

8  
lej



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Biología**

**"CICLO DE VIDA EXPERIMENTAL Y RITMO CIRCADICO DE  
EMERGENCIA DE LA CERCARIA DE *Plagiorchis maculosus*  
RUDOLPHI, 1802 (TREMATODA: PLAGIORCHIIDAE)."**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A**

**Roberto Javier Almeyda Artigas**

**Febrero de 1988**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.2.2.5.2. ULTRADIANOS .....	13.
1.2.2.5.3. VALOR ADAPTATIVO .....	13.
1.3. CONTRIBUCIONES DE LOS ESTUDIOS SOBRE CICLOS DE VIDA AL DESARROLLO DE LA PARASITOLOGIA .....	15.
1.4. CLASIFICACIONES DEL GENERO <u>Plagiorchis</u> LUHE, 1899 .....	19.
1.5. RELACION HISTORICA DE <u>Plagiorchis</u> <u>maculosus</u> (RUDOLPHI, 1802) BRAUN, 1902 .....	22.
1.6. SINONIMIA DE <u>P. maculosus</u> .....	24.
2. ANTECEDENTES.	
2.1. EN EL MUNDO:	
2.1.1. RITMOS DE EMERGENCIA CIRCADIANS DE CERCARIAS DE <u>Plagiorchis</u> spp. ....	27.
2.1.2. CICLOS DE VIDA CONOCIDOS DE ESPECIES DEL GENERO <u>Plagiorchis</u> .....	28.
2.1.3. REGISTROS DE <u>P. maculosus</u> .....	29.
2.2. EN MEXICO:	
2.2.1. PATRONES DE EMERGENCIA DE CERCARIAS .....	31.
2.2.2. ESTUDIOS SOBRE CICLOS DE VIDA .....	31.
2.2.3. ESPECIES DE <u>Plagiorchis</u> REGISTRADAS .....	33.
3. OBJETIVOS. ....	37.
4. DESCRIPCION DEL AREA DE COLECTA. ....	38.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. RECOLECCION Y TRANSPORTE DE LOS HOSPEDEROS .....	44.
5.1.1. PRIMER HOSPEDERO INTERMEDIARIO .....	44.
5.1.2. SEGUNDOS HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS .....	45.
5.1.2.1. NATURALES .....	45.
5.1.2.2. EXPERIMENTALES .....	45.
5.1.3. HOSPEDEROS DEFINITIVOS .....	46.
5.1.3.1. NATURALES .....	46.
5.1.3.2. EXPERIMENTALES .....	47.
5.2. MANTENIMIENTO .....	47.
5.2.1. MOLUSCOS .....	47.
5.2.2. ARTRÓPODOS .....	48.
5.2.3. AVES Y MAMÍFEROS .....	49.
5.3. SELECCION DE LOS CARACOLÉS INFECTADOS .....	49.
5.4. DETERMINACION DEL PATRON DE EMERGENCIA DE LA CERCARIA .....	51.
5.5. DEMOSTRACION DE UN RITMO CIRCADIANO EN LA CERCARIA .....	53.
5.6. ESTUDIO DE LAS FASES QUE COMPONEN EL CICLO DE VIDA .....	57.
5.6.1. EL ESPOROCISTO .....	58.
5.6.2. LA CERCARIA .....	58.
5.6.3. LA METACERCARIA .....	63.
5.6.4. EL ADULTO .....	64.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. ESPECIES DE CARACOLES RECOLECTADAS.	
6.1.1. <u>Stagnicola</u> sp. (DEL COMPLEJO <u>elodes</u> ) .....	67.
6.1.1.1. HABITAT .....	67.
6.1.1.2. CERCARIAS LIBERADAS .....	68.
6.1.1.2.1. <u>Plagiorchis maculosus</u> .....	68.
6.1.1.2.2. <u>Plagiorchis</u> sp. ....	73.
6.2. RITMO CIRCADIANO DE EMERGENCIA DE LA CERCARIA DE <u>Plagiorchis maculosus</u> .	
6.2.1. PATRON DE EMERGENCIA .....	73.
6.2.2. HORA DE MAXIMA LIBERACION .....	74.
6.2.3. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ILUMINACION SOBRE EL RITMO DE EMERGENCIA .....	76.
6.2.3.1. EXPERIMENTO I: OBSCURIDAD CONSTANTE .....	76.
6.2.3.2. EXPERIMENTO II: LUZ CONSTANTE .....	82.
6.2.3.3. EXPERIMENTO III: INVERSION DEL FOTOPERIODO .....	87.
6.2.3.4. EXPERIMENTO IV: DISMINUCION DE LA DURACION DEL CICLO LUZ-OBSCURIDAD .....	93.
6.2.4. EXPERIMENTO V: EFECTO DE LA ALIMENTACION SOBRE LA LIBERACION DE LAS CERCARIAS .....	98.
6.3. FASES QUE COMPONEN EL CICLO DE VIDA.	
6.3.1. EL ESPOROCISTO .....	101.
6.3.1.1. DIAGNOSIS .....	101.
6.3.1.2. DISCUSION .....	104.
6.3.2. LA CERCARIA .....	108.

6.3.2.1. DIAGNOSIS .....	108.
6.3.2.2. DISCUSION .....	115.
6.3.2.3. BIONOMIA.	
6.3.2.3.1. GENERALIDADES .....	121.
6.3.2.3.2. LONGEVIDAD, FASES DE ACTIVIDAD Y TROPISMOS .....	123.
6.3.2.3.3. ATRACCION POR EL 2do. HOSPEDERO INTERMEDIARIO .....	124.
6.3.2.3.4. SITIOS APROPIADOS DE ENTRADA .....	125.
6.3.2.3.5. PENETRACION .....	126.
6.3.2.3.6. REACCION DE LA LARVA A LA PENETRACION .....	128.
6.3.2.3.7. FORMACION DEL QUISTE .....	129.
6.3.3. LA METACERCARIA .....	131.
6.3.3.1. DIAGNOSIS .....	132.
6.3.3.2. DISCUSION .....	135.
6.3.4. EL ADULTO .....	138.
6.3.4.1. DIAGNOSIS .....	142.
6.3.4.2. DISCUSION .....	147.
7. CONCLUSIONES .....	152.
8. LITERATURA CITADA .....	153.
9. ANEXO .....	169.

## R E S U M E N

De 1,619 Stagnicola sp. (Pulmonata: Mollusca) recolectados en 1982 a lo largo de cinco visitas a la laguna de Quila (Estado de México), el 1.79 % (29) resultó estar infectado naturalmente con una especie de xiphidiocercaria perteneciente a la División "Conniae" del subgrupo "Polyadena" (Cort, 1915), la cual emergió rítmicamente (cada 24 horas) sólo durante las escotofases del nictámero en condiciones con fotoperiodo normal (L0 12:12); así, fue considerada como una cercaria "de noche" con alternancia "absoluta". El estudio experimental de su ciclo de vida permitió la confirmación de su identidad específica, resultando ser una de las fases larvarias de Plagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902 (Trematoda: Plagiorchiidae).

Distintos experimentos demostraron que dicho patrón de emergencia era del tipo "circadiano", siendo la luz el "sincronizador" del ritmo. La inversión del fotoperiodo trajo como consecuencia una inversión inmediata en la periodicidad de la emergencia. El ritmo de liberación se mantuvo en condiciones constantes de luz y de oscuridad, siendo el periodo diferente al mostrado en condiciones con fotoperiodo normal (presentándose las acrofases a tiempos menores de 24 horas). La oscuridad fue capaz de inducir la emergencia en cualquier momento. Se propone la probable existencia de un ritmo innato de producción aunado a un proceso de maduración de las cercarias, quizás enmascarados ambos fenómenos por el ritmo de emisión. Se pone en evidencia el indiscutible valor adaptativo del ritmo circadiano de emergencia, estrechamente ligado a la realización exitosa del ciclo de vida de esta especie de plagiórquido.

En el ciclo de vida natural de Plagiorchis maculosus de la laguna de Quila intervienen, además de Stagnicola sp. como primer hospedero intermediario, larvas de Hesperophylax magnus y Clistoronia graniculata (Trichoptera: Arthropoda), ninfas de Sympetrum illotum y Anax amazili (Odonata: Arthropoda) y el propio caracol como segundos hospederos intermediarios y como hospedero definitivo, muy probablemente, Turdus migratorius (Turdidae: Aves).

De esta manera se contribuye al conocimiento de los ritmos circadianos que se observan en el sistema caracol-parásito y de la parasitofauna helmintológica de nuestro país.

# I . I N T R O D U C C I O N .

## 1.1. RITMOS BIOLÓGICOS.

La capacidad que tienen los seres vivos para presentar cambios periódicos en sus actividades es un hecho conocido desde la antigüedad, pero sólo hasta los últimos años se ha sistematizado su estudio, conociéndose actualmente a todos estos cambios como ritmos biológicos y diferenciándolos entre sí por la duración de su periodo. Como consecuencia de una evolución gradual, los seres vivientes han logrado perfeccionar sus diversos mecanismos encargados de mantener un estado estable interno, no obstante los grandes cambios que se presentan en el medio externo y con el cual se mantienen siempre en interacción. Uno de estos mecanismos comprende a todas aquellas actividades fisiológicas que presentan oscilaciones de diversas periodicidades, pero asociadas con cambios en el medio externo, siendo muy notable que la mayoría de estas oscilaciones internas se anticipe a las fluctuaciones que regularmente son observadas en el medio externo. Por lo anterior, se ha propuesto la existencia, dentro del organismo, de mecanismos capaces de medir el tiempo; mecanismos a los que en general se les ha denominado como "relojes biológicos" y que en lo particular se les ha designado de acuerdo con la periodicidad del ritmo al cual están asociados; así, son conocidos como ritmos de



mareas, diarios, lunares y anuales por su unión temporal con los ciclos ambientales de los que toman sus nombres (Brady, 1979; Aschoff, 1960).

Dentro de los mecanismos que se consideran como "relojes biológicos" se excluye a los procesos rítmicos de alta frecuencia debido a que, estrictamente hablando, su frecuencia no está regulada por el paso del tiempo sino por otros factores externos o por las condiciones fisiológicas del organismo. También se excluyen a los tipos de actividad dependientes del fotoperiodo (Brady, 1979).

De la relación existente entre los ritmos de los organismos y las oscilaciones del medio externo, queda implícito el valor adaptativo de estos ritmos: permitir que el organismo ajuste sus procesos vitales al arreglo cronológico del mundo externo. De manera que las especies se dividen el ambiente no sólo en el aspecto espacial, sino también en el aspecto temporal, de tal suerte que cada una de ellas tiene como característica un tiempo durante el cual es activa (Phillips, 1976).

## 1.2. RITMOS CIRCADIANOS.

La investigación sobre los "relojes biológicos" se ha centrado en gran medida en los que tienen un periodo cercano a las 24 horas. Tales ritmos han sido denominados como circadianos, debido a que su periodo no es de 24 horas exactas, sino de 24 horas con algunos minutos o algunas horas de más o de menos; esto se hace evidente cuando el organismo es colocado en condiciones ambientales constantes. La idea que actualmente se acepta sobre los ritmos circadianos ha surgido de las características funcionales de los mismos, observadas a través de una abundante información experimental (Fuentes-Pardo, 1977).

### 1.2.1. CARACTERISTICAS.

El primer aspecto a considerar es el carácter endógeno del ritmo, el cual se pone de manifiesto cuando un sistema sigue oscilando a pesar de haber sido colocado en condiciones constantes de, por lo menos, luz y temperatura. En esas condiciones los ritmos suelen presentar un periodo diferente al que muestran cuando actúan sobre ellos los factores externos mencionados y se dice que manifiestan su "frecuencia en oscilación libre" la que sólo se puede hacer evidente en registros ininterrumpidos durante varios días. Si el ritmo se detuvo o presentó un periodo totalmente alejado o exactamente igual a 24 horas, se puede descartar el carácter circadiano del mismo (Aschoff, 1960).

La segunda característica de los ritmos circadianos se relaciona con el efecto que sobre la frecuencia de oscilación ejerce la cantidad de luz que se aplique al sistema; así como sobre la relación entre los tiempos de actividad y de reposo (relación  $\alpha/R$ ) y sobre el nivel de actividad de la estructura u organismo. Este efecto, conocido también como "regla circadiana de Aschoff" (Pittendrigh, 1960), puede resumirse de la siguiente manera: "... puede afirmarse que la frecuencia de oscilación, la relación  $\alpha/R$  y el nivel de excitación de una estructura viviente, se encuentran correlacionados de tal suerte que el cambio en uno de ellos altera en cierta medida a los otros dos; los cambios, a su vez, dependen de la cantidad de luz que recibe el sistema de tal manera que los organismos diurnos aumentan la frecuencia, la relación  $\alpha/R$  y el nivel de excitación al recibir más luz, en tanto que los nocturnos reducen estos tres parámetros ante la misma situación ambiental ..." (Fuentes-Pardo, 1977).

Un tercer aspecto característico de los ritmos se refiere a su poca sensibilidad ante los cambios térmicos, aún cuando no existe acuerdo entre los autores respecto a los mecanismos implicados en esa baja sensibilidad ante un factor tan importante en un elevado número de procesos biológicos. De hecho, lo que se ha encontrado es que el periodo, que es el parámetro básico a considerar en un proceso circadiano, no parece verse afectado cuando los registros se hacen a distintas temperaturas. Sin embargo, esto no significa que los ritmos sean independientes de la temperatura sino más bien que presentan "mecanismos de compensación de los cambios térmicos" los cuales hasta ahora no han podido ser aclarados. También hay que hacer notar que si los cambios de temperatura se aplican en forma de "impulsos" o en forma periódica pueden atrasar o adelantar la fase e inclusive modificar la frecuencia en oscilación libre de un ritmo, es decir, son capaces de actuar como "sincronizadores" (Zeitgeber) (Pittendrigh, 1954; 1960).

Precisamente el ser "sincronizables" es otra característica importante de los ritmos circadianos. Esta propiedad se define como la capacidad para atrasar o adelantar su fase como consecuencia de la aplicación de un cambio externo y puede llevar a un ritmo a modificar su frecuencia básica cuando se le aplica algún factor externo periódico. De todos los sincronizadores potenciales, la luz y la temperatura han sido los más ampliamente estudiados y hay que hacer notar que el grado de sincronización que producen es muy variable (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960; Enright, 1965).

Otra característica de los ritmos circadianos es la referente a la estabilidad que presentan ante una gran variedad de sustancias químicas, como narcóticos, estimulantes del crecimiento,

antimetabolitos y en general ante cualquier clase de sustancia que actúe sobre ellos con excepción de algunas pocas, entre las que se encuentran el óxido de deuterio y el alcohol etílico, cuyos efectos se traducen en disminución de frecuencia de oscilación en relación directa con la dosis aplicada (Bruce y Pittendrigh, 1960; Enright, 1971; Daan y Pittendrigh, 1976).

Los ritmos circadianos son innatos y pasan de generación en generación, lo que ha sido probado de diversas maneras y en distintas estructuras (Stadler, 1959; Barnett, 1966, 1969; Bruce, 1972) siguiendo los cambios periódicos en algunos casos durante 15 generaciones. El nivel de organización de los ritmos circadianos parece ser celular, si bien es cierto que resulta más fácil detectarlos en el nivel organizativo.

Las oscilaciones circadianas son autosostenidas ya que persisten durante un cierto tiempo en ausencia de señales externas; sin embargo, existe la tendencia al amortiguamiento de la oscilación después de un tiempo en el que se han mantenido constantes las condiciones ambientales (Aschoff, 1960).

Por último, cabe mencionar que los ritmos circadianos son considerados como ubicuos ya que en todos aquellos organismos en los que se les ha buscado, se han encontrado (Bunning, 1960; Brady, 1979).

### 1.2.2. RITMOS CIRCADIANOS EN ORGANISMOS PARASITOS.

Por lo que respecta a los organismos parásitos, se ha descrito que varios aspectos de su biología como son el metabolismo, la reproducción, el comportamiento y la regulación de su población, presentan claras oscilaciones rítmicas, resultando algunas de ellas de

carácter circadiano (Biagi y González, 1967). De las oscilaciones rítmicas estudiadas destacan las de tipo circadiano, que se han realizado principalmente con microfilarias. Se ha podido observar que el parásito presenta un ritmo propio que puede ser modificado rápidamente si se provocan cambios en los ritmos del organismo hospedero. Sin embargo, es probable que así como las condiciones en el organismo hospedero modifican a los ritmos del parásito, también el siguiente vector influya, aunque en menor grado, en las características del ritmo del parásito, existiendo coincidencia temporal y espacial que permita la infección. De lo anterior, se puede concluir la importancia adaptativa que representa para el parásito la presencia y el mantenimiento de un ritmo de actividad sincronizado con los de sus hospederos, para lograr completar su ciclo de vida (Harker, 1958; Cloudsey-Thompson, 1960; Mills, 1966; Combes y Théron, 1977).

El estado del conocimiento de los ritmos circadianos en los parásitos ha sido analizado ampliamente por Hawking (1975), a partir tanto de sus trabajos experimentales como los de diversos autores que se han dedicado al estudio de dichos ritmos. A continuación se presenta un resumen de los diferentes patrones en los que este autor dividió a los ritmos circadianos observados en los organismos parásitos.

#### **1.2.2.1. RITMOS QUE DEPENDEN DE LA DIVISION CELULAR SINCRONICA DE LOS PARASITOS.**

En un principio se observó en la especie humana que los ciclos de temperatura que producían las etapas de fiebre durante el ataque de malaria (paludismo) presentaban un periodo de 48 horas (fiebres tercianas). Este periodo es el que Plasmodium vivax requiere para su

desarrollo y que lo lleva a tener una división celular en forma sincrónica cada dos días, aproximadamente hacia el mediodía.

Con los estudios posteriores que se hicieron con otros parásitos productores de malaria en otros mamíferos y aves se puso en evidencia que entre las diferentes especies responsables de la enfermedad, algunas presentan un ciclo de división celular de 24 horas (Plasmodium knowlesi, P. cathemerium y P. vinckei); otras, ciclos de 48 horas (P. malariae, P. inui y P. brasilianum). De todas estas especies algunas tienen su esquizogonia al mediodía, otras durante la madrugada y en otros casos durante la medianoche; siendo notable el que todas presenten un mismo patrón, ciclos con un múltiplo simple de 24 horas y su etapa de esquizogonia tendiendo a presentarse durante una hora particular del día o de la noche.

#### 1.2.2.2. DESCARGA SINCRONICA DE LAS FORMAS INFECTIVAS DESDE EL HOSPEDERO.

La descarga de las formas infectivas desde el hospedero se lleva a cabo de acuerdo con un patrón circadiano. Dentro de los protozoos, los coccidios representan uno de los ejemplos más claros. El ritmo de descarga de los oocistos infectivos fue descrito primeramente por Boughton (1933) para el género Isospora, parásito del gorrión. Este protozoo se desarrolla en las células epiteliales del intestino durante varias generaciones, después se producen las formas sexuales que darán origen a los oocistos, los que pasan a las heces y de esta manera son desalojados. En el caso de los gorriones, la descarga se realiza exclusivamente entre las 19 y las 03 horas lo que, de acuerdo con los hábitos de los gorriones, facilita la ingesta de las formas infectivas para la continuación del ciclo biológico del

parásito. Otros coccidios de aves muestran ritmos similares de descarga pero a una hora diferente. Presumiblemente las diferentes horas de descarga de distintos organismos están relacionadas con los hábitos de descanso y de alimentación de las aves; sin embargo, nada se sabe acerca de los mecanismos que producen este ritmo.

Dentro de los helmintos, también se ha observado que la descarga de los huevos presenta ritmos circadianos; un ejemplo muy conocido es el del oxiuro humano Enterobius vermicularis que descarga sus huevos durante la primera parte de la noche. En el caso de este ritmo se ha observado que presenta una relación inversa con respecto a la de la temperatura rectal; cuando la temperatura disminuye más huevos son depositados y cuando se incrementa la temperatura la oviposición es inhibida. En el pasado se consideraba que este comportamiento del parásito estaba determinado por la relajación del hospedero, pero en la actualidad se ha demostrado claramente que es un ritmo circadiano.

Un ritmo similar se ha observado en el oxiuro de la rata, en donde la máxima oviposición se realiza durante un periodo de reposo de la rata (el día) y es mucho menor durante su periodo de actividad (la noche). Al igual que en el caso de los coccidios se desconoce el mecanismo que produce y determina al ciclo del parásito.

Un ritmo circadiano de descarga desde el hospedero también ha sido reportado para el helminto digeneo Schistosoma haematobium. El tremátodo adulto vive en las venas que rodean a la vejiga urinaria y a los uréteres y los huevos son depositados en las vénulas próximas a estos órganos. Los huevos atraviesan los tejidos y emergen en la luz de la vejiga desde donde son descargados en la orina. El número de huevos liberados no está en proporción con el volumen de orina sino que muestra un pico máximo distintivo alrededor de las 10 horas,

momento en el que la transmisión que se da en el caracol que actúa como primer hospedero intermediario se ve claramente favorecida.

### 1.2.2.3. RITMOS EN LOS QUE LOS PARASITOS MIGRAN HACIA EL INTERIOR O EXTERIOR DEL CUERPO DEL HOSPEDERO.

De los ritmos en los que se observa la migración de un mismo individuo hacia diferentes regiones del organismo del hospedero el ejemplo más típico es el que muestran muchas especies de microfilarias, las que son numerosas en la sangre periférica durante una parte del ciclo de 24 horas (generalmente durante la noche) y están ausentes o en un número muy reducido en la otra parte del ciclo. Este hecho fue descubierto primeramente por Manson en 1878 para Wuchereria bancrofti y después estudiado en muchas otras especies. De hecho, fue a través del estudio de esta periodicidad que Manson descubrió que la transmisión se realizaba por medio de un mosquito, que picaba al hospedero definitivo precisamente en el momento en el que las microfilarias incrementaban su número en la sangre periférica.

Se han descrito especies de filarias en las que sus microfilarias son numerosas en la sangre periférica durante la noche y escasas durante el día (W. bancrofti y Brugia malayi); especies que son numerosas durante el día y están ausentes o son escasas durante la noche (Loa loa); especies que son muy numerosas en el atardecer y poco numerosas en el amanecer (Dirofilaria immitis). En todos los ejemplos mencionados se debe hacer notar que el incremento de individuos en la sangre periférica corresponde con el momento de mayor actividad del mosquito que, en cada caso, actúa como vector.

Este ritmo de migración también se ha observado en ciertas especies de tripanosomas de ranas y ha sido estudiado principalmente



en Rana clamitans. Aunque no se ha podido establecer con claridad si el tripanosoma responde directamente a las modificaciones que se realizan experimentalmente sobre el ciclo de luz y oscuridad, o es la rana la que responde a dichos cambios, si ha quedado claro que la luz puede regular al ritmo. Por otro lado, no se han podido observar cambios relacionados con la serotonina o con la melatonina, aunque si se ha podido observar un incremento en la parasitemia cuando se inyecta adrenalina en un momento particular del ciclo.

Los parásitos de la malaria (mencionados en el inciso 1.2.2.1.) además del ritmo circadiano de esquizogonia, generalmente tienden a presentar un ritmo de distribución en las diferentes regiones del aparato circulatorio del hospedero, que semeja de alguna manera, al observado en microfilarias y tripanosomas.

#### 1.2.2.4. MIGRACION DE HELMINTOS.

Desde hace mucho tiempo es conocido el hecho de que las lombrices intestinales (Ascaris lumbricoides) pueden ser localizadas en diferentes niveles del intestino durante los diferentes estadios de su desarrollo. Sin embargo, recientemente se ha observado que Hymenolepis diminuta muestra una variación diaria en su localización, migrando hacia la parte superior del intestino durante parte de las 24 horas y yendo hacia la parte inferior durante la otra parte del ciclo. Aparentemente la migración ascendente se realiza durante la noche (fase activa de la rata hospedera) y el descenso se realiza durante el día (fase de reposo de la rata), y esto se ha asociado con la ingesta de alimento por parte del hospedero aunque la evidencia no es lo suficientemente clara.

### 1.2.2.5. RITMOS DE EMERGENCIA DE CERCARIAS.

Los helmintólogos han notado, a través de los años, que en condiciones naturales la emergencia de las cercarias de tremátodos se efectúa, en la mayoría de los casos, siguiendo un ritmo determinado. Las investigaciones experimentales han mostrado que la luz y la temperatura desempeñan un papel importante en la sincronización de dichos ritmos (Combes y Théron, 1977).

Como todo fenómeno cronobiológico, la emisión de las cercarias se realiza siguiendo tres tipos de ritmos que Combes y Théron (1977) definieron con base en el trabajo de Halberg y Reinberg de 1967 como: circadianos, ultradianos e infradianos; las modalidades son características de cada especie considerada. La mayoría de los ritmos de emergencia conocidos son del tipo circadiano; a continuación se mencionarán algunos ejemplos.

#### 1.2.2.5.1. CIRCADIANOS.

De acuerdo con Combes y Théron (1977), pueden distinguirse tres tipos de cercarias dependiendo de la posición de la acrofase de emergencia dentro del nictámero (cada ciclo de 24 horas): las cercarias "de día" (acrofase situada en la fotofase); las cercarias "de noche" (acrofase en la escotofase) y las cercarias "intermedias" (acrofase en el límite de la escotofase y de la fotofase). Por otro lado, independientemente de la posición de la acrofase dentro del nictámero, estos autores observaron que la forma de la curva de emisión era distinta en las diferentes especies de tremátodos, por lo que propusieron la creación de dos grupos de cercarias: las cercarias con alternancia "absoluta" (emisión situada totalmente en la fotofase

o en la escotofase) y las cercarias con alternancia "relativa" (emisión en su mayor parte en la fotofase o en la escotofase, aunque existe la liberación de por lo menos algunas cercarias en el periodo opuesto al de la emisión dominante). A este último tipo pertenecen la mayoría de las cercarias estudiadas. Como ejemplo de una cercaria con alternancia "absoluta" podemos citar a Ribeiroia marini (Théron, 1975; Théron y Moné, 1986).

En el grupo de las cercarias "de día" se incluyen: Cercaria elephantis, de Planorbella (Pierosoma) trivolvis (Cort, 1922); Cercaria limbifera, de Lymnaea palustris y Cercaria Z, de L. peregra (Rees, 1931); Diplostomum flexicaudum, de Stagnicola emarginata angulata (Giovannola, 1936b.); Cercaria purpurae, de Nucella lapillus (Rees, 1948) y Schistosoma mansoni, de Biomphalaria glabrata (Giovannola, 1936a.; Kuntz, 1947; Schreiber y Schubert, 1949; Luttermoser, 1955; Maldonado, 1959; Valle, et al., 1971; Asch, 1972; Glaudel y Etges, 1973; Théron, 1980; Théron y Combes, 1983; Théron y Moné, 1986).

En el grupo de las cercarias "de noche" podemos citar a: Cercaria cambrensis I, de Lymnaea truncatula (Rees, 1931); Schistosomatium douthitti, de Lymnaea stagnalis y L. palustris (Olivier, 1951); Plagiorchis vespertilionis parorchis, de Lymnaea stagnalis (Macy, 1960); Plagiorchis micracanthos, de Stagnicola exilis y S. reflexa (Wagenbach y Alldredge, 1974); Ribeiroia marini, de Biomphalaria glabrata (Théron, 1975; Théron y Moné, 1986); Plagiorchis neomidis, de Radix limosa (Théron, 1976); Plagiorchis noblei, de Lymnaea stagnalis y Stagnicola reflexa (Blankespoor, 1977) y a Ribeiroia ondatrae, de Biomphalaria temascalensis (Almeyda-Artigas y León-Régagnon, 1987).

Hasta 1977, la única cercaria "intermedia" conocida con certidumbre era la cercaria de un representante de la Familia Echinostomatidae (probablemente del género Stephanoprora), de Biomphalaria glabrata (Combes y Théron, 1977). Sin embargo, Ostrowski de Núñez (1982) y Pineda-López, et al. (1985) registraron a la cercaria de Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum, de Biomphalaria prona y B. obstructa, respectivamente, como perteneciente a este grupo. Ambas forman parte, además, del tipo de cercarias con alternancia "relativa".

#### 1.2.2.5.2. ULTRADIANOS.

En relación a los ritmos ultradianos (dos o más acrofases por cada ciclo de 24 horas), pocas son las cercarias que los presentan; entre ellas podemos mencionar a Clinostomum sp., de Biomphalaria glabrata (Combes y Théron, 1977) y a Drepanocephalus olivaceus, de Biomphalaria temascalensis (Almeyda-Artigas y León-Régagnon, 1987), ambas con dos acrofases (una en la fotofase y la otra en la escotofase).

#### 1.2.2.5.3. VALOR ADAPTATIVO.

A pesar de que a la fecha es escaso el conocimiento sobre los ciclos de vida y los ritmos de emergencia de las distintas especies de cercarias, los ritmos circadianos evidencian una relación muy interesante que existe entre la posición de la acrofase y el comportamiento del hospedero al que están destinados las diferentes cercarias. Algunos de los casos más claros son los siguientes (Combes y Théron, 1977):

\* Schistosoma mansonii presenta una acrofase en la fotofase que coincide exactamente con el momento en el que la actividad del hombre en el agua es la máxima; así, al bañarse, lavar la ropa y sacar agua las densidades de cercarias son las más altas.

\* Schistosomatium douthitti, a pesar de su posición sistemática tan cercana a la especie precedente, presenta una acrofase en la escotofase que concuerda perfectamente con el periodo de actividad de los hospederos a los que penetra (roedores de los géneros Microtus y Ondatra, entre otros).

\* Ribeiroia marini, la cual emerge exclusivamente en las escotofases del nictámero, penetra a peces de la familia Cichlidae (Oreochromis y Cichlasoma, entre otros géneros), los cuales permanecen inmóviles en el fondo a partir del crepúsculo, probablemente facilitando esta inactividad su infección por parte de las cercarias.

\* En cuanto a las cercarias de Stephanoprora sp., que emergen pocas horas antes del inicio de la fotofase, su caso nos parece notable ya que se trata de cercarias que deben ser consumidas por peces. La posición del pico de emisión permite la dispersión de las cercarias en el medio acuático y su postrer consumo por parte de los peces desde que éstos reanudan, en la mañana, su actividad trófica y durante el siguiente día.

\* Flagiorchis vespertilionis parorchis, F. micracanthos, F. neomidis y F. noblei son cercarias del tipo de "noche". Las probabilidades de encontrarse con las larvas de insectos, cuya actividad es principalmente nocturna y a las que deben penetrar una vez que las han alcanzado, aumentan significativamente.

Los ejemplos precedentes muestran que el ritmo de emergencia de las cercarias posee un valor adaptativo indiscutible, estrechamente ligado a la realización exitosa de sus ciclos de vida. Puede pensarse que esta íntima coadaptación es el resultado de una selección de los genes de los tremátodos, por el comportamiento de sus hospederos, que condicionan las horas de emergencia más favorables. Es muy probable que los tipos de ritmos que en la actualidad son explicados con menor claridad (por ejemplo los ultradianos) puedan ser relacionados en un futuro con los aspectos, por el momento mal conocidos, del comportamiento de sus hospederos.

### 1.3. CONTRIBUCIONES DE LOS ESTUDIOS SOBRE CICLOS DE VIDA AL DESARROLLO DE LA PARASITOLOGIA.

Una de las relaciones ecológicas más extensamente propagadas es la del parasitismo. Tan antigua y tan universal como otras asociaciones bióticas, la forma parásita de vida ha penetrado casi en todos los grupos de animales, en los que los individuos son parásitos o sirven como hospederos de las formas parásitas. A su vez, éstas pueden estar también parasitadas; por ejemplo, las gregarinas, los tremátodos, los céstodos y los nemátodos, que albergan hemosporidios; los opalinidos, que contienen amibas; o los tremátodos, cuyo aparato excretor está infectado con flagelados. Si consideramos la extensión y la incidencia del parasitismo, observamos que existen más especies parásitas que de vida libre y más individuos parásitos que de vida libre. Más aún, es palpable que el parasitismo comprende una de las categorías más distintivas de la existencia animal y constituye un fenómeno biológico discreto que muestra rasgos definitivos y fundamentales únicos, en cada grupo de animales que ha adoptado este

hábito. Siempre se manifiestan las mismas tendencias generales. aparecen atributos y relaciones similares y consecuencias similares inevitablemente resultan en la adopción del hábito parasitario. Ya que, debido a lo anterior, la parasitología ha sido considerada como una de las ciencias biológicas más importantes, a continuación se presentarán ciertas peculiaridades de la evolución de esta forma de vida y se discutirán las contribuciones que los estudios sobre ciclos de vida han ido incidiendo en el desarrollo de esta relevante disciplina.

Las especies parásitas probablemente derivaron de ancestros de vida libre a través de una adaptación gradual y progresiva. El hábito parasitario surgió, por lo menos en la mayoría de los casos, como el resultado de tentativas por lograr ya fuera protección o alimento. Los instintos de la autopreservación y de la reproducción fueron los básicamente responsables del desarrollo del parasitismo. Animales en el mismo habitat competían por el sustento, con el fin de subsistir. Los débiles eran presa fácil de los fuertes, pero algunos de los pequeños y físicamente débiles fueron capaces por diversas razones de imponerse a los fuertes y obtuvieron provecho de esta situación. Pudieron comenzar como comensales o parásitos temporales hasta que finalmente permanecieron permanentemente, recibiendo tanto protección como alimento de su hospedero. Finalmente, para asegurar condiciones de vida más seguras y ventajosas, los ectoparásitos invadieron el cuerpo de su hospedero. Algunos de los endoparásitos pudieron haber entrado accidentalmente pero, independientemente del origen, todos compartieron el mismo destino: la modificación de su forma con las consecuentes alteraciones metabólicas y de sus ciclos de vida (Stunkard, 1940).

El endoparasitismo está correlacionado con cambios marcados en los ciclos de vida, siendo éstos muy complejos y propios de los altamente especializados protozoarios y helmintos. En los tremátodos digéneos intervienen generalmente tres hospederos obligatorios, dos intermediarios y un definitivo; es en el primer intermediario (un molusco) en el que se desarrollan algunas formas larvarias (esporocistos y/o redias) de las miles de especies conocidas y se multiplican asexualmente en grandes cantidades para dar origen finalmente a la cercaria, forma larvaria generalmente de vida libre que se enquista en el segundo hospedero intermediario; este último es el que porta la fase infectiva (metacercaria) para el hospedero definitivo (vertebrados). Para que puedan perpetuarse las especies, es esencial que los descendientes de la fase adulta abandonen el hospedero definitivo; así, los huevos, producto de una reproducción sexual, son liberados junto con las heces y constituyen la fase de dispersión, siendo infectivas para el primer hospedero intermediario. De esta manera se completa el ciclo de vida.

El estudio de los ciclos de vida de los tremátodos ha sido consignada como una lucha larga y tediosa. En 1818, Bojanus observó la emergencia de cercarias a partir de redias; en 1831, Mehlis registró la eclosión de larvas ciliadas (miracidio) de huevos de Monostomum flavum, mientras que en 1835 von Siebold dio cuenta de la presencia de dichas larvas ciliadas en el interior de redias. A pesar de estas importantes y sobresalientes observaciones, no fue sino hasta 1882 que pudo completarse el primer ciclo de vida, cuando Leuckart y Thomas (independientemente) dilucidaron el de Fasciola hepatica. Los siguientes 40 años fueron testigos del descubrimiento de escasos 20 ciclos adicionales; sin embargo, los últimos 10 lustros se han



caracterizado por constituir un periodo muy prolífico, en el que han podido descubrirse los ciclos de por lo menos un representante de la inmensa mayoría de las familias de digeneos. Yamaguti (1975), en su recopilación de estudios sobre ciclos de vida de tremátodos parásitos de vertebrados, da cuenta de este auge.

La evidencia proporcionada por los ciclos de vida de especies de tremátodos cercanamente relacionadas es un indicio poderoso de que los miembros de grupos sistemáticos naturales tienen un curso de desarrollo similar; inclusive, a nivel de familias, esta semejanza es muy notable. Ya que ha sido descubierto el ciclo de por lo menos un representante de cada uno de los taxa superiores, el descubrimiento de ciclos adicionales se vuelve una tarea más sencilla, si se emplea el método científico: una observación minuciosa e inteligente, un análisis profundo y una deducción lógica. Es importante señalar que mientras no se exploren todas y cada una de las posibles variaciones y modificaciones de un ciclo de vida, las conclusiones obtenidas deberán ser estimadas como tentativas.

En el desarrollo de la parasitología, los estudios sobre ciclos de vida han aportado tres notables contribuciones. Han auxiliado en la construcción de una base más vasta y sólida para la determinación taxonómica y filogenética; han aportado la oportunidad de realizar estudios en el campo de la fisiología y en la determinación de los factores involucrados con la susceptibilidad y resistencia a las infecciones parasitarias y, finalmente, han sido y seguirán siendo el prerrequisito esencial en la consecución de medidas de prevención y contención inteligentes y efectivas.

Si la taxonomía está pensada para tener algún sentido, debe expresar relaciones genéticas y filogenéticas. En el establecimiento

de dicho sistema, el principio de homogeneidad de grupos debe recibir una atención primaria. La bien conocida tendencia de los animales y de ancestros diversos de asumir una semejanza superficial y converger hacia un tipo morfológico común, después de habitar por un periodo largo el mismo ambiente, prevalece especialmente entre las formas parásitas.

Así, entre aquellas especies altamente modificadas por la vida parásita, los criterios morfológicos aplicados a los organismos de vida libre pierden mucho de su significado. Bajo tales circunstancias, el conocimiento de los ciclos de vida y de las fases larvarias adquiere una importancia relevante. Los sistemas basados sólo en los caracteres de la fase adulta y otros basados en las estructuras larvarias han conducido a muchos errores bien conocidos; así, la información proporcionada por los estudios de ciclos de vida han sido de gran valor para alcanzar determinaciones sistemáticas correctas.

Las dificultades de la identificación específica tanto a nivel de formas adultas como larvarias ha resultado en una gran confusión. Hasta que no se determine la extensión de la variación natural de una especie y sean sus límites definidos, la determinación específica seguirá siendo imposible. Es un hecho irrefutable el que, cuando en ciertos géneros en los que han sido descritas muchas especies similares, los estudios sobre sus ciclos de vida han llevado a la reducción de muchos de estos nombres específicos a la sinonimia.

#### 1.4. CLASIFICACIONES DEL GENERO Plagiorchis LUHE, 1899.

La clasificación de los tremátodos comenzó hace más de dos siglos, con la publicación que en 1758 hizo Linneo del "Systema

Naturae". Su sistema reconoció un solo género, Fasciola, con dos especies, de las cuales en la actualidad sólo F. hepatica es considerada como un tremátodo. A lo largo del primer siglo de la sistemática de los tremátodos fueron erigidos muy pocos géneros y sólo un pequeño grupo de especies caracterizadas. En esos tiempos, los nombres genéricos se basaron esencialmente en los órganos de adhesión.

