

## DISCUSION

Este estudio reveló la presencia y distribución neuronal y extraneuronal de neurosubstancias semejantes a las de vertebrados y otros invertebrados en etapas larvales de parásitos digeneos, lo que confirma la primera hipótesis propuesta. Además, la ausencia de esquistosomina en la hemolinfa de *L. stagnalis* infectado con *D. spathacium*.

Los métodos inmunocitoquímicos únicamente permiten delinear conclusiones acerca de la similitud del determinante antigenico, pero no de exacta identidad. Por consiguiente, no es posible saber si el antisuero reconoció la misma molécula empleada como antígeno, o a un posible precursor filogenético de esta molécula, ó bien a otra molécula completamente diferente con alguna similitud en la estructura primaria. De igual manera, los resultados negativos obtenidos deberán ser interpretados con cuidado, debido a que la variabilidad en técnicas de fijación, el procesamiento de los tejidos, el método inmunológico usado, tanta como los niveles detectables del antígeno (esto principalmente en las pequeñas células de las larvas de digeneos), pueden originar discrepancias con observaciones de otros investigadores.

La demostración de glutamato (Glu) en el sistema nervioso de larvas de trematodos, soporta la hipótesis de que este aminoácido es un neurotransmisor en platelmintos, de acuerdo a algunos reportes realizados en cestodos (la clase filogenéticamente más avanzada de platelmintos): Presencia de inmunoreactividad en el sistema

nervioso; efectos excitatorios en neuronas y células musculares; efecto bloqueado por antagonistas; incremento en la actividad basal de la adenilato ciclase; mecanismos de absorción de Glu; liberación de Glu endógeno y de Glu administrado exógenamente (58-59). La presencia de Glu en diferentes etapas larvales de digeneos podría indicar que este aminoácido está ampliamente distribuido ontogénicamente. Similarmente, la presencia en el sistema nervioso de diferentes especies de trematodos sugiere que Glu es también un neurotransmisor en esta clase de platelmintos. Por otra parte, Glu es una substancia clave en muchas vías metabólicas, y ha sido reportado que en tinciones immunocitoquímicas se observa un poco de tinción inespecífica en todas las áreas del tejido examinado, ésta corresponde a la poza metabólica de este aminoácido (57,60,61). En este estudio se observó algo de tinción inespecífica, correspondiente a la poza metabólica de Glu, sin embargo, la inmunoreactividad más fuerte fue observada en tejido nervioso, la poza neurotransmisora de Glu.

La presencia de IR a neuropeptidos en el sistema nervioso de larvas de gusanos planos sugiere un posible papel como neurotransmisores, neuromoduladores ó neurohormonas. Sin embargo, diferentes especies parecen usar distintas neurosubstancias, debido a que diferencias en IR a ciertas neurosubstancias fueron detectadas entre las especies. La significancia de estas diferencias es desconocida de momento, pero podrían indicar estrategias adaptativas. Durante sus ciclos de vida los trematodos digeneos tienen cambios drásticos de medio ambiente, de etapas libres a etapas parásiticas, de huéspedes poiquilotérmicos a homeotérmicos, etc. Otra probable explicación es

que algunos parásitos obtienen sus neurosubstancias de sus huéspedes. El gusano adulto de *S. mansoni* es incapaz de producir 5HT de novo, de triptófano, sin embargo, 5HT está presente en el sistema nervioso de este parásito, por lo que depende de su huésped para el suplemento de esta substancia (116-117).

Desde que FMRFamida fue aislado de el molusco *Macrocyclista nimbosa* (62), varios péptidos relacionados a FMRFamida han sido aislados y caracterizados en diferentes especies de la mayoría de los filos animales (63-68). En platelmintos inmunoreactividad a este tetrapéptido ha sido reportada en el sistema nervioso de especies de las tres clases (21) y se ha sugerido que actua como neurotransmisor ó neuromodulador, posiblemente coordinando la actividad muscular (69). En este estudio, además de la fuerte inmunoreactividad en el sistema nervioso en todas las etapas larvales, se encontró la presencia extraneuronal de FMRFamida en las glándulas de escape de las cercarias de *T. ocellata* y *S. mansoni*. Estas glándulas liberan su contenido cuando la cercaria emerge del caracol, el posible papel que juega esta substancia al ser liberada dentro del caracol es desconocida de momento. En *L. stagnalis* (caracol), la inmunoreactividad a FMRFamida esta ampliamente distribuida, y FMRFamida y otros péptidos relacionados han sido aislados y caracterizados de esta especie de molusco (66). Un reporte previo ha demostrado que las glándulas de escape de la cercaria de *S. mansoni* muestran inmunoreactividad a polipéptido pancreático, neuropéptido Y, péptido YY, y también a FMRFamida (70). Sin embargo, estas glándulas fueron reportadas como células nerviosas, también porque presentaban inmunoreactividad a enolasa.

Este estudio mostró que estas células están localizadas en la parte superior de las glándulas preacetabulares, que tienen conductos que siguen el curso de los conductos de las glándulas acetabulares, que los conductos se abren en la ventosa anterior de la cercaria, y que estas células están ausentes en la cercaria libre, lo que demuestra que estas células son las glándulas de escape.

El neuropeptido F es el primer péptido aislado y secuenciado de platelmintos y muestra similitud en la estructura primaria a péptidos de la familia de neuropeptido Y. Se ha reportado que la immunoreactividad a FMRFamida fue eliminada cuando el antisuero dirigido contra este tetrapéptido fue absorbido con este neuropeptido F (20). Son necesarios mas estudios para determinar si la immunoreactividad detectada en etapas larvales de trematodos digeneos es debida realmente a FMRFamida, neuropeptido F, u otros miembros(s) de péptidos relacionados a FMRFamida.

