

**HISTOPATOLOGIA Y RELACIONES
FASCIOLA HEPATICA / LYMNAEA TRUNCATULA Y
L. PALUSTRIS EN INFESTACION EXPERIMENTAL**

Por Alfredo Escudero Diez

INDICE

1. INTRODUCCION. 2. REVISION BIBLIOGRAFICA.—2.1. Histopatogenia de fases larvarias de tremátodos distintos a *F. hepatica* sobre sus hospedadores intermedarios.—2.2. *Lymnaea truncatula* y *Fasciola hepatica*.—2.3. Hospedadores intermedarios de *F. hepatica*.—2.3.1. Tabla resumen de moluscos citados como hospedadores intermedarios de *F. hepatica* en el mundo, en infestaciones naturales.—2.3.2. Tabla resumen de los moluscos citados como hospedadores intermedarios de *F. hepatica* en el mundo, en infestación experimental.—2.4. REVISION DE METODOS.—2.4.1. Cultivo de moluscos en el laboratorio y formación de estirpes.—2.4.2. Infestación experimental.—2.4.3. Anestesia, disección, fijación, coloración, cortes, etc.—3. INVESTIGACIONES PERSONALES.—3.1.—MATERIAL Y METODOS.—3.1.1. Hospedadores elegidos y hábitat de los mismos.—3.1.2. Identificación.—3.1.3. Cultivo en el laboratorio de los moluscos.—3.1.4. Preparación de miracidios.—3.1.5. Infestación experimental de los moluscos.—3.1.6. Estudio de los moluscos infestados.—3.1.6.1. Anestesia y disección.—3.1.6.2. Fijación, decalcificación, inclusión y cortes.—3.1.6.3. Tinción y microfotografías.—3.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS.—3.2.1. Infestación de *Lymnaea truncatula*.—3.2.1.1. Experiencia 1.^a.—3.2.1.2. Experiencia 2.^a.—3.2.1.3. Experiencia 3.^a.—3.2.1.4. Experiencia 4.^a.—3.2.1.5. Experiencia 5.^a.—3.2.1.6. Experiencia 6.^a.—3.2.1.7. Experiencia 7.^a.—3.2.2. Infestaciones de *Lymnaea palustris*.—3.2.2.1. Experiencia 1.^a.—3.2.2.2. Experiencia 2.^a.—3.2.2.3. Experiencia 3.^a.—3.2.3. Infestación de *Lymnaea stagnalis*.—3.2.4. Infestación de *Lymnaea auricularia*.—4. RESULTADOS Y DISCUSION.—4.1. De las experiencias con *L. truncatula* (penetración y esporocistos).—4.1.1. Histología normal de las partes expuestas a la penetración de los miracidios y desarrollo de los esporocistos.—4.1.2. Penetración y localización.—4.1.3. Histopatología.—4.1.3.1. Alteraciones del epitelio ciliado del miracidio.—4.1.3.2. Alteraciones de los tejidos del molusco.—4.2. De las experiencias con *L. palustris* (penetración y esporocistos).—4.2.1. Histología normal.—4.2.2. Penetración y localización.—4.2.3. Histopatología.—4.2.3.1. Alteraciones del epitelio ciliado del miracidio.—4.2.3.2. Alteraciones de los tejidos del molusco.—4.3. De las experiencias con *L. truncatula* (redias y cercarias).—4.3.1. Histología normal de las zonas de desarrollo de las redias y cercarias.—4.3.1.1. Tejido conjuntivo-muscular y cavidad general del cuerpo.—4.3.1.2. Riñón.—4.3.1.3. He-

patopáncreas.—4.3.2. Histopatología.—4.3.2.1. Lesiones en el tejido conjuntivo-muscular.—4.3.2.1.1. Lesiones en el pie.—4.3.2.1.2. Lesiones en la proximidad del ojo.—4.3.2.1.3. Lesiones en el tejido conjuntivo muscular que rodea a la cavidad paleal.—4.3.2.1.4. Formas larvarias degeneradas.—4.3.2.2. Lesiones en la cavidad general y riñón (Emigración de redias) 4.3.2.3. Lesiones en el hepatopáncreas.—4.4. De las experiencias con *L. palustris* (redias y cercarias).—4.4.1. Histología normal de las zonas de desarrollo de las redias y cercarias.—4.4.1.1. Tejido conjuntivo-muscular y cavidad general del cuerpo.—4.4.1.2. Riñón.—4.4.1.3. Hepatopáncreas.—4.4.2. Histopatología.—4.4.2.1. Lesiones en el tejido conjuntivo-muscular.—4.4.2.1.1. Lesiones en el pie.—4.4.2.1.2. Lesiones en las proximidades del ojo.—4.4.2.1.3. Lesiones en el tejido conjuntivo-muscular que rodea a la cavidad paleal.—4.4.2.1.4. Formas larvarias degeneradas.—4.4.2.2. Lesiones en la cavidad general y riñón (Emigración de redias).—4.4.2.3. Lesiones en el hepatopáncreas.—4.5. De las experiencias con *L. stagnalis*.—4.6. De las experiencias con *L. auricularia*.—5.—CONCLUSIONES. 6.—RESUMEN. 7. BIBLIOGRAFIA.

I. INTRODUCCION

La fasciolosis es un proceso de interés médico y veterinario. En el aspecto veterinario, destaca como una de las helmintosis más importantes, por causar daños directos en los rebaños, (muerte por fasciolosis aguda, a consecuencia de la invasión masiva del hígado) o indirectos, (fasciolosis subclínicas con disminución notable de la normofuncionalidad hepática, animales depauperados, con menor producción de lana, leche, etc.). A todos estos factores, se suman las pérdidas ocasionadas por el decomiso de hígados intensamente parasitados (COLOMA 1955, GARCÍA DÍEZ 1964).

En nuestro ámbito —Provincia de León—, el 55,9 % de los ovinos mayores de dos años y el 70,9 % de los bovinos de más de cinco, se encuentran infestados (DEL RÍO 1967). También se ha diagnosticado en fecha reciente un caso de fasciolosis humana (MARTÍNEZ 1969).

Pensamos que cualquier procedimiento de lucha contra la enfermedad, se puede realizar, bien sobre el hospedador definitivo (tratamiento de los animales parasitados) bien, sobre los hospedadores intermediarios (*Lymnaea* spp.). Por esta causa, consideramos, que todo intento de profundizar en el conocimiento de las relaciones parásito-hospedador, en cualquiera de las fases del ciclo biológico de fasciola, conducirá a mejorar los procedimientos de lucha o a aumentar su eficacia o su extensión.

El presente trabajo, trata de llegar a conocer las relaciones íntimas, parásito-hospedador intermediario, a nivel tisular. Estudiamos la histopatología del desarrollo de las fases larvarias del tremátodo, en los moluscos *Lymnaea truncatula* y *L. palustris*.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

Ante el planteamiento del problema en estudio, haremos una revisión de la bibliografía concerniente a las relaciones tremátodo-molusco, en cuanto a las lesiones histopatológicas. Comenzaremos analizando los trabajos realizados con moluscos y tremátodos bastante alejados de *Fasciola*, para seguir con *Schistosoma* spp. y sus hospedadores, y finalizar con *Lymnaea* spp. con *Fasciola hepatica*.

La razón que aconseja esta revisión consiste en que, aunque los moluscos y tremátodos en estudio están muy alejados taxonómicamente de los que nos interesan, las lesiones pueden ser parecidas, especialmente en lo que se refiere a los efectos traumáticos y de masa de infestación. No obstante, seguimos en la revisión un enfoque taxonómico, desde las formas más alejadas a las más próximas, para finalizar con los escasos trabajos que se han realizado sobre *Lymnaea* spp. y *Fasciola*.

Como quiera que nuestro estudio se realiza no sólo en el hospedador normal de *Fasciola hepatica* para Europa, *Lymnaea truncatula*, sino también en *Lymnaea palustris*, se revisa la bibliografía, copiosísima, sobre los hospedadores normales y experimentales de *Fasciola hepatica* en el mundo. En esta revisión se respeta la nomenclatura utilizada por los autores. Es lógico pensar que, en muchos casos, las especies de moluscos citadas, pertenecen a la sinonimia, pero no podemos entrar en discusión, debido a que sería necesario en cada caso disponer de los moluscos en cuestión.

2. 1. HISTOPATOLOGIA DE LAS FASES LARVIARIAS DE TREMATODOS DISTINTOS A *F. HEPATICA* SOBRE SUS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

Dentro de la bibliografía mundial, pueden recogerse numerosos trabajos dedicados a estos aspectos. Se ocupan tanto del conocimiento de las lesiones histopatológicas, provocadas por las fases larvarias, como del comportamiento parásito hospedador, en variadas condiciones.

Tremátodos diversos.

FAUST (1920), hizo un estudio histopatológico de la glándula digestiva de los gasterópodos parasitados naturalmente por fases larvarias de distintos tremátodos.

Las especies estudiadas fueron: *Planorbis guadalupensis*, *Phisopsis africana*, *Planorbis trivolvis* y *Physa* spp.

Hace primeramente una descripción de la estructura normal de la glándula digestiva de los gasterópodos, llegando a la conclusión de que solamente existen dos tipos celulares: las células mucosas y las células hepáticas.

En caracoles infestados, observa que las larvas que penetran en el músculo del pie, nunca alcanzan el estado de desarrollo. Por el contrario, las que alcanzan los espacios lacunares hemáticos no se alteran, ni lesionan los tejidos del hospedador hasta que, en su desarrollo, llegan a la glándula digestiva.

La producción de cercarias en la glándula digestiva ejerce presión sobre los túbulos, llegando a colapsarlos e impidiendo la provisión de alimentos. Esta acción mecánica es lo más notorio del parasitismo.

Por procedimientos histoquímicos, comprueba que en las células del hepatopáncreas normal abundan las sustancias de reserva (glucógeno, grasa, etc.). La situación de estas sustancias cambia con el parasitismo. En las glándulas digestivas parasitadas, las células son pobres en estas sustancias, apareciendo, sin embargo, en los espacios extracelulares y en los parásitos. Es un reflejo de la acción depredadora del verme.

Los productos excretados por el parásito, son recogidos dentro de vacuolas, las cuales caminan del polo apical a la luz de los túbulos. Como esta función de expulsión es limitada, tales sustancias provocan cambios líticos en las células.

Aparecen, en principio, densos conglomerados de detritus entre el núcleo y el polo apical de las células, acúmulos que, finalmente, se dispersan por todo el citoplasma.

Posteriormente ocurren cambios patológicos en el núcleo, tal como la formación de husos multiformes.

Observó, finalmente, que la glándula digestiva del molusco puede resistir una infestación masiva durante un tiempo más largo que el hígado de los vertebrados, con recuperaciones rápidas. Esto sugiere un mayor poder de adaptabilidad y un mejor índice regenerativo, basado en una organización más simple.

La comparación que establece, entre la histopatología de los tremátodos, en la glándula digestiva de los hospedadores intermediarios y en el hígado de los vertebrados, parece más bien un símil didáctico que un reflejo de la realidad.

ACERSBORG (1924) demostró cómo los caracoles de agua dulce *Physa gyrina* y *Planorbis trivolvis*, infestados con larvas de tremátodos, responden a la infestación con una hipersecreción celular, posiblemente originada en el núcleo y acumulada en el citoplasma, que finalmente es expulsada a los espacios intercelulares. Probablemente estos productos de secreción celular tengan una función neutralizante frente a las excreciones del parásito.

La glándula digestiva puede presentar un aspecto fisiológico normal, a pesar de estar fuertemente parasitada.

Finalmente, reconoce varios estados de infestación:

1.º). Cuando el parásito invade al hospedador, los tejidos se arrugan, haciéndose difícil las manipulaciones histológicas.

2.º). Secreción de la mencionada sustancia granular.

3.º). En infestaciones masivas, desintegración de los tejidos del caracol. Observa, a veces, la transformación o metaplasia del epitelio cilíndrico de la glándula digestiva, en escamoso.

4.º). Si el hospedador no se muere durante la tercera etapa, se puede observar una regresión de las lesiones hacia la normalidad, una vez eliminado el parasitismo.

REES (1931) estudió las alteraciones producidas en *Patella vulgata* por *Cercaria patellae*, considerando que los daños fisiológicos son superiores y más importantes que las alteraciones mecánicas. Los órganos invadidos disminuyen su función específica, empleándose en la eliminación de los productos tóxicos del parásito, proceso que conduce a la atrofia de los tejidos.

REES (1936) estudió los efectos producidos por distintas larvas de tremátodos en los tejidos de *Littorina littorea*, señalando daños por acción mecánica en órganos como las branquias y riñones y daños fisiológicos en la gónada y glándula digestiva. Las alteraciones en estos últimos órganos están en función de factores tales como la naturaleza de las larvas (esporocistos o redias), su tamaño y el bloqueo producido por ciertos esporocistos inactivos.

En determinados casos, aprecia alteraciones de tipo mecánico en la gónada, por la acción depredadora del parásito. En estos casos, la glándula digestiva está afectada indirectamente, bien por la presión ejercida por las redias, o por la pérdida de sustancias nutritivas, o bien, por la enorme producción de material de desecho. Este último caso lo encuentra en *Littorina littorea* cuando es atacada por redias.

Cuando es afectada por esporocistos, en vez de redias, la gónada presenta lesiones de tipo indirecto, semejantes a las producidas en la glándula digestiva en infestaciones por redias.

DAWES (1946), con respecto al parasitismo de tremátodos, sobre los hospedadores intermediarios, revisó los problemas de cambio de sexo, crecimiento anormal y gigantismo.

JAMES (1965) estudió el efecto del parasitismo por cinco especies de tremátodos sobre la glándula digestiva de *Littorina saxatilis tenebrosa* (Mont.). Los efectos producidos por el parasitismo fueron de dos tipos.

1.º).—Bloqueo por compresión de la luz de los túbulos de la glándula digestiva. Las células situadas por encima del bloque, sufren autólisis por hambre.

2.º).—En los túbulos de la glándula digestiva que no están afectados directamente por el bloqueo, aparece una reacción en los glóbulos de reserva y un aumento compensador en el número de vacuolas. Por otra parte, se observa un aumento de células secretoras, quizá con la misión de eliminar del hemocele las sustancias de excreción del parásito. Todo este conjunto de lesiones, no directamente relacionadas con la acción mecánica del tremátodo, puede llamarse «efectos fisiológicos del parasitismo».

La extensión de las lesiones viene dada por la circunstancia específica del sistema estudiado. Depende de la velocidad de crecimiento del parásito, en relación con la duración de la vida del hospedador y del momento de iniciación del parasitismo. También de la movilidad de los sacos germinales. Finalmente, como en todos los parasitismos, del grado de acomodación de las relaciones parásito—hospedador.

La destrucción de la glándula digestiva puede tener otras causas, además de la autólisis por hambre debida al bloqueo, tales como la ingestión directa por las redias y el acúmulo de sustancias de desecho de origen parasitario.

Planorbis (sens. lat.) y *Bulinus* spp.

FAUST y HOFFMANN (1934) afirmaron que la emigración de la primera generación de esporocistos de *Schistosoma mansoni* a través de los tejidos de *Australorbis glabratus* producen muy pocos daños debido a que en esta fase el número de esporocistos es muy pequeño.

Posteriormente, la maduración rápida de las cercarias y su desplazamiento hacia las porciones distales del caracol, originan un gran aumento de la presión sobre la túnica propia.

PORTER (1939) hizo un estudio histológico de la glándula digestiva de los distintos moluscos que pueden actuar como hospedadores de tremátodos, especialmente esquistosómidos en Sudáfrica.

La considera constituida por una serie de túbulos, a veces no ramificados, pero, en general, con carácter racemoso. Los túbulos están constituidos por un epitelio glandular y unidos entre sí por tejido conjuntivo intersticial, en el seno del cual existen ramas de la arteria hepática, capilares biliares, lagunas hemáticas y algunas fibrillas nerviosas.

Posteriormente, estudia las lesiones histopatológicas inferidas en la glándula digestiva de *Bulinus africanus* por *Schistosoma haematobium*. Describe la penetración del miracidio en el tejido conjuntivo intersticial, con sus células ciliadas.

En infestaciones masivas, los esporocistos llegan rápidamente a la glándula digestiva. Los túbulos al ser comprimidos, disminuyen su luz considerablemente. Las células epiteliales aparecen vacuolizadas, desapareciendo la típica disposición en empalizada, y adquiriendo finalmente, aspecto estratificado.

Cuando el parásito crece, ocurre histolisis del conjuntivo intersticial y de los propios túbulos hepáticos, que aparecen reemplazados por parásitos.

MALDONADO y ACOSTA MATIENZO (1947), describieron el desarrollo larvario de *Schistosoma mansoni*, en el hospedador intermediario *Australorbis glabratus*.

Estudian la penetración de los miracidios en el molusco, observando que se realiza por perforación de la epidermis de los órganos cefalopodales, tentáculos y collar del manto. Lesión primaria de la infestación.

El caracol puede ser infestado simultáneamente por numerosos miracidios, degenerando muchos de ellos en los primeros días.

La reacción de los tejidos del caracol, se traduce en una fuerte tumefacción, que aparece al cuarto día de infestación, creciendo en tamaño a medida que van avanzando en edad. No describe ningún otro tipo de lesiones.

NEWTON (1952), realizó un estudio sobre el comportamiento de los tejidos de dos cepas de *Australorbis glabratus* (una procedente de Puerto Rico y otra del Brasil), a la infestación con *Schistosoma mansoni*.

La primera diferencia fue el escaso poder de infestación de *Schistosoma mansoni* de Puerto Rico, para *A. glabratus* de Brasil.

En las cepas de Puerto Rico, el parásito se desarrolló sin ninguna interferencia por parte del caracol. Por el contrario en los ejemplares de Brasil el parásito es destruido y desaparece generalmente dentro de las 24-48 horas después de la penetración.

La respuesta tisular se traduce en la presencia de un infiltrado celular alrededor del parásito, así como la formación de una reacción de tipo conjuntivo.

VASCONCELLOS (1957), estudió el desarrollo de las formas larvarias de *Schistosoma mansoni* en *Australorbis nigricans*, hospedador de elección para la estirpe de tremátodo utilizada en la experiencia.

Durante la penetración, el comportamiento de los miracidios es el mismo para ambas especies. Tras ella, mientras que en *A. glabratus*, caminan algún tiempo por los espacios lacunares, en *A. nigricans* se desarrollan en las proximidades del punto de entrada.

La presencia de miracidios (*sic*) en los tejidos de *A. nigricans* provoca la influencia de numerosos amebocitos, que tienden a envolverlo. Considera el autor que estas células tienen una doble procedencia: de los tejidos próximos al punto de penetración e implantación, y de la corriente sanguínea.

En reacciones menos recientes, observó histolisis en los esporocistos, caracterizada por piconosis primero y destrucción después, de los núcleos de las células germinativas. Apreció también cambios del citoplasma, el cual se torna ligeramente acidófilo, con presencia de gránulos.

En fases más avanzadas, comprobó modificaciones de los amebocitos; se alargan tomando aspecto fibroso y aumentando su poder fagocitario. Vio más tarde, cómo desaparece el aspecto fibroso con retorno a su forma primitiva, presentando únicamente granulaciones citoplasmáticas, semejantes a los gránulos de melanina.

Los amebocitos con su forma primitiva ya, se dispersan por los tejidos vecinos, terminando la reacción sin dejar en los tejidos alteración alguna.

Por el contrario, la presencia de miracidios en los tejidos de *A. glabratus*, no da lugar en las primeras horas, a la presencia de amebocitos, como si los tejidos del hospedador no se apercibieran de que contienen larvas.

En fases más avanzadas, cuando son irreconocibles los restos del parásito, el foco es invadido por los amebocitos.

El autor concluye señalando que, *A. nigricans* de la población estudiada, originarios de Río de Janeiro, son altamente resistentes a la infestación por las cepas de *S. mansoni* de Belo Horizonte, los miracidios completan su desarrollo, no habiéndose observado señales de reacción por la presencia de larvas.

SUDD (1960) estudió cuatro especies diferente de esquistosomas, dos de aves y dos de mamíferos, frente a hospedadores normales y anormales. Observó el comportamiento de los miracidios frente a uno y otro tipo de hospedadores y las reacciones tisulares posteriores a la penetración.

Denomina *comportamiento Tipo 4*, cuando el miracidio se fija en el cuerpo del caracol, pareciendo penetrar. Esta circunstancia es característica de los hospedadores normales, si bien el autor admite que también puede darse en hospedadores no habituales, independientemente de la evolución posterior del miracidio.

Comportamiento Tipo 3: el miracidio entra en contacto con los tejidos del caracol, se mueve rápidamente, sale nadando e intenta posteriormente la penetración.

Comportamiento Tipo 2: los miracidios realizan repetidas acciones de penetrar y salir nadando, sin que, finalmente, se establezca la penetración definitiva.

Comportamiento Tipo 1; Los miracidios parecían ignorar la presencia de los caracoles y si, accidentalmente se producía contacto, nadaban en dirección contraria.

Estos dos últimos tipos de comportamiento fueron observados por el autor en hospedadores no habituales.

Respecto a las lesiones provocadas en los tejidos del hospedador, establece igualmente cuatro categorías.

Respuesta Tipo 1; cuando no existe alteración histopatológica, por falta de penetración del miracidio.

Respuesta Tipo 2; Existe penetración del miracidio, que comienza a desarrollarse normalmente.

Respuesta Tipo 3 A; Si los esporocistos degeneran antes de comenzar su evolución.

Respuesta Tipo 3 B; cuando, a medida que aumenta el tiempo de infestación, todos los esporocistos, aún con cierto grado de evolución, degeneran sin que exista reacción alguna por parte de los tejidos del hospedador.

Lymnaea spp. Y OTROS TREMATODOS.

PORTER (loc. cit.), estudió la histología normal de la glándula digestiva de *Limnaea natalensis*, observando que las células epiteliales de los túbulos se disponen en empalizada. Las células son cilíndricas, con paredes evidentes que bordean la luz de los túbulos de manera regular. Los núcleos son pequeños, ovales y en posición generalmente basal. En su polo mundial, las células parecen tener una capa protectora.

No encuentra diferencia entre células fermentativas y hepáticas, aseverando que pasan insensiblemente de uno a otro grado.

Entre estas células, se encuentran las células limosas, que casi nunca alcanzan la luz del túbulo. Son redondas o poliédricas con grandes núcleos esféricos. El citoplasma alveolar.

En *L. natalensis* parasitada por furocercarias y xifidocercarias, el cuadro histopatológico de la glándula digestiva es similar al de *Bulinus africanus* infestado con *Schistosoma haematobium*.

Los productos de excreción y secreción del parásito, se acumulan en el seno del tejido conjuntivo intersticial. Algunos son eliminados por vía hemática, otros, se depositan en las células hepáticas formando pequeñas masas de gránulos de color oscuro.

Aun cuando las larvas se desarrollan sistemáticamente en el tejido conjuntivo intersticial, la autora ha encontrado circunstancialmente formas larvarias en el interior de los túbulos.

CHANDRA RAO (1966), comparó la receptividad de *L. natalensis* (Kraus) y *L. rufescens* (Gray), a la infestación con *Fasciola gigantica*, así como el comportamiento de los tejidos frente a la infestación.

Observó, en primer lugar, la dificultad de infestación de *L. rufescens*, indicando que los miracidios necesitan más tiempo para penetrar en los hospedadores poco receptivos.

Durante determinados períodos de tiempo, se observaron esporocistos en distintas regiones del caracol, en buen estado de desarrollo. No aparecían lesiones tisulares dignas de señalar.

En ambos moluscos, en torno a las redias aparecía un espacio claro vacío, por haber sido utilizado el tejido para su alimentación.

A los 20 días de la infestación, parte de los lóbulos de la glándula digestiva de *L. rufescens* estaban degenerados, coincidiendo este momento con la invasión de las redias de la segunda generación.

Las redias observadas en la glándula digestiva de *L. natalensis* parece que sólo se desarrollan en los espacios interlobulares, sin dañar las células circundantes, aunque el desarrollo de gran número de redias, altera extensamente la estructura de la glándula. Se encontraron lóbulos marcadamente separados unos de otros, así como atrofiados y degenerados.

2.2. *Lymnaea truncatula* y *Fasciola hepatica*.

DAWES (1946), al considerar las alteraciones provocadas por tremátodos en moluscos, las divide en dos tipos: mecánicas y químicas.

En *Fasciola hepatica* las mecánicas son producidas por las redias, que se van nutriendo de los tejidos del caracol, formando hasta llegar a la glándula digestiva, un verdadero túnel.

Las alteraciones químicas son debidas a las toxinas segregadas por el parásito (*sic*) que modifican el equilibrio fisiológico del hospedador.

BABER (1963) en infestaciones experimentales de *L. columella* con miracidios de *Fasciola hepatica* comprobó que este molusco no rechazaba los miracidios. La lesión inicial, consistía en una diminuta erosión del epitelio, con una gradual destrucción del tejido conjuntivo subyacente. En la fase de redia, detectó lesiones de las glándulas mucosas del manto y pie. No resultó atacado el ovotestis.

Los parásitos ocupaban los espacios ricos en arterias y venas. Al llegar al estado de cercaria, eran incapaces de escapar del hospedador, emigrando al interior de cavidades en el manto, velo y tentáculos donde se desintegraban.

KENDALL (1964) observó que las fases larvarias de *F. hepatica* tienen un marcado efecto patógeno sobre especies de limneidos distintos a *Lymnaea truncatula* (*L. palustris*, *L. glabra* y *L. stagnalis*). El crecimiento de los moluscos está profundamente retardado, la concha aparece transparente, por ausencia anormal de pigmento y sus espiras deformadas, y el caracol entra en letargo por efectos del parasitismo.