En 1927, Massino (Dollfus, 1960) presentó una clave para la identificación de 25 especies válidas del género; ésta se basó en la posición (oblicua o uno detrás del otro) de los testículos; en los tamaños relativos del ovario y de los testículos; la extensión de la bolsa del cirro en dirección posterior y muy particularmente en la extensión de las glándulas vitelógenas. Debido a que para un gran número de especies estas características varían grandemente en muchos de sus individuos, Dollfus estimó que esta clave no permitía delimitar con precisión a los distintos grupos de especies.

En 1931, Schulz y Skvorzov (Dollfus, 1960) decidieron no adoptar la clasificación de Massino y consideraron importante el que se tomara en cuenta la disposición de las glándulas vitelógenas; así, propusieron la erección de dos subgéneros: Plagiorchis (en el que los folículos vitelinos de la región anterior al acetábulo están confinadas a los márgenes laterales del cuerpo, existiendo en todo caso sólo unos cuantos en la línea media del cuerpo) y Multiglandularis (en el que los folículos vitelinos de la región anterior al acetábulo confluyen en la zona media del cuerpo, formando una banda continua o comisura definida). Estos autores reconocieron que existían formas intermedias entre las dos disposiciones de las vitelógenas, pero estimaron que, para un gran número de individuos coespecíficos, éstas eran la excepción. De las 50 especies por ellos

reconocidas, 24 fueron incluidas en el subgénero Plagiorchis, 19 en el subgénero Multi glandularis y siete no fueron clasificadas. Según algunos autores, la comisura vitelina preacetabular es un rasgo bastante inconsistente dentro de una misma especie, por lo que han decidido ignorar las subdivisiones de Schulz y Skvorzov.

En su clave para la identificación de especies, Olsen (1937) asumió la existencia de los dos subgéneros, incluyendo 23 especies y dos variedades en Plagiorchis y 20 especies en Multi glandularis; de éstas, el autor presentó las figuras de 28 solamente.

Después de 21 años, Skrjabin y Antipin en 1958 (Dollfus, 1960) registraron la existencia de casi el doble de especies del género Plagiorchis; describieron 40 especies y una variedad para el subgénero Plagiorchis y 37 especies y una variedad para el subgénero Multi glandularis.

Es de llamar la atención el hecho de que, cuatro años antes Fedorova (Dollfus, 1960) había reducido las 62 especies o subespecies supuestamente válidas del género a 36 (33 especies y tres subespecies), cayendo el resto en sinonimia.

Odening (1959) se basó en el resumen publicado por Fedorova en 1954 para proponer la creación de siete grupos de especies (cuatro para el subgénero Plagiorchis y tres para el subgénero Multi glandularis), mencionando además las sinonimias respectivas. Los grupos que Odening reconoció después de eliminar del género a varias especies que hasta esa fecha eran consideradas como válidas fueron, a saber: 1) vespertilionis, con cuatro especies y dos subespecies; 2) maculosus, con una especie y dos subespecies; 3) elegans-triangularis, con cuatro especies y dos subespecies y 4) especies cuyas características no coincidían con las de los grupos precedentes, con

cuatro especies (dando un total de 13 especies y seis subespecies para el subgénero Plagiorchis): 5) cirratus-laricola, con seis especies y tres subespecies; 6) multi glandularis, con una especie y dos subespecies y 7) notabilis-muris, con cuatro especies y cuatro subespecies (dando un total de 11 especies y nueve subespecies para el subgénero Multi glandularis). Al tomar en consideración las otras 10 especies que Odening mencionó pero que no admitió en los grupos precedentes, tenemos un gran total de 49 formas distintas (34 especies y 15 subespecies) dentro del género Plagiorchis.

A partir de esta fecha, en general, pocas han sido las modificaciones sufridas por la clasificación de Odening; la mayoría de los autores simplemente han ido agregando las especies nuevas a los siete grupos establecidos por él; en ciertas ocasiones, sin embargo, los criterios seguidos por distintos helmintólogos al hacer sinónimas algunas de las especies de Plagiorchis no han concordado con los de Odening. Queda manifiesta, pues, la difícil situación taxonómica en la que aún se encuentran inmersos los miembros del género Plagiorchis a pesar de que los estudios acerca de sus ciclos de vida son muy abundantes; las diferencias de opinión son propiciadas, creo yo, por el alto grado de variabilidad que en sus distintos hospederos definitivos vertebrados muestran los individuos de una misma especie, debido a la casi nula especificidad hospedatoria por éstos exhibida.

#### 1.5. RELACION HISTORICA DE Plagiorchis maculosus (RUDOLPHI, 1802) BRAUN, 1902.

En 1802, Rudolphi describió una nueva especie: Fasciola maculosa, de la porción terminal del intestino de Hirundo rustica; dió como sinónimos a F. hirudinis (Froelich, 1791) y a Distoma hirundinum

(Zeder, 1800), del recto de Hirundo apus y H. urbica, respectivamente. El mismo Rudolphi en 1809 denominó a esta especie Distoma maculosum; en 1819 la registró de Caprimulgus europaeus (Angel, 1959).

En 1899, Luhe erigió el género Plagiorchis para reunir a varias especies pertenecientes a distintos géneros y que compartían entre sí algunas características; una de éstas fue P. lima, descrita originalmente por Rudolphi en 1809. El mismo día en que apareció el nuevo nombre genérico de Luhe, Looss publicó el nombre Lepoderma para el mismo género. Luhe nombró al genotipo tiempo después, por lo que Lepoderma debió tener prioridad. Sin embargo, muy pocos autores han usado este nombre a partir de esa fecha, siendo Plagiorchis el aceptado en la actualidad (Angel, 1959; Yamaguti, 1971).

En 1900, al examinar una especie descrita originalmente por Muller en 1780, Braun decidió llamarla P. vespertilionis, cayendo en sinonimia P. lima (Rudolphi, 1809) Luhe, 1899. Yamaguti (1971) y otros muchos autores la consideran la especie tipo del género Plagiorchis. En 1902, Pratt creó la subfamilia Plagiorchiinae, de la que Plagiorchis es el género tipo.

En 1902, el mismo Braun publicó una figura de la especie Distoma maculosum de Rudolphi, la cual incluyó también en el género Plagiorchis, nombrándola P. maculosus. Braun examinó los ejemplares de Rudolphi, mencionando que habían sufrido deterioro a través de los años, por lo que la especie no podía ser descrita suficientemente a partir sólo de estos ejemplares. Sin embargo, correspondían con ejemplares nombrados similarmente almacenados en las colecciones de Viena, Munich y Königsberg. Presentó figuras de las vistas dorsal y ventral de un ejemplar de Hirundo rustica de la colección Königsberg. De acuerdo con la escala, el gusano medía 2.7 x 0.8 mm. Aunque Braun

no publicó una real descripción de la especie, si se refirió a la variabilidad mostrada en el tamaño de las ventosas y en la disposición de las glándulas vitelógenas (Angel, 1959).

En 1909, Luhe presentó una clave y la descripción de seis especies de Plagiorchis. Ya que esta fue la primera descripción de P. maculosus que se publicó, a continuación se presenta su traducción, tomada de Angel (1959):

" ... entre 2.0 y 2.5 mm. de largo; 0.5 a 0.7 mm. de ancho; cuerpo oval en sección transversal. Ventosa oral 0.2 a 0.3 mm. Ventosa ventral aproximadamente al final del primer tercio de la longitud corporal; 0.15 a 0.20 mm. de diámetro. Faringe más pequeña y ovario generalmente ligeramente menor a la ventosa ventral. Glándulas vitelógenas laterales; se extienden desde la faringe hasta la extremidad posterior del cuerpo; sólo en esta región confluyen en la superficie dorsal. Testículos comparativamente grandes, esféricos y ocupando el tercer cuarto de la longitud corporal. Utero por detrás de los testículos formando asas no muy bien definidas ...".

Al parecer, tanto la figura de Braun como la diagnosis de Luhe formaron las bases para las subsecuentes identificaciones; en el inciso 2.1.3. del siguiente capítulo (2. de ANTECEDENTES) se presentará el resto de la historia cronológica de esta especie, incluyendo a las especies que originalmente fueron descritas como nuevas y que posteriormente cayeron en sinonimia' con Plagiorchis maculosus, de acuerdo a distintos autores, tema del inciso siguiente.

#### 1.6. SINONIMIA DE P. maculosus.

Angel (1959) fue quien por primera vez discutió la posible

sinonimia de varias especies cercanas y de las tres variedades de Plagiorchis maculosus, parásitas de aves (principalmente insectívoras) y de un mamífero (Citellus musicus planicola), descritas originalmente como nuevas o como subespecies debido a que los hospederos eran (en apariencia) muy disímiles. Después de un estudio exhaustivo de morfometría comparada de los distintos tipos, llegó a la conclusión de que no existían bases suficientes para poder separar a dichas especies y subespecies de los ejemplares australianos de P. maculosus que ella obtuvo y estudió. Así, confirmó la nula especificidad hospedatoria que la fase adulta de esta especie ya había mostrado al ser registrada en una gran variedad de aves (ver inciso 2.1.3.). Finalmente reconoció una especie y una subespecie; P. nisbetti Nicoll, 1909; P. clelandi Johnston, 1917; P. spatulatus Johnston, 1917; P. maculosus citelli Schulz, 1932 y P. orientalis Park, 1939 resultaron ser sinónimas de Plagiorchis maculosus y P. maculosus motacillae Yamaguti, 1939 fue considerada como un sinónimo de P. maculosus anatis Skrjabin, 1928.

Odening (1959) presentó una revisión del género Plagiorchis, basándose en un resumen hecho por Fedorova en 1954; en ésta, reconoció a una especie y a dos subespecies, a saber: P. (P.) maculosus maculosus (P. clelandi; P. transbaicalicus Skrjabin, 1924; P. maculosus anatis (= anatinus) = P. russii Mehra, 1937; P. popowi Palimpsestov, 1929; P. maculosus citelli; P. bulbuli (Mehra, 1937) y P. eutamiatu (sic) zibethica Vasil'ev, 1939, como sinónimas); P. (P.) maculosus motacillae Yamaguti, 1931 y P. (P.) maculosus spatulatus Johnston, 1917, n. comb.

Odening (1961), incluyó a P. vespertilionis parorchis Macy, 1960 como una raza geográfica de P. maculosus, aumentando así a tres las subespecies que él consideró como válidas. Mencionó, además, los



rasgos constantes del complejo maculosus: las proporciones entre la ventosa oral, la faringe y el acetábulo; la ausencia de un esófago; la proporción entre el largo total del cuerpo y el ancho máximo y la nula especificidad hospedadora que muestra la fase adulta.

Si tomamos en cuenta las consideraciones propuestas por Blankespoor (1974) y Mackenzie y Mckenzie (1980) mencionadas en el capítulo de ANTECEDENTES (ver inciso 2.2.3.), tendríamos que agregar a la lista de especies sinónimas de P. maculosus, a P. noblei Park, 1936 y a P. gonzalchavezii Zerecero, 1949.

## 2 . A N T E C E D E N T E S .

### 2.1. EN EL MUNDO.

#### 2.1.1. RITMOS DE EMERGENCIA CIRCADIANOS DE CERCARIAS DE Plagiorchis spp.

Se conocen, hasta la fecha, los ritmos de emergencia circadianos de cuatro de las cercarias del género Plagiorchis; de acuerdo con Combes y Théron (1977), las cuatro cercarias pertenecen al tipo cercarias "de noche" (ver inciso 1.2.2.5.1.).

La de P. vespertilionis parorchis (Macy, 1960) es una cercaria con alternancia "absoluta"; sin embargo, al invertir el fotoperiodo se liberaron de Lymnaea stagnalis algunas cercarias en las fotofases (una cuarta parte del total), permaneciendo la acrofase dentro de las escotofases. Este autor consideró que es la luz y no la temperatura el "sincronizador" del patrón de emergencia observado.

La cercaria de P. micracanthos (Wagenbach y Alldredge, 1974) también pertenece al tipo con alternancia "absoluta". La inversión del fotoperiodo trajo como consecuencia una inversión inmediata del patrón de emergencia; la luz continua suprimió por completo la liberación de cercarias de Stagnicola exilis, mientras que la obscuridad constante permitió que la emergencia continuara siendo rítmica. Estos autores también observaron una considerable variación individual en los limneidos con respecto a los tiempos de máxima emergencia de cercarias. De lo anterior, propusieron la existencia de un ritmo de emergencia innato en el sistema caracol-parásito, sincronizado al

fotoperiodo por medio de la acción inhibidora de la luz.

La cercaria de P. neomidis (Théron, 1976) también es del tipo con alternancia "absoluta", situándose la acrofase en la segunda hora de la escotofase. Este autor observó además que esta acrofase coincidía con la fase de actividad de las larvas de insecto (Sialia lutaria), las cuales actúan como segundos hospederos intermediarios, dejando entrever el valor adaptativo de este ritmo circadiano (véase inciso 1.2.2.5.3.).

La cercaria de P. noblei (Blankespoor, 1977) pertenece al tipo con alternancia "relativa", ya que sólo el 72 % del total de cercarias se liberaron de Lymnaea stagnalis y Stagnicola reflexa en las escotofases de los nictámeros examinados. También observó que el tiempo de máxima emisión varió considerablemente entre los hospederos individuales. En este experimento la temperatura del agua había fluctuado en concordancia con la temperatura ambiental; para determinar si la declinación de las temperaturas nocturnas se relacionaba con la periodicidad nocturna exhibida, este autor sometió a tres limneidos a periodos alternantes de luz y oscuridad de tres horas cada uno, manteniendo la temperatura constante (19-20 C). El resultado obtenido fue que las cercarias emergieron de los caracoles casi en su totalidad durante las escotofases. De este modo, eliminó a la temperatura como "sincronizador" del ritmo por él estudiado.

#### 2.1.2. CICLOS DE VIDA CONOCIDOS DE ESPECIES DEL GENERO Plagiorchis.

A la fecha se conocen los ciclos de vida ya sea en forma natural y/o experimental de una gran cantidad de especies del género Plagiorchis. A continuación se mencionarán sólo algunos,

principalmente aquellos de las especies con las que se comparará a P. maculosus en el inciso 6.3.4.3. del capítulo 6. de RESULTADOS Y DISCUSION; son, a saber, los de:

P. (Multiglandularis) cirratus (Buttner y Vacher, 1960); P. dilimanensis (Velazquez, 1964); P. elegans (Styczynska-Jurewicz, 1962); P. goodmani (Najarian, 1961); P. jaenschi Johnston y Angel, 1951 (Yamaguti, 1975); P. maculosus (Noller y Ullrich, 1927; Strenzke, 1952; Angel, 1959); P. (M.) megalorchis (Rees, 1952); P. micracanthos (McMullen, 1937a.; Wagenbach y Alldredge, 1974); P. muris (McMullen, 1937a.); P. neomidis (Théron, 1976); P. noblei (Williams, 1964; Blankespoor, 1974 y 1977; Daniell y Ulmer, 1964; P. proximus (McMullen, 1937a.); P. vespertilionis parorchis (Macy, 1960).

### 2.1.3. REGISTROS DE P. maculosus.

Los primeros registros de esta especie, que abarcaron el periodo 1802-1909, ya fueron mencionados anteriormente en el capítulo 1. de INTRODUCCION (ver inciso 1.5.). Sólo faltaría agregar a los hospederos registrados por Luhe en 1909 (Angel, 1959): Riparia riparia, Delichon urbica, Apus apus, Hirundo rustica y Caprimulgus europaeus.

Posteriormente, Nicoll (1923) la registró en varias especies de aves de Gran Bretaña (Hirundo rustica; Delichon urbica; Riparia riparia; Micropus apus y Caprimulgus europaeus); Skryabin en 1928 (Angel, 1959) describió a la variedad P. maculosus anatis, de Casarca casarca de Transbaikalia; Schulz en 1932 (Angel, 1959) describió a la variedad P. maculosus citelli, de un roedor (Citellus musicus planicola) de la U.R.S.S.; Yamaguti en 1935, 1939 y 1943 (Angel, 1959)

la registró de varias especies de aves (Hirundo rustica gutturalis; daurica niparensis y Parus atricapillus restrictus); Yamaguti en 1959 (Angel, 1959) describió a la variedad P. maculosus motacillae, (Motacilla cinerea caspica; Callot en 1946 (Angel, 1959) la encontró en Apus apus; Strenzke en 1952 (Angel, 1959) la encontró en Aidemosyne cantans de Alemania; Yamaguti (1954) la encontró en Passer montanus Sturnia philippinensis de Macassar; Angel (1959) la registró de varias especies de aves australianas (Hirundo neoxena; Rhipidura leucophrys R. flabellifera; Gymnorhina hypoleuca y Pomatostomus superciliosus); Threlfall (1968) la registró por vez primera en el continente americano, de Larus argentatus en Newfoundland, Canadá; Webster (1974) la encontró por segunda ocasión en América, en Brogne subis de Ontario, Canadá; Kayton y Schmidt (1975) la registraron por vez primera en Colorado, E.U.A., de Petrochelidon pyrrhonota, constituyendo esta especie de golondrina un nuevo registro de hospedero; Fischthal en 1977 la encontró en Hirundo rustica de África; Movsesyan y Chubaryan en 1985 la registraron de dos especies de aves insectívoras de Armenia (Monticola saxatilis y Oenanthe isabellina).

Algunos de los registros de especies que posteriormente fueron hechas sinónimas de P. maculosus por Angel (1959) y Odening (1959) son los siguientes (ver inciso 1.6.): Johnston en 1917 (Angel, 1959) describió a P. spatulatus, de Anthus australis de Australia; el mismo Johnston en 1917 (Angel, 1917) describió a P. clelandi, de Petrochelidon ariel de Australia; Park (1939) describió a P. orientalis, de Hirundo daurica niparensis de Corea; Mehra en 1938 (Park, 1939) describió a P. bulbulii, de Molpastes haemorrhous intermedius de Alemania.

## 2.2. EN MEXICO.

### 2.2.1. PATRONES DE EMERGENCIA DE CERCARIAS.

El estudio de los patrones de emergencia de cercarias de tremátodos se inició prácticamente hasta principios de esta década, cuando el que esto escribe examinó el de Plagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902 (Almeyda-Artigas, 1982). A partir de entonces, han sido investigados los patrones de emergencia de tres especies más: el de Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum (Lutz, 1928) Dubois, 1970, de Biomphalaria obstructa, por Pineda-López, et al. (1985) y los de Ribeiroia ondatrae (Price, 1931) Price, 1942 y Drepanocephalus olivaceus Nasir y Marval, 1968, ambos de B. temascalensis, por Almeyda-Artigas y León-Régagnon (1987).

### 2.2.2. ESTUDIOS SOBRE CICLOS DE VIDA.

Los estudios que sobre ciclos de vida de tremátodos se han efectuado en nuestro país son muy escasos y en ocasiones fragmentarios, avocándose los investigadores a completar principalmente los ciclos de especies con importancia económica y/o médica.

Aguirre-Pequeño (1939) puso en contacto miracidios de Fasciola hepatica, padecimiento del ganado ampliamente conocido, con caracoles de la especie Stagnicola attenuata (= Limnaea attenuata) y observó una marcada atracción positiva de los miracidios y una penetración completa después de dos a tres horas, sin indicar si las larvas ciliadas habían logrado establecerse y producir redias y cercarias. Mazzotti (1955) completó experimentalmente con éxito el ciclo de este

mismo tremátodo, utilizando como hospederos a Fossaria obrussa (= Lymnaea obrussa), especie muy abundante en los estados del norte de la República y a cobayos. El mismo Mazzotti (1956) logró la infección experimental de Fossaria humilis (= Lymnaea humilis), especie común en el estado de Sonora. Con estas bases, en el ex Instituto Nacional sobre Investigaciones Pecuarias (ahora parte del Centro Nacional de Parasitología Animal dependiente de la S.A.R.H. y ubicado en Cuernavaca, Mor.) se han venido realizando diversos estudios ecológicos respecto al ciclo de vida de este importantísimo tremátodo (Biol. Jorge Escudero, comunicación personal).

Otro tremátodo que ha recibido mucha atención debido a su importancia en salud pública, es Paragonimus mexicanus Miyasaki e Ishii, 1968. Lamothe-Argumedo (1982) presentó la historia de esta especie y una lista de los hospederos naturales encontrados en México. En cuanto a infecciones experimentales, Lamothe-Argumedo, et al. (1978) obtuvieron adultos en gatos, mientras que Rangel-Ruiz y Lamothe-Argumedo (1985) infectaron exitosamente al prosobranquio Aroapyrngus alleei con miracidios, pudiendo describir a las etapas de esporocisto, redia madre, redias hijas y cercaria.

Fineda-López, et al. (1985) y Almeyda-Artigas y León-Régagnon (1987) dilucidaron el ciclo de vida de Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum en los estados de Chiapas y Oaxaca, respectivamente, debido a que la fase de metacercaria puede causar bajas "severas" en la producción y en el crecimiento de especies de peces de la Familia Cichlidae en condiciones de cultivo.

Otras dos especies que podrían convertirse en un serio problema de sanidad acuícola son Drepanocephalus olivaceus y Ribeiroia ondatrae; por lo anterior, Almeyda-Artigas y León-Régagnon (1987)

estudiaron los espectros de sus hospederos y algunos aspectos de su ciclo de vida, pasos necesarios en el delineamiento de medidas de prevención y contención adecuadas.

Otro ciclo de vida, que está siendo investigado actualmente en el lago de Pátzcuaro, es el de Posthodiplostomum minimum (MacCallum, 1921) Dubois, 1936, por personal del Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología de la U.N.A.M., debido a los graves daños que la fase de metacercaria le causa al "pescado blanco" (Chirostoma estor), utilizado para el consumo humano.

### 2.2.3. ESPECIES DE Plagiorchis REGISTRADAS.

Hasta 1982, tres eran las especies del género Plagiorchis que en su fase adulta habían sido registradas en nuestro país, las cuales aparecen a continuación.

Caballero y C. (1940) redescubrió a Plagiorchis (Plagiorchis) vespertilionis (Muller, 1780) Braun, 1901 en un murciélago (Tadarida brasiliensis) recolectado en la ciudad de México (Atzacapozalco).

Caballero y C. (1942) volvió a encontrar a esta misma especie de tremátodo en idéntico hospedero, capturado esta vez en los jardines del Instituto de Biología de la U. N. A. M.; este autor basó la identificación en varios rasgos, tales como la presencia de prefaringe y esófago; el tamaño y la relación de las ventosas (siendo la oral mayor que la ventral en una proporción de 1.00:0.69); la disposición de las glándulas vitelógenas (laterales, extendiéndose desde la región del poro genital y hasta el extremo posterior del cuerpo); las dimensiones de los huevos (37-39 x 20 micrómetros) y la posición del poro excretor. También redescubrió a Plagiorchis (Multiglandularis)



muris (Tanabe, 1922) Yamaguti, 1933 de otra especie de murciélago (Natalus mexicanus) de la cueva de Xictli en Tlalpan (Distrito Federal) y del convento de Acolman en el estado de Hidalgo. Caballero mencionó que sus ejemplares eran muy semejantes a los descritos por Tanabe en 1922 y por McMullen (1937); en los tres casos algunas características eran constantes, tales como: la presencia de prefaringe y esófago; la relación entre ambas ventosas (siendo la oral mayor que la ventral en una proporción de 1.00:0.62), el tamaño y la tasa ovario-acetábulo (siendo mayor el ovario en una proporción de 1.00:0.80); el tamaño de los huevos (32-40 x 16-22 micrómetros) y la disposición de las glándulas vitelógenas, formando una comisura preacetabular.

Zerecero (1949) describió a una nueva especie, Plagiorchis gonzalchavezii, de un "pájaro de pecho amarillo" (Tyrannus sp.) recolectado en Tuxtepec, Oaxaca. Aunque muy parecida a P. noblei Park, 1936, las diferencias por ella observadas fueron: el grado de espinación del cuerpo (únicamente en la región anterior de sus ejemplares); el tamaño del ovario con respecto al del acetábulo (mayor el del ovario en su material) y el límite anterior de las glándulas vitelógenas (el borde posterior de la faringe en sus ejemplares y el margen anterior del acetábulo en la especie de Park). Odening (1959) incluyó a P. gonzalchavezii en el grupo elegans-triangularis, como una subespecie de P. (P.) triangularis. Es importante señalar en este punto que Park (1936) mencionó que sus ejemplares de P. noblei se asemejaban mucho a dos de las 55 especies conocidas del género: P. maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902 y P. elegans (Rudolphi, 1802) Braun, 1902; la característica que la diferenciaba era la distribución de las glándulas vitelógenas: en P. elegans se extendían más allá del

límite posterior de la faringe y en P. maculosus, hasta el esófago mientras que en P. noblei (como ya se mencionó) hasta el borde anterior del acetábulo.

Mackenzie y Mckenzie (1980) examinaron las características que Zerecero presentó como distintivas de su nueva especie y consideraron que eran taxonómicamente inválidas; con base en la descripción original de Plagiorchis noblei (Park, 1936), el trabajo de Blankespoor (1974) sobre variaciones morfológicas de la especie de Park y en sus propias conclusiones, estos dos autores consideraron a la especie de Zerecero como un "sinónimo junior subjetivo" de P. noblei.

Por su importancia, el trabajo de Blankespoor (1974) merece un análisis detallado. Con los huevos de P. noblei obtenidos de un solo gusano adulto aislado del intestino de un mirlo de ala roja (Agelaius phoeniceus) infectado naturalmente, infectó experimentalmente a dos especies de caracoles limneidos (Lymnaea stagnalis y Stagnicola reflexa) criadas en el laboratorio; con las cercarias liberadas por los moluscos infectó experimentalmente a tres géneros de insectos (Aeschna, Coenagrion y Chironomus). De las 51 especies de vertebrados expuestas a las metacercarias de P. noblei, este autor logró establecer infecciones en 15 especies de aves (Gallus gallus, Tyrannus tyrannus y Turdus migratorius, entre otras) y en dos especies de mamíferos (Mus musculus y Rattus norvegicus). La examinación de más de 1,500 ejemplares adultos experimentales de dichos hospederos reveló que el tamaño del cuerpo; el tamaño de las ventosas; la posición de la ventosa oral; la longitud del esófago; el tamaño y la posición de las gónadas; los límites de las glándulas vitelógenas y el tamaño y la posición de la bolsa del cirro no constituían caracteres taxonómicos confiables. Aparentemente, los únicos rasgos taxonómicos constantes de

los adultos de P. noblei fueron la proporción entre ambas ventosa (1.00:0.83-0.90) y las dimensiones de los huevos (33-42 x 18-21 micrómetros). Este autor consideró que debido a las variaciones morfológicas tan pronunciadas y la nula especificidad hospedatoria tan conspicua, las especies válidas del género Plagiorchis muy probablemente fueran menos que las que se indican en la literatura.

También dejó entrever que muy probablemente P. noblei debería ser colocado como sinónima de una de las especies descritas con anterioridad (quizás de P. maculosus), ya que son notablemente similares (esta observación coincide con la de Park (1936)). Además, el único organismo adulto recobrado de un mirlo de cabeza amarilla (Xanthocephalus xanthocephalus) al que se le habían administrado metacercarias desarrolladas experimentalmente a partir de huevos obtenidos naturalmente de un murciélago, le sugirió a Blankespoor que es posible que no existan diferencias entre ciertos plagiórquidos que se sabe utilizan tanto a aves como a mamíferos como hospederos definitivos. Finalmente, este autor concluyó que los datos experimentales del tipo que él obtuvo enfatizan la necesidad de una muy necesaria revisión extensa del género, requiriéndose para lograrla un acercamiento experimental comprensivo, lo que proporcionará un concepto más sensato del género Plagiorchis.

En cuanto al registro de la fase de cercaria, sólo han sido estudiadas suficientemente dos de ellas, sabiendo con certeza que pertenecen al género Plagiorchis (ver inciso 6.1.1.2.), ya que las mencionadas por Familiar-González (1983) fueron identificadas únicamente hasta el taxón de Familia.

### 3 . O B J E T I V O S .

\* Investigar la presencia o ausencia de un patrón de emergencia en la cercaria de Flagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902, a partir de su caracol hospedero.

\* De existir un patrón, determinar, a través de distintos experimentos, si éste es de naturaleza endógena.

\* Independientemente de su naturaleza, identificar a los parámetros ambientales que tengan mayor influencia sobre dicho ritmo de liberación de la cercaria.

\* Confirmar, mediante el estudio de los ciclos de vida natural y experimental, la identidad específica de dicha cercaria.

\* Determinar el espectro de hospederos naturales de la especie del tremátodo estudiado y contribuir así al conocimiento de la parasitofauna de nuestro país.

#### 4 . D E S C R I P C I O N D E L A R E A D E C O L E C T A .

El Parque Nacional "Lagunas de Zempoala" está enclavado en la gran serranía (parte del eje volcánico transversal) que separa la cerrada cuenca del Valle de México de las abiertas campiñas morelenses, principalmente en el ángulo nor-occidental del Estado de Morelos, (en los límites con el Distrito Federal y el Estado de México), en el Municipio de Ocuilán de este último estado.

Geológicamente, esta zona pertenece a la Provincia del Eje Neovolcánico, caracterizada por el predominio de rocas volcánicas cenozoicas. Las rocas basálticas de fines del Terciario (Mioceno y Plioceno) y del Cuaternario (Pleistoceno) son las que aquí dominan, emitidas por el volcán "Zempoala"; éstas cubrieron la zona en forma de un inmenso oleaje depositado discordantemente sobre las primeras andesitas que originaron el levantamiento general del volcán "Ajusco". Es probable que las depresiones que fueron ocupadas originalmente por las lagunas hayan sido verdaderos cráteres secundarios del núcleo principal que se encontró en el "Zempoala". En las cercanías del foco principal de esta zona efusiva, se observan rocas de transición entre los basaltos y las andesitas, apreciándose su formación en sinclinas, dispuestas casi verticalmente. En los fondos de las depresiones en la zona de las lagunas se encuentran, más raramente, muestras de rocas traquiandesíticas o de contextura porfírica que difieren de la roca basáltica superficial, tanto en antigüedad como litológicamente (Sosa, 1935). Ya que la formación geológica de estos terrenos no permite la aparición de grandes corrientes superficiales permanentes, las aguas provenientes de las montañas circundantes de la sierra (las cuales pertenecen a la Cuenca del Río Grande del Amacuzac de la Región

Hidroológica del Balsas) se depositaron en las distintas depresiones y muy probablemente formaron muchos más de los vasos lacustres presentes en la zona (conocidos en la actualidad como las "Lagunas de Zempoala"), según se desprende al observar las numerosas cuencas existentes ya exhaustas.

Hace más de 50 años, siete eran las lagunas presentes en la sierra de Huitzilac, teniendo como límites la sierra de Chupaderos al norte y los bosques del poblado de Ocuilán de Arteaga al noroeste. Yendo del poblado de Huitzilac hacia el de Ocuilán, la Laguna de "Zempoala" es la que aparece primero, alimentada por un pequeño arroyo que desciende del suroeste de las vertientes del río Zempoala; a muy corta distancia y a un nivel inferior, aparece la Laguna de Compila (Acopilac), más pequeña que la anterior y alimentada por las aguas de la Laguna de Zempoala que pasan por una cascada al Vaso de Compila. Limitado éste por taludes casi verticales sin ninguna salida visible, hay la creencia de que en su centro existe un resumidero natural por donde pasan sus aguas para ir a surtir a las demás lagunas o bien se infiltran en el subsuelo para resurgir muy lejos en los manantiales de Almoloya del Río (Estado de México) donde se origina el Río Lerma. A un kilómetro aproximadamente al oeste de las dos lagunas mencionadas se encuentra la tercera Laguna, la del Sol (Tonatihuaya o Tonatihua); tan grande como la de Zempoala, esta laguna debe surtirse con los escurrimientos que descienden de las alturas circundantes, especialmente del Cerro de los Alumbres. Continuando hacia el noroeste se encuentra la Laguna Seca (Muerta), cuenca cerrada por completo que ya sólo en la época pluvial se llenaba de agua y que en el estiaje se presentaba como un pantano cubierto de pastos (Sosa, 1935). En la actualidad esta laguna se encuentra en un franco proceso de extinción.

Hacia el oeste se encuentra la Laguna Prieta (Tlilac). Las últimas de lagunas están situadas al norte de las anteriores: la Laguna de Quila y la Laguna de Hueyapan; de esta última bajaba la tubería de agua que surtía las necesidades del poblado de Huitzilac (Sosa, op. cit.). Actualmente, es de la Laguna de Quila de donde los pobladores de Santa Marta y de Huitzilac bombean el agua, debido a la extinción de la Laguna Hueyapan.

La laguna de Quila se encuentra situada dentro del Municipio de Tianguistenco en el Estado de México (al norte del Municipio de Ocuilán), aproximadamente a 65 kilómetros de la ciudad de México por la carretera federal Tres Marias-Toluca, entre los poblados de Huitzilac (Estado de Morelos) y Ocuilán de Arteaga (Edo. de México), a una altitud de 3,000 m.s.n.m. (ver Figura 1.). Tiene como coordenadas el paralelo 19° 04' de latitud norte y el meridiano 99° 20' de longitud oeste. El tipo de vegetación de la zona está considerado por Rzedowski (1983) como Bosque mixto de oyamel-pino (Abies religiosa-Pinus montezumae). La temperatura media anual varía entre 5 y 12 C; la temperatura media del mes más frío (enero) va de -3 a 18 C, mientras que la del mes más caliente (junio) se sitúa entre los 6.5 y 22 C. La precipitación media anual es de entre 1,500 y 1,600 mm., siendo menor a 40 mm. la del mes más seco (febrero). Se presentan de 80 a 100 días con heladas y de dos a cuatro días de granizadas, anualmente. El clima general de la región es del tipo semifrío subhúmedo (el más húmedo de los semifríos) con lluvias en verano (largo y fresco), siendo el cociente P/T mayor a 55.0; el porcentaje invernal anual es menor al 5%. La oscilación anual de las temperaturas medias mensuales es menor a 5 C. Así, la fórmula climática de la zona es: C(w)(w)(b')i.

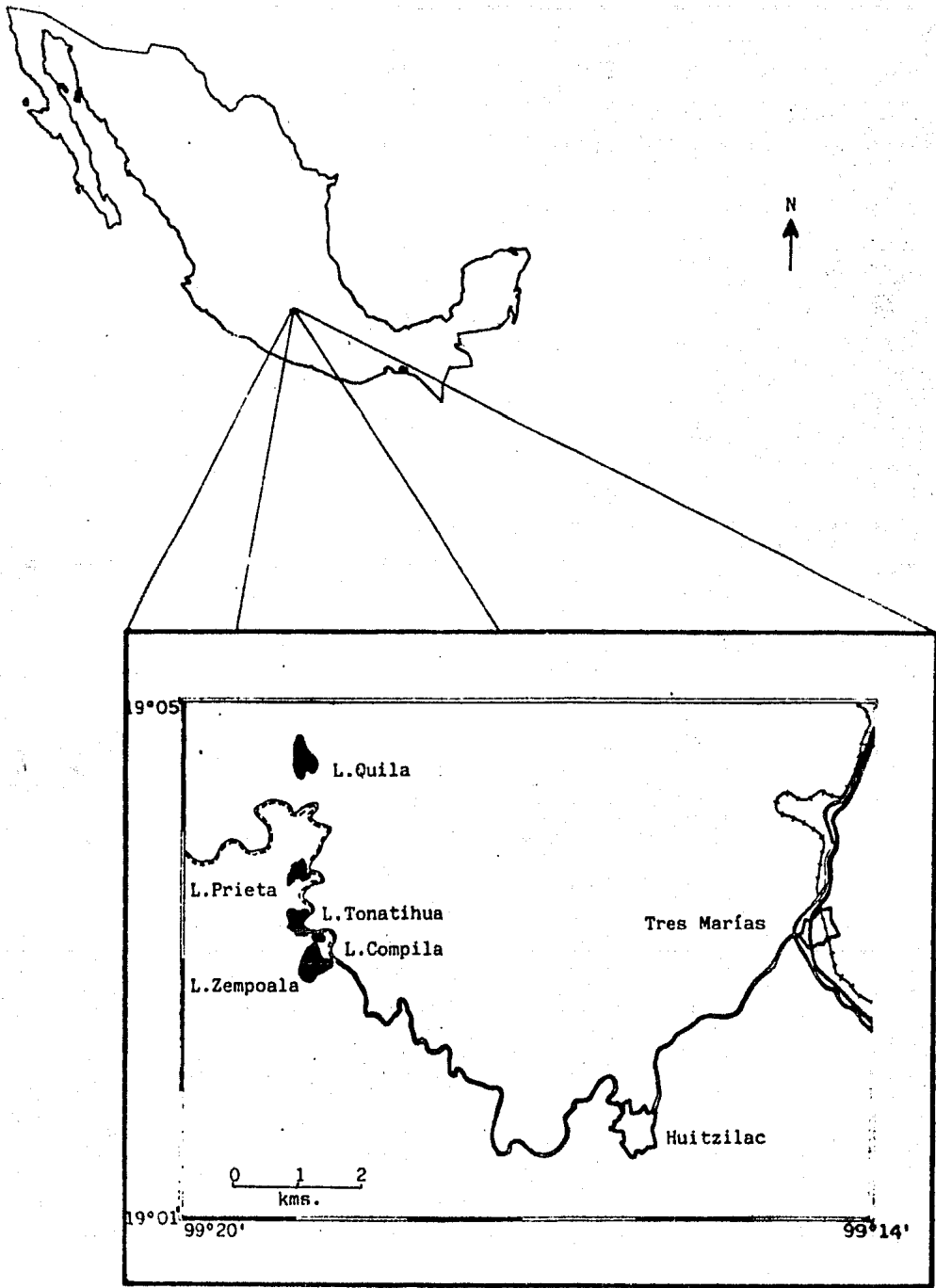


FIGURA 1.- Mapa que muestra la ubicación del área de colecta (laguna de Quila), dentro del PARQUE NACIONAL LAGUNAS DE ZEMPOALA, en el estado de México (SEPP, 1976).



Esta laguna se encuentra en un valle de pastizal inducido, rodeada de montañas que alcanzan altitudes cercanas a los 3,500 metros; está considerada como de temporal. Un angosto riachuelo que se origina de varios pequeños manantiales en la parte alta del bosque y que desciende por la región noroeste montañosa, es el que la alimenta; su substrato es de tipo arenoso; la velocidad del agua del riachuelo es de 34.6 cm./seg. (Bueno-Soria, et al., 1981). Hace 50 años el cuerpo de agua abarcaba prácticamente todo el valle. Sin embargo, la existencia de un resumidero en su región sureste y el desvío de sus aguas con el fin de surtir del líquido a los poblados de Santa Marta y de Huitzilac han traído como consecuencia un mediano estado de perturbación y, por ende, un paulatino proceso de extinción, limitándose el cuerpo de agua propiamente dicho en la actualidad a la zona sur y disminuyendo considerablemente su volumen en la época de estiaje. En esta zona la vegetación es típica de un tular, predominando Typha latifolia; otro vegetal muy abundante es Lemna gibba. En época de lluvias, debido al desbordamiento del riachuelo, se forman charcas temporales en su zona norte, volviéndose pantanosa. La temperatura del agua varía de acuerdo a la profundidad de las charcas, a la hora del día y a la época del año; las temperaturas registradas variaron entre 6 y 25 C. El pH varió ligeramente (de 6.0 a 7.0) de acuerdo con la región muestreada.