CARP fue aislado de el ganglio pedal del molusco bivalvo *Mytilus edulis* (21). Tiene efectos inhibitorios y excitatorios sobre neuronas de el cerebro del caracol *Helix*, y efectos modulatorios sobre la contracción de músculos de varias especies de moluscos (72,73). La amplia distribución de la immunoreactividad obtenida con el antisuero dirigido contra este neuropéptido en el sistema nervioso de todas las etapas larvales de digeneos, sugiere que esta substancia juega un papel importante como elemento neuroreguladorio en este grupo de gusanos planos.

APGWamide fue aislado y caracterizada de otro molusco, *Fusinus ferrugineus* (24). En varias especies de moluscos se ha demostrado que tiene efectos modulatorios sobre la contracción de varios

músculos y efectos inhibitorios sobre neuronas, además antagoniza la acción de dopamina y serotonina en el músculo retráctil del pene de *L. stagnalis* (73-75). Este estudio detectó la presencia inmunocitoquímica de este tetrapéptido en el sistema nervioso de la miracidia de *T. ocellata* y la metacercaria de *D. spathaceum*, lo que podría indicar un papel neuroregulatorio en estos organismos. La significancia de la ausencia en el sistema nervioso de las cercarias estudiadas y la presencia extraneuronal en las células flamígeras únicamente en la cercaria completamente desarrollada de *T. ocellata* es desconocida de momento. Algunas células de la pared del esporocisto hijo de *T. ocellata* también presentaron APGWamida, sin embargo, no es posible afirmar a nivel de microscopía de luz, si estas células forman parte del sistema excretorio (células flamígeras), ó representan neuronas. Por otra parte, ha sido reportado que el fluido del canal excretorio de platelmintos contiene proteína soluble y aminoácidos (76-77), si APGWamida es excretado en la hemolinfa del huésped intermedio y juega algún papel dentro del caracol, requiere posterior investigación, de igual manera si tiene alguna función intrínseca, como por ejemplo, sobre el control de transporte ó ultrafiltración de fluidos.

Este estudio reporta la presencia de somatostatina en células subtegumentales de la cercaria de *S. mansoni*. Estudios ultraestructurales (78), junto con la demostración de los componentes colinérgico (79-81), aminérgico (82), y peptidérgico (80) han demostrado que la cercaria de *S. mansoni* tiene la misma organización básica de otras cercarias de trematodos: un neuropilo con cuerpos celulares asociados, y troncos nerviosos anteriores y

posteriores (83-84). En las células immunoreactivas a somatostatina no hay antecedentes de actividad a aceticolinesterasa, catecolaminas, ó immunoreactividad a otros neuropeptidos.

La presencia de immunoreactividad a péptidos biológicamente activos en células tegumentales ha sido reportada en otros gusanos planos. Fairweather y colaboradores (85) encontraron también somatostatina en el cestodo *Trilocularia acanthidevulgaris*. Kumazawa y Moriki (86) reportaron la presencia de prolactina en otro cestodo, *Hymenolepis nana*. Thorndyke y Whitfield (87) encontraron VIP en el trematodo *Echinostoma liei*. Estos últimos autores sugirieron que la secreción de este material immunoreactivo podría ser la causa de la patología del huésped. Estudios ultraestructurales en la cercaria de *S. mansoni* han mostrado que la mayoría de las células subtegumentales (células con somatostatina) contienen grandes complejos de Golgi y muchos cuerpos densos, como los observados en el tegumento, pero no fueron observadas conexiones de estas células con el tegumento (88). Después de que la cercaria ha penetrado al huésped definitivo y se transforma en esquistosomula, se ha observado que estas células hacen conexión con el tegumento y vacuolas de estas células pasan hacia el tegumento (89,90). Se conoce que la esquistosomula llega a ser protegida contra anticuerpos en huéspedes permisivos, sin embargo, no se conoce cómo tan pronto después de la penetración expresan抗ígenos del huésped para evadir su respuesta inmune. Es de notar que las células tegumentales en la cercaria de *S. mansoni*, para la cual el humano es un huésped permisivo, muestran immunoreactividad con un antisuero dirigido en contra de somatostatina, mientras las

cercarias de *T. ocellata* y *D. spathacrum*, las cuales tienen aves como huéspedes definitivos, no muestran immunoreactividad con este antisuero. Esto podría sugerir que este material immunoreactivo a somatostatina en la cercaria de *S. mansoni* juega una función sobre la evasión de la respuesta inmune del huésped mamífero. Tal función para somatostatina no es improbable, ya que existen reportes que indican que somatostatina suprime la proliferación de linfocitos T, y la liberación de histamina y leucotrieno D4 de basófilos (91,92). Adicionalmente, somatostatina muestra una amplia distribución en el cuerpo de vertebrados, y muchas y variadas acciones (93,94). Ha sido sugerido que somatostatina no actúa como una hormona clásica sino que puede tener diferentes funciones dependiendo de su localización. Así, este péptido puede actuar a nivel neuroendocrino, paracrino, ó como regulador neuronal, dependiendo del lugar de su liberación (95). Por otra parte, somatostatina parece tener una amplia distribución filogenética, hay reportes de immunoreactividad a somatostatina de bacterias a cordados (96-104). Además, algunos reportes indican que la estructura primaria de 14 aminoácidos de este péptido es idéntica de peces a mamíferos (105-108). La producción potencialmente ilimitada de cercarias por la etapa intramolusca (esporocista hijo) de *S. mansoni*, hace esta etapa larval un excelente modelo para estudios de análisis de secuencia. Esta caracterización puede apoyar en el estudio de la filogenia de somatostatina.