El autor no fue capaz de demostrar en *L. truncatula* desaparición de la infestación antes de la muerte del molusco. En hospedadores anormales (*L. stagnalis*), infestados con éxito, el parasitismo duraba un máximo de tres meses, al cabo de los cuales, el animal recuperaba sus condiciones fisiológicas normales, coincidiendo con la pérdida de la infestación.

SAINT-GUILLAIN (1968) hizo un estudio de la evolución de las formas larvarias de *Fasciola hepatica* en *L. truncatula* y analizó las lesiones aparecidas como consecuencia del crecimiento y evolución de las distintas formas larvarias.

Respecto a la penetración del miracidio, observó la introducción de la parte cefálica del mismo, entre las células epidérmicas. Esta introducción la atribuyó a los movimientos de vaivén por parte del miracidio y a las contracciones y relajaciones por parte de los tejidos del hospedador.

Penetrado el miracidio, aparecían un pequeño número de células epiteliales desprendidas, que conservan su estructura y que posteriormente intervienen en la restauración del tejido destruido en la penetración. Observó que, antes de la penetración del miracidio, las células epiteliales ciliadas del mismo, sufren un proceso de vacuolización y quedan abandonadas en el medio externo. A veces, por quedar estas células en el borde del orificio practicado por el miracidio, pueden confundirse con diferentes productos de degradación celular procedentes de las mismas.

El autor hace un análisis de los puntos de preferencia de entrada del miracidio. Cree que el sitio de elección se halla a nivel del pneumostoma.

No observa emigraciones del esporocisto, y cree que el desarrollo tiene lugar próximo al punto de entrada, por lo que las lesiones histológicas son poco extensas cuando se efectúa en el músculo y nulas cuando se realiza a nivel del riñón.

Un problema que tiene gran interés, es el porvenir de la membrana esporocística, en el momento de la salida de las redias. El autor cree que se trata de una digestión, aunque afirma que son necesarias más experiencias encaminadas a su confirmación.

Relaciona el tamaño existente entre las redias madres y las redias hijas, su emigración y desarrollo, así como las lesiones producidas hasta la formación de cercarias.

El trabajo de este autor, ha coincidido en parte con el nuestro.

2.3. HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *Fasciola hepatica*.

Fasciola hepatica es transmitida en condiciones normales en nuestro país por *Lymnaea truncatula* (GONZÁLEZ DE CASTRO 1947, XAVIER y cols. 1965, XAVIER y cols. 1968). KENDALL (1949), indica que el nivel de infestación en los campos de Europa es del 5 al 6 por 100.

Según experiencias de los autores que realizan trabajos de campo en zonas de fasciolosis, se confirma muchas veces la rareza de *L. truncatula* frente a la presencia masiva de varios tipos de hospedadores.

KENDALL (1965) considera que existe un gran confusionismo en la terminología de los limneidos y que ciertamente *F. hepatica* es transmitida en la mayor parte del mundo por *L. truncatula*, o por otros moluscos difíciles de diferenciar de él, sobre bases morfológicas o exigencias ecológicas. *L. truncatula*, está ampliamente distribuida por Europa, Asia y otras zonas. En Kenia, el hospedador, *L. mwenensis* es casi conoespecífico, y puede tratarse de *L. truncatula* recientemente introducida en Europa. En América del Norte, *L. bulinoides techela* y, en Australia *L. tomentosa*, son morfológicamente más diferentes de *L. truncatula*, pero tienen más características en común.

El problema de la existencia de varios tipos de hospedadores se ha estudiado de dos maneras: recogiendo poblaciones de moluscos en el campo y comprobando se están infestados con *F. hepatica*, o mediante infestación experimental de especies cultivadas en el laboratorio.

PANTELOURIS (1965) revisó trabajos negativos de intento de encontrar en el campo, moluscos infestados con *Fasciola hepatica*, diferentes a *L. truncatula*. Dio como positivos el de TAYLOR (1922), que observó eliminación de cercarias de *F. hepatica* en *L. pereger*, y el de GODERDZISHVILI (1955), que en la región de Leningrado, no encontró *L. truncatula*, pero obtuvo cercarias de *F. hepatica* a partir de *Glabra palustris* 5,4 %).

BACIGALUPO (1933, 1940) demostró que *L. viatrix* era el vector de *Fasciola hepatica* en la Argentina, coincidiendo las áreas de distribución del parásito con las del vector. El caracol, no obstante, es raro, y, a menudo, difícil de encontrar.

Considera igualmente como hospedador intermediario natural de *Fasciola hepatica* a *L. attenuata*.

En Norteamérica PRICE (1953) cita a *Galba* (*Fossaria*) *bilinoides*, *G. techela*, *Limnea traskii*, *Fossaria cubensis*, *F. ferruginea*, *F. modicella* y *Pseudosuccinea columella* como posibles hospedadores.

Respecto a las investigaciones realizadas con diversas especies de moluscos cultivados en el laboratorio y experimentalmente infestados con miracidios de *F. hepatica*, LEUKART (1881) y THOMAS (1883) realizaron pruebas con moluscos considerados como posibles hospedadores, para saber cuáles eran los verdaderos.

THOMAS sometió a infestación experimental a *Lymnaea palustris*, *L. stagnalis*, *Physa fontinalis*, *Planorbis marginalis*, *P. carinatus*, *P. vertres*, *P. spirorbis*, *Bythinia tentaculata*, *Paludina vivipara*, *Succinea amphibia*, *Limax agrestis*, *L. cinereus*, *Arion ater*, *A. ortensis* y *Lymnaea truncatula*.

Comprobó que solamente la última especie actuaba como hospedador intermediario.

LEUKART, por su parte, no llegó de inmediato a esta conclusión al infestar con éxito a *L. pereger*, aunque fue incapaz de obtener cercarias.

Recientemente, y debido a la gran contradicción entre las pruebas de campo, ha sido necesario que se realicen nuevas pruebas de laboratorio.

REICHMUTH (1936), afirmó que *L. palustris* se comporta como eficiente hospedador intermediario de *Fasciola hepatica*. Infestó artificialmente 50 *L. palustris*, de las que 8 murieron, 16 contenían cercarias desarrolladas y dos contenían redias hijas, cuando se examinaron tres meses después de la infestación.

KENDALL (1949 a y b) demostró la receptividad de *L. glabra* y *L. palustris*, recién eclosionadas, a la infestación con masa de miracidios, desapareciendo la sensibilidad a los pocos días de la eclosión.

El mismo autor (1950), volvió a confirmar que *L. palustris*, *L. glabra* y *L. stagnalis* son capaces de eliminar cercarias. Que en *L. pereger* se producían infestaciones hasta la fase de redia y que *L. auricularia* era resistente.

STIEGLER (1954), comprobó en Baviera, que los miracidios de *F. hepatica* son capaces de penetrar en *L. stagnalis*, pero su desarrollo no va más allá del estado de esporocisto. En *L. ovata* penetran muy pocos miracidios, fracasando en su desarrollo. En *Radix pereger*, penetran los miracidios en ejemplares recién eclosionados, pero no en las formas adultas; en todo caso, no eran capaces de sobrepasar el estado de esporocisto. En *Stagnicola palustris*, los miracidios sólo penetraban superficialmente, sin avanzar más allá del tejido conectivo basal.

GODERDZISHVILI (loc. cit.) obtuvo experimentalmente cercarias de *Fasciola hepatica* a partir de *L. stagnalis* (12 %), *Radix ovata* (5,4 %), *Radix pereger* (3,3 %)

SAZANNOV (1957) encontró que ejemplares de *Galba palustris* procedentes del río Don, era receptivos desde el tercero al décimo día de edad y *L. stagnalis*, durante los primeros treinta días de vida. Este autor no consiguió la infestación,

a ninguna edad, de *Radix ovata*, *Planorbis planorbis*, *Viviparus viviparus* y *Succinea pfeifferi*.

KENDALLY PARFITT (1959) observaron que los miracidios de *Fasciola hepatica* son capaces de penetrar en *L. natalensis* y *L. auricularia*, sin que la infestación progrese.

BOGOMOLOVA (1961) encontró ejemplares de *Radix ovata* capaces de eliminar cercarias. Los miracidios podían penetrar además, en la mayoría de los ejemplares de *L. stagnalis*, *Radix pereger*, *Galba palustris* y *Physa fontinalis*.

BABER (1963) sometió a infestación experimental con miracidios de *Fasciola hepatica* especies de *L. columella*. De 176 caracoles expuestos a 1-300 miracidios, sufrieron infestación 63.

BERGCHEN (1964), expuso numerosas *Lymnaea* spp. frente a miracidios de *Fasciola hepatica*. *L. truncatula* fue receptiva a los 20 días de edad. *L. stagnalis* y *L. palustris* se infestaron a razón de 20 y 50 % respectivamente. *L. peregra*, *L. ovata* y *L. auricularia* fueron refractarias. No observó cercarias en *L. stagnalis*, ni *L. palustris*, a pesar de ser consideradas como posibles hospedadores en Bélgica, donde la incidencia de *L. truncatula*, en áreas endémicas de fasciolosis, es aparentemente pobre.

XAVIER, FRAGA DE ACEVEDO y ALVES DA CRUZ (loc. cit.) sometieron dos poblaciones distintas de *Lymnaea truncatula* del norte de Portugal, geográficamente distintas, a miracidios de *Fasciola hepatica*. Comprobaron por primera vez que *L. truncatula* es vectora en Portugal de *Fasciola hepatica*.

Someten igualmente a la infestación ejemplares de *L. peregra* y *Physa acuta* de las mismas regiones y en las mismas condiciones experimentales, mostrándose totalmente refractarias.

BORAY (1966) realizó infestaciones artificiales con varias cepas geográficas de *F. hepatica* y *F. gigantica* a distintas especies de limneidos (*L. stagnalis*, *L. palustris*, *L. peregra ovata*, *L. peregra peregra*, *L. auricularia natalensis*, *L. truncatula*, *L. tomentosa* y *L. lessoni*) de varias edades. Todas fueron en cierta medida receptivas a la infestación con ambos tremátodos. Se obtuvieron metacercarias infestantes de *F. hepatica* en todas las especies, excepto en *L. lessoni* y *L. auricularia natalensis*. *L. peregra peregra* dio lugar a numerosas metacercarias de *Fasciola hepatica*. Excepto *L. tomentosa* y *L. truncatula*, que fueron receptivas a la infestación en todas las edades, las otras especies solamente lo eran a los pocos días de eclosión. El autor observó considerables diferencias en la receptividad de *L. truncatula* y *L. tomentosa* según la procedencia de los miracidios (*Europa*, *Australia*). Sin embargo, comprobó una adaptación gradual de la cepa europea de *Fasciola hepatica* para *L. tomentosa*, por pases de laboratorio. La cepa australiana se adaptó gradualmente a *L. peregra peregra* en sucesivos experimentos. El autor comprobó que muchos limneidos pueden llegar a ser hospedadores de *Fasciola*.

XAVIER, MARTÍNEZ y MATTOS DOS SANTOS (loc. cit.) realizaron infestaciones experimentales con *L. stagnalis* y *L. peregra* tanto de Portugal, como de España, demostrando que estas especies no son receptivas a *F. hepatica*. *Physa acuta* de ambos países tampoco fue receptible a la infestación bajo diversas condiciones de edad, temperatura, etc.

Con *F. hepática* de Portugal, *L. truncatula* portuguesa, mostró una tasa de infestación del 52,2 %, mientras que *L. truncatula* de Salamanca (España) alcanzó un 47 %.

Con *L. palustris* de Portugal, se obtuvieron un 10 % de infestaciones positivas.

PANTELOURIS (loc. cit.) cree que los miracidios de *F. hepatica* son capaces de penetrar en otras especies distintas de *L. truncatula*, especialmente si se trata de caracoles recientemente eclosionados. Solamente en algunas especies, *L. palustris*,

L. glabra y *L. stagnalis*, los miracidios son capaces de desarrollarse hasta la fase de cercaria. En las otras especies el desarrollo se detiene en algún punto intermedio.

MURA y ARRU (1968) y ARRU y MURA (1969), encontraron *L. truncatula* en la isla de Cerdeña y sometieron a infestación artificial, con un número variable de miracidios, a *L. palustris*, *L. truncatula* y *L. limosa* (los tres limneidos normalmente encontrados en la isla) así como a *Physa acuta*, *Bithynia tentaculata*, *Bulinus contortus*, *Planorbis planorbis*, *Theodoxia fluviatilis*, *Ancylus fluviatilis* y *Succinea pfeifferi*, con edades que variaban de 2-8 semanas.

Lograron obtener infestaciones positivas en 3 % de *L. palustris* y un 7 % en ejemplares de *L. truncatula*. No obtuvieron resultados positivos en *L. limosa*, ni en el resto de los moluscos probados.

A continuación damos una relación de las especies de moluscos que pueden actuar como hospedadores intermediarios, en infestación natural o artificial, con expresión del área geográfica. Estos cuadros actualizan la revisión dada por PANTELOURIS (*loc. cit.*). No incluimos en ellos a *L. truncatula*.

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Fossaria bullimoides</i>	SHAW y SIMMS	1929	N. América	
	SSINITZIN	1929	»	
<i>F. cubensis</i>	VAN VOLKENBERG	1929	Florida	
	HOFFMAN	1930	»	
	BATTE y cols.	1950	»	
	BATTE y cols.	1951	»	
	PRICE	1953	N. América	
<i>F. ferruginea</i>	PRICE	1953	»	
<i>F. modicella</i>	MOHLER	1933	E. Unidos	
	KRULL	1934	» »	
	PRICE	1953	» »	
<i>F. ollula</i>	ALICATA	1946	Hawai	
<i>Galba bulinoides</i>	PRICE	1953	N. América	
	KRULL	1934	» »	
<i>G. cubensis</i>	KRULL	1934	» »	
<i>G. ferruginea</i>	PRICE	1953	» »	
<i>G. occulta</i>	CZAPSKI	1962		
<i>G. techella</i>	PRICE	1953	N. América	
<i>Glabra palustris</i>	GODERDZISHVILI	1955	Leningrado	
	MELIKOV	1968	Rusia	
<i>Lenia amniata</i>	SHIRAI MITSUJI	1925	Japón	
	CHANDRASECKARIAH	1951	India	
<i>Limnaea acuminata</i>	SRIVASTAVA	1944	India	
<i>L. alfredi</i>	CAMERON	1951	N. Zelanda	
	WHITTEN	1945	» »	

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea attenuata</i>	AGUIRRE PAQUEÑO	1939	Méjico	
	MAZZOTTI	1955	»	
<i>L. bogotensis</i>	BRUMPT, VELASQUES y UCROZ	1940	Colombia	
	MUÑOZ-RIVAS	1953	»	
<i>L. brazieri</i>	ROSS y McKAY	1929	Australia	
	ROSSE y McKAY	1929	»	
	ROSE	1938	N. Gales	
	MITTON	1944	Australia	
	JOHNSTON y BECKWITH	1946	»	
	BLACK	1952	»	
	SMITH y KEOGH	1953	»	
	GORDON	1955a,b	»	
	KEOGH	1955	»	
	GORDON y cols.	1959	»	
<i>L. bulinoides techella</i>	KENDALL	1965	N. América	
<i>L. columella</i>	BRENES	1968	Costa-Rica	Aparece infestada en un 50 %
<i>L. cubensis</i>	VAN VOLKENBERG	1929	América	
	HOFFMAN	1930	»	
	RAMÍREZ, VILLAMEDIANA y VERGANI	1949	Venezuela	
	GRETILLAT	1966	Martinica	
<i>L. ferruginea</i>	SHAW	1931	N. América	
<i>L. humilis</i>	McGRAW	1959	Canadá	
	MAZZOTTI	1955	Méjico	
<i>L. launcestonensis</i>	ROSS y McKAY	1929	Australia	
	JOHNSTON y BECKWITH	1946	»	
	SMITH y KEOGH	1953	»	
	GORDON	1955	»	
	KEOGH	1955	»	
	ANON	1956	»	
	GORDON y cols.	1959	»	
<i>L. muervensis</i>	DINNIK y DINNIK	1956a,b	Kenia	
	KENDALL	1965	»	

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>L. natalensis</i>	FAIN COYLE	1951 1956	Congo Uganda	
	McCULLOUGH	1965	Ghana	Posible hospedador
<i>L. palustris</i>	DIEZ	1956	Alemania	Posible hospedador
	BAILINGER	1960	Francia	
<i>L. pervia</i>	KAWANA	1940	China Central	
	WATANABE, IWATA, SASAKI, TSUCHIVA y HOMMA	1954	Islandia	
	ONO y cols.	1957	Japón	
<i>L. philipensis.</i>	DE JESÚS	1935	I. Filipinas.	
<i>L. stagnalis</i>	DIEZ	1956	Alemania	Posible hospedador
	WIBAUT	1958	Francia	Posible vector
<i>L. subacuatilis</i>	ROSS y McKAY	1929	Australia	
	JOHNSTON y BECKWITH	1946	»	
	SMITH y KEOGH	1953	»	
	GORDON	1955	»	
	KEOGH	1955	»	
	ANON	1956	»	
	GORDON y cols.	1959	»	
<i>L. tomentosa</i>	BORAY y McMI- CHAEI	1961	Australia N. Zelanda	
	BORAY	1963	Australia	
	DIXON	1963	»	
	KENDALL	1965	»	
<i>L. traskii</i>	KRULL	1934	Florida	
	PRICE	1953	N. América	
<i>L. viator</i>	REY	1957	Brasil	
	GAJARDO y cols.	1950	Chile	
<i>L. viatrix</i>	BACIGALUPO	1932	Brasil y Buenos Aires	

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea viatrix</i>	BACIGALUPO, PUO, CALZADA y BRENUIZONI	1941 1944	Uruguay Chile	
	TAGLE FAINGENBAUM y cols.	1950	»	
	TAGLE	1956	»	
<i>Mysias ampulla</i>	CAMERON	1951	Australia	
	ARMSTRONG	1954	Canterbury	
<i>Myxas ampulla</i>	MAC FARLANE	1937	N. Zelanda	
	WHITTEN	1945	» »	
<i>Mysas ampulla globosa</i>	WHITTEN	1945	N. Zelanda	
<i>Planorbis spp.</i>	DIEZ	1956	Alemania	Posible hospedador
<i>Praticolella griseola</i>	KOURI Y ARENAS ARENAS y cols.	1932 1937	Cuba »	
<i>Psedosuccinea columella.</i>	KRULL MOHLER KRULL	1933 1933 1934	Florida E. Unidos » »	
	BATTE y cols.	1950	Florida	
	BATTE y cols.	1951	»	
<i>Radix auricularia</i>	GEORGESCU	1963	Rumania	
	MELIKOV	1968	Rusia	
<i>R. ovata</i>	DIEZ	1956	Alemania	Posible hospedador
<i>R. Peregra</i>	GEORGESCU	1963	Rumania	
<i>Simlimnea sub- aquatilis</i>	ANON	1955	N. Gales del Sur	
	GORDON	1955	Australia	
	ANON	1956	»	
<i>Stagnicola buli- noides techella.</i>	OLSEN	1944	Texas	
	OLSEN	1945	»	

Nota: No se incluye a *Limnaea truncatula*. En todo caso se respeta la nomenclatura dada por los autores citados.

2.3.2. Tabla resumen de los moluscos citados como hospedadores intermediarios de *F. hepática* en el mundo, en infestación experimental.

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Fossaria modicella</i>	KRULL	1933	É. Unidos	obtuvo cercarias a los 32 días
<i>F. ollula</i>	ALICATA	1952	Hawai	Obtiene metacercarias e infesta ratones después.
<i>Galba palustris</i>	SAZANOV	1957	Rusia	Receptibles desde el 3.º al 10.º día
	BOGOMOLOVA	1961	Rusia	Los miracidios eran capaces de penetrar
<i>Limnaea auricularia natalensis</i>	MELIKOV	1968	Rusia	Obtuvo formas larvarias
	CAWSTON	1940	Sur Africa	
	KENDALL	1950	Inglaterra	
	ROBERTS	1950	Inglaterra	
	STIEGLER	1954	Alemania	Idem
	BORAY	1966	Australia	No consigue metacercarias.
<i>L. bogotensis</i>	MUÑOZ RIVAS	1953	Bogotá	De 176 caracoles expuestos a 1-300 miracidios, se infestaron 63
<i>L. columella</i>	BABER	1963	California	

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea cubensis</i>	RAMÍREZ VILLAMEDIANA Y VEGANI	1949	Caracas	El desarrollo normal se verifica a los 41 días
<i>L. glabra</i>	KENDALL	1949 a	Inglaterra	La receptibilidad se limita a pocos días después de la eclosión
	KENDALL	1950	»	
<i>L. humilis</i>	MAZZOTTI	1956	Méjico	De 238 ejemplares infestados artificialmente, 14 de ellos produjeron cercarias un mes después de la infestación.
<i>L. lessioni</i>	BORAY	1966	Australia	No obtuvo metacercarias.
<i>L. obrussa</i>	MAZZOTTI	1955	Méjico	Obtuvo cercarias en algunos caracoles.
<i>L. ollula</i>	UENO Y WATANABE	1960	Japón	
<i>L. palustris</i>	REIGHMTH	1936	Alemania	
<i>L. palustris</i>	KENDALL	1949,a	Inglaterra	La receptibilidad se limitó a pocos días después de la eclosión.
	KENDALL	1949 b	»	Observó desarrollo parcial de las larvas.

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea palustris</i>	KENDALL	1950	»	Demostró la salida de cercarias que pueden ser infestantes.
	STIEGLER	1954	Alemania	Obtiene en la infestación hasta la fase de esporocisto en cuyo momento se interrumpe el ciclo.
	CZAPSKY	1962		Logra infestaciones de especies con una longitud de 1-4 mm.
	BERGHEN	1964	Bélgica	Obtuvo cercarias en algunos caracoles.
	BORAY	1966	Australia	Sólo susceptibles de jóvenes.
	MURA y ARRU	1968	Italia	Obtienen un 3 % de infestaciones.
	XAVIER y COLS.	1968	Portugal	Obtienen un 3 % de infestaciones.
	ARRU y MURA	1969	Italia	Obtienen un 3 % de infestaciones.
<i>L. pereger</i>	LEUKART	1886	Alemania	Obtuvo infestación pero no desarrollo de fases larvrias.
	»	1901	»	

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea pereger</i>	WALTON TAYLOR	1917 1922	N. América	Obtuvo cercarias maduras
<i>L. peregra ovata</i>	THOMAS	1883	Inglaterra	Penetración de miracidios sin formación de larvas
	ROBERTS	1950	Inglaterra	Penetración de miracidios sin formación de larvas
	STIEGLER	1954	Alemania	En la infestación experimental penetran muy pocos miracidios.
	BERGHEN	1964	Bélgica	Los miracidios penetran pero no hay formación de larvas.
	BORAY	1966	Australia	Receptibles de jóvenes
<i>L. peregra peregra</i>	MIESNER y VETZEL KENDALL	1928 1949	Alemania Inglaterra	Obtuvo desarrollo parcial de larvas.
	BORAY	1966	Australia	En infestaciones artificiales obtuvo numerosas metacercarias de <i>Fasciola hepatica</i>

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea pervia</i> <i>L. plicatula</i>	ONO KAWANA	1957 1940	Japón China	En infestaciones artificiales el miracidio desarrolla solamente los primeros estadios.
<i>L. stagnalis</i>	LEUKART »	1886 1901	Alemania »	Obtuvo infestación, pero no desarrollo de fases larvarias.
	NÖLLER Y SPREHN ORTH Y SPREHN KENDALL	1924 1925 1949	Alemania Inglaterra	De 101 ejemplares expuestos a la infestación, encontró 13 infestados.
	KENDALL ROBERTS STIEGLER	1950 1950 1954	» » Alemania	Receptibles de jóvenes El miracidio es incapaz de desarrollarse más allá del estado de esporocisto
	GODERDZISHVILI	1955	Leningrado	Obtuvo infestaciones en un 1,2 %
	SAZANOV	1957	Rusia	Receptibles durante los primeros 30 días.
	BOGOMOLOVA	1961	»	Los miracidios son capaces de penetrar.

Especie de molusco	Autor	Año	País	Observaciones
<i>Limnaea stagnalis</i> <i>L. tomentosa</i>	FURMAGA BORAY	1967 1966	Polonia Australia	Obtuvo metacercarias
<i>L. traskii</i>	KRULL	1934	E. Unidos	Es infestada cuando es joven.
<i>Physa fontinalis</i>	BOGOMOLOVA	1961	Rusia	Los miracidios son capaces de penetrar
<i>Pseudosuccinea columella</i>	KRULL	1941	E. Unidos	De 8 especies infestadas se obtuvieron cercarias entre el 68-89 días de la infestación.
<i>Radix ovata</i>	GODERDZISHVILI	1955	Leningrado	Obtuvo infestaciones en un 5,4 %
	BOGOMOLOVA	1961	Rusia	Obtuvo cercarias
<i>R. pereger</i>	GODERDZISHVILI	1955	»	Obtuvo infestaciones en un 3,3 %
	BOGOMOLOVA	1961	»	Los miracidios eran capaces de penetrar.
	STIEGLER	1964	Alemania	Los miracidios penetran en ejemplares recientemente eclosionados y nunca en adultos.

2.4. REVISIÓN DE MÉTODOS

2.4.1. Cultivo de moluscos y formación de estirpes en el laboratorio

El cultivo de los caracoles en el laboratorio entraña una serie de problemas relacionados con la temperatura, oxigenación (directa o indirecta mediante plantas) y sobre todo con la alimentación.