Su fauna acuática está bien representada y la constituyen una gran variedad de organismos pertenecientes a distintos phyla de invertebrados (larvas de Trichoptera (Insecta: Arthropoda), tales como Hesperophylax magnus y Clistoronia graniculata (Bueno-Soria, et al., 1981); ninfas de Odonata (Insecta: Arthropoda), como Sympetrum illotum y Anax amazili; larvas de Diptera (Insecta: Arthropoda) y caracoles de

los géneros Physella, Planorbella y stagnicola (Pulmonata: Gastropoda Mollusca), principalmente) y dos especies de anuros (Rana berlandieri e Hyla plicata) (Amphibia: Vertebrata). No existen registros acerca de representantes de la Clase Reptilia. La ornitofauna es muy diversa perteneciendo la mayoría de sus miembros a varias familias del Orden Passeriformes (ver inciso 6.3.4.). En relación a los mamíferos, están representados por diferentes especies de los órdenes Chiroptera, Rodentia, Lagomorpha, Artiodactyla, Perissodactyla y Carnivora (Lynx rufus, entre otros).

## 5. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S .

### 5.1. RECOLECCION Y TRANSPORTE DE LOS HOSPEDEROS.

La recolección de los diferentes organismos que actúan como hospederos naturales de la especie parásita escogida, se cumplió mediante cinco visitas a la laguna de Quila (ver capítulo 4.), en un periodo de seis meses, que comprendió a las estaciones de primavera, verano y otoño del año de 1982 (ver Tabla 1. en el inciso 6.1.1.2.1.).

#### 5.1.1. PRIMER HOSPEDERO INTERMEDIARIO.

Los caracoles utilizados en la presente investigación fueron recolectados, manualmente: (1) del fondo limoso de las charcas temporales que se forman en la época de lluvias, por el desbordamiento del riachuelo que alimenta a la laguna de Quila y (2) de la vegetación inundada circundante; y, con la ayuda de una red malacológica de 40x20x20 cm. : (3) de las orillas propiamente dichas del cuerpo de agua en proceso de extinción. Se registraron, además, algunos parámetros, tales como: temperatura ambiental, temperatura del agua y pH.

Fueron transportados al laboratorio en frascos de boca ancha, con pastos en el fondo y agua, hasta la mitad de su volumen, de las mismas charcas de la laguna.

### 5.1.2. SEGUNDOS HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS.

Todos los organismos recolectados pertenecen al Phylum Arthropoda y tienen hábitos acuáticos; con excepción de las "pulgas de agua" el resto forma parte de la Clase Insecta.

#### 5.1.2.1. NATURALES.

Del riachuelo que alimenta a la laguna de Quila fueron recolectados organismos representantes: de la Familia Limnephilidae (Orden Trichoptera) en estado larvario (dentro de su "habitáculo de protección"), manualmente y del suborden Anisoptera (Orden Odonata) en estado ninfal, con la ayuda de una red malacológica de 40x20x20 cm., muy cerca de las charcas temporales en las que se recolectaron algunos de los moluscos (ver inciso 5.1.1.). Las ninfas de anisópteros también fueron recolectadas de varias charcas circundantes. Fue posible, así mismo, recolectar manualmente individuos adultos de una especie perteneciente al suborden Zygoptera (Odonata).

Todas fueron transportadas al laboratorio en frascos de boca ancha con agua hasta la mitad de su capacidad, del mismo riachuelo en el que se recolectaron, renovándose el agua periódicamente para evitar que ésta se calentara y matara a los artrópodos.

#### 5.1.2.2. EXPERIMENTALES.

Las larvas de mosquitos de la Familia Culicidae (Orden Diptera) y las "pulgas de agua" adultas del género Daphnia (suborden Cladocera, Orden Branchiopoda, Clase Crustacea) empleadas en los diferentes experimentos, fueron recolectadas sumergiendo frascos de boca ancha en un pozo permanente situado en el jardín de una casa particular en la

Delegación Coyoacán de la ciudad de México. Para su transporte al laboratorio se emplearon los mismos frascos, con agua propia del sitio de colecta.

Las náyades del Orden Odonata (Zygoptera) utilizadas, provinieron de una charca ubicada en el Jardín Botánico Exterior de la U.N.A.M.; se recolectaron manualmente, tomándolas de la vegetación sumergida a la que se encontraban sujetas.

Las larvas del Orden Trichoptera fueron recolectadas del riachuelo que alimenta a la laguna de Quila, en zonas anteriores y lejanas a los sitios en los que se observaron y/o recolectaron caracoles pulmonados, para asegurar la ausencia de infección causada por la fase de metacercaria de la especie de tremátodo estudiada (ver inciso 6.3.3.). Debido a que la velocidad del riachuelo es de aproximadamente 30 cm./seg. (Bueno-Soria, et al., 1981) y a que los moluscos habitan áreas posteriores a la desembocadura del arroyo, consideramos que las cercarias liberadas por sus hospederos difícilmente podrían nadar contra la corriente la distancia necesaria e infectar a organismos susceptibles (como larvas de Trichoptera, según Macy (1960) y Najarian (1961) para dos especies del género Plagiorchis).

Fueron transportadas al laboratorio siguiéndose el método descrito en el inciso 5.1.2.1..

### 5.1.3. HOSPEDEROS DEFINITIVOS.

#### 5.1.3.1. NATURALES.

Las aves fueron cazadas mediante la utilización de un rifle de diábolos o atrapadas con una red ornitológica, colocada en zonas

visitadas con frecuencia por dichos organismos, aledañas a los sitios de recolección de los caracoles.

Se transportaron vivas o muertas al laboratorio, en donde inmediatamente se les revisó exhaustivamente el intestino delgado (ver inciso 5.6.4.).

Para su identificación, fueron llevadas con la M. en C. Kathleen Babb Stanley del Laboratorio de Vertebrados Terrestres de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., quien además observó e identificó a otras especies de aves que frecuentan la Laguna de Quila mediante el empleo de unos catalejos con gran poder de resolución.

#### **5.1.3.2. EXPERIMENTALES.**

Las aves empleadas en los experimentos de alimentación (ver inciso 5.6.4.) fueron obtenidas en una casa comercial de la ciudad de México. Se transportaron al laboratorio en una caja de cartón con perforaciones en su tapa.

Los mamíferos utilizados fueron proporcionados e identificados por el personal del Laboratorio de Etología y Psicobiología del Instituto Mexicano de Psiquiatría de la ciudad de México.

### **5.2. MANTENIMIENTO.**

#### **5.2.1. MOLUSCOS.**

Una vez en el laboratorio, fueron lavados y separados por especie, para posteriormente ser colocados en acuarios de 31x18x19 cm., a los que previamente se les había colocado un filtro de piso, sustrato rocoso-arenoso y añadido agua hervida, reposada y aerada por

espacio de 48 horas (el agua con las características mencionadas anteriormente será considerada en adelante sólo como "agua de cultivo"). Para su oxigenación, fue utilizada una bomba para acuario. El alimento consistió en trozos de hojas de lechuga fresca, agregados cuando era necesario; los acuarios fueron lavados y su agua renovada periódicamente, evitando así la acumulación de desechos orgánicos; además, fueron colocados cerca de una ventana, de modo que recibieran la luz del sol en forma indirecta.

### 5.2.2. ARTROPODOS.

Tanto las larvas y las pupas de los mosquitos así como las "pulgas de agua" fueron mantenidas en los mismos frascos utilizados para su transporte. El agua (extraída del pozo) fue renovada en forma periódica hasta que fueran aisladas individualmente para los experimentos de infección (ver inciso 5.6.2.).

Algunas de las larvas se fijaron en alcohol al 70 % y se llevaron con el M. en C. Javier Butze, investigador del Laboratorio de Entomología en el Departamento de Zoología del Instituto de Biología de la U.N.A.M., quien amablemente las identificó.

Las ninfas de anisópteros y zygópteros y las larvas de tricópteros fueron mantenidas en acuarios de características idénticas a los empleados para el mantenimiento de los caracoles (ver inciso 5.2.1.), agregándoles en este caso agua proveniente de los sitios de su recolección.

El M. en C. Enrique González-Soriano del Laboratorio de Entomología del Instituto de Biología de la U.N.A.M. fue quien identificó a las especies de anisópteros (basándose en ninfas fijadas

en alcohol al 70 %) y de zygópteros (imago) del Orden Odonata. Cabe mencionar que para este propósito, el material del Jardín Botánico Exterior fue mantenido indefinidamente en un acuario del laboratorio hasta obtener el estado adulto; los adultos se mataron con acetato de etilo y colocados en una bolsa de papel glacine antes de ser llevados al Instituto de Biología.

La identificación de las ninfas de tricópteros estuvo a cargo del M. en C. Joaquín Bueno-Soria, investigador del Laboratorio de Entomología del Instituto de Biología de la U.N.A.M., a partir de ejemplares fijados y conservados en alcohol al 70 %.

### 5.2.3. AVES Y MAMIFEROS.

Estos fueron mantenidos, tanto durante el periodo de pre- como de post-infección, en jaulas acondicionadas con agua y alimento del que se expende comúnmente en casas comerciales; se limpiaron periódicamente para evitar la acumulación de heces. Un día antes de ser sometidos a los experimentos de alimentación, se les privó de agua y de alimento.

### 5.3. SELECCION DE LOS CARACOLES INFECTADOS.

Para determinar cuál de los moluscos recolectados presentaba infección madura, se siguió el método de selección descrito por Malek y Cheng (1974), a saber: se separaron en grupos de cinco cada uno en recipientes de plástico transparentes de 60 cc. de capacidad con 30 ml. de "agua de cultivo" y con dos trozos de hojas de lechuga; por espacio de 24 horas fueron expuestos a las condiciones naturales de



luz y de obscuridad (régimen LO 12:12). Al término de este lapso se examinó el contenido de cada recipiente con la ayuda de un microscopio estereoscópico; así, los moluscos contenidos en recipientes libres de cercarias eran pasados a otro acuario con características idénticas y bajo las mismas condiciones a los mencionados con anterioridad y, pasados 15 y 30 días fue repetido el mismo procedimiento con ellos. Si se observaban cercarias, los caracoles eran aislados individualmente en "agua de cultivo" con un trozo de lechuga y entonces eran dejados otras 24 horas antes de examinar nuevamente el agua del recipiente.

De esta manera, los caracoles parasitados fueron identificados y aislados individualmente en "agua de cultivo" y con un trozo de lechuga, para mantenerlos en sus recipientes por espacio de varios días bajo condiciones naturales de luz y de obscuridad y poder observar a las cercarias liberadas (ver inciso 5.6.2.); el agua fue renovada cada 12 horas, al igual que el alimento. Algunos de los moluscos fueron mantenidos indefinidamente en condiciones de laboratorio con la finalidad de obtener información acerca del tiempo que un caracol infectado continúa liberando cercarias: antes de perecer o hasta que se agoten completamente las células germinales de los esporocistos de la segunda generación. Otros más fueron disectados en su oportunidad (ver inciso 5.6.1.).

Todos aquellos caracoles que resultaron negativos a las infecciones maduras después de 30 días de haber sido recolectados, fueron llevados vivos al Laboratorio de Helminología del Departamento de Zoología del Instituto de Biología de la U.N.A.M., con el M. en C. Luis José Rangel-Ruiz, quien fue quien los identificó.

#### 5.4. DETERMINACION DEL PATRON DE EMERGENCIA DE LA CERCARIA.

Los caracoles infectados, aislados individualmente, fueron sometidos a dos ciclos de 24 horas, que consistieron cada uno de 12 horas de luz, seguidas de 12 horas de obscuridad (LO 12:12); la temperatura del agua de los recipientes osciló de acuerdo a las variaciones de las temperaturas ambientales reinantes.

Para asegurar que el tiempo de exposición a la luz fuera el requerido y que ésta pudiera aplicarse en cualquier momento, se suprimió la luz solar y se substituyó por una fuente de luz artificial (un tubo fluorescente circular "Luz de día" HITACHI de 45 watts). Para que la intensidad de la misma fuese constante y homogénea y estuviera dentro de los valores fisiológicos (Mills, 1966) se diseñó el siguiente dispositivo: se buscó una distribución tal, que cada uno de los 10 recipientes de prueba con 30 ml. de agua pudiera recibir la misma cantidad de luz; el tubo fluorescente fue fijado entonces a una distancia tal que la intensidad luminosa registrada en la superficie del agua fuera de 2,000 lux (185.87 bujías-pie). Dicha intensidad se logró colocando el tubo a 20 cm. de los recipientes, dispuestos éstos en forma circular. Las lecturas luminosas fueron tomadas con un luxómetro METRAWATT METRUX K.

Para obtener una obscuridad total y constante y para que las variaciones de la temperatura ambiental fueran mínimas, los caracoles fueron introducidos a una caja térmicamente aislada y forrada por ambas caras con papel negro, colocándola posteriormente en el interior de un cuarto en completa obscuridad.

Cada ciclo de 24 horas fue dividido en seis intervalos de cuatro horas cada uno, siendo tres de éstos de luz artificial y los tres

restantes de oscuridad (encendiéndose la luz a las 07 hs. y apagándose a las 19 hs.). Al inicio del primer intervalo de luz se colocaron cinco recipientes numerados, con 30 ml. de "agua de cultivo", un caracol y un trozo de lechuga en cada uno y cinco más solo con "agua de cultivo" abajo del tubo fluorescente. Al término de cada intervalo (ya fuera de luz o de oscuridad) los moluscos fueron trasladados a los nuevos recipientes (a los que se les agregaba en ese momento un trozo nuevo de lechuga), mismos que habían estado junto a los cinco ocupados por los organismos durante todo el intervalo, con el objeto de que la temperatura del agua de los dos grupos de recipientes fuera la misma al finalizar cada intervalo y evitar así un choque térmico (Olivier, 1951; Valle, et al., 1971; Blankespoor, 1977). Al inicio de cada uno de los siguientes intervalos, otros cinco recipientes con "agua de cultivo" eran colocados nuevamente junto a los que ya contenían caracoles. El traslado de los caracoles a los nuevos recipientes, al término de cada uno de los tres intervalos de oscuridad se efectuó, igualmente, en completa oscuridad.

Se consideró un periodo de dos ciclos de 24 horas para la aclimatación de los caracoles (cambio en el tipo de luz y manipulación cada cuatro horas), antes de proceder a realizar el conteo de las cercarias liberadas en cada uno de los lapsos escogidos (Macy, 1960; Wagenbach & Alldredge, 1974; Blankespoor, 1977).

El número de cercarias liberadas por caracol durante cada uno de los seis intervalos fue obtenido de la siguiente manera: al finalizar cada intervalo se retiraba el trozo de lechuga no sin antes haberlo agitado enérgicamente en el agua (para desprender cercarias que pudieran estar reptando sobre su superficie); el agua era vertida entonces en

un disco de "Syracusa" previamente cuadrículado en su parte inferior y se agregaban tres gotas de una solución de iodo al 5 % en alcohol al 70 % (que mata y tinte a las cercarias) (Giovannola, 1936a.). El conteo fue directo (Giovannola, 1936a.; McClelland, 1965), revisándose toda el agua detenidamente bajo un microscopio estereoscópico con la luz incidiendo en un ángulo aproximado de 45°. Posteriormente, se lavaba perfectamente el disco antes de proceder a contar las larvas del siguiente recipiente. Se anotaba entonces la cantidad total de cercarias, la temperatura ambiental y la del agua. El trozo de lechuga retirado era desechado para evitar que cercarias adheridas al vegetal fuesen consideradas en alguno de los conteos de los intervalos siguientes, alterando de este modo el número real de larvas liberadas por intervalo.

Para determinar con más precisión el momento de la emergencia, una vez conocido el intervalo en el que el mayor número de cercarias eran liberadas, éste fue dividido a su vez en dos fracciones (ver inciso 6.2.2.), y se siguieron los mismos procedimientos mencionados anteriormente. De igual manera, la hora en la que mas cercarias fueron vistas en el líquido fue dividida en dos lapsos de media hora (ver inciso 6.2.2.), sólo para dos de los moluscos estudiados.

##### 5.5. DEMOSTRACION DE UN RITMO CIRCADIANO EN LA CERCARIA.

Una vez obtenido el patrón de emergencia de la cercaria para dos ciclos de 24 horas bajo condiciones controladas de luz y oscuridad, se procedió a efectuar cuatro diferentes experimentos diseñados de manera que se pusieran a prueba las principales características de los

ritmos circadianos (mencionadas en el inciso 1.2.1.) y que por lo tanto nos llevaran a concluir si dicho patrón era consecuencia del fotoperiodo (exógeno) o si en el sistema caracol-parásito existe un ritmo de emergencia innato o endógeno. Por otro lado, para confirmar que la falta de alimento en el molusco hospedero (lechuga) trae como consecuencia una disminución progresiva en la cantidad de cercarias liberadas (Cort, 1922; Fratt y Barton, 1941; Wagenbach y Alldredge, 1974), se diseñó un quinto experimento; ya que el método varió ligeramente en relación a los cuatro primeros, será tratado por separado.

Cabe hacer notar que el método empleado en los experimentos que a continuación se describen, fue idéntico al señalado en el inciso anterior (5.4.), variando únicamente el tiempo de permanencia de los caracoles en la luz y en la obscuridad. De igual manera, en ninguno de los casos fue mantenida constante la temperatura del agua de los recipientes.

El número de moluscos empleados en cada experimento fue de cinco (excepción hecha del IV, en el que se colocaron sólo dos), siendo siempre distintos, escogidos al azar de entre los infectados recolectados a lo largo de las cinco visitas al área de estudio.

#### EXPERIMENTO I.- OBSCURIDAD CONSTANTE.

Tuvo una duración de siete días (42 intervalos) y se inició a las 07 hs; durante los dos primeros días los pulmonados fueron sometidos a ciclos LO 12:12 para posteriormente quedar en obscuridad completa durante los tres siguientes, después de los cuales se regresó al régimen LO 12:12.

Para la representación gráfica de los resultados, se utilizó (a) la cantidad de cercarias liberadas por caracol y (b) la suma de las cercarias que emergieron de todos los caracoles, expresadas ambas en porcentajes, para intervalos de cuatro horas cada uno. Para tal efecto, el total de larvas emergidas cada 24 horas (seis intervalos) fue considerado como el 100 % (Valle, et al., 1971), de modo que en el eje de las ordenadas se graficó, para el caso (a), lo siguiente:

$$\frac{\text{\# de cercarias liberadas durante un intervalo de 4 horas}}{\text{\# total de cercarias liberadas por cada 6 intervalos}} \times 100$$

mientras que para la situación (b), se graficó:

$$\frac{\text{suma de larvas emergidas de los 5 caracoles por intervalo}}{\text{\# total de cercarias de los 5 caracoles cada 6 intervalos}} \times 100$$

## EXPERIMENTO II.- LUZ CONSTANTE.

Inició a las 19 hs. y tuvo una duración de ocho días (48 intervalos); después de dos ciclos LO 12:12, los moluscos permanecieron en luz artificial continua por espacio de cuatro días, restableciéndose las condiciones iniciales a partir del séptimo día.

Para la presentación de los resultados de este experimento, se decidió graficar directamente, en el eje de las ordenadas, el número de cercarias liberadas por caracol para cada uno de los 48 intervalos. Para lograr una mejor presentación de los resultados, se empleó en dicho eje una escala logarítmica.

### EXPERIMENTO III.- INVERSION DEL FOTOPERIODO.

Al igual que el precedente, inició a las 19 hs. para finalizar a la misma hora ocho días después. Pasados dos días en el régimen LD 12:12, el ciclo fue invertido 180° (DL 12:12) por espacio de tres días; esto se logró al dejar la luz encendida durante 24 horas (del intervalo 10 al 15). Para regresar a los caracoles a las condiciones iniciales LD 12:12, se mantuvo la obscuridad durante 24 horas (del intervalo 28 al 33). Así permanecieron por espacio de otros tres días.

La presentación gráfica de los resultados se hizo siguiendo el procedimiento mencionado para el experimento I.

### EXPERIMENTO IV.- DISMINUCION DE LA DURACION DEL CICLO LUZ-OBSCURIDAD.

Tuvo una duración de cuatro y medio días, comenzando a las 19 hs.. Pasado un ciclo LD 12:12, se disminuyó la duración del ciclo luz-obscuridad de LD 12:12 a LD 04:04 por espacio de cuatro ciclos y medio (LD 4:4); de manera que en los dos intervalos en los que se esperaba la aparición de la acrofase (7 y 13) en condiciones normales los dos caracoles estuvieran en presencia de luz, ésta fue mantenida también durante el intervalo 7. A partir de intervalo 16, se reasumió el ciclo normal LD 12:12, por espacio de dos días.

Para la representación gráfica de los resultados, se empleó el procedimiento señalado en el experimento II.

### EXPERIMENTO V.- EFECTO DE LA ALIMENTACION SOBRE LA LIBERACION DE LAS CERCARIAS.

El único caracol infectado empleado, recolectado durante la

primera visita a la laguna de Quila, fue sometido a ciclos LO 12:12 por espacio de 11 días. Fue alimentado con lechuga 20 días antes (a partir de su llegada al laboratorio) y sólo durante el día 1 del experimento. El trozo de lechuga fue retirado del recipiente a inicio del segundo día. Los conteos de las cercarias se efectuaron cada 24 horas (por ende, el agua fue renovada una vez al día), siguiendo el método mencionado en el inciso 5.4..

### 5.6. ESTUDIO DE LAS FASES QUE COMPONEN EL CICLO DE VIDA.

A continuación se mencionan las distintas técnicas empleadas en el estudio de las diferentes fases que componen el ciclo de vida de la especie de tremátodo escogida.

Las descripciones están basadas en observaciones hechas y en medidas tomadas, bajo un microscopio fotónico, a partir de: (1) especímenes vivos montados en preparaciones temporales y/o (2) organismos fijados, teñidos y montados en preparaciones permanentes, variando su cantidad según la fase.

Los dibujos se realizaron con el auxilio de una cámara clara, utilizándose en ocasiones este método además para la obtención de algunas medidas importantes (p.e. del estilete).

Todas las medidas están dadas en micrómetros, indicando el mínimo, el máximo, y, entre paréntesis, el promedio.

La identificación de la especie descrita se basó en la morfometría comparada de las distintas fases obtenidas (tanto naturales como experimentales) con aquellas registradas en la literatura especializada.



### 5.6.1. EL ESPOROCISTO.

Se estudiaron los obtenidos a partir de diez moluscos infectados, dos de cada una de las cinco visitas realizadas a la laguna de Quila (ver Tabla 1., en el inciso 6.1.1.2.1.).

Con la ayuda de dos pinzas de punta fina, se rompió y desprendió la concha de los pulmonados vivos, colocando el cuerpo en una caja de Petri de seis cm. de diámetro que contenía solución salina de NaCl al 0.2 % . Con agujas de disección finas y bajo un microscopio estereoscópico, fueron separados los esporocistos del tejido al que se encontraban adheridos; después de ser contados, se realizaron algunas observaciones en relación con su movilidad y su habitat. Para el posterior estudio morfométrico de los esporocistos, con algunos se realizaron preparaciones temporales en solución salina, manipulándolos con pinceles finos, mientras que otros fueron sumergidos en el propio fluido del cuerpo de su hospedero.

### 5.6.2. LA CERCARIA.

Fueron estudiadas, esencialmente, "in vivo" con la ayuda de dos colorantes vitales (rojo neutro y sulfato azul de Nilo) en soluciones acuosas débiles (menores al 1 %), agregadas a la preparación temporal o mezcladas con el "agua de cultivo" utilizada (Cort, 1918; Najarian, 1952a.). Ya que los organismos recién emergidos resultaron ser los más apropiados para este fin, se obtuvieron utilizando el método descrito en el inciso 5.4. .

Debido a que la disminución en la temperatura parece acrecentar la actividad de los protonefridios (Najarian, 1952a.) y por lo tanto permite un mejor examen del sistema excretor de las cercarias, cientos

de larvas recién emergidas se refrigeraron toda una noche en pequeños frascos de vidrio (herméticamente cerrados); las observaciones se efectuaron a la mañana siguiente. Otro método, descrito en el mismo trabajo, más útil aún para determinar el patrón de las células en flama y para hacer resaltar mejor la posición y el número de las glándulas de penetración, es el de macerar caracoles infectados entre porta- y cubre-objetos; al parecer, el fluido del cuerpo del molusco tiene una acción dinámica sobre la actividad de los protonefridios, haciendo más notorias las glándulas de penetración.

Por otro lado, para reducir los movimientos de las larvas y para observar más claramente algunas estructuras, se fue desecando gradualmente la preparación temporal colocando un trozo de algodón o de papel filtro en uno de los márgenes del cubre-objetos; así, se pudo controlar a voluntad la presión ejercida por el cubreobjetos sobre el cuerpo de dichas larvas (Cort, 1918).

Para determinar el comportamiento de las cercarias durante su estancia en el agua antes de penetrar en un segundo hospedero intermediario adecuado, fueron investigados varios parámetros, tales como: (a) longevidad; (b) periodo de infectividad (con larvas de mosquitos culicinos); (c) fases de actividad (natación y reptación); (d) geotropismo y (e) fototropismo. En todos los casos se utilizaron larvas recién emergidas, colocadas en distintos recipientes con "agua de cultivo" a temperatura ambiente, haciendo las observaciones pertinentes a diferentes tiempos bajo un microscopio estereoscópico y respetando los periodos normales de luz y oscuridad. También fue examinado el efecto de la temperatura del agua en la longevidad y en el periodo de infectividad de las cercarias, para lo cual fueron mantenidas a 4, 22 y 28 C.

Los métodos experimentales empleados en el estudio de: (a) la atracción de las cercarias por parte de distintos artrópodos que pudieran actuar como segundos hospederos intermediarios; (b) los sitios apropiados de entrada a larvas de culicinos; (c) su penetración en estas últimas; (d) la respuesta de los hospederos a este fenómeno y (e) el proceso de enquistamiento aunado a sus consecuencias, serán insertados en las diferentes secciones del inciso 6.3.2.3. del capítulo que concierne a RESULTADOS Y DISCUSION.

Con el fin de obtener experimentalmente metacercarias enquistadas para: (a) su estudio morfométrico (ver inciso 5.6.3.) y (b) experimentos de alimentación utilizando hospederos definitivos susceptibles (ver inciso 6.3.4.), se siguieron dos métodos distintos, uno artificial y otro natural; en este mismo orden serán descritos.

Ya que algunas xiphidiocercarias pueden penetrar y enquistarse en substratos artificiales (si son hechos de materiales adecuados), se decidió probar con suero coagulado, tal y como lo propusieron Smyth y Smyth (1980). Para ésto, se colocaron aproximadamente cinco ml. de suero esterilizado en una caja de Petri estéril de seis cm. de diámetro; posteriormente se coaguló en un horno, durante un periodo de 30 a 60 minutos, a una temperatura de 80 C (debido a su esterilidad, las cajas pudieron ser almacenadas por largo tiempo, hasta el momento de su utilización). Para inducir el enquistamiento, fue añadida "agua de cultivo" conteniendo cientos de cercarias a la caja de Petri con la base de suero; acto seguido se iniciaron las observaciones, por espacio de dos horas, bajo un microscopio estereoscópico.

Por ser organismos muy abundantes, fáciles de recolectar, de mantener y susceptibles de ser infectados (Rees, 1952; Angel, 1959; Macy, 1960; Blankespoor, 1977), se escogieron larvas de mosquitos de

varias especies pertenecientes a la Familia Culicidae del Orden Diptera para este propósito; fueron obtenidas de un pozo permanente situado al sur de la ciudad de México, en los meses de septiembre y octubre de 1982 (ver inciso 5.1.2.2.). Ya en el laboratorio, fueron aisladas individualmente en pequeños recipientes de vidrio (de fondo plano) con tres ml. de agua aerada proveniente del mismo cuerpo de agua que habitaban, ya que algunas de ellas presentaron hábitos caníbales. Se agregaron a cada recipiente entre 10 y 20 cercarias recién emergidas, puesto que un número mayor de cercarias mataba a las larvas (ver inciso 6.3.2.5.); el agua fue renovada a la mañana siguiente y cada 24 horas a partir de ese momento. Se aprovechó la oportunidad para realizar observaciones respecto de la atracción de las cercarias por parte de las larvas, de los sitios preferentes de entrada y del proceso de penetración, bajo un microscopio estereoscópico.

Cabe hacer notar que algunas de las larvas infectadas alcanzaron el estado de pupa con el transcurrir de los días. En los distintos experimentos de alimentación se utilizaron únicamente culicidos vivos (larvas y pupas), para asegurar la infectividad de los quistes empleados. En todos los casos tanto las larvas como las pupas fueron inoculadas en "agua de cultivo", con la ayuda de una pipeta Pasteur. Datos tales como: la cantidad de dichas larvas y/o pupas tomadas en cuenta, de quistes suministrados y de hospederos definitivos empleados; la edad de los quistes y de los hospederos y el lapso comprendido entre el momento de la inoculación y el de la disección de los hospederos definitivos infectados fueron vertidos en la Tabla 12., la cual aparecerá en el inciso 6.3.4. para una mejor comprensión de los resultados obtenidos.

Por otro lado, con el objeto adicional de conocer el espectro de los segundos hospederos intermediarios potenciales del tremátodo en cuestión, se intentó la infección de larvas y ninfas de los órdenes Trichoptera y Odonata y de adultos de "pulgas de agua" del género Daphnia sp. (suborden Cladocera de la Clase Crustacea) libres de infección. Para ello, las larvas y las ninfas fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico de 60 cc. de capacidad con 30 ml. de "agua de cultivo" y 100 cercarias recién emergidas por espacio de 12 horas (renovándose el agua cada 24 horas), mientras que los cladóceros adultos fueron montados temporalmente en porta-objetos excavados en presencia de un número reducido de cercarias (entre cinco y diez), efectuándose observaciones durante una hora.

Con el fin de poder comparar las medidas publicadas por Angel (1959) con las que resultaron de la presente investigación, las cercarias fueron fijadas de la siguiente manera: se le añadió un volumen igual de formol al 10 % hirviendo al agua en la que se encontraban nadando, tal y como dicha investigadora lo menciona en su trabajo sobre el ciclo de vida de Plagiorchis maculosus en Australia.

Para ubicar a los rudimentos genitales, se siguió la técnica de tinción: aceto-carmin de Semichon diluida según Knudsen (1966), empleada ampliamente en parasitología. Tanto la manera de cómo se prepara el colorante así como el procedimiento de tinción se pueden consultar en el inciso 9.1. del ANEXO.

La descripción inicial se basó en las observaciones y en las medidas de 20 de los ejemplares liberados de uno de los ocho moluscos infectados, recolectados durante la primera visita a la laguna de Quila, ya que era indispensable que la especie de cercaria a ser utilizada en los distintos experimentos en relación con la

demostración de su ritmo circadiano (ver inciso 5.5.) fuese siempre la misma. Así, a partir de dicha diagnosis, se compararon las siguientes (obtenidas de 20 organismos de cada uno de los moluscos infectados restantes de la primera colecta y de las cuatro siguientes) con la finalidad de eliminar de la investigación a cualquier pulmonado parasitado con una especie distinta de plagiórquido. (ver inciso 6.1.1.2.2.).

### 5.6.3. LA METACERCARIA.

El estudio morfométrico de esta fase se efectuó en aquellas enquistadas presentes tanto en artrópodos hospederos recolectados en su habitat natural así como en los infectados de manera experimental: en éstos últimos las observaciones y las medidas se llevaron a cabo en diferentes intervalos, que variaron entre 15 minutos y 10 días.

La disección "in vivo" de todas las larvas y ninfas (ver incisos 5.1.2.1. y 5.6.2.) se realizó cuidadosamente bajo un microscopio estereoscópico, con la ayuda de pinzas y microbisturíes (construidos especialmente para tal efecto), haciendo dos cortes longitudinales en las regiones laterales del abdomen, poniendo especial atención al revisar el tejido graso (Najarian, 1952b.; 1952c.), inmerso éste en "agua de cultivo". Debido a la transparencia de la cutícula, las larvas de mosquitos (ver inciso 5.6.2.) no fueron disectadas, sino montadas temporalmente "in vivo" en porta-objetos excavados.

En ambos casos, todas las metacercarias enquistadas detectadas fueron primeramente contadas; algunas de las aisladas de las larvas y las ninfas fueron montadas temporalmente y medidas, al igual que un grupo de las metacercarias observadas en las larvas de mosquitos.

Por otro lado, con la finalidad de comprobar la viabilidad de metacercarias enquistadas de manera natural, observadas en el interior de algunos esporocistos (ver inciso 6.3.1.1.) y comparar los adultos obtenidos a partir de metacercarias naturales con aquellos logrados a partir de quistes experimentales, se procedió a infectar un mamífero roedor, obligándolo a ingerir la glándula digestiva y el ovotestis de un caracol parasitado vivo; después de 10 días fue sacrificado y su aparato digestivo examinado bajo un microscopio estereoscópico (ver inciso 5.6.4.). El resultado de este experimento de alimentación se presenta en la Tabla 12., en el inciso 6.3.4. del capítulo 6. de RESULTADOS Y DISCUSION.

Además del estudio morfométrico de los quistes, se realizó otro en metacercarias desenquistadas; para ello, se calentó ligeramente la preparación temporal y se presionó leve y cuidadosamente el cubre-objetos con una aguja de disección.

#### 5.6.4. EL ADULTO.

La búsqueda de esta fase se efectuó tanto en los hospederos naturales como en los infectados experimentalmente, mediante la revisión del aparato digestivo, en organismos muertos, ya sea por diábolos (las aves capturadas en la laguna de Quila), por asfixia (las aves experimentales) o por inhalación de cloroformo (los mamíferos experimentales).

Una vez hecha la disección, el aparato digestivo fue colocado en una caja de Petri de 14 cm. de diámetro con solución salina de NaCl al 0.85 % y abierto con unas tijeras de punta fina, separando el alimento digerido con pinceles finos y agujas de disección. El intestino

delgado fue dividido arbitrariamente en tres porciones de igual longitud, siendo aquí donde las probabilidades de hallar ejemplar adultos era mayor. Los parásitos encontrados fueron pasados temporalmente, con un pincel, a cajas de Petri de seis cm. de diámetro que contenían solución salina (al 0.85 %), anotando la cantidad y el hábitat en la hoja de registro (ver Tabla 12. en el inciso 6.3.4.). Algunos de ellos fueron montados temporalmente para realizar observaciones "in vivo" bajo un microscopio fotónico.

Para su fijación y aplanamiento fueron colocados entre porta-cubre-objetos; después de eliminar el exceso de solución salina con papel filtro cortado en tiras, se aplicó el fijador (AFA; ver el inciso 9.2. del ANEXO) caliente (entre 60 y 70 C) con una jeringa, a través de uno de los bordes del cubreobjetos. Las preparaciones fueron colocadas dentro de una caja de Petri de 14 cm. de diámetro y tapada para evitar que el fijador se evaporase, agregándolo cada que se hacía necesario; 24 horas después los ejemplares fijados fueron transferidos, con un pincel, a recipientes especiales para ser conservados en alcohol al 70 % .

Para su tinción se siguieron dos técnicas conocidas ampliamente en parasitología: (1) Hematoxilina de Delafield y (2) Tricrómica de Gomori (acuosa), según Shore y Ash (1979). En el inciso 9.2. del ANEXO se pueden consultar los métodos seguidos para la preparación del colorante y los procedimientos seguidos, paso a paso.



## 6. R E S U L T A D O S   Y   D I S C U S I O N .

### 6.1. ESPECIES DE CARACOLES RECOLECTADAS.

A lo largo de las cinco visitas a la Laguna de Quila en 1982, se recolectaron tres especies de caracoles, todas pertenecientes al Orden Limnophila Menke, 1828 de la Subclase Pulmonata (Gastropoda: Mollusca). Se clasificaron siguiendo la clave propuesta por Burch y Cruz (1987) para caracoles dulceacuicolas de México. De la primera de ellas, Physella sp. (Physinae: Physidae), emergieron dos cercarias, una perteneciente a la Familia Notocotylidae Luhe, 1909 y la otra a la Familia Haematoloechidae Odning, 1964. De igual manera, de Planorbella (Pierosoma) sp. (Planorbini: Planorbidae) se liberaron otras dos cercarias que fueron ubicadas dentro de las familias Cephalogonimidae (Looss, 1899) Nicoll, 1914 y Omphalometridae Buttner y Sprehn, 1928, respectivamente. Ya que no constituyó un objetivo la presentación de sus morfometrías, éstas serán publicadas posteriormente en alguna revista especializada. De aquí que a continuación se presenten únicamente aspectos de la tercera especie de pulmonado recolectada y de las cercarias que de ella emergieron.

6.1.1. \* FAMILIA LYMNAEIDAE Rafinesque, 1815

\* SUBFAMILIA LYMNAEINAE sensu stricto

\* GENERO Stagnicola Leach (en Jeffreys), 1830

\* Stagnicola sp. (DEL COMLEJO elodes).

La concha de esta especie no es del tipo "succiniforme" (típica del género Pseudosuccinea, frágil y delgada) y presenta una espira levantada dextrógira, al igual que el cuerpo del animal; es de color pardo grisáceo; la abertura es pequeña y oval. La concha del adulto es grande (con más de 20 mm. de altura); su superficie está esculpida con estriaciones microscópicas espiraladas débiles; la columela presenta un pliegue bien desarrollado.

En lo que respecta al animal, en la actualidad se está realizando el estudio morfométrico del aparato reproductor, necesario en la identificación específica, principalmente la proporción entre el pene y el prepucio. Se diferencia de los miembros del género Fossaria por presentar una bolsa prostática y un ciego uterino bien desarrollados. Se diferencia del género Lymnaea porque la próstata anterior presenta un solo doblez, en sección transversal. La rádula es típica de los representantes de la familia, con dientes bicúspides y tricúspides.

6.1.1.1. HABITAT.

Al igual que el resto de los miembros de la Familia Lymnaeidae, esta especie se encuentra abundantemente en sitios pantanosos, pudiendo soportar, inclusive, las bajas temperaturas del otoño y del invierno, al enterrarse en el fango desecado. También se concentra

densamente en el fondo del riachuelo que alimenta a la laguna de Quila y en las charcas temporales que se forman por su desbordamiento. Observada generalmente adherida a la vegetación terrestre sumergida (pastos). De acuerdo con Burch (1982), se le considera como parte del complejo elodes, entre otros rasgos, por habitar en ambientes lénticos, con aguas estancadas o con poca corriente. Nunca fue observada en el cuerpo de agua propiamente dicho de la laguna.