IR a péptidos de la familia vasopresina/oxitotina ha sido reportada en turbelarios y cestodos (13,112,113,115), sin embargo, a la fecha, estudios en trematodos han fallado para detectar estas

neurosubstancias (117-119). Este estudio reporta la presencia de IR a estos péptidos en varias etapas larvales y en dos especies de trematodos digeneos.

A pesar de que radioinmunoensayos han reportado la presencia de péptidos derivados de precursores opioides en *S. mansoni* (9), en nuestro estudio inmunocitoquímico únicamente  $\alpha$ -MSH, dinorfina y Met-Encefalina fueron detectadas en algunas etapas larvales. La causa de estas diferencias en la detección de neurosubstancias aún en diferentes etapas de una misma especie es difícil de explicar. En otras especies de platelmintos han sido reportadas discrepancias en la detección de neuropéptidos por radioinmunoensayo y métodos inmunocitoquímicos (100-111), y algunos factores influenciando estos resultados han sido discutidos por Fairweather y Halton (10). Es inesperado el hallazgo de la ausencia de esquistosomina en la hemolinfa de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum*, debido a que los efectos causados sobre la reproducción por este parásito son semejantes a los ocasionados por parásitos de la familia schistosomatidae. Ahora nace la cuestión de cual es el mecanismo que causa la castración parasitaria en especies infectadas con otros trematodos que no son de la familia schistosomatidae. Ha sido sugerido que la castración parasitaria causada por el trematodo *Zoogonus lasius* sobre el caracol huésped *Ilyanassa obsoleta* es originada por un factor producido por el parásito y que actúa directamente sobre la gametogénesis en la gónada (120). Posiblemente un mecanismo semejante es empleado por *D. spathaceum*. Por otra parte, la distribución de *D. spathaceum* dentro del caracol huésped es diferente a especies de la familia

schistosomatidae, mientras los esporocistos hijo de este parásito se encuentran distribuidos en todo el cuerpo entre los órganos del caracol, los esporocistos hijo de schistosomatidae se encuentran restringidos a la región glándula digestiva-gónada, estas diferencias podrían tener alguna significancia sobre los efectos de infección.

## CONCLUSIONES

Trematoda es filogenéticamente el grupo más inferior en el cual la inmunoreactividad a glutamato se ha detectado en el sistema nervioso. Esta localización podría indicar un posible papel como neurotransmisor. La presencia en diferentes etapas del ciclo de vida y en diferentes especies sugiere que este aminoácido tiene una amplia distribución ontogenética y entre las especies de esta clase de platelmintos.

Este es el primer reporte de la presencia de inmunoreactividad a un grupo de neuropeptidos aislados de invertebrados en platelmintos: CARP, APGWamide,  $\alpha$ -CDCP, CDCH, además la detección de los previamente reportados en otras especies de gusanos planos, SCP $\alpha$  y FMRFamide.

Los métodos inmunocitoquímicos empleados en este estudio permitieron mostrar la localización de péptidos derivados de precursores opioides en digeneos; la presencia de estos péptidos había sido demostrada por radioinmunoensayos.

La presencia y localización de inmunoreactividad a péptidos de la familia vasopresina/oxitocina es demostrada por primera vez en trematodos.

Este estudio amplía la lista de inmunoreactividad a neuropeptidos nativos de vertebrados detectados en platelmintos. Esto eventualmente puede ser de importancia ya que la presencia ó ausencia de péptidos entre las especies puede dar una indicación acerca de líneas evolutivas seguidas.

La immunoreactividad a somatostatina se localizó en células subtegumentales de la cercaria de *S. mansoni*, la cual parasita al humano, y no en células de *D. spathaceum* ó *T. ocellata*, las cuales parasitan aves.

La hemolinfa de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum* no afecta la acción de la calfluxina, lo que podría indicar que no contiene esquistosomina. Esta hormona es un antagonista de las hormonas gonadotropicas de caracoles de agua dulce, y está presente en aquellos caracoles infectados con especies de la familia schistosomatidae (trematoda).

## PERSPECTIVAS

La inmunoreactividad a neurosubstancias caracterizadas (actividad biológica y estructura primaria) detectada en este estudio deja las bases para la identificación exacta de las substancias endógenas de parásitos digeneos. Así mismo, deja las bases para el diseño de estrategias en el empleo de antagonistas en contra de estas substancias conocidas, y así combatir a las especies de importancia médica y económica.

Las neurosubstancias derivadas de invertebrados presentes en parásitos digeneos, pueden servir de base para eliminar a estos parásitos, ya que las diferencias existentes entre sus sistemas peptidérgicos y los del huésped vertebrado, pueden ser empleadas para el diseño de estrategias para controlar enfermedades causadas por trematodos digeneos, como esquistosomiasis, fasciolasis, diplostomiasis, etc.