El cultivo se puede realizar en acuarios equipados con oxigenación mediante burbujeo, en los que se hacen crecer plantas oxigenadoras, tales como *Valisneria spiralis* o *Elodea* spp. En este caso, la alimentación se realiza siguiendo el método de STANDEN (1951) para *Australorbis glabratus*, a base de gel de alginato cálcico, método utilizado para limneidos por KENDALL y PARFITT (1965).

Por otra parte, se observó que muchos moluscos se alimentan fundamentalmente de algas; WATSON (1958), lo demostró para *Bulinus truncatus*. DE MEILLON, FRANK y ALLANSON (1958) para *Bulinus africanus*, TAYLOR y MOZLEY (1948), ROBERT (1950) y KENDALL (1950) para *Lymnaea truncatula*.

A partir de los trabajos de TAYLOR y MOZLEY (l.c.), se han estandarizado los métodos de cría de limneidos a base del cultivo de algas cianofíceas *Oscillatoria* spp.: *Oscillatoria obscura*, en el Central Veterinary Laboratory (KENDALL 1965, l.c.) y *Oscillatoria fermosa* en el Instituto de Medicina Tropical de Lisboa (XAVIER y cols. 1966).

LAEMMLER (1964) cultiva algas para la alimentación de caracoles, en recipientes especiales de barro con tierra del punto de procedencia de los hospedadores. Estos recipientes con una pequeña cantidad de agua, se mantienen ligeramente inclinados con el fin de tener barro húmedo fuera del agua.

En cuanto a la formación de estirpes, dado que se trata de especies hermafroditas y con autosuficiencia sexual, los individuos se forman a partir de las masas de huevos puestas por un solo ejemplar.

2.4.2. Infestación experimental

Existe unanimidad en la bibliografía sobre las circunstancias de la infestación. Se realiza en placas o tubos, con moluscos aislados, de tamaño y edad conocidos y con un número contado de miracidios (de acuerdo con la finalidad perseguida). El tiempo de infestación máximo a que se someten los moluscos a la presencia de los miracidios, es de 6 horas, a temperatura ambiente y bajo condiciones de luz intensa, natural o artificial. La obtención de miracidios para la infestación se realiza normalmente por el método estandarizado por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960).

2.4.3. Anestesia, disección, fijación, coloración, cortes, etc.

Realizada la infestación de los moluscos, uno de los problemas que se plantea, consiste en las distintas manipulaciones a que deben ser sometidos, para que los estudios histopatológicos posteriores reflejen fielmente las lesiones producidas por el parásito.

En principio, es necesaria la muerte del molusco a distintos intervalos después de la infestación.

JOOSE y LEVER (1959) citados por SAINT-GUILLAN (Loc. cit.) anestesian previamente, con el fin de que los tejidos queden perfectamente extendidos. Los animales son sumergidos durante 40 minutos en una solución de Nembutal al 0,08 %; después, en una mezcla de solución de Nembutal al 0,08 % y de MS 222

(Sandoz) al 0,3 % durante una hora, al cabo de la cual pasan los moluscos al líquido fijador.

SUPP (loc. cit.), antes de proceder a la disección de los moluscos, los somete a refrigeración de 5° C, acción que tiene por objeto disminuir la acción autolítica de los enzimas de la glándula digestiva. Al cabo de una hora les quita la concha rápidamente.

XAVIER y MARTÍNEZ (1966), colocan los caracoles en pequeños tubos de vidrio que contengan 5 c.c. de agua corriente, añadiendo cristales de mentol. Pasadas unas horas, los caracoles se encuentran anestesiados y su cuerpo completamente extendido. Posteriormente proceden a sacrificarlos, sumergiéndolos en agua a 70° C durante 30 segundos, extrayéndolos inmediatamente después, de la concha.

PANTIN (1968), recomienda igualmente como anestésico el mentol. Deja que los caracoles se extiendan en su sitio tranquilo y en agua limpia, distribuyendo más tarde unos pocos cristales de mentol sobre la superficie y los deja durante toda la noche.

Una vez que el molusco está suficientemente estirado y anestesiado, se procede a disecarlo. XAVIER y MARTÍNEZ (l. c.), extraen el cuerpo completo del molusco rompiendo las vueltas de espira, a la altura de las suturas mediante perforaciones con aguja de disección.

SAINT-GUILLAN (l.c.), no realiza la disección de los moluscos, sino que, después de fijados, los somete a la acción quelante de un decalcificador: EDTA o Kestranal (sal bisódica del ácido etilendiamino tetracético) en solución tampón a pH 7,19. En decalcificación permite el corte del cuerpo del molusco «in situ».

Como sustancias fijadoras, se han empleado diversas mezclas, muchas veces específicas para estudios histoquímicos. Para investigaciones citológicas, la mayor parte de los autores utilizan los fijadores de Bouin y el Zenker. El primero tiene la ventaja de que el material se puede conservar indefinidamente. Esto lo hace muy apropiado cuando el número de moluscos sacrificados es grande.

Los cortes se realizan previa inclusión en diversas sustancias. Las más empleadas son la parafina y la mezcla de parafina, estearina y cera de abejas en la proporción de 85, 10 y 5 % respectivamente (VASCONCELLO, 1957). Los cortes se hacen en serie con un espesor de 7-10 micras y son colocados en portaobjetos numerados.

Entre las tinciones empleadas destacan, por su mayor utilización en el estudio de las lesiones histopatológicas, la hematoxilina-eosina, la tricrómica de Masson, la triple tinción de Mallory, el método de Unna, etc.

3. INVESTIGACIONES PERSONALES

3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1. Hospedadores elegidos y hábitat de los mismos.

Los hospedadores elegidos para el estudio de las lesiones que ocasionan las fases larvarias de *F. hepática*, fueron los moluscos gasterópodos pulmonados basimatóforos *Lymnaea truncatula* y *L. palustris*; el primero conocido hospedador natural, y posible hospedador, al menos experimentalmente, el segundo.

Hemos encontrado *L. truncatula* en lugares muy diversos de la provincia y es particularmente abundante a finales de la primavera y en el otoño. Los ejemplares cultivados en el laboratorio procedían siempre de un criadero muy rico, situado en la margen izquierda de la carretera Puente Villarente-Boñar, Km. 18, zona a la que van a parar presas de riego. El molusco lo encontramos en abundancia durante prácticamente todo el año, cerca del agua, en la tierra húmeda e inclinada hacia pequeñas colecciones de agua, como las formadas por las huellas de los carros, las pisadas de los animales, etc. En invierno, cuando helaba, desaparecía casi en su totalidad, recuperándose ejemplares medianos empleando mallas, en las charcas permanentes del centro del criadero. A finales de verano, cuando casi todo el criadero se deseca, los encontrábamos bajo las aguas, poco profundas, de las presas de riego que bordean dicho criadero. La máxima abundancia se encontró en primavera, debido a estar, por la lluvia, todo el criadero inundado, y, en otoño por la misma causa, pero en este caso debido al riesgo de los prados circundantes.

La tierra de este criadero es la que se utilizó en el laboratorio, previas las manipulaciones que se describirán, para el cultivo de *Oscillatoria fermosa*. Por otra parte, la abundancia de *L. truncatula* en este lugar, es muy explicable si se piensa que de él se aisló por el personal de la Cátedra de Botánica (Biología Animal, León) *Oscillatoria* spp. en abundancia. La fitosociología de este criadero es una típica asociación *Isoetano juncetea* B. Bl. Tx 1943 (RIVAS GODAY y BORJA, 1961 a y b).

La distribución de *L. palustris*, parece más limitada. En principio, el molusco prefiere charcos de aguas más profundas, grandes presas de agua muy lenta y charcos alimentados por el drenaje de prados. Lo hemos encontrado en las márgenes derecha e izquierda del río Berbesga, en las proximidades de León. Es particularmente abundante a finales de invierno y comienzos de primavera, dentro del agua, apoyada en la vegetación. Desaparece prácticamente en verano. La fitosociología de los criaderos localizados de este molusco es de la clase *Phragmitetea* Tx et Preisnhg 1942, orden *Phragmitetalia* W. Kosk, 1926 (RIVAS GODAY y BORJA, loc. cit.).

3.1.2. Identificación.

Para la identificación de ambos tipos de moluscos se siguieron las claves de HUBENDIK (1951) y BENTHEN JUTTING (citado por OVER, 1967).

L. truncatula presenta las volutas convexas, con sutura abrupta y la concha formando como escalones. Las masas de huevos son pequeñas y redondeadas, o cortas y ligeramente curvadas, sin uniones capsulares. frecuentemente con cuerpos extraños adheridos.

L. palustris tiene la concha cónica, con las dos espiras basales formando más de las tres cuartas partes de la altura total de la concha. Las masas de huevos son más anchas que en *L. truncatula*, con curvas marcadas. Los bordes longitudinales provistos de ligeras ondas.

Cuando los ejemplares de ambas especies son menores de 3-4 mm. es difícil la diferenciación de especies por caracteres externos. Para obviar este inconveniente, los moluscos con los que se realizaron las experiencias, procedían de ejemplares grandes perfectamente identificados, y mantenidos, en las condiciones que se expresan, en el laboratorio. En todo caso, el mantenimiento de cada especie se hizo total y absolutamente independiente. Diferentes estufas, recipientes marcados, etc.

3.1.3. Cultivo de los moluscos en el laboratorio.

Con el fin de realizar las experiencias sobre especies libres de infestación, fue necesario el cultivo en el laboratorio de los moluscos recogidos en los distintos criaderos.

Ambas especies fueron cuidadosamente lavadas con agua corriente y colocadas en recipientes de plástico, donde previamente se había cultivado el alga *Oscillatoria fermosa*. Los recipientes de plástico utilizados tenían un diámetro de 14,5 cm. y una altura de 7 cm. En cada uno de ellos se mantenían 15 limneas a 22° C en estufa. Los destinados a *L. truncatula*, se disponían inclinados, con una pequeña cantidad de agua, con el fin de mantener una porción inundada y otra húmeda, condición que favorece el anfibismo del molusco.

Los que contenían *L. palustris* se llenaban casi completamente de agua, para mantener un hábitat semejante al de su procedencia.

El alga *Oscillatoria fermosa* fue obtenida originariamente del Instituto de Medicina Tropical de Lisboa. Con ella se alimentaron, mediante cultivos sucesivos, todas las generaciones de moluscos obtenidos en el laboratorio. La tierra utilizada para el cultivo se recogió, en todo tiempo, del criadero de *L. truncatula* ya citado. La preparación de la tierra en el laboratorio consistió en secado, molido, tamizado y esterilización posterior a 15° C. durante media hora. Con agua artesiana se preparaba un barro espeso que se colocaba formando una capa uniforme de 1 cm., en el fondo de cada recipiente. La siembra se realizaba con un fragmento de un cultivo seleccionado exclusivamente para esta operación, tomándolo con pinzas y enterrándolo en el centro de la placa. El crecimiento se conseguía colocando las placas a 60 cm. debajo de una lámpara Philips de vapor de mercurio de 220 V., con reactancia incorporada. Los recipientes se tapaban con discos de cristal corriente. Diariamente, las placas se regaban con agua artesiana mediante un pulverizador.

El crecimiento del alga ocurría entre los 18-21 días en invierno y 7-10 días durante el verano.

Intentamos la conservación de placas crecidas, disponiéndolas en frigorífico a 10° C, con el fin de tener suficiente cantidad de alga en cualquier momento. Tuvimos que desistir del procedimiento, debido al crecimiento de hongos en las placas conservadas. Por esta razón siempre se utilizaron placas con cultivo fresco. El crecimiento de hongos concomitantes que, a veces, tuvimos espontáneamente, fue incompatible con el cultivo de los moluscos. Por este motivo, las placas de *Oscillatoria ferosa* fresca se examinaban cuidadosamente (al estereomicroscopio) antes de colocar en ellas a los moluscos.

Cada segundo día los caracoles se cambiaban de recipiente. Se colocaban en un tamiz y eran escrupulosamente lavados con agua corriente, separando los ejemplares muertos. Del primer recipiente se recogían las masas de huevos para su tratamiento ulterior.

Las masas eran también lavadas cuidadosamente, especialmente las de *L. truncatula*, que frecuentemente llevaban adheridas partículas extrañas. Con ayuda del estereomicroscopio se examinaba el número de huevos por masa y otras características, para saber si se trataba de masas fértiles. Una vez examinadas, se colocaban en una placa de Petri con agua artesiana y se llevaban para su incubación, a la estufa a 20° C.

La eclosión de las masas acontecía, en ambas especies, al cabo de 11-14 días. Los caracoles recién nacidos eran colocados en recipientes de *Oscillatoria* poco crecida, con ayuda de un pincel muy fino. Diariamente eran observados al estereomicroscopio y aislados de los filamentos de algas, sin cuyo proceder ocurría la muerte de las limnaeas jóvenes. Cuando habían consumido el alga del recipiente, se cambiaban para evitar, el efecto letal de las fermentaciones producidas por las heces.

Cuando los moluscos alcanzan un tamaño de 4 mm., se seleccionaban para la infestación artificial.

3.1.4. Preparación de miracidios.

Los huevos de fasciola, para la obtención de miracidios, se obtuvieron a partir de vesículas biliares de ovinos y bovinos sacrificados en el matadero. Las vesículas, una vez en el laboratorio, fueron abiertas y el contenido vertido en una malla de 125 micras de luz sobre otra de 40 micras, lavando con fuertes chorros de agua. De esta última malla, se pasaban los huevos a un vaso de precipitado, dejándolos sedimentar.

El recuento del número de huevos se efectuaba mediante cámara de McMaster. Para la incubación se disponían en recipientes de plástico, señalando la altura que alcanzaba el agua, con el fin de restituirla en caso de evaporación. En estas condiciones y herméticamente tapados los

recipientes, así como preservados de la luz, eran colocados en estufa a 27° C.

Con el fin de disponer en todo momento de miracidios suficientes, se trató de conservar huevos embrionados a 4°C., en frigorífico, en recipientes oscurecidos con papel negro. Las experiencias realizadas con los miracidios así conservados fracasaron, puesto que no se llegó a infestar un solo molusco. Por esta contingencia los huevos de fasciola eran recogidos con el tiempo suficiente para realizar la infestación en el momento de llegar a su total madurez. Por ello se mantuvieron siempre a 27° C, y diariamente a partir de los 10 días examinábamos al estereomicroscopio una muestra de uno de los recipientes, hasta el momento en que los huevos, por su estado de madurez, eclosionaban de inmediato.

Para la eclosión de los mirácidos utilizamos la técnica de OLLERENSHAW (citado por XAVIER y cols., 1965). Los miracidios fueron colocados en vasos de precipitado a los que se añadía un volumen variable de agua artesiana. Estos recipientes eran expuestos a la luz de una lámpara de 130 V. Cada 10-15 minutos se tomaba una muestra y con ayuda del estereomicroscopio se observaba el número de miracidios eclosionados. Cuando eran suficientes se procedía a la infestación artificial.

3.1.5. Infestación experimental de los moluscos.

Los moluscos que previamente se habían seleccionado, eran retirados del recipiente que contenía *Oscillatoria* y recogidos en una malla, se lavaban escrupulosamente con agua corriente a presión.

Se disponían en una serie de gradillas conteniendo tubos de hemolisis con agua artesiana. En cada uno de los tubos se colocaba una limnea. Con ayuda de un capilar de vidrio se tomaban muestras del recipiente con miracidios recién eclosionados y se depositaban en una placa de hemoaglutinación. Al estereomicroscopio, y haciendo los trasvases necesarios, se recogían con el capilar 5-10 miracidios, que se pasaban a cada uno de los tubos de hemolisis. Terminado el proceso se anotaba la hora considerándola como hora 0, aun cuando se conservaban los moluscos en los tubos durante 4-6 horas expuestos a la luz. Al cabo de este tiempo, los moluscos eran colocados en grupos de 15-20, en placas conteniendo *Oscillatoria*, y en las mismas condiciones ambientales que antes de la infestación.

Con el fin de estudiar el comportamiento de los miracidios frente al molusco, así como las características de la penetración y los primeros estadios evolutivos de la larva, se hicieron infestaciones con masas de miracidios. En este caso, los moluscos eran colocados en grandes placas de Petri, con agua artesiana, en cuyo interior se depositaban miracidios

en cantidad. Al estereomicroscopio se estudió el comportamiento, así como los distintos movimientos ejecutados para procurar la penetración.

«In vitro», y utilizando explantes de *Limnaea truncatula* fueron observados al microscopio los distintos procesos evolutivos de la capa ciliada del miracidio en el momento de la penetración.

Se hicieron un total de 10 infestaciones experimentales con grupos que oscilaban entre 25 y 125 ejemplares, tanto de *Limnaea truncatula* como de *L. palustris*.

En cada una de las experiencias se hicieron dos grupos, uno infestado con masas de miracidios, para el estudio de las lesiones en los primeros días pos-infestación y otro grupo con 5-10 miracidios para las lesiones de días posteriores hasta el final del ciclo. En este último caso, la infestación se hizo con un número menor de miracidios, para asegurar la supervivencia de los moluscos hasta el momento que eran estudiados.

3.1.6. ESTUDIO DE LOS MOLUSCOS INFESTADOS.

3.1.6.1. Anestesia y disección.

Tomando como hora cero, el momento de comenzar la infestación, los ejemplares eran sacrificados a partir de los 10 minutos, y con distintos intervalos, hasta los 30 días en *Limnaea truncatula* y 37 días en *L. palustris*. En este momento y habiendo encontrado cercarias en el hepatopáncreas, dimos por terminada la experiencia.

La disección de los moluscos entrañó serias dificultades, al pretender estudiar las lesiones provocadas con la penetración. Estas dificultades estriban en que, si utilizábamos los procedimientos de anestesia clásicos, necesitábamos varias horas, al cabo de las cuales no podíamos considerar las lesiones encontradas como provocadas a los 30 minutos de infestación, por ejemplo. Desconocemos si, durante el proceso de anestesia del limneido, cesa la actividad no sólo de la larva, sino también el poder de regeneración de los tejidos.

Para obviar este inconveniente introducíamos a los ejemplares en un recipiente conteniendo agua a 70° C. durante un minuto, al cabo del cual y con ayuda del estereomicroscopio se rompía la cáscara y se tomaba exclusivamente el pie y porción cefálica.

Cuando el estudio de las lesiones se hizo a partir de las 24 horas utilizamos, para la disección de los moluscos, el método de JOOSE y LEVES (1959) (citado por SAINT-GUILLAN *loc. cit.*). Los animales se sometían previamente a la acción de una solución de Nembutal (pentobarbital sódico) al 0,08 %; después en una solución de Nembutal al 0,08 % y de MS 222 (Sandoz) al 0,3 % durante una hora, al cabo de la cual se pasaban los moluscos al líquido fijador.

3.1.6.2. Fijación, decalcificación, inclusión y cortes.

Como líquido fijador se utilizó el Bouin acético. Este fijador tiene la ventaja de que pueden conservarse las piezas durante bastante tiempo y, por otra parte, el ácido pícrico actúa como decalcificante en aquellos ejemplares que se fijaban con concha.

Después de la fijación, los ejemplares que mantenían su concha, se sometían a la acción decalcificante de Titriplex III (sal bisódica del ácido etilendiamino tretacético) en solución tampón a Ph 7,19. A las 48 horas eran deshidratados para inclusión. Esta se realizó en parafina, utilizándose la Merck de 52-53° C. de fusión.

Se hicieron cortes con microtomo de parafina tipo Minot, de 7-10 micras de espesor.

3.1.6.3. Tinción y microfotografías.

Como métodos histológicos de coloración se utilizaron los siguientes:

Técnica de hematoxilina-eosina (hematoxilina de Böhrer).

Coloración tricrómica de Mallory.

Las microfotografías fueron obtenidas con la cámara Orthomat sobre microscopio Ortholux de Leitz; se utilizó película Adox Kb 14° din.

3.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS.

3.2.1. Infestación de *Limnaea truncatula*.

En la exposición de las experiencias no se sigue el orden cronológico de realización.

3.2.1.1. Experiencia 1.^a

Lote de 25 moluscos cultivados en el laboratorio y de una longitud de 4mm., fueron infestados con masas de miracidios y sacrificados en grupos de 5, a los 10, 20, 30, 40, y 60 minutos respectivamente. El objeto de las experiencias fue conocer el comportamiento del miracidio y las primeras lesiones durante la penetración.

3.2.1.1. Experiencia 2.^a

Explantes de limnea fueron puestos en contacto con miracidio de *F. hepática*. El objeto de la experiencia fue conocer el comportamiento del miracidio y el porvenir de sus células epiteliales ciliadas de revestimiento, en el momento de la penetración.

3.2.1.3. *Experiencia 3ª*

Un lote de 100 limneas cultivadas en el laboratorio, de 3-4 mm. de longitud, fueron puestas en presencia de masas de miracidios y sacrificadas a razón de un mínimo de 10 ejemplares, a las 2, 4, 6, 24, 48 horas, 3, 4, 5 días. El objeto de la experiencia fue el estudio de las lesiones provocadas por el miracidio en los primeros días de infestación.

3.2.1.4. *Experiencia 4ª*

Quince limneas cultivadas en el laboratorio, fueron puestas en presencia de masas de miracidios y sacrificadas en lotes de 5, a las 12, 24 horas y 3 días. El objeto de esta experiencia fue conocer el comportamiento del miracidio durante la penetración y las lesiones provocadas en los tejidos del hospedador en los períodos de tiempo indicados.

3.2.1.5. *Experiencia 5ª*

Un lote de 56 limneas seleccionadas, cultivadas en el laboratorio, de 4mm., se dividieron en dos grupos, uno de 24 ejemplares fue infestado con 10 miracidios por caracol y fueron sacrificados a partir del 10.º día hasta el día 30º de infestación. Tuvo por objeto el estudio de las lesiones provocadas por la fase de redia en su emigración hacia el hepatopáncreas.

El otro grupo de 32 limneas, fueron infestadas con masas de miracidios y sacrificados a las 2, 6, 24, 48 horas, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, y 22 días. El objeto de la experiencia fue conocer, hasta el día 22.º las lesiones provocadas por las fases larvarias en los tejidos del hospedador.

3.2.1.6. *Experiencia 6ª*

Lote de 40 moluscos cultivados en el laboratorio, de 4 mm., fueron infestados con 5 miracidios. Se sacrificaron a partir del 10.º día hasta el día 30º a razón de 3 moluscos como mínimo cada 2º día. En los lotes sacrificados hasta el día 20 inclusive, se estudiaba todo el molusco, y a partir del 21º al 30º, ambos inclusive, solamente el hepatopáncreas. El objeto de la experiencia fue llegar al conocimiento de las lesiones provocadas en los tejidos durante los diferentes estados larvarios.

3.2.1.7. *Experiencia 7ª*

Lote de 100 moluscos cultivados en el laboratorio y de una longitud de 4 mm., fueron infestados con masas de miracidios (50 por caracol) y sacrificados desde las 2 horas a los treinta días. En toda la experiencia se estudió íntegramente todo el molusco, ya que no se realizó disección, sino decalcificación de la concha.

3.2.2. *Infestación de Lymnaea palustris.*

Lo mismo que en el caso anterior, no seguimos el orden cronológico en la exposición de las experiencias.

3.2.2.1. *Experiencia 1ª*

Lote de 15 limneas cultivadas en el laboratorio, de una longitud de 4mm., fueron puestas en presencia de masas de miracidios de *F. hepática* y sacrificadas a las 2, 6 y 12 horas. El objeto de la experiencia fue llegar a conocer el comportamiento del miracidio durante la penetración y las lesiones provocadas en los tejidos del hospedador durante las primeras horas de infestación.

3.2.2.2. *Experiencia 2ª*

Lote de 50 limneas cultivadas en el laboratorio y de una longitud de 4mm., fueron puestas en presencia de 5-10 miracidios y sacrificadas desde las 2 primeras horas de infestación hasta el día 20º. El objeto de la experiencia fue llegar a conocer las lesiones provocadas en los tejidos, por los distintos estados larvarios del miracidio.

3.2.2.3. *Experiencia 3ª*

Un lote de 100 limneas se dividió en dos grupos, uno de 25 que se infestó con masas de miracidios y otro de 75 que se infestó con 10 miracidios por caracol. Los ejemplares del primer lote se sacrificaron durante los 10 primeros días de infestación, y los del 2.º desde el 10º hasta el 37º.º día. El objeto de la experiencia fue llegar a conocer las lesiones provocadas en los tejidos del hospedador por los distintos estados larvarios del miracidio.

3.2.3. *Infestación de Lymnaea stagnalis.*

Un lote de 6 limneas se colocaron en presencia de masas de miracidios de *F. hepatica* y sacrificadas a las 24, 48, y 72 horas. El objeto de la experiencia fue llegar a conocer la posibilidad de infestación de este tipo de molusco.

3.2.4. *Infestación de Lymnaea auricularia.*

Un lote de limneas son colocadas en presencia de masas de miracidios de *F. hepatica* y sacrificadas a las 24, 48 horas, 3, 4 y días. El objeto de la experiencia fue conocer la receptividad de este molusco.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. De las experiencias con *L. truncatula* (Penetración y esporocistos).

4.1.1. Histología normal de las partes expuestas a la penetración de los miracidios y desarrollo de los esporocistos.

Dentro de este apartado estudiamos las partes del molusco que se ponen en contacto con el miracidio durante la infestación, así como las que soportan el desarrollo subsiguiente de los esporocistos.