#### 6.1.1.2. CERCARIAS LIBERADAS.

De esta especie de limneido emergieron cuatro cercarias distintas, sin que se presentaran infecciones múltiples en los 1,619 individuos examinados (a diferencia de las observadas por Cort y Rickett (1937) en Stagnicola emarginata angulata). Una de estas cercarias fue ubicada en la Familia Echinostomatidae Foche, 1926; la segunda, en la Familia Diplostomidae Poirier, 1886; las dos restantes, en la Familia Plagiorchiidae (Luhe, 1901) Ward, 1917. Las descripciones de las dos primeras cercarias serán objeto de una publicación posterior e independiente. A continuación nos ocuparemos de las otras dos cercarias examinadas.

##### 6.1.1.2.1. Plagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902.

Durante la primera visita a la laguna de Quila (en el mes de junio de 1982), sólo fueron recolectados caracoles pulmonados del género Stagnicola, ya descrito; algunos de éstos liberaron grandes cantidades de una especie de xiphidiocercaria con un estilete en forma de jabalina, nunca antes registrada para nuestro país. El estudio de su morfometría (ver inciso 6.3.2.1.) nos llevó a ubicarla en el género

Plagiorchis de la Familia Plagiorchiidae; su comparación morfométrica y la del resto de las etapas que componen su ciclo de vida (obtenida natural y experimentalmente) con las demás especies del género revela que se trataba de P. maculosus (ver las distintas secciones del inciso 6.3.).

Debido a lo anterior, en este punto nos limitaremos a examinar uno de los parámetros de la infección propuestos por Margolis, et al. (1982): la prevalencia por esta especie de tremátodo en el limneico Stagnicola sp. a lo largo de las cinco visitas al área de colecta (definida por ellos como el número de caracoles infectados sobre el número total de caracoles revisados, expresada como porcentaje). Los valores de prevalencia obtenidos se muestran en la Tabla 1. Para determinar si la infección era dependiente de la estación del año muestreada, se les aplicó la prueba de independencia de "G", por medio de tablas de contingencia  $n \times m$  (Zar, 1974).

TABLA 1.

C A R A C O L E S				
FECHA DE COLECTA	TOTAL DE REVISADOS	INFECTADOS #	(PREV.)	PRUEBA DE "G"
Junio 12	278	8	(2.88)	B
Julio 10	262	9	(3.44)	B
Julio 24	235	4	(1.70)	BA
Octubre 9	499	5	(1.00)	A
Noviembre 20	345	3	(0.87)	A
	1,619	29	(1.79)	

Con un nivel de significancia de 0.05, la prueba mostró que existen diferencias significativas entre las tres primeras y las tres últimas (señaladas con la letra "B" las de valores más altos y con la letra "A" las de valores más bajos, en la última columna de la Tabla 1.); es decir, que la infección no es independiente de la época del año. Aparentemente existe una variación estacional, característica ésta de zonas templadas y semifrías (Chubb, 1979).

En un estudio similar, Blankespoor (1977) observó que las prevalencias por Flagiorchis noblei Park, 1936 en Stagnicola reflexa y Lymnaea stagnalis de Iowa (E.U.A.) arrojaron valores muy bajos (por debajo del 1%) durante la primavera y principios del verano. Sin embargo, en los meses de agosto y septiembre se presentaron picos en las prevalencias ( 1.14 y 4.33 %, respectivamente ); en ambas especies, las infecciones empezaron a declinar a partir de estas fechas. Este autor consideró que el comportamiento de las prevalencias sugiere que aquellos limneidos que albergaron infecciones de esporocistos durante todo el invierno liberaron cercarias en la primavera y principios del verano, pero murieron con el advenimiento de temperaturas más cálidas. Mientras tanto, los caracoles jóvenes adquirieron la infección a lo largo de la época de reproducción del hospedero definitivo. Así, a mediados del verano estas parasitosis recién adquiridas comenzaron a producir cercarias. En relación a los hospederos definitivos (dos especies de mirlos migratorios: Xanthocephalus xanthocephalus y Agelaius phoeniceus), éstos arribaron en la primavera libres de infección y la adquirieron en las áreas de nidación, siendo las fuentes de infección caracoles o náyades de anisópteros parasitados con metacercarias que sobrevivieron al invierno. El pico en las prevalencias mostrado por la fase adulta de

P. noblei en los mirlos en el mes de julio (época de nidación) probablemente resultó de un mayor consumo de segundos hospederos intermediarios naturalmente infectados. La disminución de la prevalencias en los meses de agosto y septiembre se debió al cambio de la dieta de los mirlos, de artrópodos a semillas, una vez finalizada su época reproductiva. También observó que la longevidad de la fase adulta de esta especie en gorriones (Passer domesticus) infectados experimentalmente fue de aproximadamente 60 días.

Ya que en la presente investigación, el estudiar la variación estacional de la infección a nivel del hospedero definitivo natural de Plagiorchis maculosus no fue un objetivo, no contamos con información suficiente para explicar y relacionar la variación estacional de las prevalencias en los limneidos revisados. Debido a lo anterior, se intentará su análisis con base en suposiciones surgidas a partir de los resultados obtenidos por Blankespoor (1977): es claro que el pico en la prevalencia por la fase adulta de P. noblei coincide con la época reproductiva de sus hospederos definitivos y, por otro lado, que el pico en las prevalencias en los limneidos hospederos se presenta desfasado, aproximadamente dos meses después (tiempo que transcurre entre la ingestión de un miracidio completamente desarrollado y la liberación de las primeras cercarias maduras; éstas son producidas en esporocistos "hijos", originados a partir de esporocistos "madre", desarrollados estos últimos en el interior de un miracidio a partir de una masa de células germinales).

Aunque nunca se revisaron, se observaron "primaveras" (Turdus migratorius) en las inmediaciones de la laguna de Quila, miembro de la Familia Turdidae con hábitos alimenticios omnívoros (incluyendo en su dieta a artrópodos y caracoles). Ya que esta especie resultó ser el

hospedero definitivo natural de Flagiarchis maculosus en la cuenega de Lerma (ver inciso 6.3.4.), suponemos que también en Quila podría actuar como tal (pudiendo incluir además a varias de las especies omnivoras e insectivoras mencionadas en el inciso 6.3.4.). Si su época de reproducción comenzara a principios de la primavera, adquiriría la infección al alimentarse de caracoles parasitados con metacercarias presentes en el interior de esporocistos (ver inciso 6.3.1.1.) que hubieran sobrevivido al invierno y/o de larvas y ninfas de tricópteros y anisópteros infectadas igualmente con metacercarias que hubieran sobrevivido al invierno (ver inciso 6.3.3.1.).

Así, el pico en la prevalencia en los limneidos se presentaría dos meses después; es decir, a finales de la primavera y principios del verano (en los meses de junio y julio). Los resultados mostrados en la Tabla 1. apoyan esta suposición. El decremento de las prevalencias observado desde mediados del verano hasta finales del otoño podría deberse a la combinación de varios factores, tales como: un cambio en la dieta de las "primaveras"; su migración (emprendida una vez que finalizara su época reproductiva); la pérdida de gusanos seniles (dos meses después de haberse establecido en los intestinos de dichas aves) y/o la muerte masiva de limneidos "viejos" infectados el año anterior que hubieran mantenido latente la parasitosis durante todo el invierno, a consecuencia del aumento en la temperatura del agua. Debido a las bajas temperaturas que se presentan en Quila durante los meses del otoño y del invierno (ver capítulo 4.), impidiendo éstas la maduración de las cercarias, esperaríamos valores nulos en las prevalencias en dicho lapso; la siguiente liberación de cercarias coincidiría, entonces, con el advenimiento de temperaturas más cálidas al inicio de la primavera.

#### 6.1.1.2.2. Plagiorchis sp.

Esta especie presentó valores de prevalencia menores al 1 % en las dos últimas visitas a la laguna de Quila. A pesar de que fue casi imposible distinguirla de P. maculosus en cuanto a su morfología y a la forma de su estilete, las medidas corporales, de las distintas estructuras y del estilete resultaron significativamente diferentes; de tal suerte, no existió ninguna dificultad al momento de su identificación. El cuerpo tiene una longitud mayor en una proporción de 2.50:1.00 y el estilete es ligeramente más largo (32-33 vs. 27).

### 6.2. RITMO CIRCADIANO DE EMERGENCIA DE LA CERCARIA DE Plagiorchis maculosus.

#### 6.2.1. PATRON DE EMERGENCIA (Tabla 2.).

La emisión de las cercarias de los cinco limneidos se encontró limitada casi exclusivamente a los periodos nocturnos (escotofases) de los dos nictameros muestreados (ver Tabla 2.), emergiendo menos del 1 % del total en los periodos diurnos (fotofases). Así, y de acuerdo con Combes y Théron (1977), esta cercaria es del tipo "de noche" con alternancia "absoluta".



TABLA 2.

HORAS	C		A		R		A		C		D		L	
	1		2		3		4		5					
DIA 1	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
07-19	5	0.9	1	0.4	14	0.9	0	0	11	1.1	31	0.7		
19-07	567	99.1	239	99.6	1452	99.1	781	100	980	98.9	4019	99.3		
	572		240		1466		781		991		4050			
DIA 2														
07-19	3	0.6	0	0	9	0.7	2	0.3	7	0.8	8	0.2		
19-07	490	99.4	357	100	1203	99.3	692	99.7	858	99.2	3613	99.8		
	493		357		1212		694		865		3621			
	1,065		597		2,678		1,475		1,856		7,671			

El número de larvas liberadas en cada ciclo de 24 horas varió grandemente para cada uno de los caracoles (entre 240 y 1466), debido a que éstos se infectaron en condiciones naturales, probablemente siendo diferente la cantidad de huevos embrionados los comidos, en una o más infecciones a lo largo de la época de reclutamiento (Chubb, 1979).

#### 6.2.2. HORA DE MAXIMA LIBERACION ( Tablas 3. y 4. ).

Sin embargo, en todos los casos se observó sólo un pico (la

acrofase) de emisión durante la escotofase, siendo este período presentándose en el primer intervalo de oscuridad, entre las 19 y las 23 hs., emitiéndose en dicho intervalo entre el 88 y el 100 % de las cercarias para cada ciclo de 24 horas (ver los primeros dos ciclos de cada uno de los tres siguientes experimentos en las Tablas 5., 7. y 9.).

Los resultados que se obtuvieron al dividir en dos fracciones el intervalo en el que se presentaba la acrofase (la 1 de 19 - 20 horas y la 2 de 20 - 23 hs.) se muestran en la Tabla 3.. El número de cercarias liberadas en las horas restantes de la escotofase fue muy pequeño (menos del 1 %).

TABLA 3.

FRAC.	C		A		R		A		C		D		L		TOTALES	
	1		2		3		4		5							
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
1	1070	78.4	80	72.7	421	90.7	323	61.3	575	47.7	2469	67.3				
2	295	21.6	30	27.3	43	9.3	204	38.7	630	52.3	1202	32.7				
	1365		110		464		527		1205		3671					

Está claro que la emergencia de las cercarias principia inmediatamente después del paso del día a la noche; la máxima emisión se presenta en la primera hora de oscuridad (67.3 % en promedio) y disminuye progresivamente a medida que avanza la escotofase. Mas aún, la acrofase pudo ser situada entre las 1930 y las 2000 horas (ver

Tabla 4.), apareciendo en el agua más del 50 % de las larvas en dicho lapso (corresponde aproximadamente al 80 % de las 1,645 cercarias que se liberaron entre las 1900 y 2000 hs.). Esta respuesta rápida del parásito al cambio de iluminación es signo de la influencia preponderante que el fotoperiodo ejerce sobre la periodicidad de la emisión (Théron, 1975).

TABLA 4.

FRACCION 1	C A R A C D L		5		TOTALES	
	#	%	#	%	#	%
1900 - 1930	256	18.8	45	3.8	301	11.7
1930 - 2000	814	59.6	530	43.9	1344	52.3
	1070	(78.4)	575	(47.7)	1645	(64.0)
FRACCION 2						
2000 - 2300	295	21.6	630	52.3	925	36.0
	1365		1205		2570	(100.0)

### 6.2.3. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ILUMINACION SOBRE EL RITMO DE EMERGENCIA.

#### 6.2.3.1. EXPERIMENTO I ; OBSCURIDAD CONSTANTE ( Tablas 5. y 6.; Figuras 2. y 3. ).

A pesar de que los cinco caracoles emitieron sus cercarias de manera continua (ver Tabla 5.), observamos claramente que aún bajo

# EXPERIMENTO I

INTERVALO	No. horas	obs.	TEMPERATURA (°C)		CARACOL NUMERO										suma de cercarias	%		
			bañ.	agua. ambiente	1		2		3		4		5					
					No. de cercarias	%	No. de cercarias	%	No. de cercarias	%	No. de cercarias	%	No. de cercarias	%				
1	7-11	<input type="checkbox"/>	24	22	0	-	2	1.82	0	-	0	-	0	-	1	1.18	3	0.34
2	11-15	<input type="checkbox"/>	24	24	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
3	15-19	<input type="checkbox"/>	24	24	1	0.16	0	-	1	0.83	0	-	1	-	1	1.18	3	0.34
4	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	22.5	44	93.82	108	98.18	158	99.57	84	100.00	85	-	85	97.70	378	90.30
5	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	22	22	83	11.48	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	83	8.50
6	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22	21	25	4.85	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	25	2.88
					890		110		188		84		87		970			
7	7-11	<input type="checkbox"/>	23	23	1	0.58	0	-	0	-	0	-	0	-	1	-	1	0.14
8	11-15	<input type="checkbox"/>	24.5	25	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
9	15-19	<input type="checkbox"/>	25	25	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
10	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	23.0	158	92.40	154	100.00	191	91.00	87	100.00	121	100.00	61	94.52	611	94.52
11	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	23.5	23	8	4.68	0	-	8	9.00	0	-	0	-	17	-	17	2.88
12	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22	22	4	2.34	0	-	0	-	0	-	0	-	4	-	4	0.63
					171		154		100		87		121		638			
13	7-11	<input checked="" type="checkbox"/>	22	22.0	5	3.78	0	-	0	-	0	-	3	8.34	8	-	8	1.98
14	11-15	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	24.5	6	4.54	20	18.96	10	18.18	14	22.98	17	30.36	67	80.36	67	18.34
15	15-19	<input checked="" type="checkbox"/>	23	24.0	2	1.51	43	40.57	28	48.48	21	34.43	20	34.71	11	17.07	11	27.07
16	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	22.5	59	44.70	35	33.02	17	30.90	13	21.31	10	17.86	134	17.86	134	32.88
17	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	22	22	46	34.86	8	7.85	2	3.64	10	16.38	6	10.71	72	17.86	72	17.86
18	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	21.8	21	14	10.81	0	-	1	1.82	3	4.92	0	-	18	-	18	4.39
					182		104		85		61		68		490			
19	7-11	<input checked="" type="checkbox"/>	21	22	106	31.17	6	12.50	9	13.04	3	5.56	4	7.41	128	22.88	128	22.88
20	11-15	<input checked="" type="checkbox"/>	21.5	24.0	28	8.24	11	22.91	20	28.99	10	18.52	11	20.37	50	14.15	50	14.15
21	15-19	<input checked="" type="checkbox"/>	22	24	149	43.82	17	36.42	17	24.64	21	38.89	13	24.07	217	38.41	217	38.41
22	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22	24	22	6.47	10	20.83	7	10.14	13	24.07	17	31.48	69	18.21	69	18.21
23	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	22	23	7	2.06	2	4.17	2	2.90	1	1.85	1	1.85	13	2.30	13	2.30
24	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22	21.5	28	8.24	2	4.17	14	20.29	6	11.11	8	14.82	58	10.27	58	10.27
					340		48		89		64		64		668			
25	7-11	<input checked="" type="checkbox"/>	22	23	31	16.14	5	8.06	6	6.38	4	8.26	6	8.11	52	10.44	52	10.44
26	11-15	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	25	21	10.94	8	8.06	21	22.34	10	13.18	7	9.48	64	12.89	64	12.89
27	15-19	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	28	40	20.83	9	14.82	18	17.02	24	31.58	28	33.78	114	22.89	114	22.89
28	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	24	36	18.75	18	28.81	19	20.21	4	5.25	6	8.11	81	16.27	81	16.27
29	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	22.0	22.5	34	17.71	13	20.97	14	14.90	18	19.74	15	20.27	91	18.27	91	18.27
30	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22.8	22.5	30	15.63	14	22.88	18	19.15	19	25	15	20.27	98	19.38	98	19.38
					192		62		94		78		74		498			
31	7-11	<input type="checkbox"/>	24	24	2	0.39	2	3.18	2	1.47	1	0.94	1	0.70	8	-	8	0.84
32	11-15	<input type="checkbox"/>	25	26	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
33	15-19	<input type="checkbox"/>	25	23.5	0	-	0	-	0	-	8	8.49	2	1.41	11	1.18	11	1.18
34	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	24	24	498	97.26	81	96.82	135	97.78	94	88.88	88	97.19	922	94.34	922	94.34
35	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	23.5	23	10	1.96	0	-	0	-	0	-	1	0.70	11	1.18	11	1.18
36	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22.5	23	2	0.39	0	-	1	0.74	2	1.88	0	-	5	-	5	0.82
					510		63		136		108		142		887			
37	7-11	<input type="checkbox"/>	28	24	0	-	0	-	1	0.83	0	-	0	-	1	-	1	0.18
38	11-15	<input type="checkbox"/>	28	28	0	-	0	-	0	-	1	3.85	1	1.27	2	-	2	0.36
39	15-19	<input type="checkbox"/>	26	26	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
40	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	24	24	248	97.26	78	100.00	118	98.34	28	96.15	78	98.78	347	96.02	347	96.02
41	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	23	23	6	2.35	0	-	0	-	0	-	0	-	6	-	6	1.68
42	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	22	23	1	0.39	0	-	1	0.83	0	-	0	-	2	-	2	0.34
					255		78		120		26		79		538			
<b>TOTALES</b>					<b>2150</b>		<b>621</b>		<b>733</b>		<b>474</b>		<b>613</b>		<b>4591</b>			

TABLA 5.- Experimento I: Obscuridad constante.

# EXPERIMENTO I

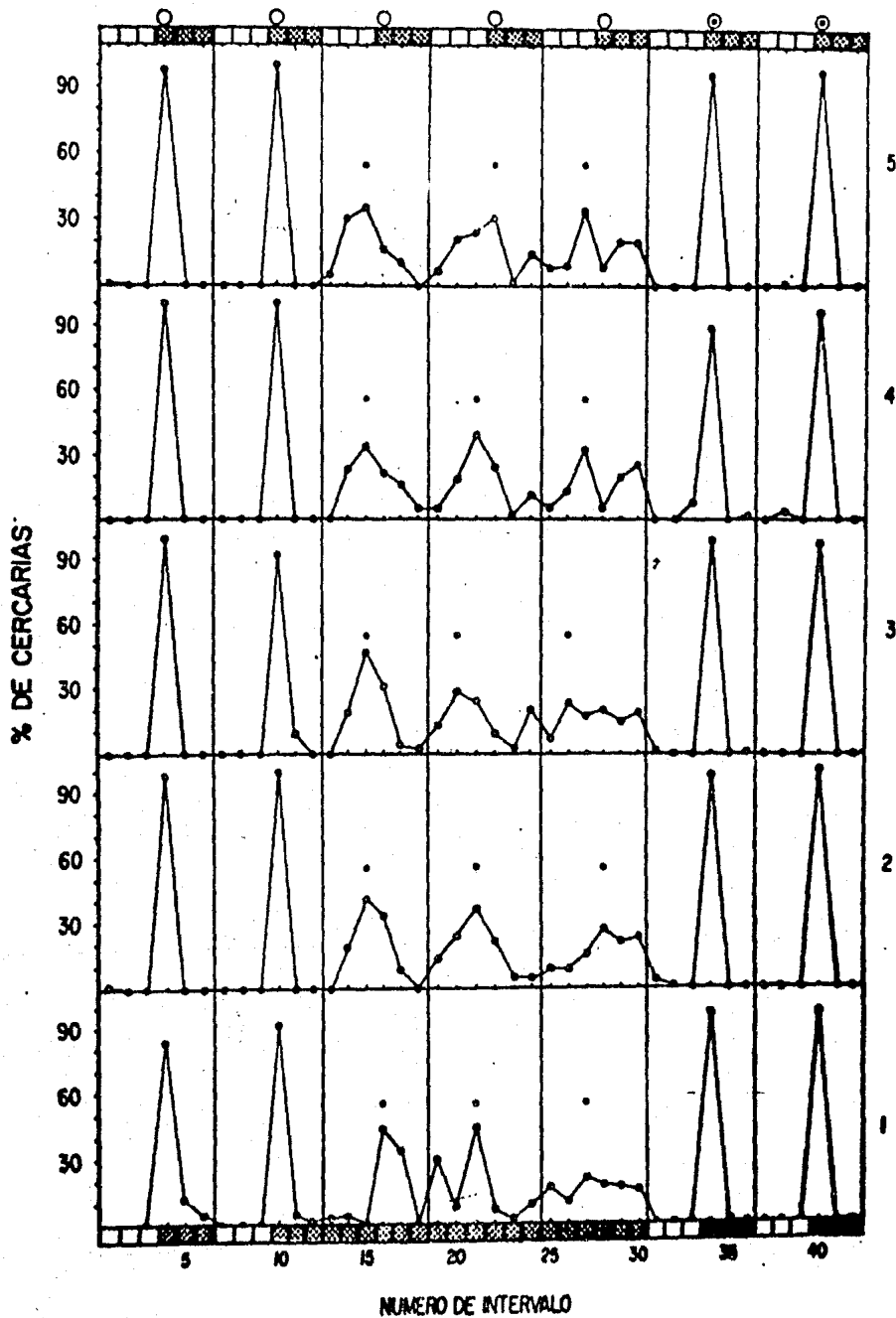


FIGURA 2.- Experimento I: Oscuridad constante. Gráficas individuales de la cantidad de cercarias emitidas por los cinco *Stagnicola* sp.

# EXPERIMENTO I

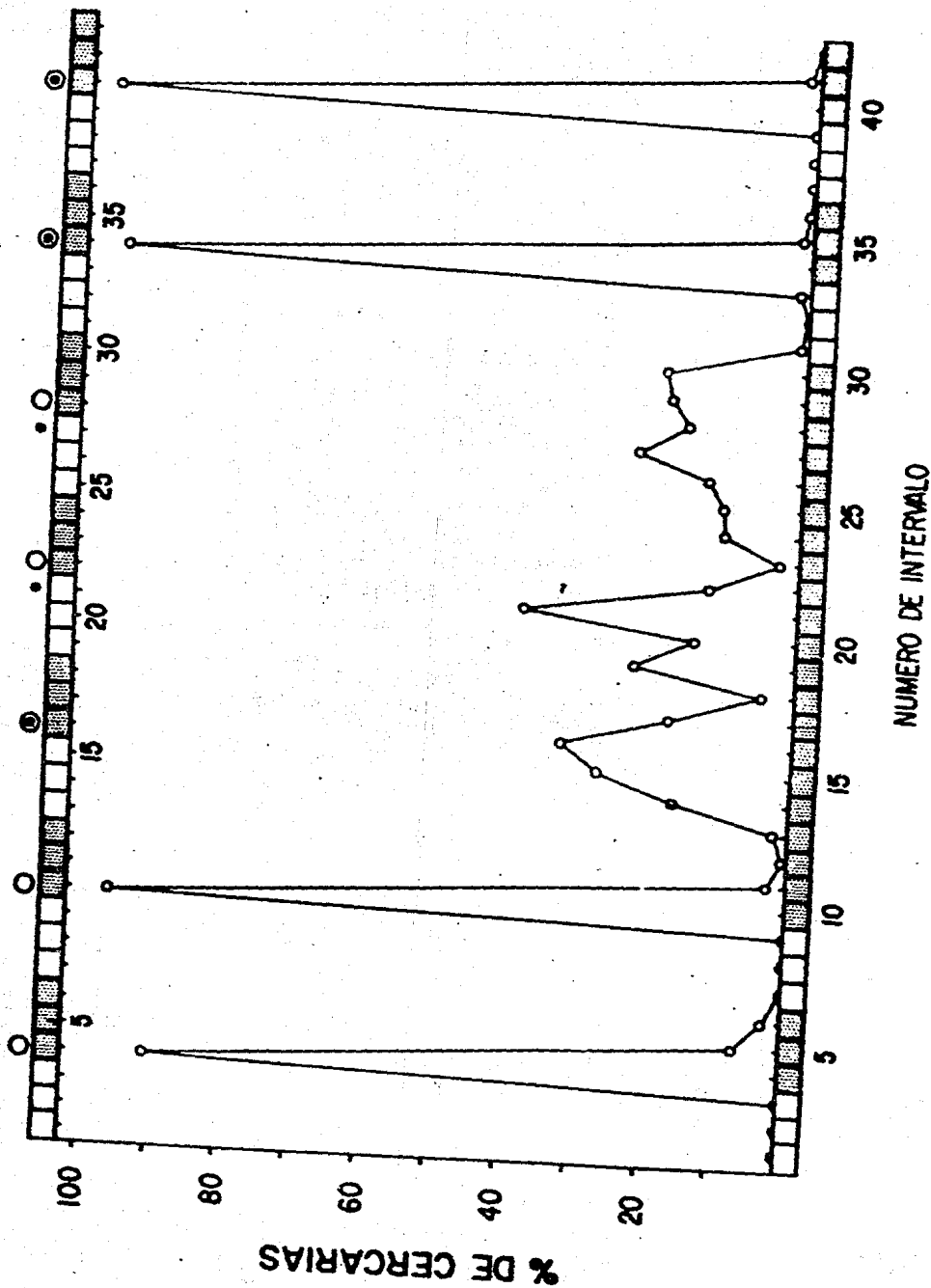


FIGURA 3.- Experimento I: Obscuridad constante. Gráfica del promedio de cercarias liberadas por los cinco limneidos.

esta condición constante, se presenta una clara periodicidad en la emergencia (ver Figura 2.). Sin embargo, es importante hacer notar que se vuelve menos notoria a medida que la permanencia de los limneidos en la obscuridad aumenta.

Como se observa en la Figura 3., si consideramos el porcentaje de cercarias liberadas por los cinco caracoles en cada intervalo, la tercera acrofase (primera en obscuridad constante y señalada con "\*") se presenta justamente en el horario esperado (señalada con "o"), aparentemente sin sufrir cambios. Sin embargo, analizando las curvas individuales de emergencia (ver Figura 2.), observamos un adelanto de un intervalo (cuatro horas) en la aparición de las acrofases (con excepción del limneido # 1). La manifestación de un periodo diferente en el ritmo de emisión de cercarias presentado por los caracoles es un hecho que apoya el carácter endógeno de este ritmo, característica esta última de los ritmos circadianos (ver inciso 1.2.1.). En general, las siguientes dos acrofases en condiciones constantes (cuarta y quinta) son de carácter circadiano respecto a la primera (tercera); es decir, el periodo de tiempo que las separa siempre es cercano a 24 horas (seis intervalos). Así, las tres acrofases se presentan, de manera constante, un intervalo antes del esperado, aunque guardando su periodicidad circadiana.

Por otro lado, al regresar a los caracoles a las condiciones iniciales (L0 12:12), la sexta acrofase coincide con la esperada. En otras palabras, el fotoperiodo sincroniza nuevamente la máxima emergencia, dándose entonces en el intervalo usual; en el séptimo día se da el mismo comportamiento.

En condiciones con fotoperiodo normal, el promedio de cercarias liberadas por los cinco limneidos en los días 1, 2 y 7 (más adelante

se expondrán las razones por las que se incluyó el día 7 y se excluyó al día 6) fue de 720 (ver Tabla 6.), mientras que en condiciones constantes el promedio (indicado entre paréntesis en la Tabla 6.) disminuyó un 32 % (sólo 491). Por otro lado, al igual que en el experimento III (ver inciso 6.2.3.3.) y en otros publicados por diversos autores que trabajaron con cercarias nocturnas de alternancia absoluta (Wagenbach & Alldredge, 1974; Théron, 1975), se observó que después de someter a los caracoles a una fotofase antecedida de una escotofase prolongada, siempre se liberaron las mayores cantidades de cercarias (con respecto al resto de los días muestreados) en la siguiente escotofase. Esta situación se da en el sexto día de este experimento. En promedio, se liberó un 32.9 % más de cercarias (237) con respecto al promedio de los otros días con fotoperiodo normal (957 vs. 720). Si sumamos las larvas emergidas en los días 3, 4 y 5 (escotofase prolongada) a las del sexto día, su promedio (607) sólo resulta un 15.7 % menor al esperado en los días con fotoperiodo normal (720).

TABLA 6.

	C	A	R	A	C	O	L	
DIAS	1	2	3	4	5	TOTALES		
1,2,7	976(325)	332(110)	379(126)	177(59)	287(96)	2161(720)		
3,4,5	664(221)	216(72)	218(72)	191(64)	184(61)	1473(491)		
6	510	63	136	106	142	957		
3-5,6	(293)	(69)	(88)	(74)	(81)	(607)		



Todo lo anterior nos lleva a pensar que, aparentemente, exist un ritmo de producción que podría no estar alterado por la obscuridad constante, aunque estar enmascarado por el ritmo de emergencia. Sin embargo, aunque tal vez no esté alterada la producción, la liberación disminuye en condiciones constantes. Al restablecer el fotoperiodo normal, las cercarias producidas no liberadas anteriormente, emergen adicionales a las propias de la escotofase que procede de la fotofase sincronizadora. La cantidad de cercarias liberadas el último día ya muestra los niveles observados en las condiciones con fotoperiodo normal.

#### 6.2.3.2. EXPERIMENTO II : LUZ CONSTANTE ( Tablas 7. y 8.; Figura 4. ).

Al igual que en obscuridad constante (ver inciso 6.2.3.1.), los cinco limneidos liberaron sus cercarias de manera continua (ver Tabla 7.); sin embargo, también bajo esta condición constante observamos una clara periodicidad en la emergencia, tan evidente como en obscuridad constante (ver Figura 4.), aún cuando se vuelve menos notoria a medida que la permanencia de los limneidos en la luz aumenta.

Como se observa en la Tabla 7., si consideramos el porcentaje de cercarias liberadas por los cinco caracoles en cada intervalo, la aparición de la tercera acrofase (primera en luz constante y señalada con " ⊙ ") sufre un retraso de tres intervalos con respecto a la acrofase esperada (señalada con " ● "). Durante la primera inversión del fotoperiodo del experimento III (luz continua en los intervalos 10 - 15) sucede algo parecido, aunque en ese caso la tercera acrofase (primera en las nuevas condiciones de luz y obscuridad) se presentó en el siguiente intervalo cuando los caracoles fueron sometidos a una

# EXPERIMENTO

## II

INTERVALO.		luz obsc.	TEMPERATURA (°C)		CARACOL			NUMERO		suma de
			agua	ambiente	1	2	3	4	5	
No.	horas				carcerias	carcerias	carcerias	carcerias	carcerias	carcerias
1	19-23	■	21.5	21.5	488	70	296	615	825	2294
2	23-3	■	21	21.5	1	0	0	0	0	1
3	3-7	■	20	21	0	0	0	0	0	0
4	7-11	□	22.5	21.5	0	0	0	0	0	0
5	11-15	□	24.5	23	0	0	0	0	0	0
6	15-19	□	24.5	23.5	1	0	0	0	0	1
7	19-23	■	21.5	22	527	110	464	1365	1205	3671
8	23-3	■	21	21.5	1	0	0	0	8	9
9	3-7	■	20.5	21	0	0	0	0	3	3
10	7-11	□	22.5	21.5	1	0	0	0	0	1
11	11-15	□	23.5	23	0	0	0	0	0	0
12	15-19	□	24	23.5	0	0	0	0	0	0
13	19-23	□	23.5	22.5	7	4	10	0	0	21
14	23-3	□	23.5	22.5	26	30	35	0	0	91
15	3-7	□	22.5	22	43	33	181	0	0	257
16	7-11	□	23.5	22.5	93	50	100	27	0	260
17	11-15	□	24	23.5	123	22	60	3	0	280
18	15-19	□	24.5	24.5	64	9	32	3	0	180
19	19-23	□	24.5	23.5	67	12	8	12	3	102
20	23-3	□	24.5	23.5	22	6	64	9	6	107
21	3-7	□	23.5	22.5	23	2	17	30	0	72
22	7-11	□	24.5	23	113	18	48	4	3	186
23	11-15	□	25	24	57	10	31	0	0	98
24	15-19	□	24.5	23.5	19	10	49	5	2	85
25	19-23	□	24	22.5	42	18	120	18	2	200
26	23-3	□	24.5	22.5	13	7	15	30	1	66
27	3-7	□	23.5	21.5	52	50	39	2	9	152
28	7-11	□	25	23	75	6	36	6	1	124
29	11-15	□	24.5	23.5	70	36	52	15	3	176
30	15-19	□	24.5	23.5	63	13	28	10	3	117
31	19-23	□	24	23.5	43	23	87	42	3	198
32	23-3	□	24	23	30	12	50	15	7	114
33	3-7	□	23.5	22	70	38	48	2	0	158
34	7-11	□	24	23	36	26	19	12	0	93
35	11-15	□	25	24	66	18	77	6	0	167
36	15-19	□	25	24	65	30	153	56	4	308
37	19-23	■	23.5	23.5	186	45	398	1459	2457	4545
38	23-3	■	23	23.5	1	0	0	2	177	180
39	3-7	■	23	22	0	0	0	0	0	0
40	7-11	□	24.5	23	0	0	1	0	0	1
41	11-15	□	25	24.5	0	0	0	0	0	0
42	15-19	□	25	24	0	0	0	0	0	0
43	19-23	■	22.5	22.5	478	270	577	871	798	2994
44	23-3	■	22	22.5	0	1	0	2	1	4
45	3-7	■	22	21.5	0	0	0	0	0	0
46	7-11	□	23.5	22	0	0	0	0	0	0
47	11-15	□	24.5	23.5	0	0	0	0	0	0
48	15-19	□	25	24	0	0	1	0	0	1

**TOTALES      2956      974      3096      4629      5521      1718**

TABLA 7.- Experimento II: Luz constante.

# EXPERIMENTO II

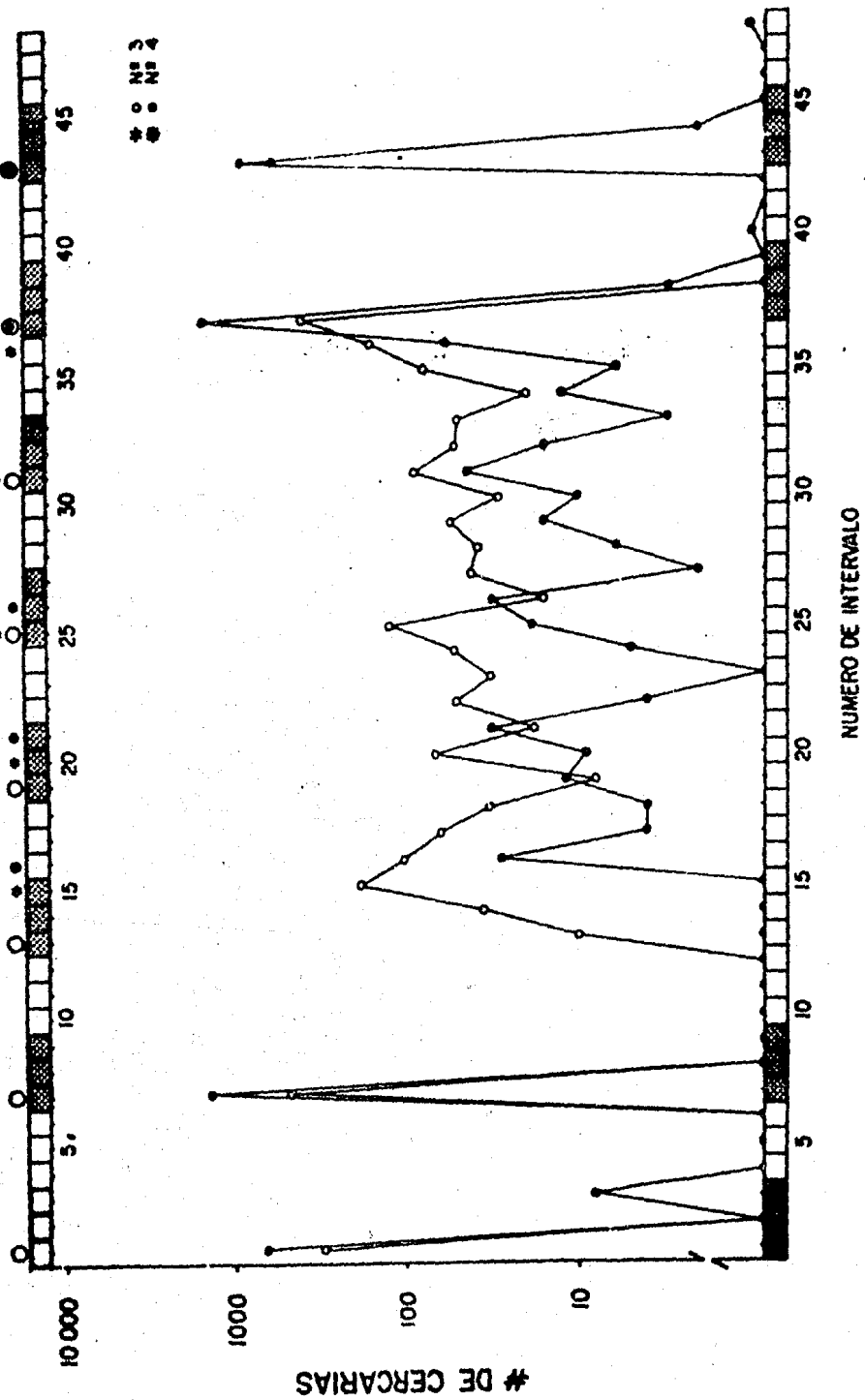


FIGURA 4.- Experimento II: Luz constante. Gráfica individual del número de cercarias emitidas de dos de los moluscos.

escotofase (ver Tabla 9. para los limneidos 2 y 4). En ambos casos, la cantidad de cercarias liberadas en cada uno de los primeros intervalos en las nuevas condiciones (cuatro en luz constante y tres durante la primera inversión del fotoperiodo) va aumentando progresivamente. En luz continua la acrofase se presenta en el cuarto intervalo, mientras que en el experimento III aparece en el tercero.

En la Figura 4. se observa claramente que para los limneidos 3 y 4, las siguientes cuatro acrofases en condiciones de luz constante (señaladas con dos "\*" diferentes) aparecen periódicamente, con una diferencia de cinco intervalos y no de seis como sucede en condiciones normales; es decir, el periodo del ritmo varió, manifestando su "frecuencia en oscilación libre", característica ésta de los ritmos circadianos (ver inciso 1.2.1.). Esta misma situación se da al ser sometidos los limneidos a condiciones constantes de obscuridad (ver inciso 6.2.3.1.).

El acortamiento que el periodo del ritmo exhibió durante los cuatro días de condiciones constantes de luz permitió la existencia de cinco acrofases en vez de las cuatro que se esperaban, en los limneidos 3 y 4 (ver Figura 4.).