El potencial ilimitado de producción de cercarias por el esporocisto hijo de las especies estudiadas en el presente trabajo crea la posibilidad para el aislamiento y caracterización del material inmunoreactivo, además de la lógica importancia filogenética, esto sería de suma importancia con varias de las neurosubstancias detectadas, por ejemplo en el caso de somatostatina en la cercaria de *S. mansoni*, mostaría nuevos candidatos epitopes en contra de los cuales una vacuna o estrategias quimioterapéuticas en contra de la esquistosomiasis podrían ser dirigidas.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Butterworth, A.E. (1980). Control of Schistosomiasis in Man. En: The Biology of Parasitism. (Paul T. Englund & Alan Sher, eds.) New York: Alan R. Liss, Inc. pag. 43-59.
- 2.- Chubb, J.C. (1979). Seasonal Occurrence of Helminths in Freshwater Fishes, Part II. Trematoda. Advances in Parasitology 18: 141-295.
- 3.- Ginetsinskaya, T.A. (1961). Parasitology of Fishes. (V.A. Dogiel, G.K. Petrushevskiy Y. Polyanski, eds.) pag. 170.
- 4.- Webb, R.A. & Friedel, T. (1978). Isolation of a neurosecretory substance which stimulates RNA synthesis in regenerating planarians. Experientia 35: 657-658.
- 5.- Friedell, T. & Webb, R.A. (1979). Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by a neurosecretory fraction. Can. J. Zool. 57: 1818-1819.
- 6.- Gustafsson, M.K.S. (1987). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the nervous system of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitol. Res. 74: 168-174,
- 7.- Harris, K.R. & Cheng, T.C. (1972) Presumptive neurosecretion in *Leucocotylidomorpha constantiae* (Trematode) and its possible role in governing maturation. Int. J. Parasitol. 2:361-367.
- 8.- Bautz, A. & Schilt, J. (1986). Somatostatin-like Peptide and Regeneration Capacities in Planarians. Gen. Comp. Endocrinol. 64: 267-272.
- 9.- Gustafsson, M.K.S. & Wikgren, M.C. (1981). Activation of the peptidergic neurosecretory system in *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidea). Parasitology 83: 243-247.
- 10.- Lee, M.B., Bueding, E. & Schiller, E.L. (1978). The occurrence and distribution of 5-hydroxytryptamine in *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*. J. Parasitol. 64: 257-264.
- 11.- Bennett, J. & Bueding, E. (1971). Localization of Biogenic Amines in *Schistosoma mansoni*. Comp. Biochem. Physiol. 39A: 859-867.

- 12.- Fairweather, I., Maule, A.G., Mitchell, S.H., Johnston, C.F. & Halton, D.W. (1987). Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitol. Res.* 73: 255-258.
- 13.- Gustafsson, M.K.S., Wikgren, M.C., Karhi, T.J. & Schot, L.P.C. (1985). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*. *Cell Tissue Res.* 240: 255-260.
- 14.- Niewiadomska, K. & Moczon, T. (1987). The nervous system of *Diplostomum psuedospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomatidae) III. Structure of the nervous system in the adult stage. *Parasitol. Res.* 73: 46-49.
- 15.- Grábda-Kazubska, B. & Moczon, T. (1991). The nervous system in sporocysts and adult *Opisthorchis felineus* (Frelich, 1791) (Trematoda, Plagiornchiidae). *Acta Parasitologica Polonica* 36(3): 125-130.
- 16.- Gustafsson, M.K.S. & Eriksson, K. (1991). Localization and identification of catecholamines in the nervous system of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Parasitol. Res.* 77: 498-502.
- 17.- Samii, S.I. & Webb, R.A. (1990). Acetylcholine-like immunoreactivity in the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Brain Res.* 513: 161-165.
- 18.- Halton, D.W., Fairweather, I., Shaw, C. & Johnston, C.F. (1990). Regulatory Peptides in Parasitic Platyhelminths. *Parasitology Today* 6: 284-290.
- 19.- Fairweather, I. & Halton, D.W. (1991). Neuropeptides in platyhelminths. *Parasitology* 102: S77-S92.
- 20.- Maule, A.G., Shaw, C., Halton, D.W., Thim, L., Johnston, C.F., Fairweather, I. & Buchanan, K.D. (1991). Neuropeptide F: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophylliidae). *Parasitology* 102: 309-316.
- 21.- Reuter, M. & Gustafsson, M. (1989). "Neuroendocrine Cells" in Flatworms - Progenitors to Metazoan Neurons? *Arch. Histol. Cytol.* 52: 253-263.
- 22.- Eriksson, K., Timoschkin, O. & Reuter, M. (1990). Neuroactive substances in an endemic flatworm from lake Baikal. En: *The Early Brain*. (M.K.S. Gustafsson and M. Reuter, eds.). Abo Akademis Förlag - Abo Academy Press.