El epitelio que cubre la superficie libre del cuerpo, está constituido por células cilíndricas de núcleo ovalado, cuyo eje mayor es perpendicular a la base. Es relativamente rico en cromatina. En el polo apical, las células presentan cilios, haciéndose más escasos en las paredes laterales del pie, donde el epitelio se transforma de cilíndrico a cúbico o plano. El citoplasma contiene gran cantidad de gránulos y es ligeramente basófilo.

El tejido conectivo subepitelial forma una especie de manto que envuelve no sólo a los órganos de la cavidad del cuerpo, sino que constituye, juntamente con el tejido muscular, el armazón del pie, tentáculos, etc.

En este tejido conectivo subepitelial hemos identificado varios tipos celulares y un componente fibroso. El componente celular consiste en fibroblastos, células pigmentarias, células vesiculares y mucosas. Los elementos fibrilares son fundamentalmente fibras colágenas.

Los *fibroblastos*, son de forma estrellada, cuyas prolongaciones, al relacionarse con las de otros elementos celulares, forman las mallas típicas del tejido conjuntivo laxo. Su núcleo es esférico, con uno o dos nucleolos en posición ligeramente excéntrica; la cromatina es granular y en localización parietal. El citoplasma es homogéneo con presencia, a veces, de inclusiones, especialmente pequeñas partículas de un pigmento color marrón.

Las *células pigmentarias*, son elementos voluminosos, diseminados entre los fibroblastos del tejido conjuntivo. Tienen forma irregular, a veces con prolongaciones citoplasmáticas. El núcleo es asimismo muy polimorfo, relativamente pobre en cromatina, ligeramente excéntrico, con un nucleolo muy evidente. El citoplasma celular presenta gran cantidad de formaciones esféricas acidófilas, o aparece uniforme, pero con una clara acidofilia.

Las *células vesiculares* son de mayor tamaño que las anteriores. Aparecen localizadas con preferencia en el seno del tejido conjuntivo de la pared dorsal de la cavidad bucal. Son células muy irregulares, con núcleo pequeño, excéntrico, con la cromatina dispuesta a modo de bandas. El citoplasma, ligeramente basófilo muestra una estructura alveolar.

Las *células mucosas* aparecen concentradas principalmente en el pie. Cada una de ellas comprende una unidad secretora de moco. Son piriformes, con núcleo oval, rico en cromatina. El citoplasma está lleno de formaciones alargadas basófilas.

Las *fibras colágenas* son elementos delicados, muy poco diferenciables con la hematoxilina eosina, tiñéndose de azul con la coloración tricrómica de Mallory. Con este tipo de coloración, aparecen ligeramente más delgadas que las fibras musculares. En el interior de la fibra colágena no se observa ninguna estructura con el microscopio óptico.

En el seno del tejido conjuntivo de las partes externas del caracol, existen gran cantidad de fibras musculares. Estas fibras musculares, según la región, aparecen aisladas o bien agrupadas, constituyendo fascículos que se entrecruzan formando una especie de enrejado.

Vistas a gran aumento este tipo de fibras musculares, da la impresión de que se trata de fibras de la variedad lisa, ya que en recorrido de las mismas no se advierte perioricidad alguna. Microscópicamente presentan una evidente estriación longitudinal. Miden unas 8 micras de espesor, con un solo núcleo difícil de identificar; su característica principal es la pobreza en cromatina.

4.1.2. Penetración y localización.

Una vez que los miracidios han eclosionado y se colocan en presencia de los moluscos, realizan movimientos rápidos y en todas direcciones. Establecido el contacto entre el miracidio y el molusco, el primero ejecuta dos tipos de movimientos: uno de rotación alrededor de su eje longitudinal, actuando con la extremidad anterior a modo de trépano, lo que indica que la perforación que realiza es, en parte, mecánica, puesto que dicha extremidad se alarga, adoptando una forma idónea para el tipo de movimiento que realiza. El segundo movimiento consiste en una serie de contracciones ondulatorias, a todo lo largo del cuerpo del miracidio. El molusco, por su parte, durante este primer ataque se muestra inquieto, con contracciones de las regiones expuestas. Si el número de miracidios es grande, se esconde a intervalos en el interior de la concha. En este último caso, hemos observado que los miracidios en contacto con ella, intentaban los mismos movimientos de penetración.

Durante los primeros momentos de la infestación, no todos los miracidios que logran contacto con el molusco hospedador quedan adheridos. Bien porque la llegada del miracidio coincide con alguna contracción del molusco, bien por otras causas, lo cierto es que el miracidio continúa sus rápidos movimientos hasta que, con nuevos intentos, se produce la adhesión.

Nuestras observaciones coinciden con las realizadas por DAWES (1959).

La localización de los miracidios en el molusco hospedador, para realizar la penetración, no presenta predilección especial por una determinada región de la parte externa del cuerpo del animal, ni parecen existir sitios por donde sea más fácil la entrada. En nuestras experiencias, encontramos esporocistos a nivel de la región del ojo, región subtentacular, tentáculos, pie, borde del manto y manto, sin que en ningún momento nos haya llamado la atención el mayor o menor acúmulo de formas larvares en una determinada región.

4.3.1. *Histopatología*

Histológicamente, durante la penetración aparecen alteraciones no sólo en los tejidos epiteliales del caracol, sino que, a su vez, el miracidio muestra alteraciones de las células ciliadas que recubren la parte externa del cuerpo.

4.1.3.1. *Alteraciones del epitelio ciliado del miracidio.*

En el momento que el miracidio ha introducido la papila anterior en la capa subepidérmica del molusco, rápidamente desprende las células epiteliales ciliadas, que sufren un proceso de vacuolización; se hacen esféricas, con núcleo igualmente esférico y en posición excéntrica. Estas células conservan durante algún tiempo su cubierta ciliar, dando la apariencia de esferas ciliadas en las proximidades del miracidio. (Fig. 1).

Estos extremos hemos podido comprobarlos poniendo en contacto miracidios con explantes de limneas en agar-agar. En períodos finales, el miracidio adquiere forma globulosa, rodeado de gran cantidad de esferas celulares de la cubierta ciliar desprendida.

En preparaciones teñidas con hematoxilina —eosina de ejemplares sacrificados en las primeras horas de la infestación, pudimos sorprender miracidios aprisionados en el mucus, igualmente rodeados de células vacuolizadas, que presentaban un núcleo picnótico, con nucleolo central muy evidente.

4.1.3.2. *Alteraciones de los tejidos del molusco.*

En el estudio de las lesiones ocurridas a los 10 minutos de la infestación, pudimos observar, después de revisar varias series de moluscos, que en ninguno de ellos existían lesiones, ni encontrábamos miracidios parcialmente incrustados. Esta negatividad en la experiencia nos indujo a pensar dos circunstancias:

- 1.^a) La posibilidad de haber utilizado miracidios sin vitalidad. En este caso, no habría infestación a los 20, 30, 40, etc. minutos.

- 2.^a) Que el miracidio necesite más tiempo para su penetración en los tejidos del caracol. Esta última debe ser la razón, puesto que en otros intervalos de infestación resultó positiva.

En las primeras horas de infestación, encontramos miracidios parcialmente introducidos, convertidos ya en esporocistos, en situación subepitelial. En esta situación, las células epiteliales daban la impresión de haberse levantado, a modo de puente lavadizo, iniciando el descenso al conseguir el miracidio la total penetración (fig. 2). El hecho de no observar grandes lesiones de las células epiteliales, nos hace pensar que el miracidio es capaz de segregar una sustancia enzimática, que actuaría provocando la disolución del cemento intercelular. Posteriormente, estas células, desligadas de sus uniones, se desplazarían formando una solución de continuidad por donde penetraría el parásito.

El miracidio se introduce a través del epitelio con su extremidad cefálica. Una vez localizada esta región en el tejido conjuntivo subepitelial, se ensancha ligeramente, ocurriendo una secuencia inversa a la del momento inicial de su penetración, cuando se alargaba en forma de punzón. Ensanchada la región cefálica, las células germinativas son succionadas hacia esta región, quedando la porción caudal del miracidio ópticamente vacía. Esta parte se alarga sensiblemente, con el fin de poder penetrar íntegramente a través del orificio, cada vez más pequeño por las contracciones del caracol, hacia los tejidos subepiteliales donde pronto se retraerá y tomará la forma ovalada típica.

Una vez penetrada la larva, las compuertas celulares descienden y obstruyen el punto de penetración formando una especie de arco que posteriormente desaparece. (fig. 3).

Llegamos a la conclusión de que el cierre de la herida no es auténticamente una regeneración celular. Bien es verdad que se trata de células muy poco diferenciadas y con un gran poder regenerativo, pero dado que el cierre es simultáneo a la total penetración del miracidio, nos hace suponer que son las mismas células desviadas las que ocupan la solución de continuidad, favorecidas por los movimientos de contracción del molusco. También parece demostrar esta hipótesis, el hecho de aparecer el punto por donde penetró el miracidio, con las células dispuestas irregularmente. Nuestra idea coincide con la de SAINT-GUILLAIN (*loc. cit.*).

Las células que cierran el punto de penetración, presentan las siguientes características estructurales: aparecen dispuestas en dos estratos, son cilíndricas o esféricas, con núcleo en posición central, esférico, pobre en cromatina y con un nucleolo muy evidente, también en posición central. En aquellas zonas donde los elementos celulares se disponen a manera de arcos, debido a las contracciones del molusco, presentan un armazón central, constituido por elementos conjuntivos, que al mismo tiempo rodean al parásito.

En la parte externa pueden observarse algunas células epiteliales desprendidas, en vías de degeneración, como lo demuestra su picnosis. Estas células tanto pueden proceder del parásito, como del epitelio ciliado del caracol.

Una vez que la larva aparece en franca posición subepitelial y transformada en esporocisto, con sus características morfológicas típicas, se observa alrededor de ella una amplia zona clara, irregular, delimitada por algunos detritus celulares, que se identifican como células epiteliales en degeneración, algunas intensamente vacuolizadas y que han penetrado arrastradas por el miracidio. En la parte más externa, existen elementos conjuntivos aparentemente inalterados (fig. 4).

La existencia y amplitud de esta zona clara, llamada por algunos autores (RAO, *loc. cit.*) «zona de lisis», está en íntima relación con la localización del esporocisto y, por supuesto, con la estructura de la región.

Los esporocistos localizados en la región del pie (en general, muy abundantes en infestaciones con masas de miracidios) no presentan apenas esta zona, clara, y las células que los rodean son normales, excepto la existencia de un ligero aumento de su basofilia.

La escasa amplitud de esta zona clara rodeando al esporocisto, sugiere la idea de que no se trata de una verdadera zona de lisis, por lo que creemos impropio el uso de dicha expresión. Desde el punto de vista histopatológico, no creemos que 30 minutos sean suficientes para provocar una destrucción celular de cuantía tal como para albergar una larva de tamaño considerable. Por otra parte, en todo proceso de lisis, hay restos que nos señalan la existencia de dicha alteración. Por muy violenta que fuera esta acción lítica, siempre existiría algún resto nuclear, especialmente, que nos indicara un trastorno de tipo lítico.

Nuestra tesis a este respecto es que el molusco, al sentir en el interior de sus tejidos la presencia del esporocisto, contrae fuertemente sus estructuras fibro-musculares, ayudando a la progresión de la larva y creación de una especie de barrera parásito/hospedador.

Hemos llegado a esta conclusión al observar que esta zona clara está íntimamente relacionada con las características estructurales de la región. En zonas ricas en elementos fibromusculares, el área clara es mínima y, a veces, falta (región del pie). Por el contrario, en zonas donde el tejido conjuntivo es laxo, con amplias lagunas tisulares, al contraerse tales estructuras quedan grandes espacios rodeando las formaciones larvianas.

Aboga en favor de esta interpretación de la contracción, el hecho de haber sorprendido evaginaciones del epitelio, en el punto de entrada del miracidio, cuando ya el esporocisto está en posición subepitelial.

Al contraerse el epitelio del caracol, rechaza hacia afuera y a manera de arco, las células movilizadas durante la penetración.

A las dos horas de la infestación, puede verse cómo la mayor parte de las formaciones larvianas se encuentran en posición subepitelial, sin que presenten especial predilección por una determinada zona.

En nuestras experiencias, pudimos contar hasta 10 esporocistos en la región del ojo. En general, la larva, con su zona circundante clara, está delimitada por pequeñas cantidades de detritus celulares, procedentes de algunas células epiteliales arrastradas durante la penetración y existen elementos fibromusculares, que se disponen constituyendo una especie de cápsula limitante.

Hay casos en que pueden aparecer esporocistos juntos; entonces, las cavidades o zonas claras confluyen, constituyendo una sola, rodeada por fibras musculares y pequeña cantidad de fibroblastos (fig. 5).

Sin embargo, esta manera de reaccionar los tejidos del hospedador nos pareció escasa, dándonos la impresión de que, lejos de actuar, el parásito como cuerpo extraño era relativamente tolerado.

Estudiando numerosas preparaciones de moluscos infestados, llegamos a la conclusión de que el hospedador responde activamente durante la primera fase larvaria, para aislarla, con mecanismos que presentan un cierto parecido a los que observamos en los vertebrados.

En principio, muchos esporocistos, precisamente aquellos que se localizan en el pie, dan lugar a una verdadera reacción conjuntiva, con formación de una cápsula (fig. 6).

Dentro del espacio claro advertimos la existencia de verdaderos elementos celulares que, por sus características, identificamos como epiteliales. Dado el poco tiempo de infestación, creemos que se trata como dijimos anteriormente, de células epiteliales del molusco o de alguna célula ciliada del propio parásito, que no llegó a desprenderse totalmente durante la penetración.

A este respecto, nuestra postura es ecléctica con relación a las opiniones de THOMAS (*loc. cit.*) y SAINT-GUILLAN (*loc. cit.*); el primero afirma que el proceso de vacuolización de las células epiteliales ciliadas del miracidio se realiza después de la penetración y en los propios tejidos del molusco. El segundo, observó que estas células no penetran jamás en el molusco con el parásito. Nosotros creemos con DAWES (1969), que el desprendimiento de las células ocurre fuera del molusco, aun cuando puede penetrar juntamente con las células epidérmicas del molusco, sirviendo de cortejo al joven esporocisto.

Existen miracidios alrededor de los cuales no es muy evidente la cápsula conjuntiva reaccional, pero presentan, en cambio, gran cantidad de células pigmentarias.

Sabido es que no todos los miracidios que penetran, alcanzan su evolución total. Gran cantidad de ellos son destruidos por los tejidos del hospedador.

Al cabo de 6 horas de infestación, se pueden encontrar esporocistos con signos claros de incipiente degeneración. Observamos, como detalle más demostrativo, la ausencia total de la zona clara; los tejidos del caracol, particularmente los elementos fibrilares, constriñen fuertemente a la larva. Por su parte, el esporocisto parece haber perdido su membrana externa, apareciendo las células germinativas en grupos sueltos, entre cuyos espacios se observan detritos procedentes posiblemente de la desintegración de la membrana. Respecto a las células germinativas, no presentan en este momento alteraciones histológicas patentes, salvo posiblemente un comienzo de pycnosis, que constituye el primer estadio de destrucción celular. Los nucleolos no son visibles y el citoplasma celular presenta una ligera reacción ácida (fig. 7).

Los miracidios que aparecen localizados en regiones constituidas por tejido conjuntivo laxo, ofrecen como características la existencia de amplio espacio claro, en cuyo interior se ven pequeñas cantidades de minúsculas partículas, procedentes de células destruidas y cantidades más o menos grandes de un pigmento de color pardo. Este pigmento lo observamos igualmente en estructuras no parasitadas, si bien su cantidad aumenta en zonas donde tiene su asiento la larva.

A los 6 días de infestación, los esporocistos que evolucionan presentan las características típicas mencionadas, sin que se observe ninguna modificación de los tejidos del hospedador. Sin embargo, es fácil observar esporocistos en avanzado estado degenerativo. Los tejidos circundantes y en íntimo contacto con la larva, presentan una franca degeneración hialina, son deleznales, toman mal los colorantes y dan a las estructuras un aspecto difuminado. Los elementos fibrilares aparecen tumefactos y entre ellos hay una sustancia ligeramente basófila.

Por su parte, el esporocisto conserva zonas amplias de la membrana. Las células germinativas están disgregadas, con grandes espacios claros e irregulares entre ellas. El citoplasma celular muestra signos degenerativos, en particular vacuolización, indicio de un proceso de autólisis. El núcleo ha perdido, en parte, su apetencia por los colorantes básicos, debido sin duda, a una alteración degenerativa de la cromatina.

Del 7.º al 10.º día de infestación, presenciaremos lentamente la evolución de las células germinativas contenidas dentro del saco esporocístico, hacia la fase de redia.

Las células embrionarias, que previamente se habían agrupado constituyendo unidades independientes, rodeadas de una especie de membrana, difieren en su comportamiento. Las más externas se hacen periféricas, apoyándose fuertemente en la membrana. Estas células son ligeramente planas, con núcleo grande, esférico, rico en cromatina, que presentan una disposición uniforme. El núcleo contiene un gran nucleolo, a veces en situación excéntrica. El citoplasma, no muy abundante, es francamente acidófilo.

Las células centrales evolucionan en relación con la situación que ocupan en el esbozo de la futura redia. Las más anteriores comienzan a disponerse radialmente para constituir el primordio de la faringe. Son células voluminosas, cilíndricas, con núcleo esférico, central, sin nucleolo. Su citoplasma es claro, notablemente vacuolizado, dando el aspecto de tratarse de células con una degeneración grasa. Alrededor de estas células, existe una limitante, con las mismas características que la que rodea a las células embrionarias en fases más tempranas.

Las células situadas en la parte media y posterior de la futura redia, no adoptan ninguna disposición especial. Estructuralmente parece existir una tendencia a la diferenciación. Al lado de grandes células con núcleo igualmente voluminoso, existen otras de menor tamaño, con un pequeño núcleo picnótico.

En una fase más avanzada, las células que adoptan una disposición radial, forman un anillo completo que rodea a un conducto interno: la faringe.

En el conducto de la faringe puede verse un pequeño grupo de células con las mismas características morfológicas que el resto de las germinativas. Se diferencian únicamente en que el núcleo está débilmente teñido y el citoplasma es claro y ligeramente acidófilo.

En la porción media del cuerpo de la futura redia, las células se invaginan (representa, desde el punto de vista embriológico, una especie de gastrulación), originando una cavidad.

Finalmente, las células dispuestas radialmente constituyendo la faringe, se han alargado ligeramente, el núcleo aparece ahora en el polo apical, y el citoplasma está claramente vacuolizado, adoptando en conjunto una disposición reticulada. Interiormente existe, en esta fase, un verdadero conducto. Aquellas células que observábamos sin disposición específica al final del conducto faríngeo, se han colocado paralelas al eje mayor, constituyendo una capa epitelial de revestimiento interno.

Las células que en la fase anterior se separaban creando una cavidad, en este momento forman un fondo de saco claro, que constituirá el aparato digestivo de la redia. Son elementos muy voluminosos, cúbicos, con núcleos en disposición basal, grande, que ocupa casi todo el citoplasma celular, rico en cromatina y dotado de un nucleolo. El citoplasma es francamente basófilo y con estructura reticular. Exteriormente esta porción aparece rodeada por una membrana (fig. 8).

Respecto a las lesiones existentes en los tejidos del molusco, durante los últimos días de evolución del saco esporocístico, observamos que no ha habido modificaciones manifiestas con respecto a días anteriores. Hay que destacar que hacia el 9.º y 10.º días, da la impresión de que el parásito es perfectamente tolerado. Aquel intento de reacción conjuntiva, con afluencia de elementos fibrilares en torno al parásito, presencia de células pig-

mentarias y fibroblastos, ha desaparecido y únicamente es visible la zona clara con las fibras conjuntivo-musculares, sin adoptar una disposición especial.

Objetivamente, las lesiones histopatológicas observadas en estos primeros estadios de penetración y localización del miracidio, así como las causadas por el desarrollo posterior del esporocisto son las siguientes:

Disgregación de las células epiteliales del revestimiento externo del molusco, que permite la existencia de una solución de continuidad. Algunas de estas células se destruyen en el medio externo. Otras penetran con el parásito, y las más, reconstruirán el epitelio al finalizar la penetración.

Localizado el esporocisto en posición subepitelial, en los primeros días de infestación, existe un espacio claro que lo rodea. Este espacio es más o menos grande, en relación con la estructura de la región. Muchos esporocistos aparecen rodeados por una verdadera cápsula conjuntiva, a la que se asocian determinadas células (fibroblastos, células pigmentarias).

Durante el 7.º al 10.º día de evolución del esporocisto, desaparecen estos signos reaccionales, apareciendo normales los tejidos del hospedador que rodea a la larva.

Cuando los esporocistos no evolucionan, la zona clara es exigua, y la reacción tisular marcada. Esta reacción presenta características histopatológicas similares a la de los esporocistos en los primeros días de infestación.

4.2. De las experiencias con *L. palustris* (Penetración y esporocisto).

4.2.1 Histología normal.

Lo mismo que en *L. truncatula*, estudiamos en este apartado las estructuras que el miracidio encuentra asequibles para penetrar, así como los tejidos en los cuales se va a realizar la evolución del esporocisto a la fase de redia.

La parte externa del molusco está recubierta por un epitelio cilíndrico ciliado. Las células poseen un núcleo voluminoso, en posición basal, ovalado, con el eje mayor perpendicular a la base; es pobre en cromatina, la cual aparece dispuesta en forma de pequeños gránulos y contiene uno o dos nucleolos muy evidentes.

El epitelio de la pared lateral del pie, así como el que recubre la cavidad del manto, es cúbico, de células pequeñas, con núcleo esférico en posición central, muy rico en cromatina. El epitelio de revestimiento externo está separado del conjuntivo por una estrecha, pero bien evidente, membrana basal.

El tejido conectivo subepitelial aparece constituido por dos tipos de estructuras: elementos celulares y fibras. Las células son, fibroblastos, células pigmentarias, vesiculares y mucosas. Las fibras son de dos clases: conjuntivas y musculares.

Los *fibroblastos* son de forma variada, dominando el tipo alargado. Tienen un citoplasma abundante, frecuentemente con grandes cantidades de un pigmento marrón, localizado periféricamente. El resto del citoplasma es basófilo, con aspecto reticulado. El núcleo es esférico o ligeramente ovalado, rico en cromatina, que aparece dispuesta en gránulos. En el interior del núcleo es perceptible un gran nucleolo. En preparaciones con hematoxilina-eosina se hace difícil la delimitación del contorno celular, identificándose estos elementos por las características nucleares.

En el tejido subepitelial del pie, este tipo de células no es muy abundante, por el predominio de elementos fibrilares, circunstancia que hace que esta región tenga gran consistencia. Por el contrario, en el borde del manto donde las fibras escasean, son más abundantes, relacionándose por medio de sus prolongaciones citoplasmáticas y constituyendo una red.

Las *células pigmentarias* son en esta especie mucho más evidentes que en *L. truncatula*. Aparecen diseminadas en el seno del tejido conjuntivo, constituyendo a veces pequeños grupos. Son de tamaño mayor que los fibroblastos, de forma irregular, con bordes curvos. Tienen un núcleo esférico, excéntrico o íntimamente relacionado con la membrana celular, rico en cromatina. En algunas células se observa una formación más densa, y que pudiera tratarse del nucleolo. El citoplasma es claramente acidófilo, con presencia de pequeñas esférulas de un pigmento cuya coloración varía de unas células a otras. En unas aparece amarillo claro, para tornarse prácticamente negro en otras.

Células vesiculares.—Son células muy irregulares, ovaladas, alargadas, ecétera. En la pared dorsal de la cavidad bucal aparecen formando grupos compactos, que adoptan forma poliédrica por presiones recíprocas. Son elementos muy voluminosos, con núcleo pequeño pobre en cromatina y de forma variada. Su situación dentro de la célula unas veces es central y otras periférica. El citoplasma es ligeramente basófilo, presentando generalmente aspecto reticulado; otras veces da la impresión de contener elementos fibrilares y como si las fibras arrancaran del núcleo, adoptando éste la forma de medusa. Las membranas celulares son netas, pudiéndose ver perfectamente todo el contorno celular.

Células mucosas.—Son muy escasas en el tejido conectivo profundo de *L. palustris*. Aparecen concentradas, constituyendo grandes colonias a nivel de la membrana del epitelio del pie, en la región conjuntiva subnasal y alrededor de la boca.

En preparaciones con hematoxilina-eosina se las identifica por su intensa basofilia. Son células pleomórficas, de gran tamaño, con núcleo cen-

tral, rico en cromatina. Cuando contienen gran cantidad de material, el núcleo queda parcialmente enmascarado. El citoplasma, en células llenas, presenta aspecto granuloso; en aquellos elementos que han expulsado su contenido, el citoplasma presenta aspecto reticulado.

Las células situadas más profundamente, dan unas prolongaciones que se relacionan con las situadas en íntimo contacto con la membrana basal. No se han observado verdaderos conductos excretorios, la secreción se realiza por medio de un sistema lacunar cuyos extremos se abren entre las células epiteliales.

Estos espacios lacunares carecen de estructura, presentando a la sección transversal una tenue membrana de aspecto conjuntivo. Interiormente aparecen repletos de material basófilo.

Este tipo de células mucosas aparecen más desarrolladas en *L. palustris* que en *L. truncatula*, pudiendo esta diferencia morfológica servir como elemento diferencial de estas dos especies de pulmonados terrestres.

Las fibras conjuntivas son fundamentalmente colágenas. Son fibras mucho más delicadas que las musculares, cortas, que se entrecruzan difusamente, constituyendo una extensa red entre los elementos celulares y las fibras musculares. No se observa en su interior estructura alguna. En preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina son difíciles de identificar, por tener características semejantes a las musculares. Con el método de la triple tinción de Mallory, lo mismo que las fibras conjuntivas de *L. truncatula*, se tiñen de color azul.