Al regresar a los caracoles a las condiciones iniciales (LD 12:12), la octava acrofase coincide con la esperada (ver Figura 4.); este mismo comportamiento se aprecia durante el último día del experimento. Queda manifiesta, nuevamente, la acción sincronizadora del fotoperiodo (ver inciso 6.2.3.1.).

En condiciones iniciales con fotoperiodo normal (LD 12:12), el promedio de cercarias liberadas por los cinco limneidos en los días 1 y 2 fue de 2,994 (ver Tabla 8.), mientras que en condiciones constantes el promedio disminuyó 71 % (sólo 867). Por otro lado, al

igual que en el experimento IV y en otros publicados por investigadores que han trabajado con cercarias "de noche" con alternancia "absoluta" (Wagenbach y Alldredge, 1974; Théron, 1975). se observó que después de someter a los caracoles a una escotofase antecedida de una fotofase más o menos prolongada, siempre se liberaron las máximas cantidades de cercarias (con respecto al resto de los días muestreados) en esa escotofase o en la siguiente. Esta situación se presenta durante el séptimo día (de los limneidos 4 y 5) y el octavo día (de los caracoles 1, 2 y 3). En promedio, se liberó 28.9 % más de cercarias (868) con respecto al promedio de los días con fotoperiodo normal (3862 vs. 2994). Si sumamos las cercarias emergidas en los días 3, 4, 5 y 6 (fotofase prolongada) a las de los días 7 y 8, su promedio (1,886) resulta 37.7 % menor al esperado en los días con fotoperiodo normal (2,994).

TABLA 8.

DIAS	C A R A C O L					TOTALES
	1	2	3	4	5	
1 - 2	1019(510)	180 (90)	760(380)	1988(994)	2041(1021)	5988(2994)
3 - 6	1272(318)	483(121)	1359(340)	307 (77)	47(12)	3468 (867)
7 - 8	665(333)	316(158)	977(488)	2334(1167)	3433(1717)	7725(3862)
3 - 8	(323)	(133)	(389)	(440)	(580)	(1866)

Los números entre paréntesis indican el promedio de cercarias liberadas en los días que se muestran en la primera columna.

El que en esta condición no quede tan clara la probable existencia de un ritmo de producción (a diferencia del experimento I), se debe quizás a que, de existir, se ve alterado de alguna manera (hasta el momento desconocida) debido a la presencia continua de luz. Sin embargo, es significativa la recuperación parcial en las cantidades de cercarias liberadas, pasando de 71 a sólo 37.7 % menos con respecto al promedio observado en condiciones con fotoperiodo normal.

#### 6.2.3.3. EXPERIMENTO III : INVERSION DEL FOTOPERIODO (Tabla 9. y Figuras 5. y 6. ).

En este caso, el ritmo de emisión de las cercarias respondió inmediatamente a la inversión del fotoperiodo; la acrofase se observó (durante los días 3, 4 y 5) entre las 07 y 11 horas, para los cinco limnsidos (ver Figura 5.). De igual forma, una segunda inversión del fotoperiodo provocó el retorno de la mayor emergencia de cercarias (en los días 7 y 8) a las condiciones mostradas inicialmente en los dos primeros ciclos L0. El comportamiento mostrado por las cercarias durante el sexto día del experimento será discutido ampliamente más adelante.

En la Figura 6. se observa que, al ser reemplazada la escotofase del día 3 por una fotofase (intervalos 13 - 15), la emergencia esperada de las cercarias (tal y como se observó en los dos días anteriores, señalada con "o") se ve prácticamente inhibida (liberándose solamente el 10 % del total para el día 3). Como ya se mencionó, la acrofase del día 3 se presentó entre las 07 y 11 horas (liberándose el 77 % de las cercarias), que corresponde al primer intervalo de la escotofase experimental (situada ésta ahora en la

# E X P E R I M E N T O

# III

INTERVALO	No. horas	TEMPERATURA (°C)	CAPACOL				NUMERO				suma de %			
			1		2		3		4		5		sercarias	%
			ago.	ambiente	No. de sercarias	%	No. de sercarias	%	No. de sercarias	%	No. de sercarias	%		
1	19-23	22 22.5	740	98.80	677	99.27	660	98.56	471	99.71	909	99.02	3457	99.00
2	23-3	21.5 22.5	7	0.93	5	0.73	11	1.64	1	0.21	8	0.87	32	0.92
3	3-7	21 21.5	2	0.27	0	-	0	-	0	-	1	0.11	3	0.08
4	7-11	23.5 22.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
5	11-15	24.5 23	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
6	15-19	24 23	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			749		682		671		472		918		3482	
7	19-23	21.5 22	1016	99.22	998	99.83	495	99.20	139	98.56	827	99.40	3075	99.36
8	23-3	21 21.5	5	0.49	1	0.17	3	0.60	2	1.42	4	0.48	18	0.48
9	3-7	20.5 21	3	0.29	0	-	1	0.20	0	-	1	0.12	8	0.17
10	7-11	23 21.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
11	11-15	24 22	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
12	15-19	24 22.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
			1024		999		499		141		832		3088	
13	19-23	23 21.5	0	-	18	2.07	0	-	17	8.01	0	-	38	1.10
14	23-3	22.5 21	0	-	31	3.57	0	-	23	6.79	0	-	54	1.70
15	3-7	20.5 21	0	-	95	10.93	0	-	129	36.06	0	-	224	7.08
16	7-11	20 20.5	711	77.79	704	81.01	132	91.03	188	49.56	741	81.81	2486	77.39
17	11-15	20.5 21.5	56	6.13	18	2.07	13	6.97	2	0.50	166	18.28	256	8.08
18	15-19	21.5 22	147	16.08	3	0.35	0	-	0	-	1	0.11	181	4.78
			914		889		145		339		908		3178	
19	19-23	23 22.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
20	23-3	23.5 22	0	-	4	0.96	0	-	0	-	0	-	4	0.17
21	3-7	22 21	0	-	1	0.24	0	-	0	-	0	-	1	0.04
22	7-11	21.5 22	777	100.00	405	97.12	280	97.56	270	100.00	671	94.62	2308	98.35
23	11-15	22 22.5	0	-	5	1.20	6	2.09	0	-	17	2.00	28	1.20
24	15-19	23 23	0	-	2	0.48	1	0.35	0	-	3	0.50	6	0.28
			777		417		287		270		691		2342	
25	19-23	24 22.5	0	-	1	0.21	1	0.24	0	-	0	-	2	0.08
26	23-3	24 22.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
27	3-7	22.5 22	0	-	1	0.21	0	-	0	-	0	-	1	0.04
28	7-11	22.5 22.5	692	98.83	467	98.52	418	99.04	191	100.00	661	98.39	3219	98.80
29	11-15	22.5 23.5	5	0.85	3	0.83	2	0.48	0	-	6	1.07	16	0.71
30	15-19	23 24	2	0.34	2	0.43	1	0.24	0	-	3	0.54	6	0.36
			699		474		422		191		680		2246	
31	19-23	23 23.5	6	12.00	60	47.82	2	4.08	14	18.67	1	10.00	83	26.77
32	23-3	23 23.5	0	-	42	33.33	31	63.27	26	34.66	0	-	99	31.94
33	3-7	22.5 22.5	42	84.00	22	17.47	15	30.61	33	44.00	8	80.00	130	38.71
34	7-11	25 23.5	2	4.00	1	0.79	0	-	2	2.67	0	-	5	1.61
35	11-15	25.5 24.5	0	-	0	-	1	2.04	0	-	1	10.00	2	0.65
36	15-19	25.5 25	0	-	1	0.79	0	-	0	-	0	-	1	0.32
			50		126		49		76		10		310	
37	19-23	24.5 24.5	943	98.33	403	99.02	413	99.04	143	99.31	920	97.77	2822	98.40
38	23-3	24 24	11	1.15	3	0.74	4	0.96	0	-	16	1.70	34	1.19
39	3-7	23.5 23.5	4	0.42	0	-	0	-	0	-	5	0.53	9	0.31
40	7-11	24.5 24	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
41	11-15	25.5 24.5	0	-	1	0.24	0	-	0	-	0	-	1	0.03
42	15-17	26 25	1	0.10	0	-	0	-	1	0.89	0	-	2	0.07
			959		470		417		144		941		2868	
43	19-23	23.5 24	677	99.71	382	99.48	451	99.12	136	100.00	727	99.18	2375	99.42
44	23-3	23 23.5	2	0.29	1	0.26	3	0.66	0	-	4	0.54	10	0.42
45	3-7	22.5 22.5	0	-	0	-	1	0.22	0	-	1	0.14	2	0.08
46	7-11	24.5 23.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
47	11-15	25.5 24.5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
48	15-19	26 25	0	-	1	0.26	0	-	0	-	1	0.14	2	0.08
			679		384		455		136		733		2389	
<b>T O T A L E S</b>			<b>5751</b>		<b>3958</b>		<b>2945</b>		<b>1770</b>		<b>5493</b>		<b>19917</b>	

TABLA 9.- Experimento III: Inversión del fotoperiodo.

### EXPERIMENTO III

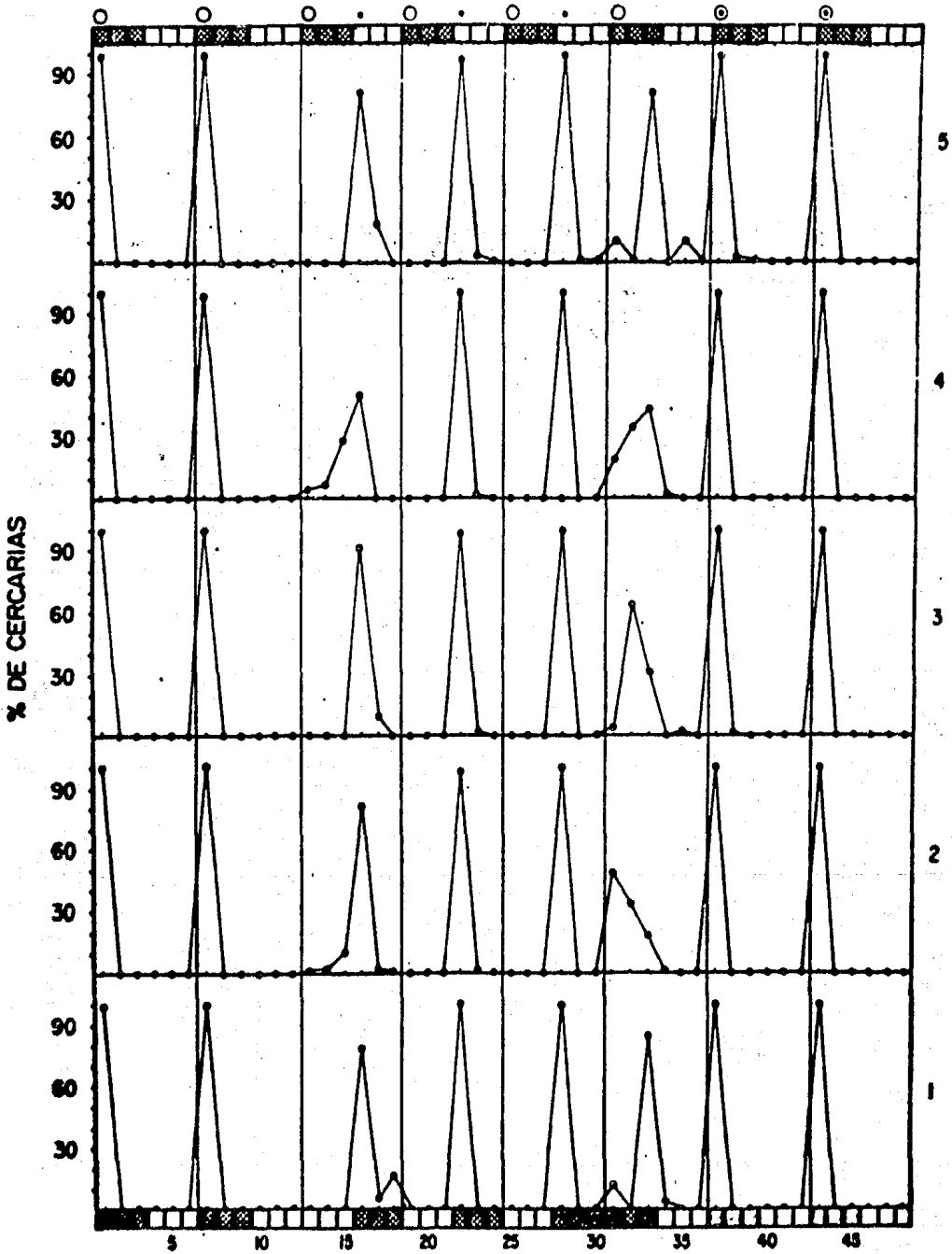


FIGURA 5.- Experimento III: Inversión del fotoperíodo. Gráficas individuales de la cantidad de cercarias liberadas por cada uno de los cinco *Stagnicola* sp.



### EXPERIMENTO III

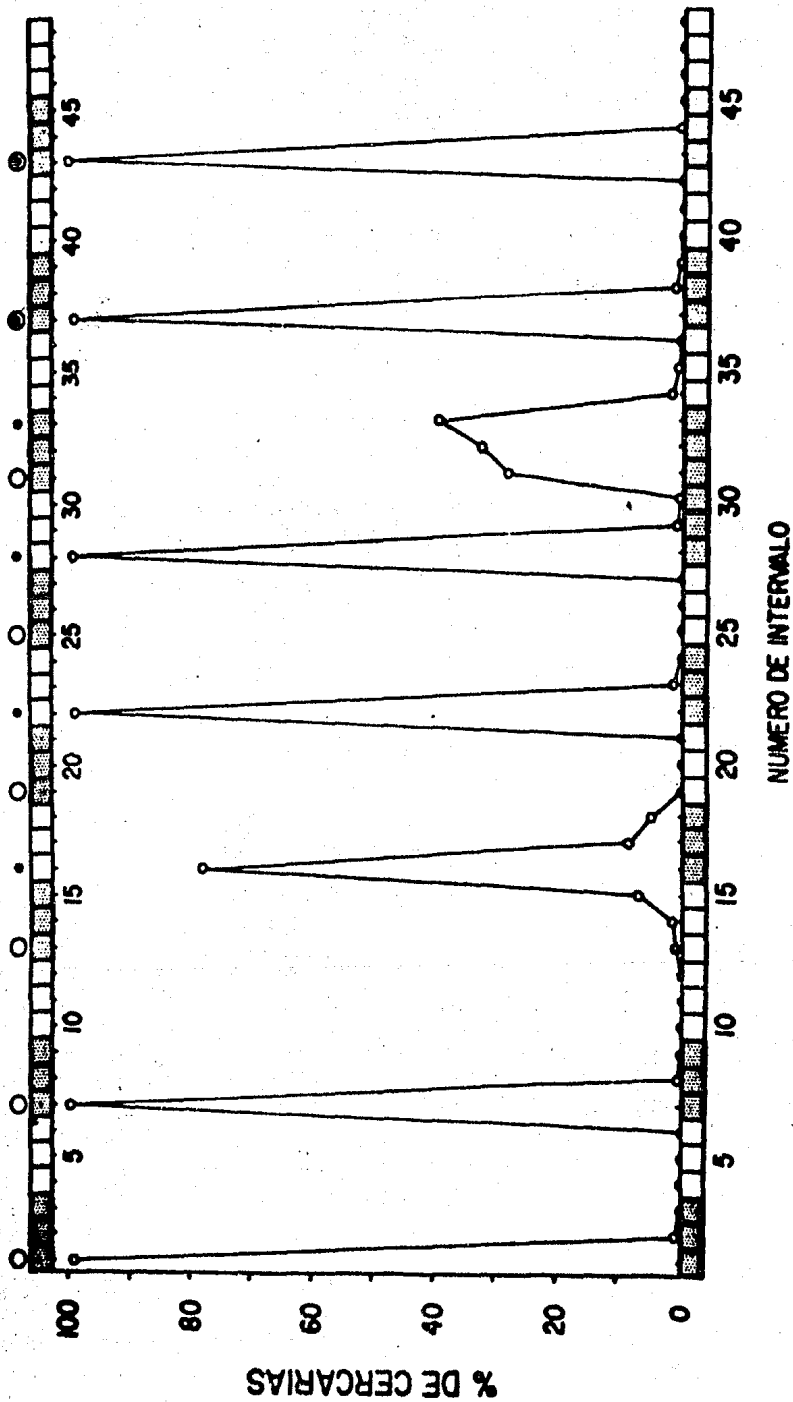


FIGURA 6.- Experimento III: Inversión del fotoperíodo. Gráfica del promedio de cercarias emergidas de los cinco limnoides.

segunda mitad del nictámero). Vuelve a quedar manifiesta la influencia del fotoperiodo sobre el ritmo de emergencia de esta especie de cercaria.

Por otro lado, el reemplazo de la fotofase del día 6 por una escotofase en los intervalos 31 al 33 (es decir, una segunda inversión del fotoperiodo con la finalidad de retornar a los caracoles hospederos a las condiciones iniciales) trajo como consecuencia dos escotofases consecutivas (24 horas de obscuridad). Esta situación provocó a su vez, a diferencia de la anterior, emisiones consecutivas de cercarias, presentándose acrofases en las dos escotofases, siendo las de la primera muy variables (ver Figura 5.); este comportamiento será discutido más adelante. Las de la segunda se dieron, en todos los casos, entre las 19 y 23 horas del séptimo día. En el último día del experimento, de igual forma, las acrofases se presentaron a la hora esperada (ver Figura 6.). Resumiendo, la prolongación de la escotofase sí permitió una emisión continua de cercarias.

Sin embargo, podemos observar en la penúltima columna de la Tabla 9. que la cantidad de cercarias liberadas durante el sexto día (donde se presenta la segunda escotofase consecutiva) es significativamente menor a las contadas en el resto, correspondiendo su número (310) al 11.04 % del promedio de cercarias liberadas por los cinco limneidos durante los otros siete días ( $19607 / 7 = 2807$ ). Existe la tendencia (principalmente en los caracoles 1, 4 y 5) a que el promedio de cercarias liberadas durante los días 6 y 7 se asemeje mucho al promedio de las emitidas, por lo menos, en los días 5 y 8. Por otro lado, es muy claro que en los caracoles 1 y 5 (no tan evidente en el caracol 2) la cantidad de cercarias liberada en el día 7 es la máxima registrada para todo el experimento. Pareciera que

quellas cercarias maduras que ya no emergieron en el día 6 debido, quizás entre otras causas, a la inhibición por parte de la fotofase, se liberaron sumadas a las propias del séptimo día. Vuelve a quedar de manifiesto la posibilidad de la existencia de un ritmo de producción enmascarado por el ritmo de emergencia (ver incisos 6.2.3.1., 6.2.3.2. y 6.2.3.4.).

Como ya se dijo antes, mientras que la primera inversión del fotoperiodo (LO 24:00) provocó que la tercera acrofase (primera en la nueva condición) apareciera en todos los casos nueve intervalos después (ver Figura 5.), la segunda inversión (LO 00:24) trajo como consecuencia la aparición de dos picos: uno mayor nueve intervalos después del cuarto (segundo en la nueva condición en el intervalo 37, al inicio del séptimo día) y otro menor (durante el sexto día) que varió de caracol a caracol (ver Figura 5.). Queda claro, pues, que las dos distintas maneras en las que se logró invertir el fotoperiodo normal (LO 24:00 o LO 00:24), provocó diferencias en la liberación de las cercarias.

El desfasamiento de la tercera acrofase con respecto a la esperada en condiciones con fotoperiodo normal (señalada con "o" en las Figuras 5. y 6.) fue consecuencia directa y conjunta de la fotofase aplicada durante la escotofase normal del tercer día y la escotofase que le procedió. La inhibición ejercida por la luz entre los intervalos 10 y 15 fue similar a la observada durante la fotofase del día 2 y los primeros tres intervalos bajo condiciones de luz constante del experimento II (ver Figura 4.).

Por otro lado, la acrofase menor observada durante la escotofase del sexto día (ver Figura 6.) se presentó cinco intervalos después de la quinta (tercera en las nuevas condiciones), al igual que la tercera

(primera en condiciones constantes de obscuridad) del experimento I (ver Figura 2.), manteniendo ambas su carácter circadiano.

#### 6.2.3.4. EXPERIMENTO IV: DISMINUCION DE LA DURACION DEL CICLO LUZ-OBSCURIDAD (Tabla 10. y Figura 7.).

Al ser expuestos los dos limneidos a cuatro ciclos LO 04:04, a pesar de que continuaron liberando cercarias de manera continua (ver Tabla 10.), se observó una nítida periodicidad en la emergencia, presentándose las cuatro acrofases en las escotofases de los distintos nictámeros. Vuelve a evidenciarse la acción "sincronizadora" que la luz ejerce sobre dicho ritmo de liberación (ver incisos 6.2.3.1., 6.2.3.2. y 6.2.3.3.). Sin embargo, el número de cercarias liberadas durante cada una de estas cuatro escotofases es muy inferior a las cantidades emergidas durante las escotofases en condiciones normales del fotoperiodo.

El atraso en la aparición de la primera y cuarta acrofases en las nuevas condiciones (señaladas con "\*" en la Figura 7.) con respecto a las esperadas (señaladas con "▼") fue consecuencia únicamente de la prolongación de la luz durante el intervalo 7. El objeto de la presencia de luz en estas cuatro horas será discutido más adelante y está en relación con el posible efecto que la temperatura podría tener en la aparición de las acrofases durante las escotofases.

A pesar de que los ciclos LO 04:04 no alteran el patrón de emergencia de la cercaria, sí afectan la cantidad de cercarias liberadas (ver Tabla 10.). Este fenómeno podría ser muy bien explicado con base en la existencia de un ritmo de producción (muy probablemente también circadiano) estrechamente ligado a un proceso de maduración de las cercarias en el interior de los esporocistos "hijos". En general,

# E X P E R I M E N T O I V

INTERVALO	No.	horas	TEMPERATURA (°C)		CARACOL	NUMERO	suma de cercarias	
			obsc.	agua	ambiente	1		2
			<input type="checkbox"/> luz <input checked="" type="checkbox"/> obsc.			No. de cercarias	No. de cercarias	
	1	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	19	20	1475	998	2473
	2	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	18.5	19	6	2	8
	3	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	18	18	0	0	0
	4	7-11	<input type="checkbox"/>	20	20	0	0	0
	5	11-15	<input type="checkbox"/>	21	20.5	0	0	0
	6	15-19	<input type="checkbox"/>	22	21	1	3	4
	7	19-23	<input type="checkbox"/>	22	20.5	1	96	97
	8	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	20	20.5	1203	2073	3276
	9	3-7	<input type="checkbox"/>	22	18.5	16	7	23
	10	7-11	<input checked="" type="checkbox"/>	18	18	158	34	192
	11	11-15	<input type="checkbox"/>	23.5	20.5	15	10	25
	12	15-19	<input checked="" type="checkbox"/>	20	21	464	1277	1741
	13	19-23	<input type="checkbox"/>	22.5	21	11	8	19
	14	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	19.5	20	728	365	1093
	15	3-7	<input type="checkbox"/>	21.5	19	61	34	95
	16	7-11	<input type="checkbox"/>	22.5	20	3	27	30
	17	11-15	<input type="checkbox"/>	24	22	0	55	55
	18	15-19	<input type="checkbox"/>	24.5	22.5	0	88	88
	19	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	21	21	1547	2462	3999
	20	23-3	<input checked="" type="checkbox"/>	20	20	3	7	10
	21	3-7	<input checked="" type="checkbox"/>	19	19	0	0	0
	22	7-11	<input type="checkbox"/>	20	21	0	0	0
	23	11-15	<input type="checkbox"/>	24	22	0	0	0
	24	15-19	<input type="checkbox"/>	24.5	22.5	0	11	11
	25	19-23	<input checked="" type="checkbox"/>	22	22	1328	1824	3152

**TOTALES                      6120                      8366                      15 286**

TABLE 10.- Experimento IV: Disminución en la duración del ciclo luz-obscuridad.

# EXPERIMENTO IV

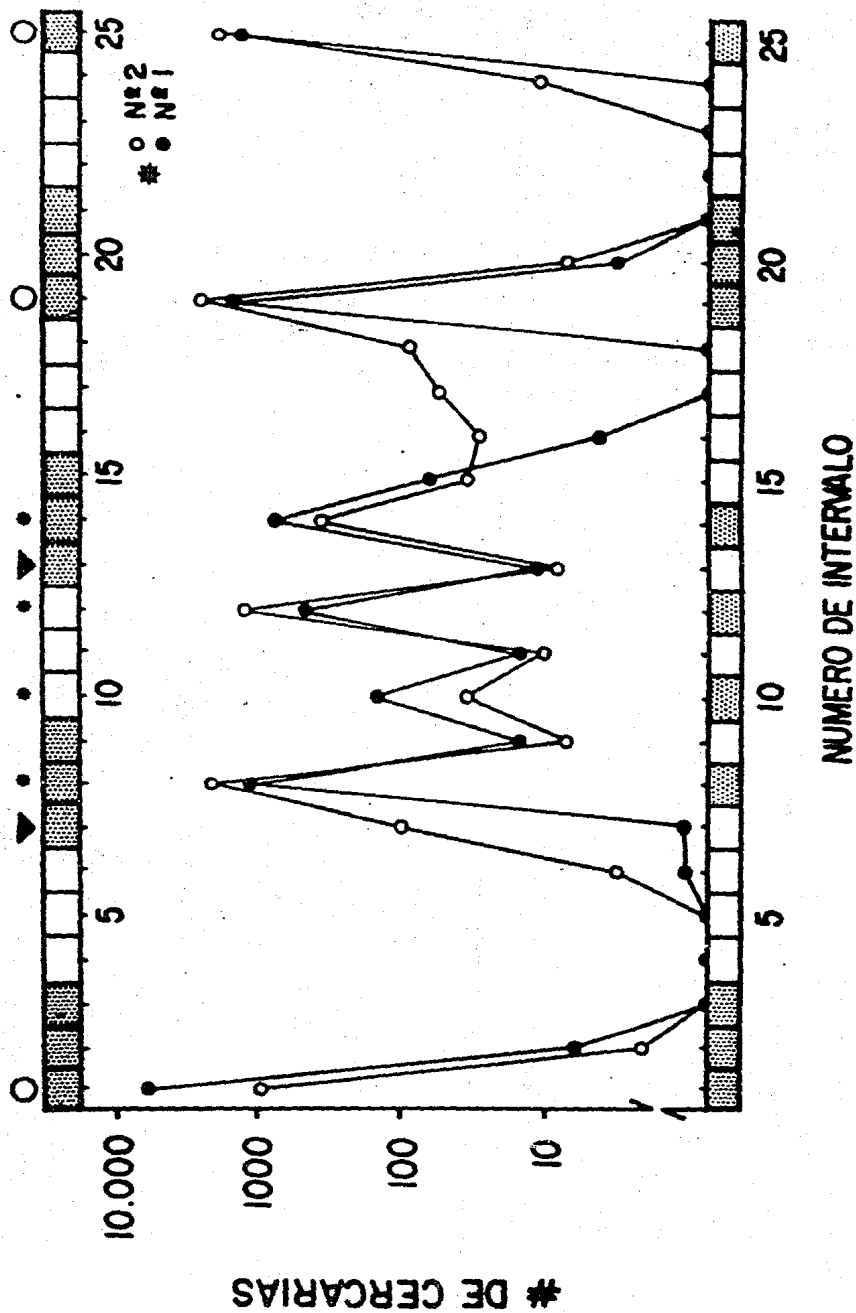


FIGURA 7.- Experimento IV: Disminución de la duración del ciclo luz-obscuridad. Gráfica individual del número de cercarias liberadas por los dos caracoles.

observamos que la cantidad de cercarias emitidas por los dos limneidos durante el intervalo 7 y la escotofase del primer ciclo LD 04:04 (1,204 y 2,169, respectivamente) es similar a las cantidades liberadas durante las escotofases del primero (1,482 y 1,003) y del último (1,328 y 1,842) de los ciclos normales LD 12:12, siendo muy pequeño el número de cercarias emitidas en la fotofase de dicho primer ciclo (16 y 7, en el intervalo 9 de la Tabla 10.). El comportamiento mostrado en el penúltimo ciclo normal (1,550 y 2,470) será discutido ampliamente más adelante. Ahora bien, aunque se liberan mucho más cercarias durante las escotofases de los siguientes tres ciclos LD 04:04, estas cantidades son mucho menores a las emitidas (en general) durante las escotofases de los ciclos normales LD 12:12. Si sumamos el número de cercarias liberadas entre los intervalos 9 y 14 (24 horas), tenemos 1,392 y 1,701, cantidades muy parecidas a las obtenidas en el primero y último ciclos normales y en el primer ciclo LD 04:04 (señaladas anteriormente); es decir, las cercarias liberadas durante los ciclos LD 04:04 segundo, tercero y cuarto (que en conjunto abarcan un lapso de 24 horas) se distribuyen en dichos nictámeros (emergiendo más durante sus escotofases).

En el supuesto caso de que existiera un ritmo de producción aunado a un proceso de maduración, las cercarias que se liberaron en la escotofase del primer ciclo LD 04:04, habrían sido producidas y hubieran madurado a lo largo del ciclo de 24 horas anterior (entre los intervalos 1 y 6) pero liberadas hasta el 8 debido a la presencia de luz en el intervalo 7). De igual modo, las cercarias que habrían comenzado a ser producidas a partir del siguiente día (intervalo 7) hubieran emergido (la inmensa mayoría) hasta el intervalo 13 en condiciones normales de fotoperiodo; sin embargo, la disminución en la

duración del ciclo LD 12:12 a LD 04:04, habría forzado la liberación de las cercarias, emergiendo en las escotofases sólo algunas de aquellas producidas que ya hubieran estado maduras para esos momentos. Sin embargo, la mayoría emergieron en las escotofases inmediata anterior y posterior al intervalo en el que se esperaba al mayor número (el 13, señalado con "▼" en la Figura 7.) de haber estado bajo condiciones normales de fotoperiodo. Este hecho manifiesta la influencia preponderante del ritmo circadiano para determinar la mayor emergencia aproximadamente cada 24 horas y también el fuerte papel inhibitor que desempeña la luz sobre la emergencia, como ya se ha mencionado anteriormente.

Al igual que en el experimento II (ver inciso 6.2.3.2.), al someter a los dos limneidos a una escotofase (intervalos 18 - 21) antecedida de una fotofase más o menos prolongada, se liberaron las máximas cantidades de cercarias (con respecto a los demás días). Este comportamiento también apoya la posible existencia de un ritmo de producción enmascarado por el ritmo de emergencia (ver incisos 6.2.3.1., 6.2.3.2., 6.2.3.3. y los dos párrafos anteriores).

Como ya se mencionó en el inciso 2.1.1., Blankespoor (1977) observó una situación idéntica en la cercaria de Plagiorchis noblei, a la mostrada en este experimento. Así mismo, con base en sus observaciones, consideramos que la temperatura no es el factor responsable ("sincronizador") de la aparición de las acrofases en las escotofases, en condiciones con fotoperiodo normal; es decir, de la ritmicidad circadiana en la emergencia mostrada por la cercaria de E. maculosus, ya que independientemente de las temperaturas del agua variantes a lo largo de los cuatro ciclos LD 04:04, la emisión máxima presenta siempre en las escotofases de los nictameros. Los



distintos experimentos han mostrado, contundentemente, que el sincronizador de este ritmo es únicamente la luz, a través de su acción inhibitoria.

Al igual que en los experimentos I, II y III, al reasumirse la condición LO 12:12 con la misma fase del inicio de este experimento, se observó que los caracoles manifestaron el mismo patrón de emergencia que se había observado en las condiciones con fotoperiodo normal (LO 12:12).

#### 6.2.4. EXPERIMENTO V: EFECTO DE LA ALIMENTACION SOBRE LA LIBERACION DE LAS CERCARIAS (Tabla 11.).

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 11. El número de cercarias liberadas diariamente empezó a declinar significativamente a partir del octavo día (seis días después de haberle retirado el alimento al limneido hospedero), hasta cesar por completo tres días después. Consideramos que esta disminución está en relación estrecha no con el fenómeno de la liberación sino con los de la producción y la maduración de cercarias. Las conclusiones obtenidas por Kendall (1947) y expuestas en el subsiguiente párrafo explican perfectamente el comportamiento exhibido por el limneido parasitado sometido de manera prolongada a la inanición.

TABLA 11.

DIAS	TEMPERATURA		NUMERO DE CERCARIAS
	AMB.	AGUA	
1	22	22	78
2	23	23	162
3	22	22	134
4	23	23	142
5	23	23	76
6	23	23	119
7	24	24	108
8	24	23	42
9	22	22	6
10	23	23	14
11	22	22	0

881

Es importante recordar que todos los pulmonados involucrados en los diferentes experimentos descritos anteriormente fueron alimentados con trozos de lechuga desde el momento de su llegada al laboratorio, así como durante el tiempo que duró cada uno de dichos experimentos, ya que distintos investigadores (Cort, 1922; Pratt y Barton, 1941; Wagenbach & Alldredge, 1974) observaron que el estado nutricional del molusco hospedero influyó significativamente en el número de cercarias liberadas, declinando marcadamente su número en caracoles no alimentados, tal y como sucedió en este experimento.

Así mismo, Kendall (1949) demostró que la tasa a la que las fases intramoluscas de Fasciola hepatica maduran está gobernada por dos factores, ambos relacionados con el abastecimiento de alimento, a saber: (1) la cantidad de alimento consumido por el molusco y, por ende, la cantidad de éste disponible presente en sus tejidos y (2) el número de parásitos (redias) compitiendo por el alimento dentro del molusco, puesto que las grandes cantidades de glucógeno, grasas y

proteínas que se encontraban normalmente presentes en el epitelio y en los senos intertubulares de la glándula digestiva de caracoles no infectados desaparecían en situaciones de infecciones severas, aparentemente siendo estas substancias transferidas a los parásitos. Así, al presentarse una extensa transferencia de alimento de las reservas del caracol al parásito sin que existiera un reemplazo comparable como resultado de una alimentación activa por parte del pulmonado, el desarrollo de las partenitas se veía seriamente retrasado.

Wagenbach y Alldredge (1974) realizaron una investigación en relación al efecto de la luz sobre el patrón de emergencia de la cercaria de Plagiorchis micracanthos a partir del caracol limneido Stagnicola exilis de Minnesota, E.U.A. En uno de los experimentos, el de la inversión del fotoperiodo, observaron que el promedio de cercarias liberadas por once caracoles durante el primer día (más de 1,200) fue disminuyendo gradualmente, habiéndose contado en promedio alrededor de 400 cercarias durante el sexto día. En la discusión aceptaron que esta disminución paulatina resultaba inexplicable, pero que podría estar relacionada con factores nutricionales del hospedero, ya que ellos no los alimentaron durante los distintos lapsos experimentales.

En nuestro caso, los resultados obtenidos en este experimento indican claramente que los distintos comportamientos exhibidos por el ritmo de emergencia de la cercaria de P. maculosus al ser sometidos los limneidos a las diferentes condiciones de luz y de oscuridad (ver incisos 6.2.1., 6.2.3.1., 6.2.3.2., 6.2.3.3. y 6.2.3.4.) no pueden ser explicados con base en factores nutricionales de los limneidos hospederos involucrados.

### 6.3. FASES QUE COMPONEN EL CICLO DE VIDA.

#### 6.3.1. EL ESPOROCISTO.

En ninguno de los caracoles disectados se observaron estados del desarrollo de la primera generación de esporocistos (esporocistos "madre"), lo que coincide con los hallazgos de algunos investigadores para otros representantes de la Superfamilia Flagiorchioidea (McMullen, 1937a.; Macy y Moore, 1958; Buttner et Vacher, 1960; Macy, 1960; Najarian, 1961; Velasquez, 1964; Théron, 1976); sin embargo, la segunda generación (esporocistos "hijos") fue aislada en grandes cantidades; se distingue de la primera generación, principalmente, en que: su habitat es distinto; en su interior se presentan, además de células germinales, embriones de cercarias en distintos estados de desarrollo y su cubierta externa presenta una pigmentación característica. Debido a que fueron aislados esporocistos "hijos" tanto inmaduros como maduros, los trataremos por separado.

##### 6.3.1.1. DIAGNOSIS (ver Figura 8.).

Se basa en la observación y en la medición "in vivo" de 160 sacos de distintas edades y tamaños (disectados cuidadosamente de uno de los tejidos de 8 de los hospederos infectados), de 20 embriones, de 20 cercarias inmaduras y de 50 quistes.

Los esporocistos inmaduros (ver Figura 8a.) tienen forma de sacos elongados, algunos con sus contornos irregulares e inmóviles. Su pared verdadera, de color amarillento, consiste de 2 capas de células, relativamente gruesas, cubierta por una capa más externa compuesta de células aplanadas de forma irregular y llamada el "epitelio primitivo"

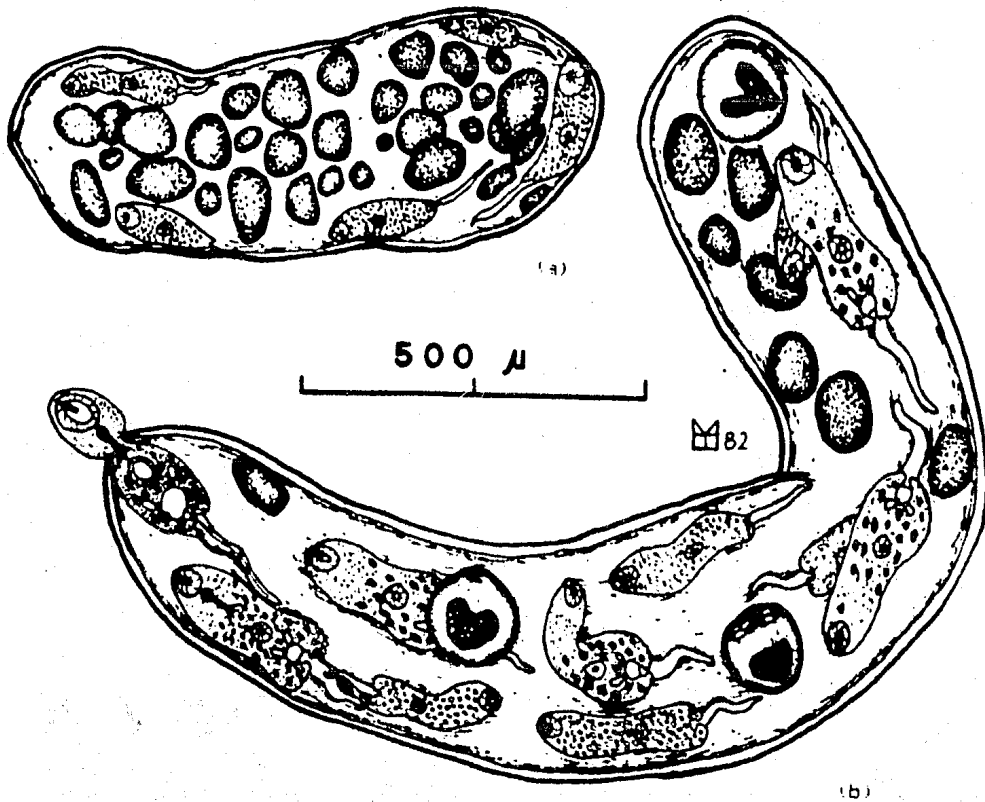


FIGURA B.- Esporocistos "hijos" (de la segunda generaci3n) de Pleqiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902, aislado de la gl3ndula digestiva de Stagnicola sp. (a) Esporocisto inmaduro, mostrando la masa de c3lulas germinales y los embriones de cercarias; (b) Esporocisto maduro, en el que se observa el poro de nacimiento y el desarrollo precoz de metacercarias en su interior.

por Dubois en 1929 (Rees, 1952) y "palelot" por Bieringer en 188  
(Cort y Olivier, 1943); se menciona en muchas de las descripciones que  
en esta etapa han presentado estudiosos de la Superfamilia  
Plagiorchoidea (Cort y Olivier, 1943; Cort y Ameel, 1944; Rees, 1952;  
Cort, Ameel y Van der Woude, 1954), presentando dicha capa una ligera  
coloración anaranjada. Estos sacos alcanzan a medir de 700 - 1,100  
(900) de largo y de 200 - 300 (270) de ancho y contienen un gran  
número de células germinales de distintos tamaños (desde 30 y hasta 80  
de diámetro) y muy pocos embriones de cercarias, en distintos estados  
de desarrollo; los embriones que ya presentan ambas ventosas, la cola  
y la vesícula excretora bien desarrolladas son móviles, midiendo sus  
cuerpos de 180 - 200 (190) de largo y de 60 - 75 (70) de ancho. No  
existe aún evidencia del poro de nacimiento. El aparato excretor está  
representado, en esta etapa, por dos pares de protonefridios unidos a  
dos túbulos nitidamente separados entre sí.