- 23.- Wikgren, M.C. & Thorndyke, M.C. (1990). An echinoderm neuropeptide in flatworms? En: The Early Brain. (M.K.S. Gustafsson and M. Reuter, eds.). Abo Akademis Förlag - Abo Academy Press.
- 24.- Phares, C.K. (1987). Plerocercoid Growth Factor: a Homologue of Human Growth Hormone. *Parasitol. Today* 3: 346-349.
- 25.- Phares, C.K. & Booth, B.J.M. (1987). Antihuman Growth Hormone (GH) Antibodies Cross-React with the GH-Like Factor from Plerocercoids of the Tapeworm *Spirametra mansonioides*. *Endocrinology* 121(5): 1839-1844.
- 26.- Phares, C.K. & Cox, G.S. (1987). Molecular hybridization and immunological data support the hypothesis that the tapeworm, *Spirametra mansonioides*, has acquired a growth hormone gene. En: Molecular paradigms for eradicating helminthic parasites. (A.J. MacInnis, ed.). New York: Alan R. Liss Inc. pag. 391-405.
- 27.- Phares, C.K. & Watts, D.J. (1988). The Growth hormone-Like Factor Produced by the Tapeworm *Spirametra mansonioides* Specifically Binds Receptors on cultured Human Lymphocytes. *J. Parasitol.* 74: 896-898.
- 28.- Hurd, H. (1990). Physiological and Behavioural Interactions Between Parasites and Invertebrate Hosts. *Advances in Parasitology* 29: 271-317.
- 29.- Schallig, H.D.F.H., Gordijk, P.L., Oosthoek, P.W. & De Jong-Brink, M. (1991). Schistosomin, a peptide present in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail's central nervous system. *Parasitol. Res.* 77: 152-156.
- 30.- De Jong-Brink, M., Elsaadany, M.M. & Boer, H.H. (1988). Schistosomin, an Antagonist of Calfluxin. *Exp. Parasitol.* 65: 109-118.
- 31.- De Jong-Brink, M., Elsaadany, M.M. & Boer, H.H. (1988). *Trichobilharzia ocellata*: Interface with Endocrine Control of Female Reproduction of *Lymnaea stagnalis*. *Exp. Parasitol.* 65: 91-100.
- 32.- De Jong-Brink, M. & Bergamin-Sassen, M.J.M. (1989). *Trichobilharzia ocellata*: Influence of Infection on the Interaction between the Dorsal Body Hormone, a Female Gonadotrophic Hormone, and the Follicle Cells in the Gonad of the Intermediate Snail Host *Lymnaea stagnalis*. *Exp. parasitol.* 68: 93-98.

- 33.- Hordijk, P.L., Van Loenhout, H., Ebberink, R.H.M., De Jong-Brink, M. & Joosse, J. (1992). The neuropeptide schistosomin inhibits ovulation in vivo in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Zool.*, en prensa.
- 34.- Hordijk, P.L., Schallig, H.D.F.H., Ebberink,, R.H.M., De Jong-Brink, M. & Joosse, J. (1992). Primary structure and origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biochem J.*, en prensa.
- 35.- Amen, R.J., Baggen, J.M.C., Bezemer, P.D. & De Jong-Brink, M. (1992). Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 104, en prensa.
- 36.- Amen, R.J. & De Jong-Brink, M. (1992). An in vitro study on the effects of *Trichobilharzia ocellata* on the internal defence system of the snail host *Lymnaea stagnalis* and the role of the central nervous system of the host. *Parasitology*, Submitido.
- 37.- Stefano, G.B., Leung, M.K., Zhao, X. & Scharrer, B. (1989). Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 626-630.
- 38.- Stefano, G.B., Cadet, P. & Scharrer, B. (1989). Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: Evidence for a subtype of receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 6307-6311.
- 39.- Duvaux-Miret, O., Dissous, C., Gautron, J.P., Patou, E., Kordon, C. & Capron, A. (1990). The Helminth *Schistosoma mansoni* Expresses a Peptide Similar to Human -Endorphin and Possesses a Proopiomelanocortin-Related Gene. *The New Biologist* 2: 93-99.
- 40.- Gustafsson, M.K.S. & Wikgren, M. C. (1981). Release of neurosecretory material by protusions of bounding membranes extending through the exolemma, in *Diphyllodothrium dendriticum* (cestoda). *Cell Tissue Res.* 220: 473-479.
- 41.- Mellink, J.J. & Bovenkamp, W. van den. (1985). In vitro culture of intramolluscan stages of the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Z. Parasitenkd.* 71: 337-351.

- 42.- Schallig, H.D.F.H., Schut, A., Knaap, W.P.W. van der & De Jong-Brink, M. (1990). A simplified medium for the in vitro culture of mother sporocysts of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitol. Res. 76: 278-279.
- 43.- Sluiters, J.F., Brussaard-Wüst, C.M. & Meuleman, E.A. (1980). The Relationship Between Miracidial Dose, Production of Cercariae, and Reproductive Activity of the Host in the Combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. Z. Parasitenkd. 63: 13-26.
- 44.- Sternberger, L.A. (1986). Immunocytochemistry. 3a. Ed. New York: Wiley.
- 45.- Sminia, T., Van Der Knaap, W.P.W. & Edelenbosch, P. (1979). The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Develop. Comp. Immunol. 3: 37-44.
- 46.- Roubos, E.W. & Van de Ven, A.M.H. (1987). Morphology of neurosecretory cells in Basommatophoran snails homologous with egg-laying and growth-hormone producing cells of *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 67: 7-23.
- 47.- Dictus, W.J.A.G. & De Jong-Brink, M. (1987). Morphometrical, enzyme cytochemical and biochemical studies on the secretory activity of a female accessory sex gland (albumen gland) of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen C90: 257-271.
- 48.- Stocum, R.D. & Roux, J.R. (1982). An Improved method for the subcellular localization of calcium using a modification of the antimonate precipitation technique. J Histochem. Cytochem. 30: 617-629.
- 49.- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1969). Biometry. San Francisco: Freeman.
- 50.- Bliss, C.J. (1967). Statistics in Biology. Vol. 1. New York: McGraw-Hill.
- 51.- Wilk, M.B. & Shapiro, S.S. (1968). The joint assessment of normality of several independent samples. Technometrics 10: 825-839.
- 52.- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1960). Principles and Procedures of Statistics. New York, Toronto, London: McGraw-Hill.
- 53.- Keenan, L. & Koopowitz, H. (1982). Physiology And *in situ* Identification of Putative Aminergic Neurotransmitters in the Nervous System of *Gyrodactylus timbriata*, a Parasitic Flatworm. J. Neurobiology 13: 9-21.