Las fibras musculares, sobre todo en la región del pie, donde son muy abundantes, y en secciones de la porción correspondiente al músculo columelar, son anchas, constituyendo fascículos que llevan distintas direcciones. Son de variedad lisa, con una disposición paralela de las miofibrillas longitudinales. Los núcleos son alargados, pobres en cromatina, lo que hace difícil su identificación.

4.2.2. Penetración y localización

Los miracidios de *F. hepatica* actúan en esta especie de molusco de la misma forma observada en *L. truncatula*. Puesto en presencia de *L. palustris*, con movimientos vivos, tratan de tomar contacto para realizar la penetración. Hecho el contacto, el miracidio rota alrededor de su eje longitudinal, introduciendo la extremidad cefálica entre las células de revestimiento externo del molusco.

Los miracidios en *L. palustris* no tienen apetencia por una región determinada para invadir al molusco. Lo mismo que en *L. truncatula*, hemos encontrado esporocistos en las más variadas localizaciones, si bien en *L. palustris* la región del pie debe ofrecer alguna dificultad, basada especialmente en el mayor desarrollo de sus células mucosas, cuya secreción posi-

blemente constituye una especie de película entorpecedora de la penetración. Cuantitativamente y en las mismas condiciones de infestación, penetran más miracidios en el pie de *L. truncatula*, que en el de *L. palustris*, a pesar de haberlos sorprendidos fijados en esta región. Por el contrario el número mayor de miracidios en *L. palustris* lo encontramos en aquellas estructuras externas que carecen de células mucosas o las poseen en número muy escaso, como los labios, las regiones tentacular y subtentacular, la cavidad paleal, etc.

Otro aspecto de la penetración de *L. palustris*, es la frecuencia con que hemos encontrado gran cantidad de miracidios que habían entrado por el pneumostoma y que penetraban a través del revestimiento epitelial del saco pulmonar, posibilidad que fue admitida por LEUKART (1901) para *L. truncatula*, y que ha sido discutida como vía de infestación de otros moluscos, por ejemplo, *Planorbis*, por *Schistosoma mansoni*. (MALDONADO y MATIENZO 1947 loc. cit) (fig. 9 y 10).

4.2.3. Histopatología

Lo mismo que en *L. truncatula*, observamos durante la penetración en *L. palustris*, procesos alterativos del epitelio ciliado del miracidio y de las células epiteliales de revestimiento del molusco.

4.2.3.1. Alteraciones del epitelio ciliado del miracidio

Hemos observado desprendimiento del epitelio ciliado del miracidio y presencia de células vacuolizadas, fuera de los tejidos del caracol. En cortes para estudio histológico, es difícil interesar este tipo de células; únicamente en las que han quedado adheridas al mucus es posible una identificación posterior.

4.2.3.2. Alteraciones de los tejidos del molusco

A las dos horas de la infestación experimental, hemos encontrado esporocistos implantados en el tejido subepitelial de las regiones externas del molusco.

El modo de penetración es idéntico a como se realiza en *L. truncatula*, es decir, por una elongación del extremo anterior del miracidio, que actúa a modo de punzón y con la secreción de una enzima capaz de disolver el cemento intercelular, penetra entre las células desprendidas, para alojarse en el conjuntivo. Una vez que gran parte del miracidio ha penetrado, la porción anterior se hace globulosa, y se adelgaza el extremo posterior, que insensiblemente se va introduciendo.

En este tipo de limnea, el orificio de entrada es francamente más evidente que en el caso de *L. truncatula*, observándose la existencia de células

epiteliales con cierto grado de degeneración. Penetrado el parásito, es evidente una solución de continuidad de la porción más superficial del epitelio. Da la impresión de que parte de las células, en un intento de reparación de la herida, se han comprimido sobre la membrana basal, quedando en la parte superior un vacío, como producido por sacabocados. La cicatrización posterior, que es muy rápida, corre a cargo de las propias células desprendidas durante la penetración que no han sufrido necrosis.

En estas experiencias, no hemos sorprendido las evaginaciones del epitelio en el punto de entrada del miracidio, típicas en *L. truncatula*.

Localizado el esporocisto en posición subepitelial, el comportamiento de los tejidos del caracol es distinto en relación con la región. En el pie, y en general en zonas de gran riqueza en fibras musculares procedentes del músculo columelar, apenas si existe espacio claro rodeando al esporocisto. Por el contrario, las formas larvarias que han penetrado por el borde del manto presentan una amplia zona clara y espesamiento de las estructuras con desaparición de los espacios intersticiales.

A las 6 horas de infestación, el epitelio aparece totalmente reconstruido y el miracidio rodeado por una cápsula conjuntiva evidente, constituida especialmente por fibras colágenas (fig. 11).

En estas primeras horas hemos encontrado esporocistos alojados en el pie que presentaban signos degenerativos. El esporocisto tiene aspecto tabicado, con espacios claros en su interior, posiblemente por destrucción de las células germinativas. Las células que persisten presentan una clara picnosis y el citoplasma vacuolizado. En conjunto la imagen difiere considerablemente de la de aquellos esporocistos que tienden a evolucionar normalmente. Alrededor de los esporocistos involucionados existe un espacio claro, sin ningún elemento estructural y, limitándolo exteriormente, aparecen los elementos conjuntivo-musculares del caracol, constituyendo una verdadera cápsula. En la parte externa de la cápsula se advierte la presencia de un componente celular constituido especialmente por fibroblastos y células pigmentarias.

A las 48 horas después de la infestación no encontramos alteraciones tisulares, en los esporocistos en vías de evolución. Por el contrario, en este periodo existen abundantes sacos esporocísticos degenerados, con características estructurales distintas a las que encontrábamos en el mismo caso, a las pocas horas de infestación.

Los esporocistos aparecen rodeados por una membrana, que se hace más evidente por la aposición de células embrionarias. La parte central es clara, sin estructura; únicamente existen algunas esférulas basófilas juntamente con un pigmento marrón. Los tejidos del hospedador rodean y aíslan el saco esporocístico con gruesos fascículos fibrilares. En este caso, observamos también la existencia de células cargadas de pigmento y

otro tipo de células de pequeño tamaño, los amebocitos. Hay que destacar que en estos procesos degenerativos de los esporocistos, existe en el foco gran cantidad de pigmento libre, a veces tan abundante, que enmascara la estructura de los componentes tisulares.

Otros sacos esporocísticos no presentan signos degenerativos tan acusados, pero, la falta de reacción de los propios tejidos del caracol, que hace no exista una delimitación clara entre ambas estructuras, nos hace pensar que se trata de formas larvarias perfectamente toleradas, aunque no concluirán su evolución larvaria.

Alrededor de algunos sacos esporocísticos cuyo porvenir no podíamos predecir desde el punto de vista estructural, encontramos, no frecuentemente, un curioso tipo de células, que por su estructura y situación nos recordaban a las células gigantes de cuerpo extraño de los vertebrados superiores. Eran células de gran tamaño de aspecto irregular y citoplasma basófilo y granuloso. En su interior, presentan una serie de formaciones esféricas equiparables a núcleos. La disposición de estos supuestos núcleos en el interior de la célula es desordenada. Estas células, creemos, sin lugar a duda, que se han formado a partir de los amebocitos; células totipotentes y equiparables a los histiocitos.

A los tres días de infestación, existen sacos esporocísticos en las más variadas localizaciones, abundando con preferencia en el borde del manto, donde pueden verse en grandes cantidades, en infestaciones masivas. Las alteraciones tisulares se caracterizan por la existencia de un acúmulo líquido parangonable al edema intersticial de los vertebrados superiores.

En regiones donde el tejido conjuntivo es más denso y se reúnen varios sacos esporocísticos, constituyen una cápsula común, donde frecuentemente aparecen células fagocitarias (amebocitos). En el interior de la zona clara y ampliamente diseminadas, se encuentran células conjuntivas histológicamente normales, como en un intento de defensa ante el insulto que supone el miracidio en los tejidos del caracol. Son fibroblastos y células pigmentarias y un tipo de células que posiblemente sea de transición entre las dos primeras, pero que recuerdan a las células cebadas. Son elementos ovalados, mayores que los fibroblastos, con gran cantidad de granulaciones basófilas esféricas en el citoplasma. El núcleo es alargado y en posición central, relativamente rico en cromatina.

A los 5 días de infestación hemos encontrado esporocistos que conservaban en parte su revestimiento epitelial. Estos miracidios aparecían localizados a nivel de la cavidad bucal. Exteriormente aparecen rodeados por fibroblastos de aspecto estrellado.

Del 7.º al 10.º día de infestación notamos serias transformaciones, tanto en aquellos esporocistos que van a degenerar, como en los tejidos del hospedador que rondan a los esporocistos normalmente evolucionados y en las células embrionarias.

Los miracidios en vías de degeneración, aparecen mal delimitados, como si se hubiera producido un fenómeno de lisis. En cuanto a las células embrionarias, no adoptan la disposición típica y no se observa ninguna diferenciación celular. Presentan un citoplasma acidófilo. El núcleo, pobre en cromatina, no es tan evidente como en las formas larvares en evolución. El nucleolo apenas si es visible. Los tejidos del hospedador continúan insensiblemente con las estructuras del esporocisto sin que exista delimitación. Solamente en regiones cercanas se observa la presencia de células pigmentarias, fibroblastos y pequeñas células fagocitarias.

La reacción de los tejidos del hospedador cuando los esporocistos evolucionan normalmente, es mínima y, en este periodo de infestación, hay que destacar la ausencia total de la barrera conjuntiva y demás elementos celulares que encontrábamos en los dos primeros días después de la infestación. En regiones donde los esporocistos tienen grandes posibilidades de evolucionar, como son todas aquellas que poseen tejido conjuntivo laxo, con presencia de amplios espacios tisulares, la larva sigue rodeada por el espacio claro, existiendo exteriormente una discreta tendencia a la disposición en empalizada de los elementos fibrilares. Se tiene la impresión de que, una vez pasado el primer ataque del parásito, existe una perfecta tolerancia entre éste y el hospedador. En infestaciones masivas y sorprendidos los esporocistos en gran cantidad en el borde del manto, los tejidos no ofrecen reacción ninguna; solamente grandes espacios claros, rodeando a las larvas y a la presencia de una sustancia hialina, en la que queda una pequeña cantidad de fibroblastos. El tejido conjuntivo laxo típico de esta región, queda reducido a una estrecha franja en relación íntima con el epitelio externo.

Las células embrionarias del saco esporocístico siguen en su evolución las mismas etapas que ya observamos en *L. truncatula*. Es posible que en esta especie de pulmonado, la evolución sea algo más rápida, ya que a los 8 días de infestación sorprendimos sacos esporocísticos con redias en bastante avanzado estado de desarrollo.

Concluimos resumiendo objetivamente las lesiones histopatológicas observadas en estos dos primeros periodos de infestación.

Respecto a la localización, aún cuando el miracidio puede penetrar por cualquiera región expuesta del caracol, prefiere zonas distintas al pie, pudiendo penetrar a través del pneumostoma.

En el punto de penetración, se produce disgregación de las células epiteliales, con destrucción de gran cantidad de ellas, que provocan una solución de continuidad evidente. La reparación se realiza a partir de células desprendidas indemnes y por división de las que marginan el orificio de entrada.

Localizado el esporocisto en posición subepitelial, en los primeros días de infestación, la respuesta de los tejidos del molusco varía con la lo-

calización. En aquellos puntos donde abundan las fibras conjuntivas, el espacio claro es exiguo y la larva aparece rodeada por las fibras, constituyendo una cápsula a la que acompañan elementos celulares (fibroblastos, amebocitos, células pigmentarias). Cuando están localizados en el seno del tejido conjuntivo laxo, el espacio claro es amplio. Por el contrario, no existe la clásica disposición de las fibras rodeándolos.

En relación con los elementos fibrosos, suele aparecer una especie de célula multinucleada gigante.

En este tipo de molusco, sobre todo en el pie, es frecuente la existencia de esporocistos degenerados. Unas veces ocurre una clara reacción conjuntiva alrededor de un acúmulo de células embrionarias alteradas y, por el contrario, otras veces presentan estas células las mismas características.

Desde el punto de vista comparativo, no parecen existir en estos periodos, grandes diferencias histopatológicas entre las dos especies de moluscos estudiadas.

En cuanto a la invasión en *L. truncatula* penetran por cualquiera de las regiones expuestas. En *L. palustris* lo hacen más fácilmente por una región distinta a la del pie.

El punto de penetración es pequeño, sin apenas destrucción celular en *L. truncatula*. En *L. palustris* es amplio, con clara destrucción celular y con regeneración posterior.

El esporocisto se desarrolla en ambas especies en un punto cercano al de penetración.

En los dos tipos de moluscos existe reacción conjuntiva en los primeros días de infestación, observándose en *L. palustris* un tipo de célula gigante que no vimos en *L. truncatula*. Desde el 6.º al 10.º día no existe en ninguna de las especies, reacción tisular marcada; la zona clara que rodea a la larva está en relación con la región.

Tanto en *L. palustris*, como en *L. truncatula*, hemos observado esporocistos degenerados, siendo más numerosos en la primera y de localización podal. Estos esporocistos presentan alteraciones de las células embrionarias, así como reacción conjuntiva de los tejidos circundantes. En *L. palustris* se observa en estos casos un acúmulo de pigmento marrón.

4.3. De las experiencias con *L. truncatula* (redias y cercarias)

4.3.1. Histología normal de las zonas de desarrollo de las redias y cercarias.

Cuando las redias han llegado a su total madurez, salen del saco esporocístico y emigran, desarrollándose en los siguientes órganos:

- 1.—Tejido conjuntivo muscular que rodea a la cavidad paleal y cavidad general del cuerpo.
- 2.—Riñón.

3.—Hepatopáncreas.

Consideramos, en contra de la opinión de algunos autores (TAYLOR 1965), que el saco esporocístico no realiza emigraciones importantes, desarrollándose cerca del punto de implantación.

4.3.1.1. Tejido conjuntivo-muscular y cavidad general del cuerpo

El tejido conjuntivo-muscular que rodea a la cavidad paleal, ya fue descrito en el apartado anterior cuando hicimos referencia a la penetración y fase de esporocisto.

La cavidad general del cuerpo, contiene los órganos del molusco. Consta de un tejido conectivo, que se dispone formando una especie de cubierta membranosa, que envuelve los órganos y ocupa los espacios existentes entre ellos.

Este tejido conectivo, igual que el que se encuentra en regiones externas del caracol, está constituido por un componente celular y otro fibroso.

El componente celular lo constituyen los fibroblastos, células vesiculares y amabocitos.

Los *fibroblastos* presentan las mismas características descritas. Poseen finas prolongaciones que se entrecruzan formando espacios por donde circula la hemolinfa.

Las *células vesiculares* aparecen distribuidas en la rádula, en el tejido conectivo del hepatopáncreas y el ovotestis. Su estructura ya ha sido descrita.

BAECKER (1932) considera a los *amebocitos* como equivalentes a los leucocitos de los animales superiores. Son de pequeño tamaño, muy polimorfos, con un núcleo vesicular esférico o alargado, en posición francamente excéntrica y la cromatina distribuida irregularmente. El citoplasma es basófilo con presencia, a veces, de gránulos y vacuolas.

El componente fibrilar está constituido por un pequeño número de fibras colágenas.

4.3.1.2. Riñón

Consta de una porción tubular y otra sacular. La primera, formada por células epiteliales cúbicas, con una membrana basal, donde existen algunas fibras musculares. El núcleo de las células es esférico, rico en cromatina y de localización central. El citoplasma da la impresión de estar longitudinalmente estriado en su polo libre.

La porción sacular, forma una serie de repliegues con un epitelio de revestimiento a base de células cilíndricas, con un núcleo esférico o ligeramente ovalado, situado en posición basal. El citoplasma es vacuolado y contiene granulaciones acidófilas.

4.3.1.3. Hepatopáncreas.

Juntamente con el ovotestis, ocupa los dos tercios caudales del cuerpo del caracol. Consiste en una glándula tubulosa compuesta, con un conducto principal y una serie de lóbulos secretores, separados por una fina capa de tejido conectivo fibroso que, a su vez, penetra por entre los lóbulos.

El conducto corre a lo largo de los lóbulos pasando luego al ciego. El epitelio da lugar a una serie de pliegues que van disminuyendo de número a partir de su unión en el ciego, haciéndose completamente liso hacia la parte posterior. Está constituido por células altas con el extremo libre cubierto de cilios.

Los lóbulos glandulares están cubiertos por una delgada lámina de tejido conjuntivo. En los intersticios del tejido conectivo existen lagunas hemáticas, células vesiculares y fibroblastos, principalmente.

En los lóbulos hepáticos de *L. truncatula* diferenciamos por sus características morfológicas, dos tipos celulares: células mucinosas y células digestivas.

Las *células mucinosas*, de forma piramidal, tienen un núcleo esférico rico en cromatina y con un gran nucleolo. El citoplasma es reticular, con presencia de gránulos basófilos en su interior.

Las *células digestivas*, están situadas entre las anteriores. Normalmente no llegan a la superficie de la luz. Por tratarse de una glándula holocrina, el extremo libre únicamente alcanza la luz de los túbulos al romperse la membrana celular superficial y dar salida juntamente con los productos de secreción a orgánulos intracelulares.

Estas células digestivas, en su evolución, elaboración y secreción de material, siguen un proceso evolutivo complicado (PAN, 1958).

Comienza por un periodo de diferenciación a partir de los fibroblastos existentes en el conectivo intertubular y se transforman en células cilíndricas carentes de cilios. El núcleo, en posición basal, es esférico y rico en cromatina. El citoplasma presenta reacción basófila y se advierte la existencia de gránulos de secreción.

Posteriormente hay un acúmulo de material acidófilo en el citoplasma celular. Las células se hacen irregulares, globulosas, dando a la luz del túbulo aspecto igualmente irregular. Por último, se aprecia la existencia de vacuolas en el interior del citoplasma, que conduce con su crecimiento a la rotura de la membrana de la superficie libre de la célula con descarga de su contenido en la luz del túbulo.

Dado el gran polimorfismo observado en este tipo de células y en relación con su función, no es raro que se haya pretendido identificar varios tipos celulares. Nosotros nos aventuramos más; creemos que el hepatopáncreas de *L. truncatula* posee solamente un tipo de células, que adquieren distinta morfología según la fase funcional y el requerimiento del momento.

Por distintas causas, creemos que una célula digestiva puede transformarse en vesiculosa y una vesiculosa en digestiva.

4.3.2. Histopatología

Siguiendo el orden establecido en la descripción de los órganos donde más frecuentemente asienta el parásito, estudiamos en este apartado las lesiones provocadas por la redia en los tejidos conjuntivo-muscular, cavidad general del cuerpo, riñón; más las provocadas por redias y cercarias en el hepatopáncreas.

4.3.2.1. Lesiones en el tejido conectivo muscular

Cuando la redia ha alcanzado el estado de madurez, por rotura del saco esporocístico, queda libre en el mismo lugar de evolución de éste y, alimentándose de los propios tejidos del caracol, se dirige hacia el hepatopáncreas, al mismo tiempo que comienza la evolución de las células germinativas.

El primer problema que se plantea al respecto, es la forma de la salida de la redia y el mecanismo en virtud del cual va a producir la rotura de la membrana del esporocisto.

Uno de los modos, puede ser puramente mecánico. Las redias contenidas en el saco esporocístico, al evolucionar, van distendiéndolo y adelgazándolo hasta que aquél «estalla». Sin embargo, hemos observado la falta de membrana esporocística en fase de redias maduras. Por el contrario, las de crecimiento retardado, presentaban una membrana evidente. Pensamos que, independiente del factor mecánico, exista un factor de tipo enzimático, segregado por la propia redia y que actúa provocando una disolución de la membrana que lo circunda, quedando de esta forma libre, sin menoscabo de la ulterior evolución del resto de las formaciones larvarias que no han alcanzado la total madurez.

4.3.2.1.1. Lesiones en el pie.

A partir del 8.º día, encontramos redias en el pie del molusco. Se trata de formas larvarias recién salidas del saco esporocístico y perfectamente viables. El hallazgo de redias en este órgano, indica que el pie no es totalmente inadecuado para la evolución del esporocisto, como se pretende.

La redia aparece rodeada por un espacio claro, con las mismas características que presentaban los esporocistos a los pocos días de la infestación. En la parte externa existe gran cantidad de células que, aunque difíciles de interpretar, consideramos se trata de fibroblastos y amebocitos, tan íntimamente relacionados, que constituyen una verdadera barrera conjuntiva (figura 13). En otros casos, los tejidos que rodean a la redia presentan

menos número de células y la cápsula formada es fundamentalmente fibrosa.

En general, las lesiones en esta primera localización no son muy evidentes y difieren poco de las del estado final del esporocisto. En esta fase, es evidente que la redia recién eclosionada no ha comenzado su acción depredadora, o bien su alimentación consiste en los detritos que pudieran existir en el espacio claro, y que posiblemente correspondan a fragmentos de la membrana del esporocisto.

4.3.2.1.2. Lesiones en las proximidades del ojo.

En distintos intervalos de infestación se han podido encontrar redias libres localizadas a nivel del ojo. A los 21 días, algunas de ellas presentan caracteres especiales. Son redias libres, puesto que carecen de saco esporocístico. Sus órganos están perfectamente y, por último, puede verse contenido en el saco gástrico, lo que indica la ingestión de sustancias alimenticias (fig. 14).

Los tejidos del caracol no presentan grandes lesiones. Unicamente se observa un mecanismo defensivo que consiste en la presencia de elementos fibrosos, (fibras colágenas) dispuestos circularmente alrededor de la larva.

El hecho de que no exista destrucción celular alrededor de la formación larvaria alimentada, apoya nuestra hipótesis de que estos alimentos proceden de restos del saco esporocístico, o también de células embrionarias que, por varias circunstancias, no han alcanzado la evolución total.

Podría pensarse que las redias que evolucionan en estas regiones no alcanzan nunca el hepatopáncreas, por impedírsele la barrera conjuntiva y que finalmente degeneran y mueren. En nuestras experiencias no hemos encontrado redias que presenten señales de que tal proceso fuera evidente.

4.3.2.1.3. Lesiones en el tejido conjuntivo-muscular que rodea a la cavidad paleal.

En el borde del manto y, en general, en todos los tejidos del caracol constituidos por conjuntivo laxo, se aprecian lesiones con más frecuencia que en las localizaciones anteriores.

A los 8 días y con infestaciones masivas encontramos sacos esporocísticos en el borde del manto, conteniendo formaciones larvarias en distintos grados de evolución. Desde redias casi totalmente maduras, hasta conglomerados de células embrionarias, cuya evolución parecía detenida. El saco esporocístico era muy tenue, confundiéndose en algunos puntos con los bordes del tejido del molusco. A su alrededor abundan las células conjuntivas, pero sin adoptar una disposición específica. Las fibras muscu-

lares existentes en la región aparecen con aspecto de degeneración hialina, habiendo desaparecido la estriación longitudinal típica.

A los 16 días, en infestación con 5-10 miracidios, encontramos redias libres en el borde del manto, y el tejido conjuntivo se disponía igualmente alrededor de la larva. En ocasiones, aparte de las células típicas, encontramos algún tipo de célula especial, tal como alguna célula adiposa con características estructurales idénticas a la de los vertebrados superiores. Se identifica este tipo celular por presentar el núcleo en posición periférica y en íntima relación con la membrana celular, adoptando en conjunto la forma de anillo de sello. El citoplasma está ocupado por una gran vacuola. Posiblemente se trate de fibroblastos que han sufrido un proceso de infiltración grasa debido a trastornos metabólicos inducidos por el parásito.

A los 19 días y en las mismas condiciones de infestación, podemos ver cómo la redia se va alimentando de los tejidos del caracol, puesto que las estructuras que se encuentran a nivel de la entrada de la faringe aparecen con amplios espacios claros. Por el contrario, la parte posterior y laterales presentan un tejido conjuntivo normal.

En este mismo periodo de infestación, localizamos redias en el tejido conjuntivo-muscular a nivel del estómago. Las lesiones son pequeñas y consisten en la destrucción de un exiguo número de elementos celulares. Posiblemente esta destrucción sea de tipo mecánico, es decir, se deba a conflicto de espacio, por crecimiento simultáneo de varios sacos que comprimen las células, destruyéndolas. Las células del estómago próximas a la redia, aparecen estructuralmente normales, apareciendo únicamente un adelgazamiento de las capas conjuntivo-musculares. Esta lesión es posible que sea igualmente por compresión.

Redias libres en múltiples localizaciones, hemos encontrado en el transcurso de nuestras experiencias. A los 12 días, y en ejemplares infestados con 5-10 miracidios, hallamos redias en el tejido conjuntivo laxo a nivel del esófago. Eran redias libres, alimentándose activamente, como lo demuestra la gran distensión del saco gástrico y la presencia en su interior de detritos de difícil identificación. Se trata, en general, de una masa uniforme sin estructura y ligeramente basófila.

Existe, en este caso, una alteración evidente de los tejidos del molusco. Aparecen disgregados y han perdido el aspecto reticular típico. Posiblemente estas lesiones sean consecuencia de la acción conjunta de dos factores: por una parte la acción expoliadora y por otra la depredadora.