Los esporocistos maduros (ver Figura 8b.) presentan una  
pigmentación más anaranjada en su envoltura externa epitelial, que se  
intensifica con la edad de la infección, persistiendo esta capa a lo  
largo de toda la vida del esporocisto y tornándose más gruesa; en  
conjunto, la pared verdadera se vuelve más delgada. Miden de 1,600 -  
3,000 (2,100) de largo y de 270 - 450 (400) de ancho máximo y  
contienen una menor cantidad de células germinales y una mayor  
cantidad de cercarias inmaduras y maduras (entre 20 y 35, de acuerdo  
con el estado de madurez del saco; los cuerpos de las larvas miden, en  
promedio, 250 de largo y 100 de ancho). Algunos de ellos se encuentran  
unidos entre sí y a la glándula digestiva por uno de sus extremos,  
mientras que otros lo están individualmente; otros más fueron  
conservados sueltos (aunque unidos entre sí por extensiones de sus

cubiertas epiteliales externas) y embebidos en la glándula, pero totalmente separados de ella; todos, inmóviles. El poro de nacimiento, débilmente muscular, fue localizado, en todos los casos, en el extremo más aguzado, observándose claramente sólo en el momento en que una cercaria escapaba a través de él.

Un fenómeno de llamar la atención fue el de que en numerosas ocasiones se observaron casos del desarrollo precoz de metacercarias dentro de algunos esporocistos maduros, nunca vistos en los inmaduros. Todos los caracoles disectados los presentaban; su número varió entre 0 y 4 (2.7) por saco. Los quistes midieron de 105 - 123 (119) de diámetro, valores que coinciden con los registrados para quistes obtenidos de forma natural y experimental en segundos hospederos intermediarios normales (ver inciso 6.3.3.1.). Apparently, no presentaban anomalías; es decir, supuestamente eran infectivos: con una pared en el quiste, las concreciones llenando totalmente la vesícula excretora, el estilete suelto en la cavidad del quiste (en ocasiones ya desintegrado) y la cola ausente (desprendida antes de ser iniciado el proceso de enquistamiento).

HABITAT: Glándula digestiva (hepatopáncreas).

HOSPEDERO: Stagnicola sp.

#### 6.3.1.2. DISCUSION.

Existe poca información acerca de esta etapa de Plagiiorchis maculosus; creemos conveniente transcribir el párrafo (traducido) de Angel (1959) a este respecto: "... los esporocistos eran pequeños y

contenían sólo un número reducido de cercarias. Estas corresponden, en apariencia, a aquellas que Strenzke mostró en sus fotografías (en 1952). Ejemplares formalinizados median hasta 800 (micrómetros) de largo y 140 (micrómetros) de ancho de caracoles infectados 46 días antes; de caracoles infectados 39 días antes, el esporocisto más grande observado media 540 (micrómetros) de largo y 140 (micrómetros) de ancho. Las figuras de Strenzke median de 700 a 1,000 (micrómetros) de largo y de 200 a 250 (micrómetros) de ancho, probablemente tomadas dichas medidas de material "in vivo" y de caracoles recientemente sacrificados. En la presente investigación, los esporocistos fueron examinados hasta que el caracol fuera visto muerto y bajo estas condiciones la mayoría de las cercarias habían ya escapado de ellos, dejándolos más delgados en apariencia. Como lo muestran las dimensiones mencionadas anteriormente, el tamaño probablemente dependa también, en cierto grado, de la edad ...".

Es claro que el tamaño de los esporocistos de la segunda generación depende de su edad, tal y como lo demuestran las medidas mencionadas en nuestra descripción. Seguramente los caracoles (Radix auricularia) disectados por Strenzke en 1952 (Angel, 1959) contenían infecciones jóvenes, mientras que los de Angel (1959) eran más recientes aún (entre 39 y 46 días); la edad de los esporocistos pudo ser calculada ya que Angel infectó a los caracoles (Lymnaea lessoni). En lo que respecta a los limneidos recolectados en la laguna de Quila, éstos se infectaron en condiciones naturales, por lo que es imposible calcular la edad de las parasitosis. Sin embargo, la intensa coloración anaranjada observada en las envolturas externas epiteliales (no presente en los sacos aislados de R. auricularia y L. lessoni) es indicio de un estado avanzado de las infecciones. Por otro lado, es



importante hacer notar el hecho de que la considerable variación observada entre el tamaño de los esporocistos (tanto en los inmaduros como en los maduros) de diferentes infecciones y de una misma infestación, ha sido señalada igualmente para otras especies del género Plagiorchis (Mc Mullen, 1937a.; Cort y Olivier, 1943; Cort y Ameel, 1944; Velasquez, 1964). Debido a lo anterior, consideramos entonces que las medidas dadas en las distintas descripciones tienen muy poca validez si quieren ser consideradas como un caracter específico.

Cort y Olivier (1943) mencionan que una envoltura externa epitelial ("palelot") rodea tanto al esporocisto "madre" como a los esporocistos "hijos" de Plagiorchis muris. Aunque estos autores asentaron que la envoltura externa de los esporocistos "hijos" se deriva del revestimiento epitelial del esporocisto "madre", no hicieron mención del posible origen de la envoltura del esporocisto "madre". Por otro lado, Schell en 1962 (Erasmus, 1974) al describir las generaciones de esporocistos de Glypthelmins quieta (Plagiorchiidae), consideró que tanto la envoltura externa del esporocisto "madre" como la de los esporocistos "hijos" se componía de células de la membrana basal del hospedero. Aparentemente, la proliferación de estas células de la pared intestinal del molusco es un tipo de respuesta local del hospedero a la presencia del parásito. El hecho de que en algunos casos la envoltura epitelial externa adquiriera pigmentación, encaja con el concepto de una respuesta del hospedero.

Pratt y Barton (1941), en un estudio histológico acerca del efecto de una infección severa causada por los esporocistos de Plagiorchis muris sobre el hepatopácreas y el ovotestis de un individuo pulmonado de la especie Stagnicola emarginata angulata,

aseveraron que la mayoría de las partenitas se habían establecido en la zona central de la glándula digestiva, quedando embebidas en el tejido conectivo laxo existente entre los túbulos hepáticos y otras rodeando al intestino, pero nunca en la luz de alguno de dichos conductos. En pocos casos observaron cambios en o degeneración de los túbulos hepáticos; en general, el efecto fue sólo el de reducir el número aparente de túbulos y limitar su presencia a la periferia de la glándula digestiva. Aparentemente, estos daños no le hubieran provocado la muerte, a pesar de tratarse de una infección severa. Sin embargo, les llamó fuertemente la atención la ausencia del ovotestis y del conducto hermafrodita; era obvio que la infección había castrado al limneido hospedero.

De los 29 limneidos infectados (ver inciso 6.1.1.2.1.) recolectados en la laguna de Quila, 10 de ellos fueron sacrificados con el fin de observar y medir a las partenitas; el resto fue mantenido bajo observación de manera indefinida. Todos continuaron liberando cercarias con un ritmo circadiano de emergencia (ver inciso 6.2.) por espacio de entre tres y seis meses, sin que variara mucho la producción individual de larvas a lo largo de dichos periodos. En todos los casos la responsable de la detención de las emisiones fue la muerte de los individuos, como producto (en la mayoría) del aparente avanzado estado de senilidad. Esto nos lleva a pensar que la presencia de una mayor o menor cantidad de esporocistos en las glándulas digestivas de los 19 Stagnicola sp. examinados no fue la causa de los decesos.

El desarrollo precoz de metacercarias dentro de esporocistos ha sido observado previamente en representantes de varios grupos de tremátodos. Mc Mullen (1937a.; 1938) lo encontró en infecciones con

### 6.3.2. LA CERCARIA.

#### 6.3.2.1. DIAGNOSIS (ver Figuras 9., 10. y 11.).

Está basada en la observación "in vivo" de una gran cantidad de larvas totalmente maduras y en la medición de 20 especímenes vivos recién emergidos y 20 fijados con formol.

Xiphidiocercaria perteneciente al grupo "Cercariae armatae" de Luhe, 1909, grupo "Polyadena" de Cort, 1915, modificado por Sewell, 1922 y, de acuerdo con Brooks (1943), a la división "Conniae" del mencionado grupo "Polyadena".

Cuerpo oval, con concavidad ventral marcada, flexible y muy contráctil; carece de manchas oculares, de órgano virgulado y de pigmentación; coloración ligeramente amarillenta; translúcido; completamente cubierto con hileras transversales de pequeñas espinas dirigidas hacia atrás que van disminuyendo en número y en tamaño en dirección del extremo posterior; además de éstas, la cutícula presenta aproximadamente 14 hileras de pelos sensoriales que surgen de pequeñas papilas que sobresalen del tegumento y que rodean el cuerpo, quedando distribuidos más o menos regularmente en toda su longitud (ver Figura 9).

El estilete presenta forma de jabalina (ver Figura 11a.), se encuentra colocado horizontalmente y descansando en el labio dorsal de la ventosa oral dentro de una "vainas", sin que su punta se proyecte más allá del extremo anterior del cuerpo; en sus superficies dorsal y lateral y aproximadamente al final del primer tercio de su longitud desde la punta, existen dos fuertes "alas" (también llamados "hombros"), ausentes en la superficie ventral (ver Figura 11b.); en

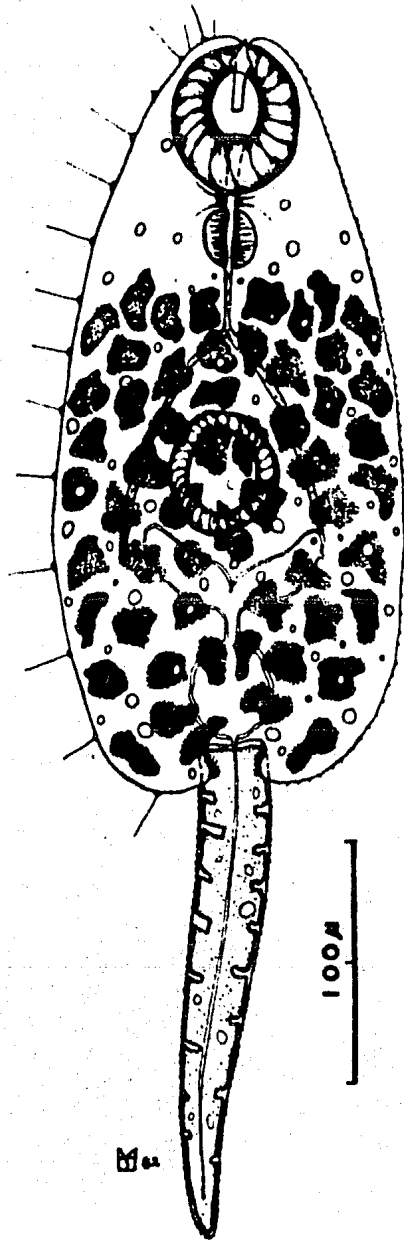


FIGURA 9.- Vista ventral de la cercaria de Plagiorchis maculosus, en la que se aprecian: la posición del estilete; las ventosas; el aparato digestivo; las glándulas cistógenas; las bolsas caudales; la cola y las ornamentaciones cuticulares.

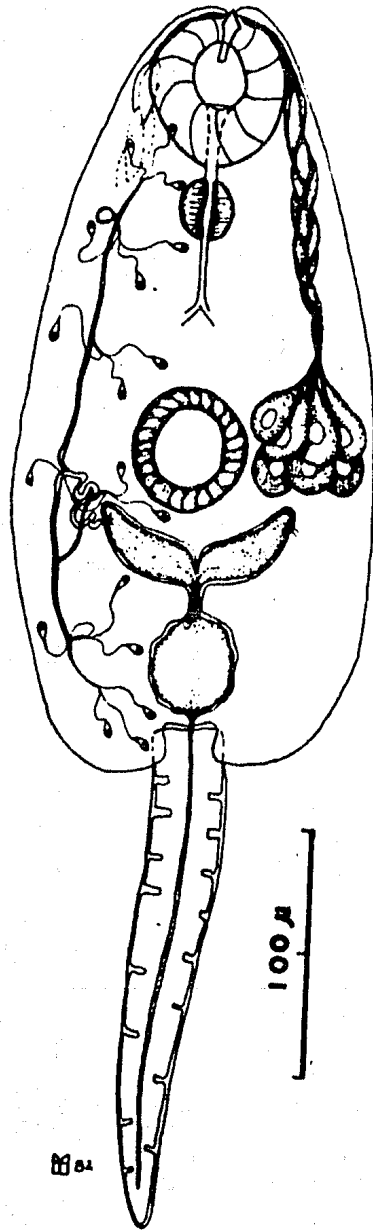


FIGURA 10.- Glándulas de penetración y aparato excretor de la cercaria de F. maculosus, en vista ventral.

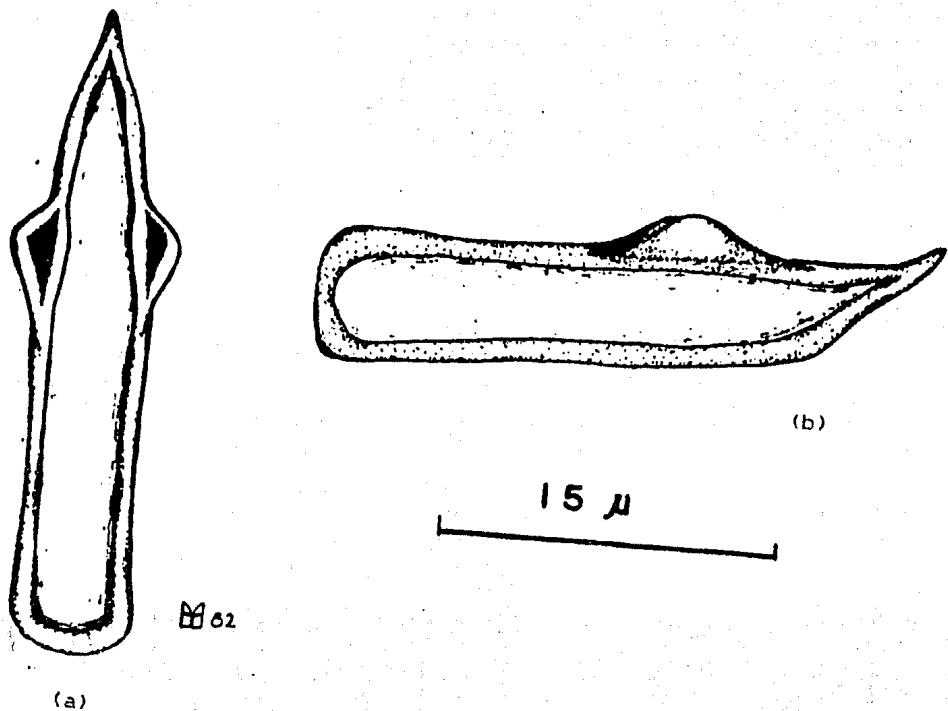


FIGURA 11.- Estilete en forma de jabalina de la cercaria de P. maculosus, armado con dos fuertes "alas". (a) Vista ventral; (b) Vista lateral.

vista ventral se observa que la punta del estilete se curva ligeramente en dirección dorsal; carece de un bulbo basal, aunque su ancho en la base es ligeramente mayor que en el eje, sin que se presenten expansiones laterales o anillos en ésta, vistos en otros estiletes de la división "Conniae".

La ventosa oral es subterminal y ventral, con un diámetro mayor al del acetábulo; en su centro se abre la boca, que comunica con una prefaringe muy corta no visible en organismos en reposo; le sigue una faringe muscular y un esófago delgado de la misma longitud que el órgano precedente y que se bifurca muy por delante de la ventosa ventral; los dos ciegos intestinales son muy delgados, corren laterales a las paredes del cuerpo y terminan en algún punto entre el borde posterior del acetábulo y el extremo posterior del cuerpo. Este último órgano es muscular y se encuentra localizado ligeramente posterior a la mitad del cuerpo (ver Figura 9).

Las glándulas cistógenas son muy numerosas, dorsales, distribuidas en todo el cuerpo, dejando libre de ellas únicamente la región comprendida entre el borde posterior de la faringe y el extremo anterior del cuerpo; sus contornos son irregulares y contienen en su interior pequeños gránulos, que se tifen fácilmente con rojo neutro; en ejemplares vivos presentan una coloración amarillenta muy tenue (ver Figura 9).

Glóbulos de grasa refráctiles, escasos, dispersos por todo el cuerpo, pequeños y de distintos diámetros (ver Figura 9). Existen, además, dos grupos de ocho glándulas de penetración alargadas, dorsales, laterales, pre- y para-acetabulares, formando dos hileras de cuatro en cada una; contienen un citoplasma finamente granular y un núcleo esférico bien visible; se tifen fácilmente con sulfato azul de

Nilo; sus conductos se ensanchan en casi todo su trayecto, adelgazándose en la región de la ventosa oral, un poco antes de desembocar en cuatro poros ventrales, a cada lado del estilete, a medio camino entre las "alas" y su punta; también se tñen con sulfato azul de Nilo (ver Figura 10).

Las bolsas caudales son conspicuas y están provistas con numerosas espinas no muy obvias en sus superficies laterales; la extensión de estas bolsas varía de acuerdo con el grado de contracción del cuerpo (ver Figura 9).

La cola es simple, delgada, más corta que el cuerpo (excepto en condición extendida extrema), está cubierta de espinas y sujeta subterminalmente a la pared ventral del cuerpo; presenta una estructura media en forma de canal, dando la impresión de un conducto excretor (ver Figura 9).

La vesícula excretora tiene forma de "Y", paredes gruesas y con la peculiaridad de ser evidente bajo el menor aumento de un microscopio estereoscópico; se extiende desde la base de la cola hasta el borde posterior del acetábulo. Consiste de dos brazos anteriores que se conectan con la porción impar posterior ovoide por medio de un canal corto; cada uno de los dos conductos colectores primarios se vacía, subterminalmente en apariencia, en cada uno de dichos brazos; antes de dividirse, a la altura del borde posterior de la ventosa ventral, cada conducto colector se enrolla en dirección anterolateral; de éste surgen dos conductos colectores secundarios que recorren lateralmente la longitud del cuerpo; uno anterior, hasta la región de la faringe y otro posterior, hasta la región posterior de la porción impar de la vesícula; ambos conductos reciben a su vez otros más delgados (terciarios) que provienen de tres grupos de tres células en



flama cada uno, unidos a los protonefridios por medio de capilares, siendo la fórmula :  $2 [(3 + 3 + 3) + (3 + 3 + 3)] = 36$ . La porción impar posterior se abre a la región de las bolsas caudales a través de un canal corto y delgado; el poro excretor es terminal y está situado sobre la cara ventral, en la unión del cuerpo con la cola; los movimientos de la vesícula son tales que existe un llenado y un vaciado alterno de los brazos anteriores y de la porción impar (ver Figura 10).

Los ganglios cerebrales están representados por dos áreas claras a ambos lados del extremo anterior de la faringe y están unidos por medio de una comisura evidente, que pasa dorsalmente a la prefaringe; el resto del sistema nervioso no pudo ser observado (ver Figura 9).

Los primordios genitales sólo son visibles en organismos teñidos y montados, hallándose presentes en las proximidades del acetábulo; consisten de una masa de pequeñas células indiferenciadas que comienzan enfrente de la ventosa ventral, sitio en el que se desarrollará el poro genital, recorriendo dorsalmente esta ventosa y continuando por detrás de ella, para terminar a nivel del extremo anterior de los brazos de la vesícula excretora (no señalados en las Figuras).

**MEDIDAS DE LOS ESPECIMENES VIVOS.** Longitud total del cuerpo: 180 - 310 (250); ancho máximo: 80 - 150 (130); diámetro ventosa oral: 47 - 58 (54); diámetro faringe: 21 - 26 (24); diámetro acetábulo: 37 - 45 (40); longitud total de la cola: 115 - 240 (150); ancho en la base: 25 - 40 (35). - **ESTILETE:** longitud total: 26.6 - 27.4 (27); ancho en la base: 4.2 - 4.9 (4.5); ancho del eje: 4.2 - 4.5 (4.3); ancho en las "alas": 7.0 - 8.4 (7.7); distancia de la punta al inicio de las

alas": 5.0 - 5.4 (5.2); proyección de las alas": 1.9 - 2.1 (2.0); longitud de las alas": 6.3 - 7.0 (6.5).

MEDIDAS DE LOS ESPECIMENES FIJADOS CON FORMOL. Longitud total del cuerpo: 120 - 220 (180); ancho máximo: 60 - 110 (95); diámetro ventosa oral: 33 - 40 (38); diámetro faringe: 15 - 20 (17); diámetro acetábulo: 26 - 34 (29); longitud total de la cola: 100 - 130 (110); ancho en la base: 21 - 35 (30).

#### 6.3.2.2. DISCUSION.

Noller y Ullrich (1927) obtuvieron experimentalmente la fase adulta de Plagiorchis maculosus a partir de una " xiphidiocercaria del grupo 'Armatae' " emergida de Lymnaea stagnalis, pero no incluyeron en su publicación la descripción de dicha xiphidiocercaria, solamente microfotografías. Varios años más tarde, Angel (1959) comentó en relación a éstas que, aunque no mostraban mucho detalle, no existía razón para dudar (en cuanto a la morfometría) de la correcta identificación del material de Noller y Ullrich.

En 1952, Strenzke (Angel, 1959) dió las siguientes medidas de cercarias de esta misma especie "muertas por calentamiento ligero": longitud 250-300; ancho 120-140; diámetro de la ventosa oral 60; diámetro del acetábulo 36; longitud del estilete 25-27. Comparadas con las nuestras, se asemejan más a las obtenidas a partir de material vivo; debido a que no conocemos los pormenores del método empleado por Strenzke, no podemos explicar la semejanza observada.

La descripción que Angel (1959) presentó es similar a la deslasmada en el inciso anterior (6.3.2.1.): observó igualmente espinas

corporales; una pequeña prefarínge; un corto esófago; gránulos refráctiles escasos y dispersos por todo el cuerpo; una gran cantidad de células citógenas de color verdoso, con citoplasma finamente granular y núcleo ausente, en la región anterior del cuerpo; los primordios genitales. Sin embargo, no pudo dilucidar el patrón de las células en flama, el cual evidentemente coincide con el de la especie tipo del grupo Polyadena de Cort (1914), Cercaria polyadena (Cort, 1919; McMullen, 1937a.) y con los de otras especies del género Plagiorchis (McMullen, 1937b.; Najarian, 1952a.); el número exacto de glándulas de penetración y de sus conductos; el sistema nervioso. Aunque en la Figura 9. dibuja las bolsas caudales, no las menciona en el texto; tampoco hace referencia a las espinas observadas por nosotros en esa región y en la cola.

Tanto la morfometría del estilete como el supuesto punto de vaciado de los conductos excretores primarios en los brazos anteriores de la vesícula excretora merecen atención aparte. Angel menciona que el estilete en esta especie es muy frágil en presencia de formol y se rompe en sentido longitudinal a la menor presión hecha con el cubreobjetos. Debido a esto, tuvo dificultad para encontrar un número adecuado de estiletos que estuvieran en buenas condiciones y en posición propicia para poder ser medidos. En ejemplares formalizados la longitud del estilete varió entre 21.5 y 24.8, mientras que en organismos vivos entre 24.3 y 28.9, con un ancho de entre 6 y 7 a nivel de las "alas", ancho en el eje uniforme, ensanchándose ligeramente en su base y midiendo entre 4.1 y 4.5, sin presentar un bulbo basal. Ella concluyó que debido a la variabilidad mostrada por la longitud del estilete, no debería ser utilizada ésta como un carácter de diagnóstico en el caso de Plagiorchis maculosus. Brooks

(1943) y Lang (1963), entre muchos otros, no sólo quedaron impresionados por la uniformidad en las dimensiones de estiletes de xiphidiocercarias de la división "Conniae" Brooks (1943) del subgrupo "Polyadena" Cort, 1915 de Sewell, 1922 y, en general, las del grupo "Armatæ" Luhe, 1909, sino también en su forma; inclusive, propusieron el que se utilizara esta estructura en la separación de especies en las que su morfología fuera muy parecida. Con base en la consistencia que mostraron tanto las distintas medidas como la forma del estilete por nosotros examinado, coincidimos con Brooks y Lang; en otras palabras, las variaciones obtenidas por Angel probablemente se debieron a fallas en el método empleado.

En relación al aparato excretor, McMullen (1937b.) asentó que en todas las cercarias del género Plagiorchis los conductos primarios se vaciaban terminalmente en los brazos anteriores de la vesícula. Sin embargo, en todas las xiphidiocercarias que Brooks (1943) incluyó en la naciente división "Conniae" éstos lo hacían subterminalmente. Así mismo, en la cercaria de Plagiorchis goodmani (Najarian, 1952a.) se presenta la misma situación. Angel (1959) concluyó que el supuesto punto de vaciado de los conductos colectores primarios era una cuestión que debería ser tratada con reserva, ya que el enrollamiento de los conductos primarios y accesorios aunado a otros factores, hacían que en ocasiones el punto de vaciado pareciera terminal y en otras subterminal.

En 1909, Luhe (Najarian, 1952a.) creó el grupo "Armatæ" para incluir xiphidiocercarias que carecieran de una aleta caudal y cuyas longitudes corporales sobrepasaran los 250 micrómetros. Cort (1914) erigió el grupo "Polyadena", en el que incluyó a cercarias que se desarrollaban en esporocistos alargados; con cola delgada y más corta

que el cuerpo; con un acetábulo situado por detrás de la línea media transversal del cuerpo y menor que la ventosa oral; con un estilete seis veces más largo que ancho, con una longitud aproximada de 30 micrómetros y con engrosamientos (las "alas" u "hombros") a dos terceras partes de la distancia desde la base hacia la punta; con seis o más pares de glándulas de penetración a cada lado del cuerpo, entre la faringe y el acetábulo; con una vesícula excretora en forma de "Y"; con una prefaringe muy corta y una faringe pequeña presentes; con un esófago de longitud variable y con ciegos intestinales (cuando existen) que alcanzaran el extremo posterior del cuerpo. Cort sugirió la posibilidad de que las formas americanas de este nuevo grupo pertenecieran a la subfamilia Plagiorchiinae Pratt, 1902. En 1922, Sewell modificó el grupo "Polyadena" de Cort y lo colocó como un subgrupo del grupo "Armatae". Brooks (1943) sugirió la erección de la división "Conniae" del subgrupo "Polyadena" para incluir a aquellas cercarias que carecieran de aleta caudal; que tuvieran el estilete en forma de jabalina y sin bulbo basal y que presentaran glándulas cistógenas evidentes, ya que las cinco cercarias por Brooks estudiadas e incluidas en la reciente división "Conniae" parecían formar un subgrupo natural.

El descubrimiento de una gran cantidad de cercarias del subgrupo "Polyadena" Cort, 1915 modificado por Sewell en 1922 confirma la suposición de Cort (1914), ya que todas han sido incluidas en los diferentes géneros de miembros de la subfamilia Plagiorchiinae; por ejemplo, Cercaria baldai (Nasir, 1964) y C. urceus (Nasir y Acuña-Cedeño, 1966) son muy semejantes a la cercaria de Opisthoglyphe locellus (Macy y Moore, 1958). Así mismo, Brooks (1943) tenía razón, ya que todas las cercarias descritas a partir de la creación de la

división "Conniae" y que se han incluido en ella son la fase larvaria de miembros del género Plagiorchis (McMullen, 1937a.; Najarian, 1952a.; Buttner y Vacher, 1960; Macy, 1960; Lang, 1963; Velazquez, 1964; Williams, 1964 y Théron, 1976, por citar algunas).

Por lo anterior, son muchas las características las compartidas por las especies de cercarias del género Plagiorchis, además del tipo de caracol hospedero (todos de la Familia Lymnaeidae); sin embargo, existen diferencias en su morfometría y, principalmente en las medidas del estilete. Así, tanto el cuerpo, la cola, las ventosas como el estilete de la cercaria de P. muris (McMullen, 1937a.; Lang, 1963) son mayores que en P. maculosus; además, los gránulos refráctiles son mucho más abundantes y las bolsas caudales carecen de espinas en la primera. La cercaria de P. proximus (= Cercaria polyadena Cort, 1914) (Cort, 1919; McMullen, 1937a.; Lang, 1963) es muy semejante a la de P. muris, aunque su cuerpo está prácticamente libre de gránulos refringentes y su estilete es ligeramente más corto (36 vs. 31). La cercaria de P. micracanthos (McMullen, 1937a.) es ligeramente más pequeña que la de P. muris, midiendo su estilete 30; la diferencia más obvia es el carácter de los gránulos refringentes, ya que los de P. micracanthos, aunque muy numerosos, tienen un menor diámetro y puede verseles frecuentemente agrupados en racimos. La cercaria de P. noblei (Williams, 1964) es ligeramente mayor a la de P. maculosus, al igual que su estilete (27 vs. 32).

Las cercarias de P. vespertilionis parorchis (Macy, 1960) y de P. goodmani (Najarian, 1952a.) merecen tratamiento aparte, puesto que la fase adulta de la primera fue considerada por Odening (1961) como una raza geográfica de P. maculosus y porque la segunda es la que más se asemeja a la cercaria de P. maculosus. La discusión que hicimos

sobre la apreciación de Odening (1961), puede apreciarse en el inciso 6.3.4.3. del capítulo 6. de RESULTADOS Y DISCUSION, tomando en cuenta las similitudes y las diferencias anotadas a continuación.

Las semejanzas mostradas por las cercarias de P. vesperilionis parorchis emergidas de Lymanaea stagnalis de Washington, E.U.A. y P. maculosus emitidas de Stagnicola sp. de la laguna de Quila, Edo. de México, son las siguientes: la forma del estilete; el ancho máximo del cuerpo; la longitud de la prefaringe; el diámetro del acetábulo; la cantidad, el tamaño y la distribución de los gránulos refringentes; el diámetro de la faringe; el número y la distribución de las glándulas cistógenas; la posición y la forma de la vesícula excretora; las medidas de la cola y, finalmente, los patrones de emergencia, siendo ambas consideradas como cercarias "de noche" con alternancia "absoluta" (ver incisos 2.1.1. y 6.2.1.). Las diferencias estriban en: la longitud corporal (la de la primera es mayor: 220 vs. 180); la extensión de las espinas cuticulares corporales (sólo presentes en el primer tercio); la existencia de pelos sensoriales (ausentes en la especie de Macy) y el diámetro de la ventosa oral (mayor en la primera: 48 vs. 38). Macy (1960) no pudo observar el resto del aparato digestivo, la cantidad y la posición de las glándulas de penetración y el patrón de las células en flama, por lo que no es posible hacer comparaciones en estos campos.

En cuanto a las diferencias observadas entre la cercaria de P. goodmani (Najarian, 1952a.) emergida de Lymnaea palustris de Michigan, E.U.A. y la de P. maculosus, tenemos las siguientes: el grosor de la base del estilete (mayor en la primera); la extensión de las glándulas cistógenas (hasta la región de la faringe en la de Najarian); la longitud de la prefaringe (mayor que en la de la laguna de Quila); la

longitud del esófago (menor); la extensión de los ciegos intestinales (muy cortos en la cercaria de F. goodmani); el diámetro de la ventosa oral (mayor en la primera: 58 vs. 38) y el diámetro del acetábulo (mayor en la primera: 36 vs. 29). Consideramos que estas diferencias, aunadas a las existentes entre sus fases adultas, son suficientes como para mantenerlas como especies distintas.

#### 6.3.2.3. BIONOMIA.

##### 6.3.2.3.1. GENERALIDADES.

En condiciones naturales de luz y de obscuridad, un gran número de cercarias emergió únicamente en las escotofases, al igual que en situaciones controladas (ver inciso 6.2.), siendo la emisión de éste circadiana.

Los 19 pulmonados infectados mantenidos indefinidamente en el laboratorio liberaron cercarias diariamente, de manera periódica, por periodos muy variables. Un limneido maduro liberó más de 700 cercarias cada 24 horas antes de perecer, por espacio de seis meses, probablemente debido a su estado de senilidad. En ninguno de los casos sucedió que un caracol continuara vivo sin liberar cercarias (habiéndose estado alimentando frecuentemente con lechuga). La disección de los 19 caracoles mostró una gran cantidad de esporocistos "hijos" llenos de cercarias inmaduras y células germinales.

Es bien sabido que la duración del periodo en el que las cercarias son liberadas estará en estrecha relación con las longevidades y las productividades tanto del esporocisto "madre" como de los esporocistos "hijos" (Erasmus, 1974). La extensión de la



producción de cercarias también se verá afectada por la presencia de un poro de nacimiento en el esporocisto, lo que permitiría la liberación de larvas durante lapsos prolongados, mientras que si ésta se efectuara por medio de la ruptura de la pared del esporocisto, la producción de cercarias no sería un proceso continuo.

Una de las características propias del desarrollo de los representantes del género Plagiorchis es la marcada longevidad de los esporocistos "hijos" y la gran cantidad de cercarias que una sola infección puede producir. De hecho, parece ser que esta alta producción de cercarias es común a todos los miembros de la Superfamilia Plagiorchoidea (Cort y Olivier, 1943). En el caso de Plagiorchis muris, cada esporocisto "hijo" produce varios cientos de cercarias a lo largo de su vida, siendo de casi un millón el número desarrollado a partir de un solo miracidio. Esta altísima productividad es lograda, en parte, gracias a una considerable multiplicación de un número reducido de células germinales apartadas durante el desarrollo del miracidio para formar los varios cientos de esporocistos "hijos" que un solo esporocisto "madre" produce. Más importante es, sin embargo, la habilidad reproductiva de las grandes masas germinales que se desarrollan en los esporocistos "hijos" antes de migrar del esporocisto "madre"; por medio de un tipo especial de poliembrionia, éstas producen un flujo constante de embriones de cercarias durante todo el lapso que dure la infección. Las cercarias, una vez maduras, abandonan el esporocisto a través de un poro de nacimiento presente en su extremo más aguzado. Este poro permite, a su vez, que la emisión pueda darse de manera continua y por periodos muy prolongados (varios meses).

Al igual que P. muris, y de acuerdo con las observaciones

anteriores, Plagiorchis maculosus también posee la capacidad de producir grandes cantidades de cercarias y por lapsos de tiempo muy prolongados. Esta habilidad contribuye, contundentemente, al éxito que esta especie tiene como parásito (ver incisos 6.3.4.2. y 6.4.).

#### 6.3.2.3.2. LONGEVIDAD, FASES DE ACTIVIDAD Y TROPISMOS.

Una vez emergidas de un caracol infectado, tienen una longevidad de 48 horas, en "agua de cultivo" y a temperatura ambiente promedio de 22 C. Sin embargo, la habilidad de las cercarias para penetrar la cutícula de los segundos hospederos intermediarios cesó aproximadamente 18 horas después de haber emergido del limneido. Fue observado además, que la temperatura del agua ejerció un efecto muy pronunciado tanto en su longevidad como en su infectividad: aquellas mantenidas a 4 C vivieron por espacio de más de ocho días y fueron incapaces de penetrar a su siguiente hospedero después de 40 horas; por otro lado, aquellas mantenidas a 28 C tuvieron una vida media de 24 hs. y ya no pudieron penetrarlos después de 10 horas.

A temperatura de laboratorio (22 C), se presenta una fase inicial de actividad durante las primeras 18 hs., en la que todas las cercarias nadan vigorosamente, mientras que en las siguientes 14 hs. el número de organismos activos nadadores va disminuyendo, hasta que a las 32 horas de haber emergido prácticamente todos los organismos se encuentran en el fondo del recipiente y se desplazan con la ayuda de sus dos ventosas (al igual que las sanguijuelas y los gusanos "medidores"); ésta constituye la segunda fase de actividad. Durante las últimas ocho hs., el movimiento va desapareciendo paulatinamente hasta que mueren, la mayoría con la cola desprendida.

Sin embargo, las cercarias también reptan durante la primera fase: debido a su geotropismo negativo, nadan ascendentemente hasta la superficie del agua, momento en el que el movimiento cesa y comienza un periodo de hundimiento que suele ser rápido, suponemos que debido al peso de su cuerpo. En ocasiones, la natación la reasumen antes de tocar el fondo, pero frecuentemente al tocarlo reptan por lapsos veces cortos y a veces largos, a una velocidad promedio de 3.0 mm./min., reanudando después los movimientos de natación ascendentes. Por lo tanto, las larvas recién emergidas alternan periodos de natación con periodos de hundimiento y reptación.

Es importante señalar que justo antes de iniciar la natación, la cercaria flexiona su cuerpo de manera tal que su extremo posterior toma la forma de "U", estando la cola completamente extendida. Ya en acción, la cola se desplaza como látigo, con movimientos vibratorios vigorosos, mientras que el cuerpo, siempre por debajo, muestra un nodo estacionario en su centro, tal y como sucede en otras cercarias del mismo género (Najarian, 1952a.).

En cuanto a su fototropismo, responden muy poco a los cambios en la intensidad de la luz, por lo que podría ser considerado como un fototropismo negativo.