- 54.- Webb, R.A. (1986). The uptake and metabolism of L-glutamate by tissue slices of the cestode *Hymenolepis diminuta*. Comp. Biochem. Physiol. 85C: 151-162.
- 55.- Webb, R.A. (1988). Release of exogenously supplied (<sup>3</sup>H)glutamate and endogenous glutamate from tissue slices of the cestode *Hymenolepis diminuta*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 66: 889-894.
- 56.- Thompson, C.S. & Mettrick, D.F. (1989). The effects of 5-hydroxytryptamine and glutamate on muscle contraction in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). Can. J. Zool. 67: 1257-1262.
- 57.- Webb, R.A. & Eklove, H. (1989). Demonstration of intense glutamate-like immunoreactivity in the longitudinal nerve cords of the cestode *Hymenolepis diminuta*. Parasitol. Res. 75: 545-548.
- 58.- Eklove, H. & Webb, R.A. (1990). Glutamate-like immunoreactivity in the cestode *Hymenolepis diminuta*. Can. J. Zool. 68: 2417-2423.
- 59.- Eklove, H. & Webb, R.A. (1991). The effect of L-glutamate and related agents on adenylate cyclase in the cestode *Hymenolepis diminuta*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 69: 28-36.
- 60.- Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (1984). Glutamate- and GABA-Containing Neurons in the Mouse and Rat Brain, as Demonstrated With a New Immunocytochemical Technique. J. Comp. Neurology 229: 374-392.
- 61.- Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (1985). Different Neuronal Localization of Aspartate-like and Glutamate-like Immunoreactivities in the Hippocampus of Rat, Guinea-pig and Senegalese Baboon (*Papio papio*), with a Note on the Distribution of -Aminobutyrate. Neuroscience 16: 589-606.
- 62.- Price, D.A. & Greenberg, M.J. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science 197: 670-671.
- 63.- Stern, A.S., Lewis, R.V., Kimura, S., Rossier, J., Geber, L.D., Brink, L., Stein, S. & Udenfried, S. (1979). Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin (Arg<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup>) from bovine adrenal medullary granules and stratum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6680-6683.

- 64.- Dockray, G.J., Reeve Jr., J.R., Shively, J., Gayton, R.J. & Barnard, C.S. (1983). A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* 305: 328-330.
- 65.- Joosse, J. & Geraerts, W.P.M. (1990). *Neuropeptides: Unity and Diversity, A Molecular Approach*. En: *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. (A.B. Borkovec y E.P. Masler, eds.). The Humana Press Inc. pag. 3-38.
- 66.- Ebberink, R.H.M., Price, D.A., Loenhout, H. van, Dobie, K.E., Riehm, J.P., Geraerts, W.P.M. & Greenberg, M.J. (1987). The Brain of *Lymnaea* Contains a Family of FMRFamide-Like Peptides. *Peptides* 8: 515-522.
- 67.- Cottrell, G.A. (1989). The biology of the FMRFamide-series of peptides in molluscs with special reference to *Helix*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A: 41-45.
- 68.- De Loof, A. & Schoofs, L. (1990). Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 459-468.
- 69.- Magee, R.M., Fairweather, I., Johnston, C.F., Halton, D.W. & Shaw, C. (1989). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology* 98: 227-238.
- 70.- Skuce, P.J., Johnston, C.F., Fairweather, I., Halton, D.W. & Shaw, C. (1990). A confocal scanning laser microscope study of the peptidergic and serotonergic components of the nervous system in larval *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 101: 227-234.
- 71.- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N. & Muneoka, Y. (1987). Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. *Brain Res.* 422: 374-376.
- 72.- Hirata, T., Kubota, I., Imada, M., Muneoka, Y. & Kobayashi, M. (1989). Effects of the Catch-Relaxing Peptide on Molluscan Muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C: 283-288.
- 73.- Walker, R.J., Mat Jais, A.M., Sharma, R., Pedder, S., Kubota, I. & Muneoka, Y. (1991). Actions of catch relaxing peptide, CARP, and other peptides on *Helix* central neurons. En: *Molluscan Neurobiology*. (K.S. Kits, H.H. Boer and J. Joosse, eds.). North Holland Publishing Company, Amsterdam. pag. 97-102..