Observamos en esta experiencia un hecho que nos había llamado la atención en experiencias anteriores y que achacábamos a un defecto de técnica. Las estructuras aparecían frecuentemente con aspecto borroso, en las zonas próximas a las formas larvarias, especialmente en la fase de redia. Las células, en estos casos, son de difícil identificación, tienen as-

pecto, en conjunto, de carne cocida. El citoplasma celular está lleno de una sustancia amorfa y los núcleos toman carácter acidófilo en algunas células. Las fibras conjuntivas aparecen tumefactas y fragmentadas. Algunas de las células encontradas cerca de la redia, parecen proceder del saco esporocístico; son células germinativas que no han constituido parte de un grupo, o que habiéndolo constituido no evolucionaron y, finalmente, se disgregaron (fig. 15).

Que estas alteraciones son debidas al efecto del parásito, nos lo hace suponer la circunstancia de que, dentro del mismo corte histológico, encontramos zonas no parasitadas que conservan su estructura y características tintoriales en los distintos componentes tisulares.

A los 19 días de infestación, existen redias a nivel del saco pulmonar. En este caso se trata de redias que han encontrado un lugar adecuado para su proceso evolutivo. La redia presenta una gran longitud y pueden ya diferenciarse en su interior grupos celulares, que posteriormente darán lugar a las cercarias. No parecen existir grandes alteraciones tisulares, excepto a nivel de la entrada de la faringe, donde se aprecian espacios claros con células libres, que servirán de alimento a la larva en su emigración hacia el hepatopáncreas.

4.3.2.1.4. *Formas larvarias degeneradas.*

No todos los esporocistos localizados en el tejido conjuntivo-muscular evolucionan hasta llegar a la fase de redia. Muchos de ellos sufren un proceso involutivo. Estos esporocistos no evolucionados tienen como localización preferente el tejido del pie.

A los 8 días y en linneas infestadas con masas de miracidios, pudimos sorprender la existencia de sacos esporocísticos en regresión. Las células embrionarias contenidas en su interior aparecían muy juntas, siendo imposible su identificación y su estudio. Los núcleos eran pálidos en las células que conservaban todavía su estructura, ya que en otras aparecían claramente vacuolizados. Alrededor del saco esporocístico involucionado no existía una membrana diferenciada; exteriormente este saco, era de forma irregular, con entrantes y salientes. La zona clara era relativamente amplia, observándose en su interior una masa pulverulenta de un pigmento marrón. Delimitando la zona clara existía una verdadera reacción conjuntiva, estando protegida la propia cápsula por gran cantidad de células mucosas, que se teñían intensamente por colorantes básicos.

A los 13 días y en las mismas condiciones de infestación y de implantación encontramos sacos esporocísticos con un grado avanzado de degeneración. Su parte interna está constituida por un espacio claro amplio, en el que nadan algunas pocas células esféricas que, por sus características histológicas, identificamos como germinativas degeneradas. Tienen un tama-

ño ligeramente mayor que el normal y han perdido su intensa basofilia para tornarse ligeramente acidófilas. El citoplasma es vacuolar. Exteriormente, el saco esporocístico carece de membrana o está soldada íntimamente al tejido circundante. Los tejidos del caracol se disponen concéntricamente constituyendo una cápsula. Fuera de la cápsula hay gran cantidad de tejido conjuntivo denso, pobre en células y con pigmento marrón. (figura 16).

A partir de los 15 días de infestación encontramos sacos esporocísticos que, sin presentar signos degenerativos, tampoco muestran caracteres evolutivos. En este caso, los tejidos del molusco han organizado una cápsula conjuntiva aislándolo por completo. Esta cápsula está constituida por fibras conjuntivas jalonadas por fibroblastos que se disponen uniformemente. En el espacio claro entre la cápsula y el parásito, destaca la presencia de algunas células piramidales de núcleo voluminoso rico en cromatina, posiblemente se trate de amebocitos.

4.3.2.2. Lesiones de la cavidad general y riñón (emigración de redias).

Una vez que las redias han salido del saco esporocístico intentan su emigración hacia el hepatopáncreas, punto donde concluirán su proceso evolutivo con la formación y expulsión de cercarias. Las redias llegan hacia este órgano por el camino, no sólo más corto, sino más fácil, como es la cavidad general del cuerpo, progresando a través del tejido conjuntivo que rodea a los órganos y a través de la glándula del albumen y del ovotestis para llegar al hepatopáncreas.

Durante la emigración, que suele ser bastante rápida, la larva atraviesa barreras epiteliales, cuyas células desprendidas le sirven de alimento. Posteriormente la redia se nutre a expensas del tejido conjuntivo y de los líquidos que por él circulan.

A los 14 días, en infestaciones con masas de miracidios, sorprendemos redias destruyendo el epitelio de la cavidad paleal para penetrar en la cavidad general. Estas redias, en general, provocan la destrucción de los tejidos que encuentran en su emigración, quedando a su paso un espacio claro, sin estructura.

A partir de los 16 días de infestación, la mayor parte de los moluscos presentan redias libres en la cavidad general del cuerpo.

Se localizan entre la lámina del tejido conjuntivo que envuelve exteriormente a los órganos, así como entre los senos venosos. La redia se alimenta de estas estructuras, dejando a su paso gran cantidad de detritos, que se tiñen intensamente por colorantes básicos. A veces, el parásito comprime fuertemente alguno de los órganos, provocando modificaciones en la luz del conducto. Esta acción es puramente mecánica, si bien en su actividad depredadora puede originar la destrucción de las capas externas del órgano con el que ha entablado contacto.

En infestaciones con masas de miracidios, puede ser tal la afluencia de redias en la cavidad general del cuerpo, que los espacios interorgánicos están ocupados por el parásito, y gran cantidad de células polimorfas, amebocitos, que se congregan particularmente alrededor de las redias. Las membranas basales de los distintos órganos aparecen desflecadas. Toda la cavidad libre del cuerpo, está bañada por una sustancia basófila, hialina. Por otra parte, los tejidos son deleznable, toman mal los colorantes y, en general, presentan el aspecto de las estructuras que padecen una degeneración turbia.

4.3.2.3. Lesiones en el hepatopáncreas.

A partir del decimonoveno día de infestación, las redias han pasado a través de la cavidad general del cuerpo, hacia la glándula del albumen y el ovotestis, para establecerse en el hepatopáncreas, donde concluirán su evolución.

La glándula del albumen, tubular, está constituida histológicamente por un conducto excretor y formaciones tubulares ramificadas. El epitelio de los túbulos contiene dos tipos celulares: la células secretoras y las de sostén.

Las células secretoras son polimorfas, con núcleo central esférico, muy rico en cromatina. El interior del citoplasma contiene gran cantidad de gránulos acidófilos:

Las células de sostén, situadas entre las anteriores, son difíciles de identificar en ciertos momentos de actividad de la glándula, por quedar comprimidas por las células secretoras. Son células cilíndricas, muy estrechas, con núcleo alargado, en posición variable, central o basal. Los tubos secretores están cubiertos exteriormente por una fina lámina de tejido conjuntivo.

Las redias localizadas en este órgano a los 19 días de infestación, no producen ningún tipo de lesión histológica de los tubos glandulares. La larva camina y se desarrolla en el seno del tejido conjuntivo interlobulillar, provocando únicamente con su presencia un colapso de los túbulos más próximos. La redia aparece delimitada claramente por la membrana basal de los túbulos, en los que ha desaparecido la luz, tomando aspecto de cordones macizos.

A los 20 días y en la totalidad de las experiencias realizadas con resultado positivo, encontramos redias en el hepatopáncreas. Aparecen localizadas, igualmente que en la glándula del albumen, en el tejido conjuntivo que separa los distintos lobulillos.

En emigraciones recientes, puede observarse la casi total ausencia de lesiones, y únicamente en zonas próximas a la redia, los túbulos glandulares estrechan su luz, pero casi nunca adoptan la forma de cordones macizos, debido a la disposición festoneada de su luz.

En infestaciones de más tiempo, con el correspondiente desarrollo de la redia para la producción de cercarias, ocupan un amplio espacio, comprimiendo túbulos cuyas células no parecen muy afectadas, a no ser un ligero aumento del número y tamaño de las vacuolas intracitoplasmáticas que, además, contienen una sustancia granular de color pardo. Cerca de la larva existen pequeños acúmulos celulares, fibroblastos y amebocitos procedentes del conjuntivo (fig. 17).

En zonas donde existen redias en avanzado estado de desarrollo, aparece una destrucción evidente de la glándula, cuyos restos se hallan disgregados en el seno de una sustancia amorfa, y pequeños grupos de amebocitos, como respuesta a un proceso reaccional. El resto de la glándula es aparentemente normal, excepto la excesiva vacuolización de las células mucinosas.

En nuestras experiencias, sistemáticamente hemos encontrado redias localizadas en el tejido conjuntivo intertubular, excepto en una ocasión, en que la redia da impresión de estar localizada en el interior del conducto excretor del hepatopáncreas. La pared de este conducto es totalmente atípica, puesto que carece de epitelio interno. solamente está formado por fibras colágenas dispuestas circularmente y fibroblastos. Es posible que, casualmente, la redia penetrara dentro del conducto, provocando con su presencia una necrosis del epitelio sin regeneración posterior. Rodeando a la redia existe una sustancia hialina con pequeñas formaciones glandulares, procedentes del conducto destruido y de los productos de excreción de la propia redia. En la parte externa y rodeando al conducto, hay una clara degeneración hialina del tejido conjuntivo (fig. 18).

A los 22 días, en ejemplares con la glándula digestiva parasitada, localizamos formaciones larvarias en el ovotestis. Histológicamente presentan una destrucción total de los huevos y del parénquima del propio ovotestis. Estos extremos explican la falta de puesta de masas de huevos en moluscos infestados.

En el hepatopáncreas, las redias han logrado un claro desarrollo. Las células embrionarias comienzan a diferenciarse hacia cercarias, o hacia redias hijas. En una de las experiencias, un molusco infestado presentaba redias con redias hijas. El espacio ocupado por ellas está libre de toda estructura, a excepción de un depósito pulverulento procedente tanto de la destrucción de los tejidos, como de los productos excretados por la redia. El crecimiento larvario, además de la destrucción de los túbulos, provoca compresión de los más cercanos. Estos presentan sus células claramente degeneradas, en especial el extremo epical, que aparece fusionado y en ocasiones roto, con depósito de restos en la luz de los túbulos.

A los 24 días de infestación, los contornos de los tubos glandulares son irreconocibles y, en su interior, las células aparecen desorganizadas, con detritos celulares en la luz de los túbulos.

Existe una clara diferencia entre las formaciones tubulares relativamente normales y distanciadas de las larvas, de las que están en íntimo contacto con ellas.

En el primer caso, las células están individualizadas, con características histológicas semejantes a las que presentan en la glándula digestiva normal. Quizás debido al efecto del parasitismo los núcleos son más claros.

En el segundo caso, las células aparecen destruidas a nivel del polo superior.

A los 30 días de infestación artificial, pudimos observar en la casi totalidad de los moluscos estudiados, presencia de redias con cercarias en perfecto estado de madurez, así como cercarias libres.

La localización es amplia, puesto que ocupan no solamente la glándula digestiva, sino también aparecen afectados órganos como la molleja, glándula del albumen y ovotestis.

En la molleja, así como también en la porción final del intestino, las redias que contienen cercarias libres, se ubican en el tejido conjuntivo interorgánico, destruyéndolo en su totalidad. La molleja es un órgano hueco, tapizado interiormente por un epitelio simple de células altas, con un núcleo rico en cromatina y de posición basal. Su citoplasma es acidófilo. El polo apical de las células aparece diferenciado, constituyendo una especie de chapa. Rodeando al epitelio, existen varias capas de fibras musculares, que dan al órgano un cierto espesor. Exteriormente está envuelto por una capa de tejido conjuntivo. Este órgano presenta siempre en su interior sustancias extrañas.

En infestaciones con cercarias libres, se disponen éstas alrededor del órgano, provocando una destrucción de la cubierta externa, tan intensa, que, a veces, interesa a la capa muscular. No hemos observado en estos casos ningún tipo de reacción por parte de los tejidos del molusco.

En la porción terminal del intestino la afluencia larvaria provoca sólo comprensión mecánica con obstrucción de la luz intestinal dificultando el paso de sustancias alimenticias.

En el ovotestis, la presencia de redias y de cercarias producen alteraciones no sólo en el parénquima del órgano, sino en los huevos. La glándula muestra una gran destrucción de la pared, apreciándose interiormente restos que proceden de la lisis celular. Los huevos son irregulares, contraindos, con el núcleo desprendido. Otras veces desaparece la acidofilia del citoplasma, tornándose en su totalidad en una masa amorfa, en la cual la identificación del núcleo es difícil (fig. 19).

En el hepatopáncreas, las larvas siguen con su localización en el tejido conjuntivo interlobulillar. En este periodo de infestación se nota la destrucción amplia de los túbulos, quedando reducida la glándula a un pequeño número de túbulos dispersados entre los espacios libres no ocu-

pados por las formaciones larvarias. Entre estas, existen detritos celulares como consecuencia de la destrucción de las estructuras orgánicas del molusco, ya que las sustancias segregadas por el parásito son, en principio metabolizadas por las células glandulares indemnes. Esta metabolización tiene ciertos límites, fuera de los cuales provoca alteraciones citológicas.

Los tubos glandulares que han sobrevivido a la infestación y que ejercen una acción vicariante, en virtud de la cual se realizan los procesos metabólicos del molusco, de manera suficiente como para evitar su muerte, aparecen difusamente dispuestos. Sus células no presentan límites claros. En el interior de su citoplasma existen gran cantidad de vacuolas. En otros túbulos, aun cuando sus células presentan una clara diferenciación, la porción apical aparece fundida, conteniendo una masa hialina de difícil tinción.

En infestaciones masivas del hepatopáncreas se ve la escasa cantidad de órgano funcionante, pero suficiente para la supervivencia del molusco (fig. 20), puesto que la observación se realizó sobre el animal sacrificado.

En infestaciones con 5-10 miracidios, todo el tejido conjuntivo intersticial del hepatopáncreas aparece sembrado de células fagocitarias, como respuesta a un proceso reaccional inflamatorio.

Los tubos glandulares aparecen festoneados. Las células dan la impresión de que se han alargado haciéndose cilíndricas altas. La porción basal que contiene el núcleo es basófila y el resto del citoplasma ligeramente acidófilo. En el interior del citoplasma aparecen dos tipos de vacuolas situadas arbitrariamente. Unas son irregulares, sin contenido. Por el contrario, otras más abundantes, son esféricas o ligeramente alargadas, que contienen en su interior gran cantidad de pequeñas esférulas fuertemente refringentes. Posiblemente se trata de un proceso acumulativo de sustancias procedentes del parásito y que las células intentan eliminar. Cuando la célula se ve imposibilitada para eliminar los productos de secreción de las larvas, su acúmulo provoca la muerte (fig. 21).

El hepatopáncreas, que normalmente presenta una disposición lobular, con profusión de túbulos separados por conectivo, en las fases finales de infestación, cuando el molusco comienza a eliminar cercarias, estas se disponen frecuentemente en la porción central del lóbulo. En esta región, no se observa estructura alguna de la glándula, únicamente un pequeño número de células conjuntivas y restos procedentes de la destrucción celular. En la porción periférica del lóbulo se disponen ordenadamente los túbulos indemnes, ligeramente comprimidos contra el tejido conjuntivo interlobulillar (fig. 21).

Histológicamente estos túbulos son normales y su función no parece estar disminuida. Las células presentan un núcleo pobre en cromatina, en situación basal. Esta porción celular frecuentemente está vacuolizada,

mientras que la parte apical presenta un contenido acidófilo que, en algunos puntos, hace prominencia en la luz de los túbulos.

Finalmente, hemos encontrado moluscos con infestaciones masivas del hepatopáncreas y, sin embargo, el resto de las estructuras aparecían no sólo libres de formas larvarias, sino que histológicamente era imposible determinar la existencia de lesiones anteriores.

Resumiendo las lesiones encontradas durante las fases de redia y cercaria, obtenemos las siguientes conclusiones:

Las redias se han desarrollado dentro del saco esporocístico cerca del punto de penetración.

En el pie, las redias libres se encuentran rodeadas por tejido conjuntivo-muscular, sin que existan lesiones tisulares marcadas.

En regiones constituidas por tejido conjuntivo laxo, existe una gran destrucción del mismo, con presencia de elementos celulares alrededor de la larva, especialmente fibroblastos y amebocitos.

En la fase de emigración, la redia destruye barreras epiteliales y tejido conectivo, dejando en su progresión hacia el hepatopáncreas, zonas vacías con pequeñas cantidades de restos celulares.

En la cavidad general del cuerpo y riñón, las lesiones son mínimas. Se traducen en compresiones de órganos huecos con disminución ostensible de su luz.

En el hepatopáncreas, al comienzo de la invasión, los túbulos están solamente comprimidos.

En infestaciones más avanzadas y sobre todo en la fase de cercaria, hay destrucción de los túbulos, quedando prácticamente toda la glándula convertida en un saco conteniendo larvas, a excepción de un grupo pequeño de túbulos, que se disponen periféricamente en los lóbulos glandulares.

Los esporocistos que no evolucionan presentan a su alrededor una reacción conjuntiva y lisis de células embrionarias.

4.4. De las experiencias con *L. palustris* (redias y cercarias).

4.4.1. Histología normal de las zonas de desarrollo de las redias y cercarias.

De la misma forma que en *L. truncatula*, una vez que las redias han alcanzado la madurez, abandonan el saco esporocístico y, a partir del punto de implantación del esporocisto, emigran hacia el hepatopáncreas.

El desarrollo de los esporocistos, así como la presencia de redias y cercarias, tienen lugar especialmente en los siguientes órganos:

- 1.—Tejido conjuntivo-muscular que rodea a la cavidad paleal y el que forma parte de las estructuras externas del caracol.
- 2.—Cavidad general del cuerpo.
- 3.—Riñón.
- 4.—Hepatopáncreas.

El esporocisto, lo mismo que en *L. tuncatula*, no parece realizar emigraciones, por lo que el proceso evolutivo del mismo se realiza en un punto próximo al de penetración del miracidio.

4.4.1.1. Tejido conjuntivo-muscular y cavidad general del cuerpo.

Ya se describió al tratar sobre la penetración del miracidio y en la fase de esporocisto. Concretamente en la cavidad paleal, existe una diferencia cuantitativa con respecto a otras regiones, tales como el pie. Los elementos fibrilares son más escasos, dando a esta región un aspecto reticulado, con abundancia de espacios claros y senos hemolinfáticos.

La cavidad general del cuerpo sirve de receptáculo a una serie de órganos: digestivos, circulatorios, riñón, etc. Cubriendo y protegiendo a los órganos, existe un tejido conectivo constituido por fibras colágenas. Entre estas fibras hay fibroblastos, células vesiculares y amebocitos.

Los *fibroblastos* tienen forma estrellada, con finas y largas prolongaciones que al establecer contacto con las de otros elementos, originan una especie de entramado por donde circula la hemolinfa. Tienen un núcleo esférico central, rico en cromatina con un nucleolo excéntrico.

Las *células vesiculares* son abundantes en el tejido conjuntivo, sobre todo cerca del que se relaciona con la superficie externa de los órganos, particularmente en el hepatopáncreas y en la glándula del albumen. No presentan ninguna característica diferencial con las estudiadas en el tejido conjuntivo de las partes externas del caracol.

Los *amebocitos* presentan las mismas características estructurales que en *L. truncatula*.

4.4.1.2. Riñón.

Consta de una porción tubular y otra sacular. La tubular está tapizada interiormente por células epiteliales cúbicas altas, con núcleo esférico situado excéntricamente en el polo basal de la célula, muy rico en cromatina. El citoplasma es frecuentemente vacuolar, observándose células con una gran vesícula que desplaza y aplasta el núcleo contra la zona basal. En células que no contienen grandes vacuolas, el citoplasma presenta el típico aspecto estriado.

La porción sacular forma una serie de entrantes y salientes, a veces tan pronunciados, que en cortes transversales ofrece aspecto papilar. Consta de una capa de células cilíndricas, pero que en los pliegues se disponen en 2 ó 3 capas de células colocadas irregularmente. Presentan un núcleo esférico en posición basal, relativamente rico en cromatina. El nucleolo es evidente. El citoplasma celular ofrece en su interior una gran vacuola.

4.4.1.3. Hepatopáncreas.

En términos generales ofrece la misma estructura histológica que en *L. truncatula*. Consiste en una glándula tubulosa compuesta, formada por un conducto principal y una serie de lóbulos secretores.

El conducto está tapizado por un epitelio de células altas con cilios.

Los lóbulos presentan los dos tipos celulares ya descritos en *L. truncatula*, células mucinosas y células digestivas.

4.4.2. Histopatología.

Siguiendo el orden establecido en la descripción de los órganos donde frecuentemente tiene asiento el parásito, estudiamos en este apartado las lesiones provocadas por los redias y cercarias en el tejido conjuntivo-muscular, cavidad general del cuerpo, riñón y hepatopáncreas.

4.4.2.1. Lesiones en el tejido conjuntivo-muscular.

Una vez que la redia concluye su evolución dentro del saco esporocístico, bien por disolución de la membrana, bien por rotura, quedan libres en los tejidos del hospedador, comenzando su emigración hacia el hepatopáncreas.

4.4.2.1.1. Lesiones en el pie.

A partir del 9.º día de infestación, se comienza a encontrar redias libres en distintas localizaciones.

Indicábamos en los primeros periodos de infestación, que el pie resultaba inadecuado para la penetración del miracidio, en virtud de las características de sus células mucosas. A pesar de ello, es indudable que en infestaciones con masas de miracidios no sólo penetran, aunque en pequeña cantidad, sino que pueden desarrollarse normalmente hasta la fase de redia.

A los 13 días de infestación aparecen redias con esta localización, no totalmente maduras. El saco esporocístico está constituido por una membrana hialina, en el que se adosan interiormente células de aspecto epitelial. Exteriormente está rodeado por varias capas de elementos fibrilares y células multinucleadas, que consideramos como reaccionales, de cuerpo extraño. Este tipo de células fueron observadas ya, a los pocos días de la infestación (fig. 22).

En el mismo período de infestación, hemos encontrado redias libres. El saco esporocístico está disuelto en el punto de salida de la redia, que aparece rodeado por un conglomerado de células en el seno de una sustan-

cia hialina reticular, ligeramente basófila. Las células, difíciles de identificar, dado su avanzado estado de degeneración, tienen un citoplasma muy claro y finalmente vacuolizado. Creemos se trata de células embrionarias degeneradas. Apuntábamos en otra ocasión que, con toda posibilidad, no todos los grupos celulares germinativos alcanzan el estado de redia, de tal forma que se disgregan al producirse la rotura del saco esporocístico y con seguridad servirán de primer alimento para aquellas formas libres que han alcanzado la madurez.

El trayecto desde la abertura del saco esporocístico hasta el lugar donde aparece ubicada la redia emigratoria, está bordeado por una trama de elementos conjuntivo-musculares que llevan una dirección paralela al eje mayor de aquella.

Por delante de la extremidad cefálica de la redia, da la impresión como si se produjeran una serie de contracciones y relajaciones de los tejidos del molusco, creando un espacio vacío que beneficia la emigración de la redia hacia la cavidad general.

En ocasiones, y tratándose igualmente de redias libres perfectamente maduras, se las puede ver claramente delimitadas por un espacio claro, en cuyo interior no existe ningún tipo de estructura. Los tejidos del molusco forman una barrera conjuntiva delgada, rodeada de gran cantidad de células mucosas.

Dado lo avanzado de la infestación y la total ausencia de lesiones por depredación, creemos se trata de redias que no emigrarán al hepatopáncreas, por impedirlo la compacta estructura de la región y la distancia existente hasta la cavidad general (fig. 23).

4.4.2.1.2. Lesiones en las proximidades del ojo.

La presencia de redias en esta región es relativamente frecuente, pero, lo mismo que ocurre con frecuencia en el pie, es dudoso que todas estas larvas emigren y alcancen el hepatopáncreas. Apoya nuestra afirmación la existencia de formas degeneradas. En este caso se observa una destrucción parcial del ojo, apareciendo la redia rodeada de amebocitos, fibroblastos y elementos fibrilares conjuntivo-musculares.

La redia aparece disgregada. El núcleo de sus células es picnótico y el citoplasma vacuolado, con presencia de gránulos basófilos.

4.4.2.1.3. Lesiones en el tejido conjuntivo muscular que rodea a la cavidad paleal.

Tanto en las infestaciones masivas como con 5-10 miracidios, esta región constituye una de las principales zonas de localización de las redias libres, en la que producen lesiones evidentes en su emigración.

A los 13 días después de la infestación, las redias libres provocan la destrucción del tejido conjuntivo laxo, apareciendo sin el aspecto reticular típico. Como proceso reaccional no hemos encontrado más que un pequeño cortejo de amebocitos. La destrucción del tejido es originada por la acción depredadora del parásito ya que en este periodo de infestación la larva se alimenta. Puede verse cómo su saco gástrico está lleno de detritos celulares no identificables. Por otra parte, en nuestras experiencias hemos podido localizar redias libres en el saco pulmonar, en emigración hacia el hepatopáncreas, cuya abertura oral bucofaríngea se relacionaba con células del molusco en un intento de prehensión (fig. 24). Dada la delicada estructura del saco pulmonar en *L. palustris*, constituido por delgados tabiques conjuntivos, esta acción depredadora produce una gran destrucción de dichos tabiques, originando amplios espacios por confluencia de varios senos.

4.4.2.1.4. Fases larvarias degeneradas.

A partir del 9.º día de infestación, cuando abundan las redias libres, se encuentran con relativa frecuencia sacos esporocísticos degenerados. La localización de estos esporocistos es sistemáticamente el tejido conjuntivo rico en fibras colágenas y elementos musculares.