#### 6.3.2.3.3. ATRACCION POR EL 2do. HOSPEDERO INTERMEDIARIO.

Al parecer, las cercarias no se ven atraídas por las larvas de culicinos, sino que nadan fortuitamente en el agua hasta entrar en contacto con ellas; inclusive, algunas nadan en sentido contrario después de hacer contactos temporales. Debido a los movimientos ascendentes y descendentes de las larvas de dípteros al abastecerse de

oxígeno, a su actividad pasiva (con el sifón en contacto con la superficie del agua) y a los movimientos de natación ascendentes de las cercarias, las probabilidades de contacto entre ambas resultan muy altas; por otro lado, los pelos sensoriales juegan un papel importante en este proceso, ya que gracias a éstos detectan a las larvas, ya sea por contacto directo con su cutícula o con sus espinas o por las corrientes de agua provocadas al desplazarse en busca de oxígeno o de alimento. Sin embargo, aunque no exista una atracción evidente, una vez que hay contacto no existe duda de que aquellas cercarias que empiezan a reptar sobre la superficie de una larva, hacen intentos por penetrarla.

#### 6.3.2.3.4. SITIOS APROPIADOS DE ENTRADA.

Las cercarias se detienen de tiempo en tiempo en busca de un sitio apropiado de entrada, siendo muy variable el periodo que consumen en encontrarlo. La mayoría se acumulan en ambos extremos del díptero, siendo el sitio de entrada escogido casi siempre entre dos segmentos sucesivos o en la base de una espina, pero no necesariamente ahí. En una ocasión, fueron vistas varias cercarias entrar rápidamente a través del ano, atravesar la pared intestinal y entonces alcanzar la cavidad corporal. En otro caso, después de explorar la superficie del sifón, entró una cercaria por su extremo distal. Una vez dentro de la larva y ya sin cola, reptó por el hemoceloma, perturbando varias estructuras y frecuentemente estimulando al insecto a reaccionar violentamente. Sin embargo, éstas no parecen ser las vías usuales de penetración. Cabe hacer notar además, que no todas las cercarias que reptan sobre la superficie de la larva logran su objetivo debido, por

un lado, a que los movimientos espasmódicos violentos provocados por otras cercarias ya en su interior hacen que se desprendan, a pesar de estar sujetas con ambas ventosas y, por otro lado, a un proceso de "limpieza" llevado a efecto por la larva (ver inciso 6.3.2.3.6.) en respuesta a la acción de escarificación que el estilete de la cercaria tiene sobre su cutícula, en un intento por producir una abertura.

Por otro lado, las cercarias puestas en contacto con un substrato artificial (suero coagulado) no son atraídas por éste; aunque se les vió intentar penetrarlo de forma esporádica, en ningún caso se logró la formación de metacercarias enquistadas.

#### 6.3.2.3.5. PENETRACION.

Para investigar más detalladamente los procesos de penetración y enquistamiento (ver inciso 6.3.2.3.7.), se realizaron observaciones bajo un microscopio fotónico, exponiendo larvas de culicinos (mosquitos que por su transparencia y tamaño son excelentes organismos de experimentación para este propósito) a un número reducido de cercarias (generalmente 20) entre porta- y cubre-objetos. De esta manera fue posible observar totalmente la secuencia de los eventos, a saber: una vez encontrado un sitio apropiado de entrada, la cercaria se adhiere firmemente con ambas ventosas; el acetábulo no cambia su posición durante este proceso, mientras que la ventosa oral se mueve ligeramente hacia atrás y hacia adelante a medida que se va formando la incisión en la cutícula del hospedero. El estilete es el responsable de dicha abertura ya que es un órgano notablemente eficiente para este fin, por su forma de jabalina y sus dos "alas" anchas (ver inciso 6.3.2.1.). Normalmente está colocado en posición

horizontal, pero cuando va a ser utilizado los músculos que a él se encuentran adheridos son los encargados de variar su posición. El extremo posterior es jalado dorsalmente y hacia el extremo anterior del cuerpo de la cercaria hasta formar un ángulo aproximado de 45°, quedando el extremo anterior del estilete muy cerca del borde anterior de la boca; es entonces cuando se utiliza como un pequeño escalpelo, realizando movimientos de corte en una dirección ventro-dorsal (hacia abajo y hacia arriba), actuando al parecer como fulcro un punto en la región de las "alas". De este modo va escarificando la cutícula en varios sitios a lo largo de una línea del tamaño aproximado del diámetro de la ventosa oral, con la ayuda de su extremo anterior curvado dorsalmente. Cuando este método es empleado, la ventosa oral se encuentra firmemente adherida y ayuda al estilete a mantenerlo apretadamente contra la cutícula. En ocasiones, sin embargo, el acetábulo es usado para mantener a la cercaria en posición y todo el extremo anterior es empleado para escarificarla. Después de varios movimientos de rayado de la cutícula (dependiendo el número del grosor del tegumento) a lo largo de dicha línea, se produce una abertura, muy probablemente con la participación de las secreciones de las glándulas de penetración pre- y para-acetabulares. La penetración de la cercaria se lleva a cabo tan pronto como se ha completado la incisión. El extremo anterior es lanzado a través del orificio y el resto del cuerpo es atraído sin pausa alguna hasta que la cercaria queda completamente dentro del cuerpo de la larva; después de esto, los márgenes de la abertura, que habían sido separados, se vuelven a juntar. La entrada puede ser muy rápida, siendo, en algunas partes del cuerpo, el menor tiempo observado para que se completara el orificio y el ingreso de la cercaria, de dos minutos; en otras regiones, de 10 a

15 minutos. Al parecer, la penetración resulta más fácil y toma menos tiempo en zonas cercanas a la extremidad posterior de la larva.

La liberación de la cola puede tener lugar a tiempos variables: en algunos casos se desprende tan pronto como la cercaria comienza el proceso de penetración, en cualquier momento mientras se completa la abertura o durante la entrada de la cercaria. En pocos casos permanece la cola adherida una vez que la cercaria ha penetrado totalmente. Estando ya en el interior la cercaria reptaba activamente entre los tejidos por periodos que varían entre 0.25 y 1.00 hora; después comienza, en un sitio paropiado, el proceso de la formación del quiste. Aquellas que no han liberado su cola antes de la penetración, lo hacen en cualquier momento del proceso de exploración quedando activos los apéndices en la cavidad del cuerpo hasta 24 horas. La liberación de la cola se lleva a efecto gracias a la secreción de las glándulas dorsales que quedan en la vecindad de la raíz de la cola y que pasan a las bolsas caudales, empujando gradualmente a la cola, hasta que finalmente es liberada. Pueden observarse a las bolsas caudales llenas con la secreción, una vez que este órgano ha sido desprendido completamente.

#### 6.3.2.3.6. REACCION DE LA LARVA A LA PENETRACION.

No se observó reacción alguna mientras la cercaria reptaba sobre la superficie de la larva, pero una vez que el proceso de penetración empezaba, sí se presentó una respuesta marcada. La larva sufre movimientos espasmódicos violentos con flexiones ventrales del extremo posterior. La superficie de su cuerpo es examinada con la boca y "cepillada" con los apéndices torácicos, cuyas espinas pueden ser

efectivas para remover temporalmente a las cercarias, aunque estas pueden regresar después de un corto periodo de natación en el agua que circunda al mosquito hospedero. Algunas cercarias son recogidas con las partes bucales y tragadas; otras, nadando en el agua, pueden también ser tragadas y se encuentran comúnmente en el canal alimenticio. Algunas son capaces de penetrar la pared del intestino y alcanzar la cavidad del cuerpo, mientras que otras comienzan el proceso de enquistamiento en la luz del intestino. Si estos quistes están formados totalmente y si la larva sobrevive, probablemente serán expulsados junto con las heces en su curso normal. La larva no es capaz de explorar todas las partes de su cuerpo y por lo tanto no puede deshacerse de todas las cercarias. Este proceso de "limpieza" se ve inquietado por las punzadas propinadas durante la perforación de las paredes de su cuerpo por parte de las cercarias, quedando alternado éste con flexiones espasmódicas. Así, muchas cercarias son capaces de entrar en un corto periodo antes de que su hospedero pueda quitárselas. Parece ser que las cercarias no se ven inquietadas por las flexiones del cuerpo de la larva una vez que las ventosas se han adherido firmemente. Después de haber penetrado las cercarias, el comportamiento de la larva se vuelve normal, a menos que hayan penetrado en ella demasiadas cercarias, ya que si así sucede, observamos que los movimientos de la larva disminuyen gradualmente y sobreviene la muerte.

#### 6.3.2.3.7. FORMACION DEL QUISTE.

Cuando grandes cantidades de cercarias penetran, trayendo como consecuencia la muerte de la larva muy rápidamente, el proceso de



enquistamiento no se completa. Se desconoce el número de penetraciones simultáneas que una larva puede soportar para sobrevivir, pero 15 no la matan en un periodo de cinco días (que fue el mayor tiempo que fueron mantenidos ejemplares infectados).

En el caso de las "pulgas de agua" (Daphnia sp.), se observó que las cercarias penetraban rápidamente; el número máximo de parásitos que la cavidad corporal de los cladóceros pueden soportar es de cinco, llenando éstos por completo el espacio disponible y perturbando diferentes estructuras en sus movimientos de reptación. Aunque algunas cercarias lograron completar su quiste, las "pulgas de agua" irremediablemente morían; debido a lo anterior, consideramos que estos crustáceos no actúan normalmente como segundos hospederos intermediarios de Plagiorchis maculosus.

El proceso de enquistamiento fue examinado en ejemplares vivos de mosquitos culicinos: cuando el quiste está por formarse, el cuerpo de la cercaria toma la forma de "C", con la concavidad ventral hacia adentro, quedando la boca en contacto con el poro excretor, formando una estructura casi esférica. Comienza entonces a mover la extremidad anterior rápidamente hacia adelante en esa dirección y al mismo tiempo vierte una secreción proveniente de la superficie dorsal formando una membrana hialina delgada alrededor del tegumento. No sabemos con certeza si dicha secreción es producida por las glándulas cistógenas o por otras células glandulares dorsales que existan. A intervalos todo el cuerpo cambia su posición, rotando en un ángulo de 90° y continúa girando de manera que se mantenga la estructura esférica del quiste a medida que esta capa se endurece y además para que quede lisa en su parte interna. Este proceso continúa por espacio de 1.00 hora aproximadamente, quedando la estructura de la cercaria inalterada y el

estilete aún en posición. Cuando un gran número de cercarias están presentes, pueden quedar tan próximas entre sí que la secreción de las glándulas dorsales se vuelve continua y quedan varias cercarias embebidas en una masa de dicha secreción. En tales casos el proceso de enquistamiento puede cesar en este punto y nunca quedar totalmente formado el quiste, pero en algunos casos se observa el comienzo de la formación de la pared del quiste.

En situaciones normales, una vez que la membrana inicial se ha endurecido, los movimientos de la cercaria decrecen y se vuelven irregulares. Se exuda entonces otro líquido proveniente de las glándulas cistógenas, acumulándose como una capa delgada sobre la membrana original. La cercaria se retuerce dentro del quiste en desarrollo, supuestamente para distribuir el material cistógeno uniformemente. La formación completa del quiste requiere de un periodo aproximado de 12 horas, tiempo en el que la pared ya se ha endurecido totalmente, volviéndose más gruesa.

### 6.3.3. LA METACERCARIA.

Se pudo observar una rápida penetración de grandes cantidades de cercarias, tanto en ninfas del Orden Odonata, Suborden Zygoptera como en larvas del Orden Trichoptera y del Orden Diptera, (1) Familia Culicidae: (a) subfamilia Culicinae y (b) subfamilia Anophelinae y (2) Familia Chironomidae, causando la muerte de las larvas de dípteros en algunas ocasiones, en periodos que variaron entre 1.5 y 3.0 horas. Se contaron más de 20 quistes en larvas de dípteros muertas; aquéllas que sobrevivieron, presentaban desde uno hasta 15 quistes repartidos a todo lo largo del cuerpo. Las ninfas del suborden Zygoptera y las

larvas del Orden Trichoptera soportaron un mayor número de metacercarias enquistadas; sin embargo, también algunas de éstas murieron, debido a la severidad de las sobreinfecciones.

#### 6.3.3.1. DIAGNOSIS (ver Figura 8.).

Está basada en la observación y en las medidas "in vivo" de 100 quistes y 25 organismos desenquistados obtenidos experimentalmente y de 10 quistes y cinco ejemplares hallados en forma natural.

Los quistes recién formados miden de 84 - 90 (88) de diámetro; la metacercaria conserva aún las características de la cercaria y su actividad dentro es intensa.

Una vez que se ha terminado de formar totalmente el quiste (12 horas después), éste mide de 90 - 96 (94) de diámetro, mientras que su pared tiene un grosor de 4 - 6. Para este momento, se han recolectado en la vesícula excretora algunos gránulos refringentes subsféricos: ésta se presenta distendida. En ejemplares vivos se observa como una masa oscura trilobada muy característica. El estilete se libera y puede ser visto suelto dentro del quiste, intacto. Las glándulas de penetración comienzan a desaparecer, al igual que las bolsas caudales y sus espinas.

A las 48 horas de haberse formado, el quiste mide de 98 - 117 (106) de diámetro. Las únicas evidencias obvias de desarrollo son un ligero aumento en el tamaño de la metacercaria y un incremento de concreciones en la vesícula excretora. Aunque el cuerpo del animal crece, las ventosas y la faringe mantienen los diámetros observados en la cercaria. Las glándulas de penetración desaparecen completamente y la espinación en el extremo anterior del cuerpo comienza a ser

evidente. El estilete permanece intacto, libre en el interior.

A las 72 hs., observamos que los quistes han aumentado de tamaño, aunque éste es muy homogéneo; el diámetro promedio obtenido fue de 124. El número de gránulos depositados en la vesícula se intensifica; el estilete no se ha desintegrado todavía. El cuerpo de la metacercaria crece ligeramente al igual que las ventosas. Los movimientos de rotación del parásito dentro del quiste son lentos y escasos, aunque las concreciones cambian su posición a menudo.

A las 216 hs. (nueve días), tiempo máximo de observación, los quistes son prácticamente idénticos a los de 72 hs. de edad. A diferencia de todos los anteriores, en éstos se observa una capa gruesa e irregular de tejido conectivo originada por el hospedero, alrededor de los aislados de ninfas y larvas de odonatos y tricópteros pero no de larvas de culicidos. La metacercaria exhibe movimientos muy lentos y esporádicos, los cuales seguramente continúan por espacio de varias semanas. No existen esbozos genitales; la prefaringe es muy corta, al igual que el esófago, alcanzando los ciegos el extremo posterior del cuerpo. El estilete permanece intacto, a diferencia de otros del género Plagiorchis, que se desintegran poco tiempo después de haberse formado el quiste (Macy, 1960; Najarian, 1961).

Con base en lo anteriormente expuesto, podemos concluir que los quistes requieren de por lo menos 72 horas para alcanzar su capacidad infectiva; apoyan esta suposición los resultados obtenidos de los experimentos de alimentación (ver inciso 6.3.4.). Siguen siendo viables en las etapas de pupa e imago de los segundos hospederos intermedarios examinados, sin tener la certeza de que sean infectivos. En general, son esféricos aunque algunos tienen forma ovalada, al quedar comprimidos por los distintos órganos del cuerpo

del hospedero que los alberga.

Conviene hacer la aclaración de que todos los quistes naturales examinados presentaron características semejantes a los de 216 horas de edad y tuvieron diámetros superiores a 120 micrómetros, por lo que fueron considerados como maduros; es decir, infectivos. Por otro lado, los diámetros de aquéllos vistos en el interior de los esporocistos "hijos" variaron entre 105 y 123 y en apariencia eran idénticos a los naturales, por lo que podemos considerarlos igualmente maduros.

**HABITAT:** Esporocistos "hijos" (de la segunda generación) (en la glándula digestiva del limneido); cavidad corporal (en larvas de dípteros); tejido graso del abdomen (en larvas de tricópteros y ninfas de odonatos); agallas (en ninfas de odonatos).

**HOSPEDEROS NATURALES:** Stagnicola sp. (Lymnaeidae, Pulmonata); Hesperophylax magnus y Clistoronia graniculata, en estado ninfal (Limnephilidae, Trichoptera); Sympetrum illotum y Anax amazili, en estado larvario (Anisoptera, Odonata).

**HOSPEDEROS EXPERIMENTALES:** Culex thriambus, C. interrogator, C. stigmatosoma, Culiseta maccrackense, Uranotaenia sp. y Orthopodomyia sp., en estado larvario (Culicinae, Culicidae, Diptera); Anopheles pseudopunctipennis, en estado larvario (Anophelinae, Culicidae); Chironomus sp., en estado larvario (Chironomidae, Diptera); Hesperophylax magnus y Clistoronia graniculata, en estado ninfal (Trichoptera); Enallagma praevarum, en estado larvario (Zygoptera, Odonata).

### 6.3.3.2. DISCUSION.

Noller y Ullrich (1927) publicaron que la cercaria de Plagiorchis maculosus se enquistaba tanto en forma natural como experimental en larvas de mosquitos de la Familia Chironomidae, aunque no mencionaron las dimensiones de los quistes.

En 1952, Strenzke (Angel, 1959) mencionó que los quistes de de esta misma especie eran generalmente esféricos, raramente ovoides; el diámetro de 100 quistes por él medidos fue de 102 - 150 (128), aparentemente obtenidos experimentalmente en larvas de mosquitos de la Familia Culicidae (Chaoborus sp. y Culex sp.), sin haber especificado su edad.

Angel (1959) obtuvo experimentalmente metacercarias enquistadas de P. maculosus en "larvas de mosquitos"; las encontró más frecuentemente en la región cefálica y en el abdomen (una larva examinada 48 horas después contenía 117 quistes). Los quistes eran pequeños, esféricos y presentaban una pared relativamente delgada; las concreciones oscuras de la vesícula excretora constituyeron un rasgo regular y característico, al igual que la forma en "Y" de la vesícula. Los de 24 horas de edad midieron de 90-105 x 90-98, mientras que tres quistes a 20 días de haberse formado midieron de 106-120 x 106-113. Aunque no encontró al segundo hospedero intermediario natural, supuso que serían larvas de mosquitos de la Familia Chironomidae. Entre los organismos que resultaron negativos a la infección por cercarias mencionó a "pulgas de agua" y otros crustáceos, anfipodos, varios moluscos, sanguijuelas, peces y renacuajos.

Como se puede apreciar, es muy poca la información que existe

acerca de esta fase de Plagiorchis maculosus; sin embargo, los datos disponibles de la morfometría coinciden con los expuestos en el inciso anterior (6.3.3.1.). En relación a los artrópodos que actúan como segundos hospederos intermediarios en forma natural, además de las larvas de mosquitos del Orden Diptera, habría que agregar a las larvas y ninfas de los órdenes Trichoptera y Odonata registrados en el presente estudio, así como al limneido Stagnicola sp., siendo éste el primer registro que se tiene acerca del desarrollo precoz de metacercarias enquistadas en el interior de esporocistos "hijos" para esta especie de tremátodo, a nivel mundial (ver inciso 6.3.1.1.). Como se verá más adelante, este fenómeno parece ser bastante común entre los miembros del género Plagiorchis.

En relación a la morfometría de los quistes y a los segundos hospederos intermediarios de otras especies del género Plagiorchis, existen tanto semejanzas como diferencias con respecto a P. maculosus; a continuación se mencionan a algunas de las especies encontradas frecuentemente en el continente americano, entre las que están aquellas que se asemejan a P. maculosus en su fase adulta (ver inciso 6.3.4.2.).

McMullen (1937a.) mencionó que los quistes maduros de P. muris midieron en promedio 200; los de P. proximus, 130 y los de P. micracanthos también 130. Sirvieron como segundos hospederos intermediarios experimentales miembros de varios órdenes de insectos: Diptera (Chironomidae y Culicidae), Ephemeroptera y Odonata. En las dos primeras especies observó, además, el desarrollo precoz de metacercarias en los esporocistos presentes en la glándula digestiva de Stagnicola emarginata angulata. Macy (1960) describió una nueva subespecie, P. vesperilionis parorchis, cuyos quistes recién formados

medieron en promedio 126 x 170, obtenidos experimentalmente en larvas de Diptera, Ephemeroptera y Trichoptera y en ninfas de Odonata. Los quistes jóvenes de P. goodmani (Najarian, 1961) tuvieron un diámetro promedio de 100 - 130, mientras que los maduros alcanzaron diámetros de 190. Larvas de Trichoptera (Limnephilus indivisus) y el caracol pulmonado Lymnaea palustris actuaron como segundos hospederos intermediarios naturales. Williams (1964) observó que la cercaria de P. noblei penetró y se enquistó rápidamente en larvas de Diptera (Curlicidae: Aedes aegypti y Chironomidae), Ephemeroptera y Trichoptera y en ninfas de Odonata; los quistes maduros presentaron un diámetro promedio de 137.

En ninguno de los tres artículos que tratan aspectos del ciclo de vida de Plagiorchis maculosus se menciona la edad a la que las metacercarias enquistadas ya pueden considerarse como infectivas. Para otras especies del género, los tiempos son muy variables: van de 66 horas en quistes experimentales de P. noblei (Blankespoor, 1977) obtenidos en ninfas de Odonata (Aeschna sp.: Anisoptera) hasta una semana en quistes del resto de las especies mencionadas anteriormente. McMullen (1937a.) asentó que quistes de menos de 48 horas de edad no eran infectivos. Así, podemos considerar que el tiempo que requieren las metacercarias de P. maculosus para alcanzar la capacidad infectiva es relativamente corto (72 horas) (ver inciso 6.3.4.).

Por último, el periodo de viabilidad e infectividad de las metacercarias de las diversas especies de Plagiorchis es muy variable y sorprendente a la vez: Najarian (1961) encontró que los quistes de P. goodmani obtenidos experimentalmente en larvas de Trichoptera mantenidas en el laboratorio hasta alcanzar el estado adulto demostraron ser viables e infectivos a los dos meses de edad.



Blankespoor (1977) indicó que los quistes de P. noblei formados en ninfas de Odonata (Aeschna sp.) mantuvieron su capacidad infectiva por lo menos 80 días después de que las cercarias penetraron en el anisóptero.

#### 6.3.4. EL ADULTO.

Durante las dos últimas visitas a la laguna de Quila se pudieron atrapar seis aves, pertenecientes a dos familias: Fringillidae (dos Aimophila ruficauda y dos Pheucticus melanocephalus) y Turdidae (dos Sialia mexicana). Todas resultaron negativas a la infección por la fase adulta de Plagiorchis maculosus. Otras especies de aves vistas sobrevolando la laguna y alimentándose en los alrededores fueron: Ergaticus ruber (Parulidae); Turdus migratorius (Turdidae); Vireo sp. (Vireonidae); Polioptila sp. (Sylviidae) y Junco phaenotus (Fringillidae). Con excepción de las especies de la Familia Turdidae (que son omnívoros), el resto se alimenta principalmente de insectos.

En la Tabla 12. se muestran los resultados de los distintos experimentos de alimentación al utilizar como hospederos definitivos potenciales a aves y mamíferos domesticados; la edad de los quistes empleados varió entre 72 horas (los presentes en larvas y pupas de mosquitos culicinos) y por lo menos 10 días (los que supuestamente iban dentro de los esporocistos de un limneido infectado tendrían esa edad ya que éste fue dado como alimento 10 días después de haber sido recolectado).

TABLA 12.

TIPO DE HOSPEDERO	# Y TIPO DE 2DO. HOSP. INT.	QUISTES		TIEMPO DE INFECTADO	# ADULTOS RECOBRADOS
		#	EDAD (HS.)		
* RATON	10 PUPAS	30	72	10 DIAS	11 (8)
RATON	10 LARVAS	40	96	11 DIAS	12 (4)
RATON	ESPOROCISTOS	??	??	10 DIAS	0
RATON	-----	0	--	10 DIAS	0
@					
FOLLO	12 LARVAS	30	72	8 DIAS	0
FOLLO	6 PUPAS	20	96	9 DIAS	0
FOLLO	4 NINFAS^	??	96	10 DIAS	0
FOLLO	-----	0	--	10 DIAS	0

\* (= Mus musculus C 57, machos, de cuatro meses de edad; Gallus gallus, de dos a tres días de edad; ^ = de Enallagma praevarum, dadas a comer completas. Todos los artrópodos estaban vivos al ser dados como alimento. En cuanto al número de quistes, es sólo una estimación aproximada. Entre paréntesis se indica la cantidad de adultos maduros en cuyos úteros fueron observados huevos).

A pesar de utilizar como hospedero definitivo natural a aves principalmente, P. maculosus también cuenta con la capacidad de poderse establecer en mamíferos (en el roedor Citellus musicus planicola en forma natural y en Mus musculus de manera experimental). Una situación similar fue observada por Blankespoor (1974) para P. noblei. Otra especie que se comporta de igual manera (ver inciso s.3.4.2.) es P. yespertilionis parorchis (Macy, 1960). Queda así manifiesta la casi nula especificidad hospedatoria de la fase adulta de esta especie de plagiórquido.

Se confirma también la suposición presentada en el inciso s.3.3.3. en el sentido de que los quistes alcanzaban su capacidad

infectiva por lo menos a las 72 horas de haberse formado.

Al igual que la de P. maculosus, la fase adulta de las demás especies de Plagiorchis alcanzan el estado grávido en muy pocos días, aunque el tiempo varía de acuerdo al tipo de hospedero que las albergue. Williams (1964) obtuvo gusanos adultos con huevos de P. noblei en pollos experimentales a los seis días de haberlos infectado, mientras que en ratas experimentales los tremátodos requirieron de ocho días para volverse grávidos. Aparentemente, la mayor tasa metabólica de las aves (en comparación con la de los mamíferos) es la causante de la producción más temprana de huevos observada.

Angel (1959) obtuvo seis gusanos adultos de P. maculosus del intestino delgado de un pollo (Gallus gallus) infectado 13 días antes con una gran cantidad de metacercarias maduras presentes en 227 larvas de mosquitos y dos más de otro pollo alimentado 21 días antes con 216 larvas de mosquitos infectadas con varios quistes cada una. Strenzke en 1952 (Angel, 1959) infectó dos pinzones con larvas de mosquitos parasitadas con quistes de P. maculosus y observó huevos en las heces siete días después; de un pinzón recuperó 85 gusanos y del otro 262 ejemplares, muriendo las aves como producto de tan severas infecciones. Por otro lado, Blankespoor (1974) infectó experimentalmente a 161 pollos domésticos con metacercarias de P. noblei, resultando parasitados 145 de éstos y recobrando más de 100 gusanos de cada uno, por lo que consideró a la especie de ave como altamente susceptible. Aunque nosotros esperábamos una situación similar, los resultados de la Tabla 12. muestran todo lo contrario. Con base en los hallazgos de Angel y Strenzke, suponemos que los pollos domésticos, por no ser un hospedero definitivo natural de P. maculosus, no adquieren la infección a menos que les sea suministrada

una dosis elevada de quistes o las infecciones se pierden en pocos días. Inclusive, se sabe de la existencia de protozoos esporozoario intestinales (Biol. David Osorio-Sarabia, comunicación personal), que no permiten el desarrollo de helmintos, sobre todo de tremátodos. De cualquier manera, es clara la baja susceptibilidad de Gallus gallus al establecimiento de la fase adulta de P. maculosus.

Durante un estudio asesorado por el que esto escribe (en 1985) relacionado con los ciclos de vida de algunos tremátodos de vertebrados habitantes de la ciénega de Lerma (San Pedro Tlaltizapán), los alumnos que integraron la Biología de Campo aislaron una gran cantidad de organismos del intestino delgado de una "primavera" juvenil (Turdus migratorius). Una vez teñidos y montados en preparaciones permanentes, procedieron a su estudio morfológico y taxonómico, para posteriormente ubicarlos en el género Plagiorchis Luhe, 1899.

Varios meses más tarde, al examinar detenidamente las proporciones observadas entre los distintos órganos del cuerpo, el que esto escribe encontró que, en esencia, coincidían con las obtenidas a partir de formas adultas experimentales que tres años antes había identificado como Plagiorchis maculosus. La única diferencia fue que los especímenes experimentales eran más pequeños, a pesar de haber estado ya maduros y liberando huevos (ver inciso 6.3.4.1.). Más aún, en 1985 el que esto escribe también encontró que Stagnicola attenuata liberó a una especie de xiphidiocercaria que resultó ser idéntica a la de Plagiorchis maculosus presentada en el inciso 6.3.2.1..

Debido a lo anterior, se decidió incluir en la diagnosis las medidas y las proporciones de las formas adultas encontradas en Turdus migratorius de la ciénega de Lerma, a pesar de que la presente

investigación se efectuó en la laguna de Quila. Sin embargo, hemos observado a través de los años que las parasitofaunas de las distintas especies de moluscos y vertebrados que habitan regiones aledañas al Valle de México (lago de Texcoco, Xochimilco, ciénega de Lerma y laguna de Quila) son muy similares entre sí.

#### 6.3.4.1. DIAGNOSIS (ver Figura 12.).

Está basada en la observación y en las medidas de siete de los 23 ejemplares experimentales recobrados y de 10 ejemplares naturales, teñidos y montados en preparaciones permanentes.

Cuerpo lanceolado, un tanto aplanado dorso-ventralmente; el extremo anterior redondeado, el posterior moderadamente aguzado; ancho máximo a nivel del testículo anterior; coloración en vivo, blanco-amarillenta; cutícula delgada, armada de pequeñas espinas que cubren los dos primeros tercios del cuerpo; son más numerosas y están más próximas entre sí en la extremidad anterior.

Ventosa oral subterminal, de mayor tamaño que el acetábulo, quedando el borde posterior de este último aproximadamente a la mitad del cuerpo, muy por debajo de la bifurcación intestinal; prefaringe muy corta, visible sólo en ejemplares vivos; faringe musculosa, pequeña, de menor tamaño que el ovario; esófago aparentemente ausente; ciegos intestinales no sinuosos, de paredes gruesas, corren a lo largo de los márgenes laterales del cuerpo casi alcanzando su extremidad posterior.

Ovario subsférico, situado al inicio de la segunda mitad del cuerpo por detrás y a la izquierda del acetábulo, menor que este último; el oviducto es corto; el canal de Laurer está presente y se

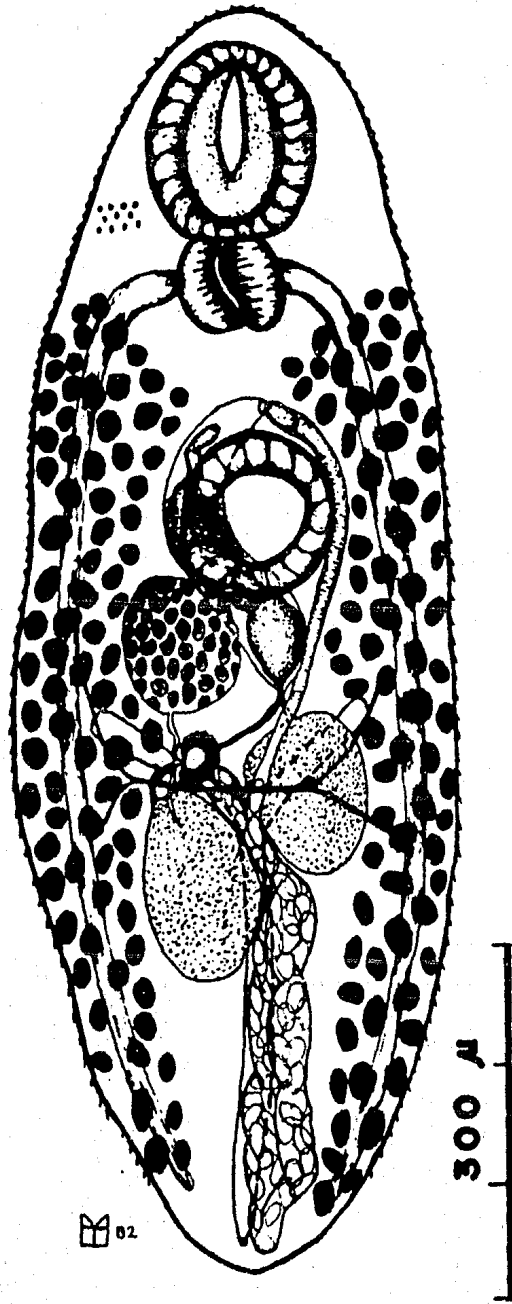


FIGURA 12.- Fase adulta de Plagiorchis maculosus, en vista ventral.

abre dorsalmente; ootipo y glándula de Mehlis presentes; receptáculo seminal verdadero ausente. Testículos grandes, ovoides, situados en la mitad posterior del cuerpo, oblicuos; testículo posterior ligeramente mayor que el anterior y ambos, en general, mayores que la ventosa oral; cada vaso deferente se origina en el borde anterior de cada testículo, sus extremos distales entran por la porción posterior de la bolsa del cirro, que es una estructura alargada, más de dos veces más larga que el diámetro del acetábulo; esta bolsa se curva alrededor del margen izquierdo del acetábulo (para en ocasiones encimarlo dorsalmente) y pasa entre éste y el ovario, sobrepasando a veces su extremo distal el borde posterior de éste último; vesícula seminal interna, en la porción distal de la bolsa, dividida en dos compartimientos de distinto tamaño; células prostáticas presentes en la parte media; pene protrusible, largo, angosto y sin espinas; abertura genital masculina lateral a la femenina; poro genital común, ventral, medio o ligeramente desplazado al lado derecho, exactamente por encima del borde anterior del acetábulo, conspicuo y situado ligeramente anterior al término del primer tercio del cuerpo.

Glándulas vitelógenas laterales y foliculares, cada folículo estando constituido por varias células; se extienden desde la región comprendida entre el borde posterior de la faringe y el borde anterior del acetábulo hasta el extremo posterior del cuerpo, principalmente extracecales; los campos vitelinos nunca confluyen, ni anterior ni posteriormente, a pesar de que algunos folículos se presentan laterales y anteriores al acetábulo; sistema de conductos vitelinos no muy prominente, en forma de "H", con un conducto común que alcanza al ootipo por debajo del ovario.

Utero muy desarrollado y ocupando gran parte de la mitad

posterior del cuerpo; el asa descendente pasa entre el testículo anterior y el testículo posterior, llegando casi al borde del extremo posterior del cuerpo, sitio en el que se vuelve ascendente, pasando de nuevo entre ambos testículos; esta asa entonces continúa por entre el testículo anterior y el ovario; metratermo muscular, corre lateral al acetábulo por su lado derecho, por enfrente de la bolsa del cirro; se abre en el poro genital femenino, preacetabular. Huevos muy numerosos, con cápsula de paredes lisas, siendo su porción posterior más ancha, operculados, amarillentos, abandonando el cuerpo no embrionados.

Vesícula excretora en forma de "Y"; la región impar se extiende hasta la región del testículo anterior, en donde se bifurca; los brazos en ocasiones quedan en contacto con la pared interna de los ciegos, a nivel del borde posterior del ovario; poro excretor subterminal, dorsal.

**MEDIDAS DE LOS EJEMPLARES EXPERIMENTALES.** Longitud total: 853 - 1,232 (1046); ancho máximo: 386 - 539 (470); relación longitud total/ancho máximo: 1.80 - 2.65 (2.23); diámetro ventosa oral: 128 - 179 (156); diámetro faringe: 72 - 107 (91); relación diámetros ventosa oral/faringe: 1.00:0.53-0.65 (1.00:0.58); diámetro acetábulo: 107 - 164 (148); relación diámetros ventosa oral/acetábulo: 1.00:0.84-0.99 (1.00:0.92); distancia del centro del acetábulo al extremo anterior: 295 - 502 (421); distancia del centro del acetábulo al extremo anterior/longitud total (expresada en porcentaje): 34.6 - 49.3 (40.2); diámetro ovario: 96 - 133 (114); relación diámetros ovario/faringe: 1.00:0.69-0.91 (1.00:0.81); relación diámetros acetábulo/ovario: 1.00:0.64-0.94 (1.00:0.78); diámetro testículo anterior: 131 - 172 (154); diámetro testículo posterior: 139 - 175



(160); relación diámetros testículo posterior/testículo anterior: 1.00:0.91-0.98 (1.00:0.96); relación diámetros testículo anterior/ventosa oral: 1.00:0.95-1.08 (1.00:1.03); relación diámetros testículo posterior/ventosa oral: 1.00:0.92-1.06 (1.00:0.98); distancia del poro genital al extremo anterior: 268 - 400 (337); relación distancia del poro genital al extremo anterior/longitud total (expresada en porcentaje): 27.42 - 38.51 (31.71); huevos: 34 - 38 (36) x 19 - 23 (20).

MEDIDAS DE LOS EJEMPLARES NATURALES. Longitud total: 1,478 - 2,538 (2091); ancho máximo: 601 - 754 (675); relación longitud total/ancho máximo: 2.18 - 3.88 (3.10); diámetro ventosa oral: 218 - 262 (235); diámetro faringe: 105 - 140 (122); relación diámetros ventosa oral/faringe: 1.00:0.48-0.56 (1.00:0.52); diámetro acetábulo: 172 - 203 (188); relación diámetros ventosa oral/acetábulo: 1.00:0.75-0.86 (1.00:0.80); distancia del centro del acetábulo al extremo anterior: 581 - 1,064 (777); distancia del centro del acetábulo al extremo anterior/longitud total (expresada en porcentaje): 35.19 - 43.40 (38.22); diámetro ovario: 137 - 195 (161); relación diámetros ovario/faringe: 1.00:0.63-0.87 (1.00:0.76); relación diámetros acetábulo/ovario: 1.00:0.74-0.98 (1.00:0.86); diámetro testículo anterior: 195 - 275 (240); diámetro testículo posterior: 209 - 289 (250); relación diámetros testículo posterior/testículo anterior: 1.00:0.91-1.00 (1.00:0.96); relación diámetros testículo anterior/ventosa oral: 1.00:0.87-1.22 (1.00:0.99); relación diámetros testículo posterior/ventosa oral: 1.00:0.85-1.20 (1.00:0.95); distancia del poro genital al extremo anterior: 462 - 909 (645); relación distancia del poro genital al extremo anterior/longitud total

(expresada en porcentaje): 27.88 - 37.08 (30.82); huevos: 32 - 39 (36)  
x 18 - 22 (20).

