CARP, α-CDCP, Arg-Vasopresina y Substancia P. IR a FMRFamida estuvo presente en algunas neuronas en la periferia de los ganglios centrales, tanto como en la comisura central, los nervios longitudinales anteriores y posteriores, y en las fibras nerviosas que corren a lo largo de la cola (Fig.49).

Algunas neuronas cerca de la comisura central mostraron IR a Substancia P. También IR a este neuropeptido fue observada en los troncos nerviosos longitudinales (Figs.50-51). IR a CARP, α-CDCP y Vasopresina, fue observada únicamente en la comisura central y en fibras de los cordones nerviosos longitudinales anteriores y posteriores.

IR a Met-encefalina fue localizada en células no neuronales en la cola de la cercaria en desarrollo, y células del organo anterior, las mismas células inmunoreactivas que en las otras dos especies de cercarias estudiadas. De manera similar, algunas células de los conglomerados germinales también mostraron IR a este opioide.

Metacercaria de *D. spathaceum*:

De los antisueros tratados, IR en el sistema nervioso fue observada con: FMRFamida, CARP, APGWamida, SCPB, α-CDCP, CDCH-I, Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina y Substancia P.

Entre los antisueros dirgidos en contra de péptidos de invertebrados, FMRFamida mostró la mas extensa distribución en la

metacercaria. IR fue observada en los ganglios anteriores, las comisuras anteriores y posteriores, en los cordones nerviosos ventrales, dorsales y laterales, fibras nerviosas inervando las carnosidades anteriores, fibras en el organo adhesivo-absortivo, fibras asociadas con el poro excretorio, y comisuras transversales subtegumentales (Figs.52,56,57). Neuronas inervando la ventosa anterior, a lo largo de los troncos nerviosos ventrales y asociadas con la comisura posterior fueron inmunoreactivas a este tetrapéptido. (Figs.53-55).

CARP, APGWamida, Arg-Vasopresina y Substancia P mostraron similar distribución, IR estuvo presente en los ganglios anteriores, troncos nerviosos anteriores y posteriores, commisuras subtegumentales, fibras alrededor del poro excretorio y en el organo adhesivo-absortivo (Figs.58-61). Algunas neuronas cerca de los ganglios anteriores fueron inmunoreactivas a Substancia P.

SCPB y CDCH I estan menos distribuidos, IR fue observada unicamente en los ganglios anteriores, la comisura principal y comisuras nerviosas subtegumentales (Fig.62-63). El poro excretorio mostró fibras inmunoreactivas a SCPB (Fig.64). Inervación del organo adhesivo-absortivo fue observado con CDCH I.

α-CDCP y Arg-Vasotocina mostraron la mas débil inmunoreactividad, esta fue observada en los ganglios, la comisura principal, y en los troncos nerviosos ventrales.

<u>Detección de esquistosomina en hemolinfa.</u>

Suero obtenido de la hemolinfa de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum* no afectó la acción de la calfluxina sobre las mitocondrias de células de la glándula del albumen (Figs.65-66). La

acción de esta hormona fue afectada por suero obtenido de caracoles infectados con *T. ocellata* y no fue alterada con suero obtenido de caracoles no infectados (Gráfica 1).