A los 12 días encontramos en el pie, esporocistos degenerados. Presentaban como característica histológica, una destrucción parcial de las células embrionarias que en conjunto formaban ovillos hialinos. A su alrededor ostentaban una recia membrana conjuntiva.

A los 15 días de infestación, han avanzado los procesos de destrucción del esporocisto. Existe una clara necrosis de las células embrionarias, que se han transformado en una masa uniforme fuertemente basófila. Los elementos conjuntivos del molusco se disponen irregularmente y abundan los fibroblastos y amebocitos. Estas células provocan primero una destrucción y limpieza, originándose una reparación conjuntiva posteriormente. Las zonas próximas a la larva son ricas en pequeñas granulaciones de pigmento marrón. La frecuencia con que encontramos estos acúmulos de pigmento en tejidos parasitados, nos hace suponer que proceden de células pigmentarias del tejido conjuntivo, que lo desprenden para así desdiferenciarse y actuar como verdaderos macrófagos. Esta hipótesis está basada en los estudios histológicos realizados por PAN (loc. cit.) en el tejido conjuntivo de *Australorbis glabratus*, el cual considera a las células pigmentarias como fibroblastos diferenciados. Nosotros pensamos en la reversibilidad de tal diferenciación como un mecanismo de defensa.

A los 20 días y en la misma localización encontramos sacos esporocísticos que, sin presentar signos claros degenerativos, no habían evolucionado. En este caso, la larva está rodeada por un espacio claro. Los tejidos del molusco constituyen una cápsula conjuntiva.

4.4.2.2. Lesiones en la cavidad general y riñón (emigración de las redias).

Las redias fuera del saco esporocístico emigran hacia la glándula digestiva, donde terminan su evolución con la formación de redias hijas, o de cercarias. En *L. palustris*, la emigración al hepatopáncreas, en ejemplares infestados experimentalmente, se realiza, por lo general, a través de la cavidad general del cuerpo.

A los 20 días de infestación con 5-10 miracidios, se observa que las redias emigrantes proceden, casi en su totalidad, de aquellas que se han desarrollado en el tejido conjuntivo-muscular que rodea a la cavidad paleal. Puesta la redia en libertad atraviesa el epitelio interno, introduciéndose en la cavidad del cuerpo (fig. 25).

A los 12 días de infestación encontramos redias libres en la cavidad general, procedentes del borde del manto o de regiones conjuntivo-musculares próximas a ella.

La redia fuera del saco esporocístico presenta movimientos activos. La parte anterior de la faringe actuando a modo de bomba aspirante, introduce en su interior células y restos celulares del cuerpo del molusco, tal vez alterados por agentes enzimáticos segregados por la redia. En su progresión hacia la cavidad general del cuerpo, la redia se rodea de un espacio vacío formado por dos mecanismos:

1.º) Los movimientos de desplazamiento de la redia producen contracciones de los tejidos del caracol, equiparables a los provocados por la entrada del miracidio, creando este espacio.

2.º) La acción depredadora de la redia, que no sólo se mueve, sino que se alimenta de las estructuras del molusco.

Circundando la zona clara que rodea a la redia, el tejido conjuntivo-muscular está fragmentado. Las fibras, muy engrosadas, presentan sus extremos deshilachados. Los fibroblastos se han hecho globulosos y se han desprendido de sus uniones quedando libres.

Rota por fin la barrera epitelial que tapiza interiormente la cavidad general del cuerpo, las redias se sitúan en el seno del tejido conjuntivo que está protegiendo los órganos.

Durante esta fase y, sobre todo, en infestaciones con pequeño número de miracidios, apenas existen lesiones. Las redias se alimentan de las sustancias nutritivas que contienen los espacios hemolifáticos, pudiendo provocar compresiones de algunos órganos huecos, sin que generalmente alteren su estructura. Microscópicamente se advierte la existencia de una sustancia hialina, basófila, coagulada, posiblemente originada por la acción de las sustancias segregadas por el parásito.

En infestaciones con masas de miracidios y con gran cantidad de larvas en la cavidad general, la intensa acción mecánica y depredadora suele ser incompatible con la vida del molusco.

A partir del 10.º día de infestación, hemos encontrado redias libres en el riñón. Histológicamente no hemos apreciado lesiones importantes, a no ser compresiones del órgano por conflicto tamaño-espacio.

4.4.2.3. Lesiones en el hepatopáncreas.

A los 15 días de infestación artificial con 5-10 miracidios, se comienzan a encontrar formaciones larvarias (redias) en el hepatopáncreas del molusco.

La localización de la redia es el tejido conjuntivo intertubular, si bien hemos encontrado casualmente algunas redias dentro de los túbulos.

En estos primeros días de emigración, las redias no provocan alteraciones histológicas apreciables. Los túbulos glandulares, están comprimidos, originándose evaginaciones del epitelio. En el punto de contacto con la redia, el epitelio del túbulo pierde su disposición típica en empalizada, tomando aspecto estratificado. El resto de las células no presentan más que un ligero aumento en el número de vacuolas intracitoplasmáticas, posiblemente relacionado con la infestación. Rodeando a la redia existe una lisis del conjuntivo, que es sustituido por una sustancia amorfa. En contacto con la extremidad anterior de la redia, es frecuente la existencia de detritos celulares.

En ocasiones, y en el mismo periodo de infestación, hemos encontrado gran cantidad de amebocitos rodeando a la redia, células que representan un mecanismo de defensa orgánica en este tipo de animales.

En este caso, la redia no sólo destruye el conjuntivo, sino que provoca la lisis del epitelio de los túbulos.

A los 19 días de infestación y como consecuencia del aumento de tamaño de las redias, la compresión tubular es más marcada, apareciendo los túbulos colapsados y con aspecto de 8. Respecto a las alteraciones histológicas del epitelio tubular, es clara la pérdida total de su disposición normal en empalizada, sufriendo el epitelio una metaplasia, con transformación del epitelio de simple a estratificado. El citoplasma celular está ocupado por vacuolas de gran tamaño y, a veces, esta vacuolización es tan intensa, que en muchas de las células no es posible la identificación del núcleo. Las vacuolas son esféricas y contienen una sustancia granulosa acidófila, posiblemente procedente de las excreciones del parásito y que la célula intenta eliminar. El polo mundial está ocupado por un material granuloso muy basófilo (fig. 26).

Esta degeneración obedece a la dificultad que representa para las células, el metabolizar las sustancias excretadas por el parásito. Es posible que, debido a la gran capacidad regenerativa de estas células y también a su gran adaptación, en principio sean capaces de eliminar dichas sus-

tancias, pero dentro de ciertos límites; fuera de ellos sobrevienen alteraciones traducidas en la presencia de enormes vacuolas, que la célula parece incapaz de dirigir a su extremidad libre y depositarlas en la luz de los túbulos. Este mecanismo está posiblemente impedido por la presencia, en el polo apical, de granulaciones basófilas, que actúan como barrera al principio y ocasionan la destrucción celular después.

Rodeando a la redia, existe histolisis conjuntiva con hialinización de tejidos próximos y pequeños grupos de amebocitos.

A los 21 días de infestación con 5-10 miracidios no sólo existen alteraciones de los túbulos glandulares sino la destrucción de lóbulos enteros (fig. 27). La casi totalidad del lóbulo se ha convertido en un receptáculo lleno de larvas, que nadan en el seno de una sustancia amorfa conteniendo detritos celulares y algunas células. Frecuentemente existe algún lóbulo funcionante. La imagen histológica consiste en la presencia de un epitelio metaplasiado estratificado, con células difíciles de identificar, por estar casi fundidas. En el citoplasma celular abundan las vacuolas con granulaciones acidófilas. Otros grupos celulares presentan el citoplasma con una basofilia tal, que no se comprueba estructura histológica alguna. La luz del túbulo, y debido a la metaplasia del epitelio simple en estratificado, es exigua.

En infestaciones menos intensas y con gran cantidad de parénquima funcionante, en la zona de histolisis se pueden observar grandes grupos de amebocitos (fig. 28).

En el primer caso, da la impresión de que el animal es incapaz de reaccionar ante el parásito, provocando grandes destrucciones. En el segundo, la presencia de amebocitos nos indica el intento de lucha, por parte de las defensas orgánicas, siendo las lesiones de menor importancia.

A los 28 días, hemos encontrado imágenes histológicas de hepatopáncreas infestados que presentan características especiales. Aparte de una amplia destrucción de la glándula, los pocos acinis que quedan funcionando sufren una importante hipertrofia. Las células epiteliales de los túbulos se hacen cúbicas, perfectamente ordenadas y en el interior del citoplasma celular no existen las vacuolas típicas del hepatopáncreas, tanto infestado como normal. En este caso, la supervivencia del molusco se debe a la hipertrofia vicariante de los túbulos no afectados que son capaces de realizar la función dentro de ciertos límites (fig. 29).

A los 30 días de infestación encontramos imágenes histológicas semejantes a la anterior, con la particularidad de que presuponemos que, además de la hipertrofia funcional que sufren los túbulos, la dilatación se debe a rotura de algunos tabiques y confluencia en una misma luz. El epitelio está adelgazado, con células casi planas, sin límites precisos y sus polos apicales fundidos, formando relieve en la luz del túbulo. Junto a estos tubos dilatados existen otros que conservan parcialmente su estructura

normal; únicamente se aprecia la falta de vacuolas típicas del hepatopáncreas, y están sustituidas por una sustancia carente de estructura y con apetencias tintoriales basófilas.

A los 35 días, las redias han producido tal destrucción en el hepatopáncreas, que aparecen lóbulos sin túbulos. Las redias están rodeadas por una especie de membrana conjuntiva con algunas células planas.

A los 37 días de la infestación, la glándula digestiva se ve invadida por redias y cercarias libres. La cantidad de túbulos funcionantes es pequeña, presentando una gran dilatación con las características estructurales indicadas.

Las zonas de localización de las cercarias están libres de estructura y solamente existen alrededor de ellas, detritos celulares (fig. 30).

Las lesiones encontradas en *L. palustris* durante las fases larvares de redia y cercaria, se resumen en las siguientes conclusiones:

Las redias se han desarrollado dentro del saco esporocístico, cerca del punto de penetración del miracidio.

En el pie, la mayor parte de los esporocistos sufren un proceso de degeneración, traducido en lisis de las células embrionarias y reacción conjuntiva por parte de los tejidos del molusco. En esta cápsula reaccional se ha observado la existencia de fibroblastos, amebocitos, células gigantes y pigmento marrón.

De los esporocistos que en esta región evolucionan formando redias, únicamente los situados cerca de la cavidad general del cuerpo alcanzan el hepatopáncreas, existiendo histolisis en el lugar de localización y en la vía de emigración.

En cuanto a las redias, localizadas en plana masa conjuntivo-muscular y en perfecto estado de desarrollo, no parece probable su emigración, por estar rodeadas por una fuerte membrana conjuntiva.

Las redias que han alcanzado su madurez en la cavidad paleal, ocasionan lesiones del tejido conjuntivo laxo. Posteriormente lesionan el epitelio interno que recubre dicha cavidad y, a través de ella, emigran al hepatopáncreas. Las lesiones consisten en histolisis del tejido conjuntivo que separa a los órganos y compresión de los mismos.

En el riñón no se han observado lesiones histológicas de consideración.

En el hepatopáncreas, las redias se localizan en el tejido conjuntivo intertubular. Raramente hemos encontrado redias dentro de los túbulos.

Al principio de la infestación, no están muy afectadas las estructuras nobles de la glándula digestiva. Cuando el periodo de infestación es mayor, como consecuencia del crecimiento de la larva, las células de los túbulos van perdiendo su disposición clásica en empalizada, sufriendo una metaplasia hacia epitelio estratificado.

Como consecuencia de la acción provocada por las excreciones de las larvas, las células muestran alteraciones citoplasmáticas, caracterizadas

por un considerable aumento de sus vacuolas, modificaciones nucleares y destrucción del polo mundial.

En la fase de cercaria libre, existe una verdadera histolisis, a veces tan intensa, que afecta a lóbulos enteros. Los lóbulos que han sobrevivido a la infestación son hipertróficos.

Desde el punto de vista comparativo, durante el periodo de redia y cercaria, no existen grandes diferencias histopatológicas entre las dos especies de moluscos.

Tanto en *L. truncatula* como en *L. palustris*, las redias se desarrollan en el punto cercano al de penetración del miracidio.

Se comienzan a ver redias maduras a los 8 días de infestación en *L. truncatula* y a los 9 en *L. palustris*.

Generalmente, las redias localizadas en el pie no alcanzan el hepatopáncreas, excepto las procedentes de miracidios que se han implantado a través del pie, cerca de la cavidad general del cuerpo, como en el caso observado en *L. palustris*.

En las dos especies de moluscos, existen en el pie formas degeneradas. Las lesiones difieren en que, así como en *L. palustris* encontramos células «monstruosas» que proceden del molusco, en *L. truncatula* solamente es evidente la reacción conjuntiva con fibroblastos y amebocitos.

En la cavidad paleal y borde del manto, las lesiones en ambas especies son las mismas. Igualmente ocurre en la cavidad general del cuerpo y riñón.

En el hepatopáncreas existe en ambas especies una serie de grados de alteración, en relación con el crecimiento de la larva y producción de material de excreción.

Tanto en *L. palustris* como en *L. truncatula*, al principio sólo existe compresión tubular. Posteriormente, alteraciones del conjuntivo, de las células de los túbulos, y finalmente destrucción de éstos.

En *L. palustris* la destrucción tubular es más intensa que en *L. truncatula*.

La presencia de cercarias libres ocurrió en *L. truncatula* a los 30 días de la infestación, mientras que en *L. palustris* fue a los 37 días.

En las dos especies de moluscos, existe histolisis en esta fase de cercaria libre. Los túbulos no afectados por la infestación sufren un proceso de hipertrofia, más acusada en *L. palustris* que en *L. truncatula*.

4.5. De las experiencias con *L. stagnalis*.

Las 6 limneas colocadas en presencia de masas de miracidios, se estudiaron realizando cortes seriados del pie para su investigación histológica. No se encontró ningún signo que demostrara la penetración del miracidio durante los distintos días de infestación.

4.6. De las experiencias con *L. auricularia*.

Las 10 limneas colocadas en presencia de masas de miracidios, se estudiaron realizando cortes seriados del pie para su examen histológico. Se obtuvieron los mismos resultados que en el caso anterior.

5. CONCLUSIONES

1.^a).—En las condiciones experimentales descritas, han resultado plenamente receptivas a *Fasciola hepatica* las especies *Lymnaea truncatula* y *L. palustris*, en tanto que *L. stagnalis* y *L. auricularia* ni siquiera sufrieron la invasión por miracidios.

2.^a).—Los miracidios penetran en el molusco receptivo a través de cualquier parte expuesta a ellos pero en *L. palustris* el pie ofrece mayores dificultades, mientras que el pneumostoma es vía frecuentemente utilizada.

3.^a).—El miracidio, previo abandono de su ciliatura, penetra en los tejidos del caracol. Disgregando las células epiteliales de revestimiento externo del mismo, las cuales posteriormente cubren el orificio de entrada, apareciendo estratificado y con ausencia de cilios (*Lymnaea truncatula*). O bien, provocan destrucción celular, reparada ulteriormente a expensas de los elementos epiteliales que limitan el orificio de entrada (*L. palustris*).

4.^a).—Los esporocistos prosiguen su evolución *in situ*. Los implantados en zonas ricas en elementos fibrosos, pie, tentáculo, etc., suelen degenerar, rodeándose de una cápsula conjuntiva e incluso (*Lymnaea palustris*) de células gigantes que recuerdan a las de cuerpo extraño. Pero si excepcionalmente, llegan a formarse redias, sólo las situadas en las zonas superiores del pie, en contacto con la cavidad general, emigran hacia el hepatopáncreas.

5.^a).—A partir del 8.º-9.º día, en ambos hospedadores, se forman redias, las cuales, tras romper el saco esporocístico, emigran hacia la cavidad general, destruyendo a su paso los tejidos del molusco y situándose en el tejido conjuntivo que rodea a los órganos, sobre los que actúa por compresión.

6.^a).—En el hepatopáncreas, las redias se albergan en el tejido conjuntivo intertubular (accidentalmente en situación intraluminal), provocando al principio colapso de los túbulos, por compresión. Mas, a medida que aumentan de tamaño, el epitelio se metaplasia a plano estratificado; el citoplasma celular, tiene abundantes vacuolas y en el polo epical aparece un depósito basófilo que, al romperse la célula, pasa a la luz del túbulo. Tales lesiones se consideran provocadas por las sustancias excretadas por la partenita.

7.^a).—Al liberarse las cercarias existe destrucción celular, más acusada en *L. palustris* que en *L. truncatula*. Por contra, los túbulos indemnes se hipertrofian y la glándula digestiva adopta aspecto vesicular.

6. RESUMEN

Tras una revisión de los aspectos histopatológicos de las relaciones «trematodo/molusco hospedador», y de los métodos de mantenimiento y estudio de moluscos en el laboratorio, se ha investigado la receptividad a *Fasciola hepatica*, de estirpes de *Limnaea truncatula*, *L. palustris*, *L. stagnalis* y *L. auricularia*, mantenidas en el laboratorio sobre cultivos de *Oscillatoria* spp. Las dos primeras especies resultaron adecuadas en tanto que las dos últimas no llegaron a ser invadidas por los miracidios.

El estudio histopatológico, al microscopio óptico, de los sistemas *Fasciola hepatica* / *Limnaea truncatula* y *L. palustris*, demuestra que la invasión del miracidio va precedida de la eliminación de su revestimiento ciliar y tiene lugar a través de cualquiera de las zonas blandas del molusco; el pie ofrece las mayores dificultades. En *L. truncatula*, las lesiones son mínimas y la rápida reparación se caracteriza por estratificación celular y pérdida de los cilios del revestimiento externo del molusco. En *L. palustris* la destrucción es más intensa y la restauración más laboriosa.

Los esporocistos evolucionan *in situ*. Los implantados en zonas ricas en elementos fibrosos tienden a degenerar, rodeándose de una cápsula conjuntiva rica en fibroblastos, amebocitos y en *L. palustris*, de células polinucleares que recuerdan a las de cuerpo extraño de los mamíferos. Los situados en el seno del conectivo laxo, aparecen rodeados de una zona clara y tienden a proseguir su desarrollo.

A partir del 8.º-9.º día se forman redias, que emigran hacia la cavidad del cuerpo, dejando trayectos ocupados por detritos celulares. Su presencia en aquella cavidad es bien tolerada y su acción patógena, cuando se produce, parece deberse simplemente a compresión. Cuando penetran en el hepatopáncreas, se albergan en el tejido intertubular provocando compresión de los túbulos y alteraciones celulares, consistentes en la aparición de grandes vacuolas, ricas en sustancias pigmentarias y en un depósito basófilo a nivel del polo apical. En *L. palustris* el epitelio tubular sufre una metaplasia a plano estratificado.

Al liberarse las cercarias hay destrucción celular en los túbulos, más patentes en *L. palustris* que en *L. truncatula*. Los túbulos indemnes sufren hipertrofia vicariante y la glándula adopta un aspecto vesiculoso.

La comparación de los resultados obtenidos en ambos moluscos confirma el papel de *L. truncatula* como hospedador óptimo. No obstante, dado que el ciclo se completó satisfactoriamente, en *L. palustris*, es muy probable que también intervenga activamente como vector de *F. hepatica* en condiciones naturales, lo que debería investigarse.

RESUME

Après une révision des aspects histopathologiques des relations «trematode mollusque hôte» et des méthodes de entretien des mollusques, et une étude de ces mollusques dans le laboratoire, on a recherché la réceptivité à *Fasciola hepatica* de souches de *Limnaea truncatula*, *L. palustris*, *L. stagnalis* et *L. auricularia*, conservées dans le laboratoire sur des cultures d'*Oscillatoria* spp. Les deux premières espèces furent appropriées, alors que les deux dernières ne furent pas envahies par les miracidies.

L'étude histopathologique, avec un microscope optique, des systèmes *Fasciola hepatica* / *Limnaea truncatula* et *L. palustris*, démontre que l'envahissement par le miracidium est précédé de l'élimination de son revêtement ciliaire et a lieu à travers n'importe laquelle des zones molles du mollusque; le pied présente les plus grandes difficultés. Dans la *L. truncatula*, es lésion son très petites et leur rapide réparation ou cicatrisation se caractérise par une stratification cellulaire et la perte des cils du revêtement externe du mollusque. Dans la *L. palustris* la destruction est intense et la restauration plus laborieuse.

Los sporocystes évoluent *in situ*. Ceux qui sont implantés dans des zones riches en éléments fibreux tendent à dégénérer et s'entourent d'une capsule conjonctive riche en fibroblastes et amébocytes, et en *L. palustris* de cellules polynucléaires qui rappellent celles de corps étrange des mammifères. Ceux qui sont situés dans le tissu connectif laxo apparaissent entourés d'une zone claire et tendent à poursuivre leur développement.

A partir du 8ème — 9ème jour, il se forme des redias, lesquelles émigrent vers la cavité du corps et laissent des zones occupées par des débris cellulaires. Leur présence dans cette cavité est bien tolérée et leur action pathogène, quand elle se produit, semble être due tout simplement à une compression. Quand elles pénètrent dans l'hépatopancréas, elles s'abritent dans le tissu intertubulaire et provoquent une compression des tubules et des altérations cellulaires qui consistent dans l'apparition de grandes vacuoles, riches en substances pigmentaires et d'un dépôt basophile au niveau du pôle apical. Dans la *L. palustris* l'épithélium tubulaire subit une métaplasie à plan stratifié.

Quand les cercaires se libèrent il y a une destruction cellulaire dans les tubules, plus marquée dans la *L. palustris* que dans la *L. truncatula*. Les tubules indemnes subissent une hypertrophie vicariante et la glande adopte ou prend un aspect vésiculeux.

La comparaison des résultats obtenus dans les deux mollusques confirme le rôle de la *L. truncatula* comme le meilleur hôte. Cependant, étant donné que le cycle se compléta satisfactoriement dans la *L. pa-*

lustris, il est très probable qu'elle intervienne aussi de forme active comme vecteur de *F. hepatica* dans des conditions naturelles, ce qu'il faudrait étudier et rechercher.

SUMMARY

After a revision of histopathological features of «trematode/mollusc host» relationships and of methods of maintaining mollusc in laboratory conditions the author has studied the receptivity of local strains of *Lympaea truncatula*, *L. palustris*, *L. stagnalis* and *L. auricularia* strains to *Fasciola hepatica*: snails being maintained in the laboratory on *Oscillatoria* spp. cultures. The first two species were adequate while the others did not get invaded by miracidia.

The histopathological study, which light microscope, of *Fasciola hepatica*/*Lympaea truncatula* and *L. palustris* systems, makes evident that invasion by miracidia occurs before the elimination of its ciliary coating and that takes place through any soft area of the mollusc foot offering the greatest difficulties. In *L. truncatula* lesions are very mild and their quick healing is characterized by a cellular stratification after loss of cilia of the external coating of the mollusc. In *L. palustris* destruction is more severe and restoration more complex.

Sporocysts develop *in situ*. Those located in areas rich in fibrous tissue tend to degenerate being surrounded with a conjunctive capsule containing a great number of fibroblasts, amebocytes, and in *L. palustris*, with polynuclear cells similar to foreign body cells in mammals. Those brought into the loose connective tissue appear surrounded by a clear area and they incline to continue their development.

After the 8th-9th day some rediae are formed. These rediae migrate towards the cavity of the body, leaving some areas occupied by cellular detritus. Their presence in that cavity is well tolerated and their pathogenic effect when produced, seems to be simply due to compression. When they get into the hepatopancreas, they lodge in the intertubular tissue provoking a compression in the tubules and cellular damage consisting in the appearance of big vacuoles, rich in pigmentary substances and in a basophilic precipitate at the apical pole level. *L. palustris* tubular epithelium presents a metaplasia in a stratified plan.

At the emergency of cercariae there is destruction of cells in the tubules; this destruction is more evident in *L. palustris* than in *L. truncatula*. The undamaged tubules present a vicarious hypertrophy and the gland adopts a vesiculous aspect.

The comparison of results obtained in both molluscs confirms the role of *L. truncatula* as best host. However, as the cycle was satisfactory completed in *L. palustris* it is very probable that it also intervenes actively as a vector of *F. hepatica* under normal conditions; this should be searched.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mi maestro profesor Gallego, el cual, con sus enseñanzas, ha sido el responsable de mi afición a la histopatología.

Al profesor Dr. M. Cordero, director del Departamento de Patología Infecciosa y Parasitaria, en el cual se realizó el trabajo experimental, por su consejo certero y revisión crítica del original.

Al Dr. A. R. Martínez, director de esta tesis, que no solamente me proporcionó el tema del trabajo, sino que ha cooperado activamente tanto en la parte experimental como en la traducción de textos, revisión de bibliografía, microfotografías, etc.

A don Angel M.^a Saavedra, por el mecanografiado del texto.