**HABITAT:** Intestino delgado.

**HOSPEDERO EXPERIMENTAL:** Mus musculus C 57.

**HOSPEDERO NATURAL:** Turdus migratorius (Turdidae: Passeriformes).

**LOCALIDAD:** San Pedro Tlaltizapán (ciénega de Lerma), Estado de México.

#### 6.3.4.2. DISCUSION.

Las diferencias observadas en los valores de las distintas relaciones examinadas entre los ejemplares experimentales y los naturales, tales como: longitud total/ancho máximo (2.23 vs. 3.10); diámetros ventosa oral/faringe (0.58 vs. 0.52); diámetros ventosa oral/acetábulo (0.95 vs. 0.80); diámetros ovario/faringe (0.80 vs. 0.75); diámetros testículo posterior/ventosa oral (0.98 vs. 0.94); diámetros testículo anterior/ventosa oral (1.02 vs. 0.98) y diámetros acetábulo/ovario (0.77 vs. 0.86), pueden ser explicadas sobre la base de dos distintos estados de las formas maduras. Los adultos experimentales fueron fijados 10 y 11 días después de haberse establecido en los intestinos de los ratones, mientras que desconocemos la edad de las formas naturales, muy probablemente más viejas. Es bien conocido que los tremátodos maduros continúan creciendo después de alcanzar el estado grávido (Blankespoor, 1974) hasta alcanzar una talla máxima, tal y como parece ser que ocurrió con las formas naturales, no así con las formas experimentales, ya que no tuvieron el tiempo suficiente. La relación longitud total/ancho máximo

pone en evidencia perfectamente esta situación. Aunque las ventosas la faringe aumentan de tamaño, el crecimiento de los órganos reproductores es mayor y más rápido. Para el caso de los testículos se observó que crecen en la misma proporción (0.96 vs. 0.96). Estas semejanzas observadas, entre ejemplares obtenidos naturalmente y experimentalmente, a pesar de provenir de hospederos muy disímiles, también fueron vistas en las formas adultas provenientes de aves y mamíferos de P. noblei (Blankespoor, 1974).

La diagnosis presentada párrafos atrás concuerda perfectamente con las publicadas por Angel (1959) y Odening (1961) para P. maculosus. Tanto la proporción entre la longitud total y el ancho máximo; las proporciones entre ambas ventosas; la proporción entre las ventosas y la faringe; la longitud de la prefaringe; la ausencia de un esófago; la proporción entre el acetábulo y el ovario; el tamaño de los testículos, así como la distribución y la extensión de las glándulas vitelógenas son idénticas, por lo que no existe duda respecto a su correcta identificación. La morfometría comparada del resto de las fases que componen su ciclo de vida, ampliamente discutidas en las distintas secciones del inciso 6.3., apoyan todavía más esta certidumbre.

El conjunto de rasgos mencionados permite diferenciar muy fácilmente a P. maculosus de las dos especies que el Dr. Caballero encontró en dos especies de murciélagos y que redescribió hace más de 25 años (ver inciso 2.2.3). P. (P.) vespertilionis (Caballero, 1940; 1942) presenta una prefaringe y un esófago muy evidentes (siendo muy corta la prefaringe y estando ausente el esófago en P. maculosus), mientras que la proporción entre ambas ventosas es significativamente diferente (1.00:0.69 vs. 1.00:0.80-0.92). P. (M.) muris (Caballero,

1942) también presenta una prefaringe y un esófago notorios; la proporción entre ambas ventosas es igualmente significativa (1.00:0.62 en los ejemplares de Natalus mexicanus); el ovario es mayor que el acetábulo en una proporción de 1.00:0.80, mientras que en P. maculosus el acetábulo es mayor al ovario en una proporción de 1.00:0.78-0.86; finalmente, la distribución de los folículos vitelinos en la región anterior al acetábulo es totalmente diferente (formando una comisura en los ejemplares de Caballero).

En cuanto a la tercera especie registrada en México (descrita originalmente como nueva por Zerocere (1949) con el nombre de P. gonzalchavezii), consideramos que, con base en el análisis que sobre su identidad específica se hizo en el inciso 2.2.3. del capítulo 2. de ANTECEDENTES, se trata de un sinónimo de P. noblei Park, 1936. Más aún, creemos que la especie de Park (y por ende la de Zerocere) debería ser colocada como sinónima de P. maculosus, con base en las observaciones hechas por Blankespoor (1974) y expuestas en el mismo inciso 2.2.3.; los dos únicos rasgos taxonómicos constantes para P. noblei encontrados por Blankespoor coinciden con los de P. gonzalchavezii y con los de P. maculosus: la proporción entre la ventosa oral y el acetábulo en los ejemplares de Blankespoor es de 1.00:0.83-0.90, mientras que en los de Zerocere es de 1.00:0.76; las dimensiones de los huevos también son muy semejantes (33-42 x 18-24 y 40 x 23, respectivamente, vs. 32-39 x 18-23 en P. maculosus).

Macy (1960) describió a nueva especie, P. vespertilionis parorchis obtenida naturalmente de una especie de murciélago (Myotis lucifugus alascensis) y experimentalmente de un roedor (Mus musculus), ambos hospederos recolectados en Washington, E.U.A. Se basó en la posición casi opuesta de los testículos para diferenciarla de P.

vespertilionis típica del continente asiático (en la que los testículos se presentan más bien oblicuos). Sin embargo, observó que sus ejemplares eran muy similares a P. bulbulii, P. russii y P. clelandi, especies consideradas como sinónimas de P. maculosus por Angel (1959) y Odening (1959) (ver inciso 1.6.). Odening (1961), dos años más tarde la consideró como una raza geográfica de P. maculosus, denominándola P. maculosus parorchis, señalando la posición de los testículos como un rasgo distintivo de dicha subespecie norteamericana. Esta situación nos llevó a analizar cuidadosamente la diagnosis de la especie de Macy: en sus ejemplares la prefaringe no es evidente; el esófago es muy corto; la proporción entre la ventosa oral y el acetábulo es de 1.00:0.93; la proporción entre el acetábulo y el ovario es de 1.00:0.83; las glándulas vitelógenas son laterales (principalmente extracecales) y se extienden desde el extremo posterior del cuerpo hasta una zona intermedia entre la ventosa oral y el acetábulo, sin confluir en la región preacetabular; los huevos miden de 35-38 x 18-20 micrones.

Con excepción de la posición de los testículos, la diagnosis de P. vespertilionis parorchis coincide totalmente con las de P. maculosus, P. noblei y P. gonzalchavezii mencionadas anteriormente. Sin embargo, las diferencias señaladas entre las cercarias de P. vespertilionis parorchis, P. noblei y P. maculosus (de la laguna de Quila) en el inciso 6.3.2.2., indican la posible existencia de por lo menos tres razas geográficas americanas de P. maculosus maculosus, dos en "Norteamérica" y la otra en México. Por el momento, consideraremos como distintas a las especies de Macy y la que aquí se presenta, independiente de sus status subespecíficos; este interesante tema será, como otros ya mencionados, objeto de una publicación posterior

independiente.

Por último, queremos señalar que al igual que Plagiorchis muriei (McMullen, 1937a.; Cort y Olivier, 1943) y de acuerdo con todas las observaciones anotadas anteriormente, Plagiorchis maculosus también posee la capacidad de producir grandes cantidades de cercarias. Cuenta además, con otras características especiales que la hacen tener gran éxito como parásito: las fases larvarias en el caracol están tan localizadas y sus hábitos son tales que en apariencia no le producen daños severos a su hospedero (ver inciso 6.3.1.2.). No existe evidencia de que la presencia de esta especie provoque un aumento en las tasas de mortalidad de los limneidos, como sucede en otros tipos de infecciones por tremátodos larvarios. Aunado a lo anterior, la fase de metacercaria puede desarrollarse no sólo en una gran variedad de larvas acuáticas de insectos (ver inciso 6.3.3.1.), sino también de manera precoz en el interior de esporocistos en el primer hospedero intermediario (ver inciso 6.3.1.1.), por lo que no solamente aquellos organismos que se alimenten de los imagos podrán infectarse, sino también aquellos que lo hagan de moluscos infectados. Finalmente, una falta de especificidad a nivel del hospedero definitivo hace posible que la fase adulta se desarrolle en una gran variedad tanto de aves como de mamíferos (ver incisos 1.5., 1.6., 2.1.3., 2.2.3., 6.3.4. y 6.3.4.2.).

## 7 . C O N C L U S I O N E S .

Con base en los resultados obtenidos y en las distintas discusiones planteadas a lo largo de este trabajo, se concluye que:

1.- La cercaria de Plagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) Braun, 1902 emerge rítmicamente del caracol limneido Stagnicola sp. cada 24 horas, únicamente en las escotofases del nictámero, en condiciones con fotoperiodo normal; así, se le considera como una cercaria "de noche" con alternancia "absoluta".

2.- El patrón de emergencia de esta cercaria es del tipo "circadiano", manifestando este ritmo endógeno su "frecuencia en oscilación libre" en condiciones constantes de obscuridad y de luz y siendo el periodo diferente al mostrado en situaciones con fotoperiodo normal.

3.- De los parámetros ambientales examinados, es el fotoperiodo el "sincronizador" de este ritmo innato, a través de la acción inhibidora de la fotofase.

4.- El estudio de la morfometría comparada de las fases naturales y experimentales encontradas que componen el ciclo de vida de este tremátodo nos permitió confirmar la identidad específica de la cercaria.

5.- En el ciclo de vida natural de P. maculosus en la laguna de Quila intervienen, como primer hospedero intermediario, el limneido Stagnicola sp.; como segundos hospederos intermediarios, por lo menos, el propio caracol; Hesperophylax magnus; Clistronia graniculata; Sympetrum illotum y Anax amazili y como hospedero definitivo, muy probablemente Turdus migratorius.

## B. L I T E R A T U R A C I T A D A .

- Aguirre Pequeño, E. 1939. La Limnaea attenuata Say, huésped intermedio de la Fasciola hepatica en la República Mexicana. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 1 : 67 - 70.
- Almeyda-Artigas, R. J. 1982. Demostración de un ritmo circádico de emergencia en la cercaria de Plagiorchis maculosus Rudolphi, 1802 (Trematoda: Digenea). Informe preliminar. VI CONGRESO NACIONAL DE ZOOLOGIA. MAZATLAN. SINALOA, MEXICO.
- \_\_\_\_\_ y V. León-Régagnon. 1987b. Primer hallazgo de las fases larvianas de Drepanocephalus olivaceus Nasir and Marval, 1968 (Trematoda: Echinostomatidae) y aspectos biológicos de otras 2 cercarias emergidas de Biomphalaria temascalensis Rangel-Ruiz, 1987, en Temascal. Oaxaca. IX CONGRESO NACIONAL DE ZOOLOGIA. VILLAHERMOSA, TABASCO, MEXICO.
- Angel, M. 1959. An account of Plagiorchis maculosus, its synonymy and its life history in South Australia. Trans. Roy. Soc. S. Aust. 82 : 265 - 281.
- Asch, H. L. 1972. Rhythmic emergence of Schistosoma mansoni cercariae from Biomphalaria glabrata: Control by illumination. Exp. Parasitol. 31 : 350 - 355.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor



- Barnett, A. 1966. A circadian rhythm of mating type reversals in Paramecium multimicronucleatum, syngen 2, and its genetic control. J. Cell. Physiol. 72 : 1 - 16.
- \_\_\_\_\_. 1967. Cell division: a second circadian clock system in Paramecium multimicronucleatum. Science 164 : 1417 - 1418.
- Biagi, F. y A. González. 1967. Ritmos en los organismos parásitos y su papel como reguladores ecológicos. IV Simposio Panamericano de Farmacología y Terapéutica. México, D. F. pp. 101 - 113.
- Blankespoor, H. D. 1974. Host-induced variation in Plagiorchis noblei Park, 1936 (Plagiorchiidae: Trematoda). Am. Midl. Nat. 92 (2) : 415 - 433.
- \_\_\_\_\_. 1977. Notes on the biology of Plagiorchis noblei Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 44 (1) : 44 - 50.
- Boughton, D. C. 1933. Diurnal gametic periodicity in avian Isospora. Am. J. Hyg. 18 : 161 - 182.
- Brady, J. 1979. Biological Clocks. Studies in Biology # 104. E. Arnold Pub., Ltd. London. pp. 1 - 20.
- Brooks, F. G. 1930. Studies on the germ cell cycle of trematodes. Amer. J. Hyg. 12 (2) : 299 - 339.

- \_\_\_\_\_ . 1943. Larval trematodes of Northwest Iowa. I. Nine new xiphidiocercariae. J. Parasitol. 29 (5) : 330 - 339.
- Bruce, V. G. 1972. Mutants of the biological clock in Chlamydomonas reinhardtii. Genetics 70 : 537 - 548.
- \_\_\_\_\_ . and C. S. Pittendrigh. 1960. An effect of heavy water on the phase and period of the circadian rhythm in Euglena. J. Cell. Comp. Physiol. 56 : 25 - 31.
- Bueno-Soria, J., J. Padilla and M. Rivera. 1981. Observations on the longitudinal distribution of Trichoptera larvae in a stream at Zempoala, Mexico, Mexico. Proc. 3rd. Int. Symp. Trichoptera, Ser. Entomologica. 20 : 33 - 38.
- Bunning, E. 1960. Opening adress. En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25 : 1 - 9.
- Burch, J. B. 1982. Freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) of North America (North of Mexico). (Enviromental monitoring and support laboratory office of research and development). U. S. Enviromental Protection Agency. Cincinnati, Ohio. 249 pp.
- \_\_\_\_\_ . y A. Cruz-Reyes. 1987. Clave genérica para la identificación de gastrópodos de agua dulce en México. Instituto de Biología, U. N. A. M. 46 pp.
- Buttner, A. et C. Vacher. 1960. Recherches sur le developpement et l'identification de Plagiorchis (Multi glandularis) cirratus. I. Etude du cycle evolutif. Ann. Parasit. Hum. Comp. 35 (3) : 268 - 281.

- Caballero y Caballero, E. 1940. Algunos tremátodos intestinales de los murciélagos de México. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Mex. 11 (1) : 215 - 223.
- \_\_\_\_\_ . 1942. Tremátodos de los murciélagos de México. IV. Descripción de un nuevo género de la subfamilia Lecithodendriinae Looss, 1902, y una nueva especie de Prosthodendrium Dollfus, 1931. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Mex. 14 (1) : 173 - 193.
- Chubb, J. C. 1979. Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes. Part II: Trematoda. Advances in Parasitology 17 : 141 - 313.
- Cloudsey-Thompson, J. L. 1960. Adaptive Functions of Circadian Rhythms. En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25 : 345 - 355.
- Combes, C. et A. Théron. 1977. Rythmes d'émergence des cercaires de trematodes et leur interet dans l'infestation de l'homme et des animaux. En: Excerta Parasitológica en Memoria del Dr. Eduardo Caballero y Caballero. Instituto de Biología, U.N.A.M. Publicaciones especiales No. 4 : 141 - 150.
- Cort, W. W. 1914. Larval trematodes from north american fresh-water snails. Preliminary report. J. Parasitol. 1(1):65-84.
- \_\_\_\_\_ . 1918. Methods for studying living trematodes. Trans. Amer. Micr. Soc. 37 (1) : 129 - 130.
- \_\_\_\_\_ . 1919. The excretory system of a stylet cercaria.

Univ. Calif. Pub. Zool. 19 (7) : 275 - 281.

- \_\_\_\_\_, 1922. A study of the escape of cercariae from their snail hosts. J. Parasitol. 8 (4) : 177 - 184.
- \_\_\_\_\_, and D. J. Ameel. 1944. Further studies on the development of the sporocyst stages of plagiiorchiid trematodes. J. Parasitol. 30 (2) : 37 - 56.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and A. Van der Woude. 1954. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes. Exp. Parasitol. 3 : 185 - 225.
- \_\_\_\_\_, and S. Brackett. 1937. Precocious development of the metacercaria stage of Diplostomum flexicaudum in the snail intermediate host. J. Parasitol. 23 (5) : 545 - 546.
- \_\_\_\_\_, D. B. McMullen, and S. Brackett. 1937. Ecological studies on the cercariae in Stagnicola emarginata angulata (Sowerby) in the Douglas Lake region, Michigan. J. Parasitol. 23 (5) : 504 - 532.
- \_\_\_\_\_, and L. J. Olivier. 1943. The development of the larval stages of Plagiiorchis muris Tanabe, 1922, in the first intermediate host. J. Parasitol. 29 (2) : 81 - 99.
- Daan, S. and C. S. Pittendrigh. 1976. A functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant light: homeostasis of frequency? J. Comp. Physiol. 106 : 267 - 290.
- Daniell, D. L. and M. J. Ulmer. 1964. Life cycle of

- Plagiorchis nobles Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae) (Abstract). J. Parasitol. 50 (3), Sect. 2 : 29.
- Dollfus, R. Ph. 1960. Recherches sur le developpement et l'identification de Plagiorchis (Multi glandularis) cirratus. II. Description et identification. Description du Plagiorchis obtenu adulte chez des souris blanches de laboratoire. Ann. Parasit. Hum. Comp. 35 (3) : 282. 291.
  - Enright, J. T. 1965. Synchronization and ranges of entrainment. En: Circadian Clocks. North Holland Pub. Co., Amsterdam. pp. 112 - 124.
  - \_\_\_\_\_ . 1971. Heavy water slows biological timing processes. Z. vergl. Physiol. 72 : 1 - 16.
  - Erasmus, D. A. 1972. The Biology of Trematodes. Edward Arnold Pub. Ltd., London. 312 pp.
  - Familiar-González, R. 1983. Estudio de la frecuencia estacional de larvas (cercarias) de tremátodos digeneos en moluscos gasterópodos de la ciénaga de Lerma, Estado de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México. 126 pp.
  - Fuentes-Pardo, B. 1977. Correlación entre los ritmos circádicos electroretinográfico y motor del acocil P. bouvieri. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, U. N. A. M. 103 pp.
  - Giovannola, A. 1936a. Some observations on the emission of

- cercariae of Schistosoma mansoni (Trematoda: Schistosomatidae) from Australorbis glabratus. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 3 (1) : 60 - 61.
- \_\_\_\_\_ . 1936b. Inversion in the periodicity of emission of cercariae from their snail hosts by reversal of light and darkness. J. Parasitol. 22 (3) : 292 - 295.
  - Glaudel, R. J. and F. J. Etges. 1973. The effect of photoperiod inversion upon Schistosoma mansoni cercarial emergence from Biomphalaria glabrata. Int. J. Parasitol. 3 (5) : 619 - 622.
  - Harker, J. E. 1958. Diurnal rhythms in the animal kingdom. Biol. Rev. 33 : 1 - 52.
  - Hawking, F. 1975. Circadian and other Rhythms of Parasites. Advances in Parasitology 13 : 123 - 182.
  - Kayton, R. J. and G. D. Schmidt. 1975. Helminth parasites of the cliff swallow, Petrochelidon pyrrhonota Vieillot, 1817 in Colorado, with two new species. J. Helminthol. 49 (2) : 115 - 119.
  - Kendall, S. B. 1949. Nutritional factors affecting the rate of development of Fasciola hepatica in Limnaea truncatula. J. Helminthol. 23 (3/4) : 179 - 190.
  - Knudsen, J. W. 1966. Biological techniques: collecting, preserving, and illustrating plants and animals. Harper and Row Pub. New York, and John Weatherhill, Inc. Tokyo. 525 pp.

- Kurze, R. E. 1947. Effect of light and temperature on emergence of Schistosoma mansoni cercariae. Trans. Amer. Micr. Soc. 66 (1) : 37 - 49.
- Lamothe-Argumedo, R. 1982. Hospederos definitivos e intermediarios de Paragonimus mexicanus Miyasaki e Ishii, 1968 en México. An. Inst. Biol. Univ. Nat. Auton. Mex. 52 (1981) Ser. Zool. (1) : 39 - 44.
- \_\_\_\_\_, J. Caballero D. y E. Lázaro Ch. 1978. Paragonimiasis experimental en gatos (Felis catus L.) con Paragonimus mexicanus Miyasaki e Ishii, 1968. Neumol. Cir. Torax. Mex. 39 (2) : 71 - 80.
- Lang, B. Z. 1963. Comparison of the xiphidiocercariae of Plagiorchis muris and P. proximus (Trematoda: Plagiorchiidae). J. Parasitol. 49 (1) : 84.
- 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. Parasitol. 41 (2) : 201 - 208.
- Mackenzie, D. I. and C. E. McKenzie. 1980. Morphological variation in Plagiorchis noblei Park, 1936 (Trematoda: Plagiorchiidae) from Tyrannus tyrannus and T. verticalis (Aves: Tyrannidae). J. Parasitol. 66 (1) : 145 - 149.
- Macy, R. W. 1960. The life cycle of Plagiorchis vespertilionis parorchis n. sp. (Trematoda: Plagiorchiidae), and observations on the effects of light on the emergence of the cercaria. J.

Parasitol. 46 (3) : 337 - 345.

- \_\_\_\_\_ and D. J. Moore. 1958. The life cycle of Opisthioglyphe locellus Kossack, 1910, with a redescription of the species. Trans. Amer. Micro. Soc. 77 (4) : 396 - 403.
- Maldonado, J. F. 1959. The daily emergence of the cercaria of Schistosoma mansoni. Bol. Asoc. Med. Puerto Rico 51 (9) : 336 - 339.
- Malek, E. A. and T. C. Cheng. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 398 pp.
- Margolis, L., G. W. Esch, J. C. Holmes, A. M. Kuris, and G. A. Shad. 1982. The use of ecological terms in Parasitology (Report of an "ad hoc" committee of the American Society of Parasitologists). J. Parasitol. 63 (1) : 131 - 133.
- Mazzotti, L. 1955. Lymnaea obrússa Say, huésped intermediario de Fasciola hepatica. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. México 15 (3) : 163 - 165.
- \_\_\_\_\_ 1956. Lymanaea humilis (Say), huésped intermediario de Fasciola hepatica. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. México 16 (4) : 21 - 23.
- McClelland, W. J. F. 1965. The production of cercariae by Schistosoma mansoni and S. haematobium and methods for estimating the numbers of cercariae in suspension. Bull. Wld. Hlth. Org. 33 (2) : 270 - 276.
- McMullen, D. B. . 1937a. The life histories of three



- trematodes, parasitic in birds and mammals, belonging to the genus Plagiorchis. J. Parasitol. 23 (3) : 235 - 243.
- \_\_\_\_\_ . 1937b. A discussion of the taxonomy of the Family Plagiorchiidae Luhe, 1901, and related trematodes. J. Parasitol. 23 (3) : 244 - 258 .
- \_\_\_\_\_ . 1938. Observations on precocious metacercarial development in the trematode Superfamily Plagiorchioidea. J. Parasitol. 24 (3) : 273 - 280.
- Mills, J. N. 1966. Human Circadian Rhythms. Ann. Rev. Physiol. 46 : 128 - 171.
- Najarian, H. H. 1952a. A new xiphidiocercaria, C. goodmani, from Lymnaea palustris. J. Parasitol. 38 (2) : 157 - 160.
- \_\_\_\_\_ . 1952b. The encystment of Cercaria goodmani Najarian, 1952. J. Parasitol. 38 (4), Sect. 2 (Suppl.) : 38 - 39.
- \_\_\_\_\_ . 1952c. Observations on caddis fly larvae with respect to their serving as intermediate hosts for trematodes. J. Parasitol. 38 (4), Sect. 2 (Suppl.) : 39.
- \_\_\_\_\_ . 1961. The life cycle of lagiorchis goodmani n. comb. (Trematoda: Plagiorchiidae). J. Parasitol. 47 (4) : 625 - 634.
- Nasir, P. 1964. Studies on freshwater larval trematodes. Part V. A new polyadenous Xiphidiocercaria, C. baldai, from Venezuela. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 31 (1) : 28 - 30.

- \_\_\_\_\_. and A. Acuña-Cedeño. 1966. Studies on freshwater larval trematodes. Part XIII. Some new species of cercariae from Venezuela. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 33 (1) : 96 - 100.
- Nicoll, W. 1923. A reference list of the trematode parasites of british birds. Parasitology 15 (2) : 151 - 202.
- Noller, W. und K. Ullrich. 1927. Die entwicklung einer Plagiorchis - Art. (Ein Beitrag zur Kenntnis der Cercariae armatae). Sitzungsb. Gesellsch. naturf. Fr. (Berlin), 81 - 96.
- Odening, K. 1959. Über Plagiorchis, Omphalometra und Allocreadium (Trematoda: Digenea). Z. Parasitenkd. 19 : 14 - 34.
- \_\_\_\_\_. 1961. Zur morphologischen Variationsbreite von Plagiorchis und Opisthioglyphe (Trematoda, Digenea). Monatsberichte der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin 3 (3/4) : 188 - 202.
- Olivier, L. 1951. The influence of light on the emergence of Schistosomatium douthitti cercariae from their snail hosts. J. Parasitol. 37 (2) : 201 - 204.
- Olsen, O. W. 1937. A systematic study of the trematode subfamily Plagiorchiinae Pratt, 1902. Trans. Amer. Micr. Soc. 56 (3) : 311 - 339.
- Ostrowski de Núñez, M. 1982. Die entwicklungszyklen von Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum (Lutz, 1928) Dubois,

- 1970 und D. (A.) mordax (Szidat und Nani, 1951) n. comb.  
Sudamerika. Zool. Anz. Jena 208 (5/6) : 393 - 404.
- Park, J. T. 1936. New trematodes from birds, Plagiorchis noblei sp. nov. (Plagiorchiidae) and Galactosomum humbargari sp. nov. (Heterophyidae). Trans. Amer. Micr. Soc. 55 (3) : 360 - 365.
- \_\_\_\_\_. 1939. Trematodes from Mammalia and Aves. II. Two new trematodes of Plagiorchiidae: Plagiorchoides rhinolophi n. sp. and Plagiorchis orientalis n. sp. from Tyosen (Korea). Keizye J. Med. 10 (1) : 1 - 6.
- Phillips, J. G. 1976. Fisiología Ecológica. Ed. Blume. Madrid, España. pp. 7 - 13.
- Pineda-López, R. F., D. Osorio-Sarabia, R. J. Almeyda-Artigas, G. Pérez-Ponce de León y O. Andrade S. 1985. Estudio del control sanitario de la Piscifactoría "Benito Juárez" y en los vasos de las presas de "Malpaso" y "La Angostura", Chiapas. Memoria del Contrato EF-009-84. Dirección General de Acuicultura, S.E.P.E.S.C.A., 306 pp. + 14 lams. + 2 planos.
- Pittendrigh, C. S. 1954. On temperature independence in the clock system controlling emergence in Drosophila. Proc. Nat. Acad. Sci. 40 : 1018 - 1029.
- \_\_\_\_\_. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25 : 159 - 184.

- Fratt, I. and G. D. Barton. 1941. The effects of four species of larval trematodes upon the liver and ovotestis of the snail, Stagnicola emarginata angulata (Sowerby). J. Parasitol. 27 (4) : 283 - 288.
- Price, P. W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Monographs in population biology No. 15. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, U.S.A. 237 pp.
- Rangel-Ruiz, L. J. y R. Lamothe-Argumedo. 1986. Estudio de las formas larvianas de Paragonimus mexicanus Miyasaki e Ishii, 1968, en el primer hospedero intermediario Aroapyrgus alleei (Mollusca: Gastropoda) de Colima, México. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Mex. 57, Ser. Zool. (1) : 31 - 48.
- Rees, G. 1931. Some observations and experiments on the biology of larval trematodes. Parasitology 23 (4) : 428 - 440.
- \_\_\_\_\_. 1948. A study of the effect of light, temperature, and salinity on the emergence of Cercaria purpurae Lebour from Nucella lapillus (L.). Parasitology 38 (4) : 228 - 242.
- \_\_\_\_\_. 1952. The structure of the adult and larval stages of Plagiorchis (Multiglandularis) megalorchis n. nom. from the turkey and an experimental demonstration of the life history. Parasitology 42 (1/2) : 92 - 113.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Ed. Limusa, S. A. México. 432 pp.
- Schell, S. C. 1970. How to know the trematodes. Wm. C. Brown

Co. Pub. Iowa, U. S. A. 355 pp.

- Schreiber, F. G. and M. Schubert. 1949. Experimental infection of the snail Australorbis glabratus with the trematode Schistosoma mansoni and the production of cercariae. J. Parasitol. 35 (1) : 91 - 100.
- Shore, L. and L. R. Ash. 1979. Diagnostic Parasitology. Clinical Laboratory Manual. C.V. Mosby Co. Saint Louis, Missouri, U. S. A. 2nd. Ed. 174 pp.
- Smyth, J. D. and M. M. Smyth. 1980. Frogs as host-parasite systems. I. An introduction to parasitology through the parasites of Rana temporaria, R. esculenta, and R. pipiens. MacMillan Press, Ltd. London. 112 pp.
- Sosa, A. H. 1935. Los bosques de Huitzilac y las Lagunas de Zempoala en el estado de Morelos. México Forestal 13 (5/6) : 39 - 46.
- Stadler, D. R. 1959. Genetic control of a cyclic growth pattern in Neurospora. Nature 184 : 170 - 171.
- Stunkard, H. W. 1940. Life history studies and the development of Parasitology. J. Parasitol. 26 (1) : 1 - 15.
- Théron, A. 1975. Chronobiologie des cercaires de Ribeiroia marini (Faust et Hoffmann, 1934) parasite de Biomphalaria glabrata: action de la photopériode sur le rythme d'émission. Acta Tropica 32 (4) : 309 - 316.
- \_\_\_\_\_ . 1976. Le cycle biologique de Plagiorchis neomidia

- Brendow, 1970 digene parasite de Neomys fodiens dans les Pyrenees. Chronobiologie de l'émission cercarienne. Ann. Parasit. Hum. Comp. 51 (3) : 329 - 340.
- \_\_\_\_\_. 1980. Mise en évidence de Races chronobiologiques de Schistosoma mansoni, agent de la bilharziose, à partir des cinétiques d'émission cercarienne. C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, 291 (2) : 279 -282.
- \_\_\_\_\_. et C. Combes. 1983. Analyse génétique du rythme d'émergence des cercaires de Schistosoma mansoni par croisement de souches à pics d'émission précoces ou tardifs. C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. III, 297 (12) : 571 - 574.
- \_\_\_\_\_. et H. Moné. 1986. Shedding patterns of Schistosoma mansoni and Ribeiroia marini cercariae from a mixed infection of Biomphalaria glabrata. J. Helminthol. 60 (4) : 255 - 259.
- Threlfall, W. 1968. Studies on the helminth parasites of the American herring gull (Larus argentatus Font.) in Newfoundland. Can. J. Zool. 46 (6) : 1119 - 1126.
- Valle, C., J. Pellegrino e N. Alvarenga. 1971. Ritmo circadiano de emergencia de cercárias (Schistosoma mansoni--Biomphalaria glabrata). Rev. Brasil. Biol. 31 (1) : 53 - 63.
- Velasquez, C. C. 1964. Observations on the life history of Plagiorchis dilimanensis sp. n. (Trematoda: Digenea). J. Parasitol. 50 (4) : 557 - 563.
- Wagenbach, G. E. and A. L. Alldredge. 1974. Effect of light on

- the emergence pattern of Plagiorchis micracanthos cercariae from Stagnicola exilis. J. Parasitol. 60 (5) : 782 - 785.
- Webster, W. A. 1974. Diplotrriaena obtusa (Rudolphi, 1802) and Plagiorchis maculosus (Rudolphi, 1802) collected from a purple martin, Progne subis, in Canada. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 41 (1) : 109.
  - Williams, R. R. 1964. Life history of Plagiorchis noblei Park, 1936 (Abstract). J. Parasitol. 50 (3), Sect. 2 (Suppl.) : 29.
  - Yamaguti, S. 1954. Parasitic worms mainly from Celebes. Part 4. Trematodes of reptiles and birds. Acta Med. Okayama 8 (4) : 329 - 340.
  - \_\_\_\_\_. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vols. I and II. Keigaku Pub. Co. Tokyo, Japan. 1074 + 349 pp.
  - \_\_\_\_\_. 1975. A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates, with special reference to the morphology of their larval forms. Keigaku Pub. Co. Tokyo, Japan. 590 pp. + 219 plates.
  - Zar, J. H. 1974. Biostatistical analysis. Englewood Cliffs, N. J. Prentice Hall, Inc.
  - Zerecero y D., M. C. 1949. Acerca de una nueva especie del género Plagiorchis Luhe, 1899, en el intestino de Tyrannus sp. (Aves, Passeriformes, Tyrannidae). An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Mex. 20 (1/2) : 293 - 299.

9.1. CERCARIA:

ACETO-CARMIN DE SEMICHON DILUIDA

\* PREPARACION DEL COLORANTE :

- Agua destilada ..... 25 ml.
- Acido acético glacial ..... 25 ml.
- Carmin en polvo seco ..... en exceso

Mezclar el ácido lentamente con el agua, agitando. Añadir el colorante seco a la mezcla y calentar hasta 95 - 100°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar. El filtrado resultante es la solución madre, la cual se diluye (por lo menos) con una cantidad idéntica de alcohol al 70 % antes de ser utilizada.

\* PROCEDIMIENTO :

1.- Ya fijadas, pasar a las larvas, utilizando una pipeta Pasteur, a una caja de Petri con alcohol al 70 % durante 10 minutos.

2.- Una vez retirado el alcohol, cubrirlas ligeramente con el colorante diluido con dos a tres volúmenes de alcohol al 70 %, hasta que tomen una tinción roja oscura.

3.- Retirar el colorante y lavarlas una vez con alcohol al 70 %, por espacio de cinco minutos.

4.- Destefir con alcohol al 70 % acidulado al 1.0 % , agitando la solución ligeramente con un pincel ( para remover el remanente de colorante del parénquima que pudiera obscurecer estructuras internas importantes ) hasta que queden de color rosa pálido y renovando el alcohol ácido en caso de que se ponga muy rojo.

5.- Remover el ácido lavándolas en alcohol al 70 % , utilizando de uno a tres cambios, substituyendo este último con alcohol al 80 % .

6.- Deshidratarlas en alcoholes al 96 % y absoluto, durante 30 minutos en cada uno.

7.- Aclarar a las cercarias en carbol-xilol, en creosota neutra de la Haya o en xilol. Otros, como el Salicilato de Metilo, son menos tolerantes al agua remanente, por lo que el tratamiento debe hacerse de un modo gradual: alcohol 100 % - salicilato de Metilo 2:1, 1:1, 1:2 y, finalmente, salicilato puro (dejándolas en cada solución por lo menos hasta que las corrientes de difusión disminuyan y las larvas se vean más claras que en la mezcla precedente, pudiéndolas dejar indefinidamente en el salicilato puro, sin que se vuelvan quebradizas como sucede con el xilol y sin que se decoloren,



como ocurre con la exposición prolongada a otros agentes aclarantes).

8.- Montarlas en bálsamo de Canada o en resina sintética, directamente del xilol o del salicilato de Metilo o después de lavarlas en xilol si es que fueron aclaradas en un agente no-volátil que pudiera interferir con el endurecimiento apropiado de la resina.

9.- Colocar las preparaciones permanentes en una estufa de secado (a una temperatura de 60oC) por espacio de una semana.

10.- Limpiarlas cuidadosamente con alcohol al 96 % y xilol.

11.-Etiquetarlas correctamente (especies del parásito y del hospedero, fecha de colecta, localidad, colector, técnica de tinción, quién determinó, fecha de determinación y número de catálogo).

## 9.2. ADULTO:

### 9.2.1. FIJADOR AFA.

Se mezclan 10 partes de formol comercial, 50 partes de alcohol al 96 %, 2 partes de ácido acético glacial y 40 partes de agua destilada, después de lo cual puede ser empleado inmediatamente.

### 9.2.2. TECNICAS DE TINCION.

## HEMATOXILINA DE DELAFIELD

### \* PREPARACION DEL COLORANTE :

- Cristales de hematoxilina .....	1 gr.
- Alcohol etílico absoluto .....	10 ml.
- Sulfato aluminico potásico .....	18 gr.
- Agua destilada .....	100 ml.
- Glicerina .....	25 ml.
- Alcohol metílico absoluto .....	25 ml.

La solución saturada acuosa de alumbre se obtiene mezclando el sulfato aluminico potásico con el agua destilada, calentando la solución hasta que se disuelva perfectamente. Por otro lado, se disuelve la hematoxilina en el alcohol, para entonces ser añadida ésta última a la solución saturada, una vez enfriada. Por espacio de una semana se expone a la luz solar y al aire para que madure al oxidarse se convierte en hemateína, utilizando para este fin una botella transparente con un tapón de algodón. Después de ser filtrada, se le añade la glicerina y el metanol. Se recomienda que se deje añejar más de un mes en presencia de luz solar antes de ser empleada.

**\* PROCEDIMIENTO :**

1.- Hidratar a los ejemplares gradualmente en una serie de alcoholes de 70, 50 y 30 % , 30 minutos en cada uno.

2.- Sumergirlos en el colorante diluido en nueve partes de agua destilada, varias horas.

3.- Lavarlos varias veces en agua destilada.

4.- Deshidratarlos gradualmente en una serie de alcoholes de 30, 50 y 70 % , 30 minutos en cada uno.

5.- Diferenciarlos en alcohol al 70 % acidulado al 1 %.

6.- Quitarles el exceso de ácido mediante varios lavados en alcohol al 70 % .

7.- Virarlos hasta púrpura-azuloso en alcohol al 70 % alcalino (varias gotas de una solución acuosa saturada de carbonato de litio o cinco gotas de amoníaco).

8.- Deshidratarlos gradualmente en otra serie de alcoholes, de 80, 96 y 100 % , de 30 a 60 minutos en cada uno.

9.- Aclararlos en creosota neutra de la Haya, esencia de clavos, xilol o salicilato de Metilo (ver paso 7. del inciso 9.1.).

10.- Montarlos en bálsamo de Canadá o en resina sintética.

11.- Secar las preparaciones permanentes en una estufa, a una temperatura de 60oC, por espacio de una semana.

12.- Limpiar el exceso del medio de montaje con alcohol al 96 % y con xilol, cuidadosamente.

13.- Etiquetarlas correctamente.

**TRICROMICA DE GOMORI**

**\* PREPARACION DEL COLORANTE :**

- Chromotrope 2R .....	0.6 gr.
- Verde brillante SF .....	0.8 gr.
- Acido fosfotungsténico .....	0.7 gr.
- Agua destilada .....	100 ml.
- Acido acético glacial .....	1 ml.

Se mezclan todos los componentes en el agua destilada, agitando la solución hasta que se disuelvan perfectamente, agregándose al final el ácido acético. Se almacena en frasco color ambar con tapa hermética.

\* PROCEDIMIENTO :

1.- Hidratar gradualmente a los ejemplares en una serie de alcoholes de 70, 50 y 30 % hasta agua destilada, 30 minutos en cada uno.

2.- Tefirlos en el colorante diluido (tres gotas de la solución "madre" por cada nueve ml. de agua destilada), hasta que tomen una coloración oscura homogénea.

3.- Quitarles el exceso de colorante en varios cambios de agua destilada.

4.- Diferenciarlos en agua destilada agregada de ácido acético glacial, hasta que ya no suelten colorante.

5.- Lavar el exceso de ácido en varios cambios de agua destilada.

6.- Deshidratarlos gradualmente en una serie de alcoholes de 30, 50, 70, 80, 96 y 100 % , 30 minutos en cada uno.

7.- OPCIONAL: Si se desea, pueden suprimirse los pasos 4 y 5, diferenciándolos en alcohol al 96 % agregado del ácido acético, lavando el exceso de ácido en alcohol de 96 % antes de pasarlos al alcohol absoluto.

8.- Aclararlos.

9.- Montarlos.

10.- Secar las preparaciones en la estufa.

11.- Limpiarlas y etiquetarlas correctamente.