- 74.- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Fujisawa, Y., Ikeda, T., Miura, A., Minamitake, Y. & Muneoka, Y. (1990). A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone RCPH. *Biochem. Biophysical Res. Comm.* 167: 273-279.
- 75.- Croll, R.P., Minnen, J. van, Kits, K.S. & Smit, A.B. (1991). APGWaramide: Molecular, histological and physiological examination of a novel neuropeptide involved with reproduction in the snail, *Lymnaea stagnalis*. En: *Molluscan Neurobiology*. (K.S. Kits, H.H. Boer and J. Joosse, eds.). North Holland Publishing Company, Amsterdam. pag. 248-254.
- 76.- Webster, L.A. & Wilson, R.A. (1970). The chemical composition of protonephridial canal fluid from the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 201-209.
- 77.- Barrett, J. (1991). Amino Acid Metabolism in Helminths. *Advances in Parasitology* 30: 39-105.
- 78.- Cousin, C.E. & Dorsey, C.H. (1991). Nervous system of *Schistosoma mansoni*/cercaria: organization and fine structure. *Parasitol. Res.* 77: 132-141.
- 79.- Lewert, R.M. & Hopkins, D.R. (1965). Cholinesterase activity in *Schistosoma mansoni*/cercariae. *J. Parasitol.* 51: 616.
- 80.- Fripp, P.J. (1967). Histochemical localization of esterase activity in schistosomes. *Exp. Parasitol.* 21: 380-390.
- 81.- Bruckner, D.A. & Voge, M. (1974). The nervous system of larval *Schistosoma mansoni* as revealed by acetylcholinesterase staining. *J. Parasitol.* 60: 437-446.
- 82.- Orido, Y. (1989). Histochemical evidence of the catecholamine-associated nervous system in certain schistosome cercariae. *Parasitol. Res.* 76: 146-149.
- 83.- Grabda-Kazubska, B. & Moczon, T. (1981). Nervous system and chaetotaxy in the cercaria of *Haplometra cylindracea* (Zeder, 1800) (Digenea, Plagiorchiidae). *Z. Parasitenkd.* 65:53-61.
- 84.- Niewiadomska, K. & Moczon, T. (1982). The nervous system of *Diplostomum pseudospothoecum* Niewiadomska, (Digenea, Diplostomatidae). *Z. Parasitenkd.* 68: 295-304.
- 85.- Fairweather, I., Mahendrasingam, S., Johnston, C.F., Halton, D.W. & Shaw, C. (1990). Peptidergic nerve elements in three developmental stages of the

tetraphyllidean tapeworm *Trilocularia acanthocephaloris*. Parasitol. Res. 76: 497-508.

86.- Kumazawa, H. & Moriki, T. (1986). Immunoenzymatic demonstration of a presumptive prolactin-like substance in *Hymenolepis nana*. Z. Parasitenkd. 72:137-139.

87.- Thorndyke, M.C. & Whitfield, P.J. (1987). Vasoactive Intestinal Polypeptide-like Immunoreactive Tegumental Cells in the Digenean Helminth *Echinostoma tiei*. Possible Role in Host-Parasite Interactions. Gen. Comp. Endocrinol. 68: 202-207.

88.- Hockley, D.J. (1972). *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument. Parasitology 64: 245-252.

89.- Hockley, D.J. & McLaren, D.J. (1973). *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. Int. J. Parasitol. 3: 13-25.

90.- McLaren, D.J. (1980). *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. En: Tropical Medicine Research Studies (K.H. Brown, ed.). Research Studies Press, Chichester. pag. 195-229.

91.- Goetzl, E.J., Chernov, T., Renold, F. & Payan, D.G. (1985). Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. J. Immunol. 135: 802-805.

92.- Payan, D.G. & Goetzl, E.J. (1985). Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. J. Immunol. 135: 783-786.

93.- King, J.A. & Millar, R.P. (1979). Phylogenetic and Anatomical Distribution of Somatostatin in Vertebrates. Endocrinology 105: 1322-1329.

94.- Krieger, D.T. (1983). Brain Peptides: What, Where, and Why? Science 222: 975-985.

95.- Larsson, L. I. (1985). Distribution and morphology of somatostatin cells. Adv. Exp. Med. Biol. 188: 383-403.

96.- LeRoith, D., Roberts Jr., C., Lesniak, M.A. & Roth, J. (1986). Receptors for intercellular messenger molecules in microbes: Similarities to vertebrate receptors and possible implications for diseases in man. Experientia 42: 782-788.

- 97.- Berelowitz, M., LeRoith, D., Schenk, H. von, Newgard, C., Szabo, M., Frahmam, L.A., Shiloach, J. & Roth, J. (1982). Somatostatin-like immunoreactivity and biological activity is present in *Tetrahymena pyriformis*, a ciliated protozoan. *Endocrinology* 110: 1939-1944.
- 98.- Bautz, A., Schilt, J., Richoux, J. P. & Dubois, M.P. (1980). Detection immunocytologique, denombrement et localisation des cellules à somatostatine (SRIF) chez deux espèces de Planaires, *Dugesia lugubris* et *Dendrocoelum lacteum* (Turbellaries, Triclades). *C.R. Acad. Sc. Paris* 291(Serie D): 833-836.
- 99.- Leake, L.D., Crowe, R. & Burnstock, G. (1986). Localisation of substance P-, somatostatin-, vasoactive intestinal polypeptide- and met-enkephalin-immunoreactive nerves in the peripheral and central nervous systems of the leech (*Hirudo medicinalis*). *Cell Tissue Res.* 243: 345-351.
- 100.- Dhainaut-Courtois, N., Tramu, G., Beauvillain, J.C. & Masson, M. (1986). A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. *Neurochem. Int.* 8: 327-338.
- 101.- Schot, L.P.C., Baer, H.H., Swaab, D.F. & Noorden, S. van. (1981). Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates. *Cell Tissue Res.* 216: 273-291.
- 102.- Martin, G. & Dubois, M.P. (1981). A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod *Porcellio dilatatus* Brandt. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45: 125-130.
- 103.- El-Salhy, M., Falkmer, S., Kramer, K.J. & Speirs, R.D. (1983). Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca, and corpora allata of an adult lepidopteran insect, *Manduca sexta* (L.). *Cell Tissue Res.* 232: 295-317.
- 104.- Fritsch, H.A.R., Van Noorden, S. & Pearse, A.G.E. (1979). Localization of somatostatin-, substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of *Ciona intestinalis* L. (Asciidaeae). *Cell Tissue Res.* 202: 263-274.
- 105.- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. & Guillemin, R. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.

- 106.- Benoit, R., Bohlen, P., Brazeau, P., Ling, N. & Guillemin, R. (1980). Isolation and characterization of rat pancreatic somatostatin. *Endocrinology* 107: 2127-2129.
- 107.- Noe, B.D., Spiess, J., Rivier, J.E. & Vale, W. (1979). Isolation and characterization of somatostatin from anglerfish pancreatic islet. *Endocrinology* 105: 1410-1415.
- 108.- Plisetskaya, E.M., Pollock, H.G., Rouse, J.B., Hamilton, J.W., Kimmel, J.R., Andrews, P.C. & Gorbman, A. (1986). Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 252-263.
- 109.- Magee, R.M., Fairweather, I., Shaw, C., McKillop, J.M., Montgomery, W.I., Johnston, C.F. & Halton, D.W. (1991). Quantification and partial characterization of regulatory peptides in the liver fluke, *Fasciola hepatica*, from different mammalian hosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 201-207.
- 110.- McKay, D.M., Shaw, C., Halton, D.W., Johnston, C.F., Fairweather, I. & Buchanan, K.D. (1990). Mammalian regulatory peptide immunoreactivity in the trematode parasite *Haplometra cylindrocaea* and the lung of its frog host, *Rana temporaria*. Comparative chromatographic characterisation using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C: 345-351.
- 111.- McKay, D.M., Fairweather, I., Johnston, C.F., Shaw, C. & Halton, D.W. (1991). Immunocytochemical and radioimmunometrical demonstration of serotonin- and neuropeptide- immunoreactivities in the adult rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Parasitology* 103: 275-289.
- 112.- Reuter, M., Lehtonen, M. & Wikgren, M. (1988). Immunocytochemical evidence of neuroactive substances in flatworms of different taxa- a comparison. *Acta Zool. (Stockh.)* 69: 29-37.
- 113.- Wikgren, M., Reuter, M. & Gustafsson, M. (1986). Neuropeptides in free-living and parasitic flatworms (Platyhelminthes). An immunocytochemical study. *Hydrobiologia* 132: 93-99.
- 114.- Schallig, H.D.F.H., Bergamin-Sassen, M.J.M., Hordijk, P.L. & De Jong-Brink, M. (1991). *Trichobilharzia ocellata*: Influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and cercarial induction of the

release of schistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotropic hormones. *Parasitology* 102: 85-91.

115.- Gustafsson, M.K.S., Lehtonen, M.A.I. & Sundler, F. (1986). Immunocytochemical evidence for the presence of "mammalian" neurohormonal peptides in neurones of the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*. *Cell Tissue Res.* 243: 41-49.

116.- Catto, B.A. & Ottesen, E.A. (1979). Serotonin uptake in schistosomules of *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 63C: 235-242.

117.- Bennett, J. & Bueding, E. (1973). Uptake of 5-hydroxytryptamine by *Schistosoma mansoni*. *Molec. Pharmac.* 9: 311-319.

118.- Richard, J., Klein, M.J. & Stoeckel, M.E. (1989). Neural and glandular localisation of substance P in *Echinostoma caproni* (Trematoda-Digenea). *Parasitol. Res.* 75: 641-648.

119.- Basch, P.F. & Gupta, B.C. (1988). Immunocytochemical localization of regulatory peptides in six species of trematode parasites. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C: 565-570.

120.- Bautz, A., Schilt, J. & Stephan, F. (1983). Evolution des cellules à somatostatine au cours de la régénération chez la planaire *Dendrocoelum lacteum*. *C.R. Soc. Biol.* 177: 668-671.

AGRADECIMIENTOS:

SON MUCHAS LAS PERSONAS A LAS QUE DEBO AGRADECER EL APOYO, ACADEMICO Y MORAL, QUE ME DIERON PARA LOGRAR ESTA META, Y AUNQUE NO ME ES POSIBLE NOMBRAR A TODAS, TRATARE DE MENCIONAR ALGUNAS:

Ph.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA Y Ph.D. MARIJKE DE JONG-BRINK, QUISIERA AGRADECERLES SINCERAMENTE TODO EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO, GRACIAS POR SU ORIENTACION, POR LA TRANSMISION DE CONOCIMIENTO, Y POR SUS VALIOSAS CRITICAS QUE ME HAN PERMITIDO LOGRAR ESTE OBJETIVO.

MARIO CESAR SALINAS CARMONA, GUADALUPE ARREDONDO DE ARREOLA, MARIO MORALES VALLARTA, CARLOS MEDINA, HARRY BOER, HENK SCHALLIG, MARJA RAMKEMA, LIES MEULEMAN, WIM SCHOUTEN, RENE AMEN, WIL VAN DER KNAAP, NORA FRIAS, JAN VAN MINNEN, CAROOL POPULIER, WIM VAN DEN BOVENKAMP, JOSE SAUL MARTINEZ, TINEKE BROERS-VENDRIG, GUADALUPE MARTINEZ, MARION BERGAMIN-SASSEN, VICTOR HUGO, JERRY SLOSTRA, ROSA PATRICIA PENILLA, J. JOOSSE, BEATRIZ GONZALEZ, LINDA MULLER, CARRY, LUPITA, CORA, CHIQUIS, WALTER, MECHE, RON, RICARDO, IRENE MEESTER, ETC. ETC. ETC. ETC.

QUISIERA ADEMÁS AGRADECER A EL GOBIERNO DE MEXICO (CONACYT) Y AL GOBIERNO DE HOLANDA (NUFFIC) POR LAS BECAS OTORGADAS PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