Mi sincera gratitud en fin, a todos aquellos que por uno u otro motivo y en cualquier momento, con su ayuda, hicieron realidad esta tesis.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGERSBORG H. P. K. (1924). Studies on the effect of parasitism upon the tissues. I. with special reference to certain gastropod molluscs. *Quart. J. micr. Sci.*, **68**: 361-401.
- AGUIRRE PAQUEÑO, E. (1939). La *Limnaea attenuata* Say, huésped intermediario de la *Fasciola hepatica* en la República Mexicana. *Revta. Soc. mex. Hist. nat.*, **1**: 67-70.
- ALICATA, J. E. (1946). The control of liver fluke of cattle in Hawaii. *Hawaii Agric. exp. stat.*, **25**: 19.
- (1952). Autochthonous infection of cattle in Hawaii with *Fasciola hepatica* Linn. *J. Parasit.*, **38**: 495-496.
- ANON. (1955). Liver fluke of sheep and cattle and black disease of sheep. *Agric. Gaz. N. S. W.*, **66**(8): 426-431; (9) 463-470.
- (1956). Liver fluke of sheep. *Rur. Res. C. S. I. R. O.*, **17**: 11-16.
- ARENAS Y MARTORELL, R y ALVAREZ GONZALEZ, J. R. (1937). Profilaxis de la distomatosis hepática. *Medna. hoy*, **2**: 90-97.
- ARMSTRONG, M. C. (1954). Jouth Canterbury as a new locality for liver-fluke. *N. Z. vet. J.*, **2**: 28.
- ARRU, E. y MURA, D. (1969). Sulla distomatosi de *Fasciola hepatica* in Sardegna (Distribuzione, ciclo biologico e sensività degli ospiti intermedi all'azione di sostanze malacocide). *Vet. Ital.*, **20**: 521-549.

- BABER, I. W. (1963). The pathology producer in the snail *Lymnaea columella* Say, 1817, by the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Diss. Abstr.*, **24**(3): 1293
- BACIGALUPO, J. (1932). *Limnaea viatrix* D'Orb infestée par des cercaires des *Fasciola hepatica*, a Buenos Aires. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, **38**: 828
- (1933). Superposition géographique de *Fasciola hepatica* L. et de *Limnaea viatrix* D'Orb. *C. r. Séanc. Soc. Biol* **5**: 492-493
- (1940). La *Galba attenuata* (Say), *Limnaea attenuata* (Say), como huésped intermediario de la *Fasciola hepatica* (L.). *Revue méd. fr. Extr.—Orient.*, **1**: 627-628
- PUO, M. C. CALZADA, S. V. y BERNUIZONI, J. (1941). La *Limnaea viatrix* d'Orbigny huésped intermediario de la *Fasciola hepatica* en el Uruguay. *Semana méd.*, B. Aires, **2**: 1282-1283
- BAECKER, R. (1932). Die Mikromorphologie von *Helix pomatia* und einigen anderen Stylommatophoren. *Zeitschr. Gesam. Anat., Ergeb. Anat. Entwickl.*, **29**: 449-585
- BAILENGER, J., CAILLAU, M. y PAUTRIZEL, R. (1960). La distomatose. I. Etat actuel de son épidémiologie dans le sud-ouest de la France. *Revue Hyg. Méd. soc.*, **8**: 603-617
- BATTE, E. G. y SWANSON, L. E. (1950). Control of the common liver fluke in cattle. *Rep. Fla. agric. Exp. Stn., Año* **49-50**: 105-106.
- BATTE, E. G., SWANSON, L. E. y MURPHY, J. B. (1951). Control of fresh water snail (intermediate hosts of liver fluke) in Florida. *J. Am. Vet. med. Ass.*, **118**: 139-141
- BERCHEN, P. (1964). Some Lymnaeidae as intermediate host of *Fasciola hepatica* in Belgium. *Exp. Parasit.*, **15**: 118-124
- BLACK, S. L. (1952). Liver fluke disease of sheep. *Agric. Gaz. N. S. W.*, **63**: (4): 195-198; (5): 255-260
- BOGOMOLOVA, N. A. (1961). *Radix ovata* as one of the intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. *Zoolog. Zhurnal*, **40**: 774-775
- BORAY, J. C. (1963). The ecology of *Fasciola hepatica* with particular reference to its intermediate host Australia. *Int. vet. Congr. Hannover*, agosto **14-21**. Vol. I: 709-717
- (1966). Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infestation with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **60**(1): 114-124
- y McMICHAEL, D. F. (1961). The identity of the Australian Limnaeid snail host of *Fasciola hepatica* and its response to environment *Austr. J. Mar. Freshw Res.*, **12**: 150-163
- BRENES, R. R., ARROYO, G., MUÑOZ, G. y DELGADO, E. (1968). Estudio preliminar sobre *Fasciola hepatica* en Costa Rica. *Revta. Biol. trop.*, **15**: 137-142
- BRUMPT, E., VELASQUES, J., UCROZ, H. y BRUMPT, L. C. (1940). Découverte de l'hôte intermédiaire *Limnaea bogotensis* Pilsbry, de la grande douve, *Fasciola hepatica*, en Colombie. *Annls. Parasit. hum. comp.*, **17**: 563-579
- CAMERON, T. W. M. (1951). *The parasites of domestic animals*. Adam & Charles Black, London
- CAWSTON, F. G. (1940). A consideration of the life-cycle of *Fasciola* in South Africa. *S. Afr. med. J.*, **14**: 84
- COLOMO DE LA VILLA, G. (1955). La distomatose en Espagne. *Bull. Off. int. Epizoot.*, **43**, (1-2): 53
- COYLE, T. J. (1956). Liver fluke in Uganda. *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, **4**: 47-55.
- CZAPSKI, Z. (1962). The snail *Galba oculata* (Jackiewicz 1959), another intermediate host of *Fasciola hepatica* L. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **13**: 332-337
- CHANDRASEKHARIAH, H. R. (1951). Fasciolosis in buffaloes. *Indian vet. J.*, **27**: 457-458
- CHANDRA RAO, M. P. (1966). On the comparative susceptibility of *Lymnaea natalensis* (Kraus) and *L. rufescens* (Gray) to infection with *Fasciola gigantica* (West African strain) and the tissue responses in the snails. *J. Parasit.*, **40**: 131-140.

- DAWES, B. (1946). *The Trematoda*. Cambridge University Press. London
- (1959). Penetration of the liver-fluke, *Fasciola hepatica* into the snail, *Limnaea truncatula*. *Nature*, **184**: 1334-1335
- DE JESUS, Z. (1935). *Lymnaea philipensis*, an intermediate host of *Fasciola hepatica* in the Philippines, with some observations on the bionomics of the parasite. *Pharm. J.*, **3**: 299-314.
- DE MEILLON, B., FRANK, G. L. y ALLANSON, B. R. (1958). Some aspects of snail ecology in South Africa. A preliminary report. *Bull. W. H. O.*, **18**: 771-783
- DEL RIO LOZANO, J. (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*, **13**: 211-285
- DIEZ, G. (1956). «Die Verbreitung des *Distomon hepaticum* L. beim Rind im Bezirk Rostock» *Wiss. Z. Univ. Rostock*, **5**: 327-344
- DINNIK, J. A. y DINNIK, N. N. (1965 a). Observations on the succession of rudial generations of *Fasciola hepatica gigantica* Cobbold in a snail host. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **7**: 397-419.
- (1956 b). Systematic, distribution and life-histories of stomach flukes. *Rep. E. Afr. Vet. Res. Org.* (1955-1956): 35-39.
- DIXON, K. E. (1963). Incidence of liver fluke (*Fasciola hepatica*) in Queensland cattle. *Aust. vet. J.*, **39**: 53-56
- FAIGUENBAUM, J., AGOSIN, M. y TAMARGO, A. (1950). Distomatosis humana. *Rev. méd. chil.*, **78**: 384-387
- FAIN, A. (1951). *Limnaea (Radix) natalensis* transmetteur naturel de *Fasciola gigantica* au Congo belge. Reproduction expérimentale du cycle évolutif de cette douve. *Ann. Soc. Belge med. Trop.*, **31**: 531-539
- FAUST, E. C. (1920). Pathological changes in the gastropod liver produced by fluke infection. *John Hopkins Hosp. Bull.*, **349**: 79-84
- y HOFFMAN, W. A. (1934). Studies on *Schistosoma mansoni* in Puerto Rico. III Biological Studies. *Puerto Rico J. publ. Hlth.*, **10**: 1-47
- FURMACA, S. y GUNLACH, J. L. (1967). *Lymnaea stagnalis* L. as one more intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Acta parasit. pol.*, **15**: 231-235
- (1967). *Lymnaea stagnalis* as a source of infection with *Fasciola hepatica*. *Acta Parasit. por.*, **15**: 237-239.
- GAJARDO TOBAR, R., ADABLAZA, H., URIBE, P., BENAVIDES, I., VARGAS, A., CEPEDA, C., ROJAS, E., ZELDIS, A., LUCCHINI, A. y LA FUENTE, J. (1950). Nuevos casos de distomatosis hepática. Estudio epidemiológico, clínico y anatomopatológico. *Hosp. Vina d. Mar*, **6**: 71-121
- GARCIA DIEZ, A. (1964). Distomatosis hepática. *Progm. Exp. Agr. La Coruña*
- GEORGESCU, L., FROMUNDA, V. y STOICAN, E. (1963). Observatii asupra rolului surselor adaptat (benturi) din Podisul Cotileana Arges in epizootologia fascioloziei. *Lucr. stiint. Inst. Patol. Ig. anim.*, **12**: 423-432
- GODERZIHVILI, G. I. (1955). Papel de algunas especies de caracoles de agua fría en la fasciolosis en la región de Leningrado y el efecto de algunos minerales fertilizantes en aquéllos. *Leningrad. Inst. Usoevshent. Vet. Vrachei*, **10**: 119-223 (Original en ruso)
- GONZALEZ CASTRO, J. (1947). *Aportación al conocimiento de la fasciolosis humana, con motivo de algunos casos observados en Granada*. Tesis Doctoral. Imprenta Urania. Granada.
- GORDON, H. McL. (1955 a). Fasciolosis, referred to acute fluke disease. *Aust. vet. J.*, **41**: 46-47
- (1955 b). Some aspects of fasciolosis. *Aust. Vet. J.*, **31**: 182-189
- PEARSON, I. G., THOMSON, B. J. y BORAY, J. G. (1959). Copper pentachlorophate as a molluscicide for control of fasciolosis. *Aust. vet. J.*, **35**: 465-473
- GRETILLAT, S. (1966). *Lymnaea cubensis* Pfeiffer 1911, mollusque hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* L., 1858 á la Martinique». *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris. Serie D*. **262**: 2736-2739
- HOFFMAN, W. A. (1930). The intermediate host of *Fasciola hepatica* in Puerto Rico. *Puerto Rico J. publ. Hlth. trop. Med.*, **6**: : 89-90

HUBENDICK, B. (1951). Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *K. svenska Vetensk.-Akad. Handl. Fjärde Serien*, Band 3, N.º 1.

ITAKAKI, S. e ITAKAKI, H. (1955). Anatomical and ecological studies on *Lymnaea ollula* Gould, 1859, as the snail intermediate host of the liver fluke, including the relation the prevalence of fasciolosis. *Sci. Rep. Azabu vet. Coll.*, 2: 1-16

JAMES, B. L. (1965). The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal prosobranch, *Littorina saxatilis* (Oliv.) subsp. *tenebrosa* (Montagn). *Parasit.*, 55: 93-115

JOHNSTON, T. H. y BECKWITH, A. C. (1946). The life cycle of the sheep liver fluke in South Australia. *Trans. roy. Soc. S. Aust.*, 70: 121-126

KAWANA, H. (1940). Study on the development of the excretory system of *Fasciola hepatica* L., with special reference of its first intermediate host in Central China. *J. Shanghai Sci. Inst.*, 3: 13-34

KENDALL, S. B. (1949 a). Species of *Limnaea* as intermediates hosts of *Fasciola hepatica*. *Vet. Rec.*, 61: 462

— (1949 b). *Limnaea stagnalis* as an intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Nature*, 163: 880-881

— (1950). Snail hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminth.*, 24: 63-74

— (1964). Some factors influencing the development and behaviour of trematodes in their molluscan hosts. In: *Host-parasite relationships in invertebrate host*. Symposium of the British Society for Parasitology, November 1963. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 51-73

— (1965). Relationships between the species of *Fasciola hepatica* and their molluscan hosts. In: *Advances in Parasitology*, Vol. 3: 59-95

— y PARFITT, J. W. (1959). Studies on the susceptibility of some species to infection with *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Ann. Trop. med. Parasit.*, 53: 220-227

— (1965). The life-history of some vectors of *Fasciola gigantica* under laboratory conditions. *Ann. Trop. med. Parasit.*, 59: 10-16

KEOCH, J. (1955). Fasciolosis in South Australia. *Aust. vet. J.*, 31: 48-49

KOURI, P. y ARENAS, R. (1932). *Praticotella griscola* Pfeiffer, posible huésped intermediario de *Fasciola hepatica* L. en Cuba. *Vida Nueva*, 30: 329-346

KRULL, W. H. (1933). New snail y rabbit hosts for *Fasciola hepatica* Linn. *J. Parasit.*, 20: 49-52

— (1933). The snail *Pseudosuccinea columella* (Say) as a potentially important intermediate host in extending the range of *Fasciola hepatica* Linn. *J. Wash. Acad. Sci.*, 23: 389-391

— (1934). The intermediate hosts of *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in the United States. *N. Am. Vet.*, 15: 13-17

— (1941). The number of cercariae of *Fasciola hepatica* developing in snails infested with a single miracidium. *Proc. helminth. Soc. Wash.*, 8: 55-58

LAMMLER, G. (1964). Die experimentelle Chemotherapie der Trematoden-Infektionen und ihre Problematik. *Trop. Parasit.*, 7: 164-368

LEUKART, R. (1881). Zur Entwicklungsgeschichte des Leberegels. *Zool. Anz.*, 99: 641-646

— (1886-1901). *Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden Krankheiten*. C. F. Winter'schen Verlagshandlung. Leipzig.

MALDONADO, J. F. y ACOSTA MATIENZO, J. (1947). The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. *Puerto Rico J. publ. Hlth. trop. Med.*, 22: 331-373

MAZZOTTI, L. (1955). *Lymnaea obrussa* Say, huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revta. Inst. Salubr. Enferm. trop. Méx.*, 15: 163.

— (1956). *Limnaea humilis* (Say) huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revta. Inst. Salubr. Enferm. trop. Méx.*, 16: 31-33

MELIKOV, YU. F. (1968). Biology of the intermediate stages of development of *Fasciola* spp. from farm animals in Azerbeidzhan. *Doki. Akad. Nauk. azerb. S. S. R.*, 24: 43-46

MCCULLOUGH, F. S. (1965). *Lymnaea natalensis* and fasciolosis in Ghana. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 59: 320-326

MCFARLANE, W. V. (1937). Liver-fluke in New Zealand sheep. *N. Z. J. Agric.*, 55: 274-279

MCGRAW, B. M. (1959). The ecology of the snail *Limnaea humilis*. *Trans Amer. micr. Soc.*, 78: 101-121

MEISSNER, H. y WETZEL, R. (1928). Die Bekämpfung der Leberegelseuche in der Gemeinde Nesse. *Dtsche. tierärztl. Wschr.*, 36: 55-60

MITTON, R. L. (1944). Internal parasites of sheep: the liver fluke. *J. Dep. Agric. S. Aust.*, 48: 202-206.

MOHLER, J. R. (1933). Zoological division. Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry, United States Department of Agriculture, : 42-47

MUÑOZ RIVAS, G. (1953). Fasciolosis experimental. *Hospital. Bucaramanga*, 23: 59-53

MURA, D. y ARRU, E. (1968). Some original observations on the life-cycle of *Fasciola hepatica* in Sardinia. *Studi. sassar.*, 5-6: 1-6

NEWTON, W. L. (1952). The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Jour. Parasit.*, 38: 362-366

NÖLLER, W. y SPREHN, C. (1924). Die Entwicklung des Leberegels bis zur Zerkarie in *Limnaea stagnalis*. *Berl. tierärztl. Wschr.*, 40: 369-370

OLSE, O. W. (1944). Bionomics of the lymneid snail. *Stagnicola bulimoides techella* the intermediate host of the liver fluke in Southern Texas. *J. Agric. Res.*, 69: 389-403

— (1945). Ecology of the metacercariae of *Fasciola hepatica* in Southern Texas and its relationship to liver fluke control in cattle. *J. Parasit.*, 31: 20

ONO, Y. (1957). Estudios sobre *Limnaea pervia* como hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* en la Prefectura de Hyogo. *J. Jap. vet. med. Ass.*, 10: 227-230 (En japonés, resumen en inglés).

ORTH, O. y SPREHN, C. (1925). Einiges zur Leberegelseuche. *Münchn. tierärztl. Wschr.*, 76: 1053-1057

OVER, H. J. (1967). Ecological biogeography of *Limnaea truncatula* in the Netherlands. *Tesis Doctoral*. Universidad de Utrecht.

PAN, C. (1958). The general histology and topography microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Mus. comp. Zool. Harv.*, 119: 237-299

PANTELOURIS, E. M. (1965) *The common liver fluke*. Pergamon Press. Oxford.

PANTIN, C. F. A. (1968). *Técnicas microscópicas para zoólogos*. Editorial Academia. León (España).

PORTER, A. (1938). *The larval trematoda found in certain South African mollusca (with special reference to schistosomiasis)*. South African Institute for Medical Research, n.º 42 Johannesburg.

PRICE, E. W. (1953). The fluke situation in American ruminants. *J. Parasit.*, 39: 119-134

RAMÍREZ VILLAMEDIANA, J. J. y VERGANI, F. (1949). Contribución al estudio del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepática* en Venezuela. *Revta. grancolomb. Zootec. Hig. Med. vet.*, 3: 817-833.

RESS, F. G. (1931). Some observations and experiments on the biology of larval trematodes. *Parasit.*, 23: 428-440.

RESS, W. J. (1936). The effect of parasitism by larval trematodes on the tissues of *Littorina littorea* (Linn.) *Proc. Zool. Soc. London*: 337-368.

REICHMUTH, W. (1936). Die Leberegelschencke *Galba truncatula* Müll., zugleich ein Beitrag zur Systematik der Süßwasserschneckenfamilie Lymnaeidae. *Z. Morph. Aekol. Tiere*, 32: 207-244.

REY, L. (1957). *Fasciola hepatica* no gado, no Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. *Revta. Bras. Melar. Donç. trop.*, **9**: 473-483.

RIVAS GODAY, S. y BORJA CARBONELL, J. (1961). Estudio de la vegetación y flórmula del macizo del Gúdar y Jabalambre. *Anal. Inst. Bot. A. J. Cavan*, **19**: 165.

——— (1961). Estudio de la vegetación y flórmula del Macizo del Gúdar y Jabalambre. *Anal. Inst. Bot. A. J. Cavan*, **19**: 159.

ROBERTS, E. W. (1950). Studies on the life cycle of *fasciola hepatica* L. and of its snail host, *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller, in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **44**: 187-206.

ROSSE, A. L. (1938). The liver fluke of sheep and cattle. Description, life history and control measures. *Agric. Gaz. N. S. W.*, **49**(6): 311-316; **(7)**: 365-369; **(8)**: 428-430.

ROSE, A. L. (1938). The liver fluke of sheep and cattle. Description, life history and the final host. *Aust. Vet. J.*, **5**: 17-23.

ROSS, K. y McKAY, A. C. (1929). The bionomic of *Fasciola hepatica* in New South Wales and of the intermediate host *Limnaea brazieri*. *Bull. Com. Sci. industr. Res. Aust.*, **43**: 1-62.

ROWCLIFFE, S. A. y OLLERENSHAW, C. B. (1960). Observations on the bionimics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **52**: 172-181.

SAINT-GUILLAIN, M. (1968). Etude histologique des premiers stades évolutifs de *Fasciola hepatica* L. *Acta zool. Pat. antverp.*, **46**: 77-132.

SAZANOV, A. M. (1957). Epizootiologia y control de fasciolosis en ruminantes. *Veterinariya*, **34**: 28-30 (En ruso en el original).

SHAW, J. N. y SIMMS, B. T. (1929). *Galba bulinoides* Lea as intermediate host of *Fasciola hepatica* in Oregon. *Science*, **69**: 357.

SHAW, J. N. (1931). Some notes on liver fluke investigations. *J. Ame. vet. med. Ass.*, **31**: 19-24.

SHIRAI, M. (1925). On the intermediate host of *Fasciola hepatica* in Japan. *Sci. Rep. Inst. Infect. Dis. Tokyo Univ.*, **4**: 441-446.

SMITH, W. S. y KEOGH, J. (1953). Liver fluke and black disease in South Australia. *J. Dep. Agric. S. Aust.*, **37**: 101-106.

SRIVASTAVA, H. D. (1944). The intermediate host of *Fasciola hepatica* in India. *Proc. Indian Sci. Cong.*, **111**: 114.

SSINITZIN, D. F. (1929). Rediae and cercariae of *Fasciola hepatica* L. *Zbl. Bakt.*, **74**: 280-285.

STANDEN, O. D. (1951). Some observations upon the maintenance of *Australorbis glabratus* in the laboratory. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **45**: 80-83.

STIEGLER, L. (1954). Untersuchungen über die Zwischenwirtsspezifität von *Fasciola hepatica* L. im Raume Nordbayern. *Z. Parasitenk.*, **16**: 322-350.

SUDD, R. H. J. r. (1960). Observations of *Schistosoma* miracidial behavior in the presence of normal and abnormal snail host and subsequent tissue studies of these host. *J. Mitchell Soc.*, **5**: 121-123.

TACLE, I. (1956). Distomatosis hepática en el ganado. *Bol. chil. Parasit.*, **11**: 35-36.

TACLE, V. I. (1944). Observaciones sobre la evolución de la *Fasciola hepática* Linneo 1758. Comprobación del huésped intermediario en Chile. *Rev. Chil. Hist. nat.* **46/47**: 232-241.

TAYLOR, E. L. y MOZLEY, A. (1948). A culture method for *Lymnaea truncatula*. *Nature*, **161**: 894.

TAYLOR, M. (1922). Water-snails and liver fluke. *Nature*, **110**: 701.

THOMAS, A. P. (1883). The life history of the liver fluke. *Quart. J. Micr. Sci.*, **23**: 99-133.

UENO, H. y WATANABE, S. (1960). Ecological studies on the common liver fluke in Japan. I). Comparison of intermediate hosts of Japanese and English flukes. *Bull. natn. Inst. Anim. Hlth., Tokyo*, **38**: 167-181.

VAN VOLKENBERG, H. L. (1929). Report of the parasitologist. *Rep. P. ins. exp. Sta.* **1928**: 36-38.

VASCONCELLOS, M. (1957). Aspectos do desenvolvimento das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. *Rev. Brasil Biol.*, **17**: 325-337.

WATANABE, S., IWATA, S., SASAKI, T., TSUCHIRA, M. y HOMMA, T. (1954). Observations on *Limnaea pervia* as the intermediate host of the common liver fluke, *Fasciola hepatica* in Sado Island. *Jap. J. vet. Sci.*, **16**: 120-121.

WALTON, C. L. (1917). The liver rot of sheep and bionomics of *L. truncatula* in the Aberystwyth area. *Parasitology*, **10**: 232-266.

WATSON, J. M. (1958). Ecology and distribution of *Bulinus truncatus* in the Middle East. With comments on the effects of some human activities in their relationship to the snail host on the incidence of bilharziasis haematobia in Middle East and Africa. *Bull. W. H. O.*, **18**: 833-894.

WHITTEN, L. K. (1945). Liver-fluke of shepp and cattle. *N. Z. J. Agric.*, **70**: 167-171.

WIBAUT-ISEBREE MOENS, N. L. (1958). Distomatosis bij de mens. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **83**: 877-884.

XAVIER, M. L., FRAGA DE ACEVEDO, J. y ALVES DA CRUZ, A. (1965). A *Lymnaea truncatula* vectora em Portugal de *Fasciola hepatica*. *Rev. Iber. Parasit.*, **25**: 357-370.

XAVIER, M. L., FRAGA DE ACEVEDO, J. y AVELINO, I. (1966). Importancia da *Oscillatoria formosa* Bory na cultura em laboratorio dos moluscos vectores de *Schistosoma haematobium*. II. Assembleia da Associaçao Médica da Lingua Portuguesa. Lisboa, 6-12. Octubre.

XAVIER, M. L. y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. (1966). Susceptibilidade de algumas espécies de moluscos de água doce a *Fasciola hepática*. Comunicação a la 2.^a Assembleia de AMELPO Lisboa, 6-12 Octubre.

XAVIER, M. L., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. y MATTOS DOS SANTOS, M. A. (1968). Susceptibility of some fresh water snails species of Portugal and Spain to *Fasciola hepatica*. *An. Fac. Vet. León*, **14**: 235-251.

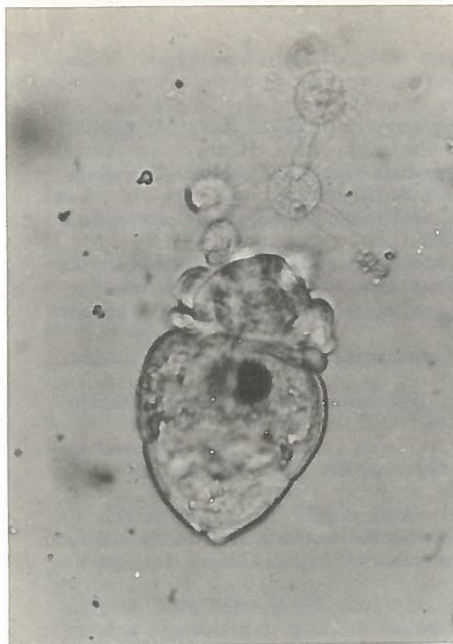


Fig. 1.—Miracidio con constricción y vacuolización de las células epiteliales ciliadas desprendidas. 642 c. a.



Fig. 2.—Miracidio penetrando. Lesiones del epitelio, 642 c. a. A las 4 horas después de la infestación

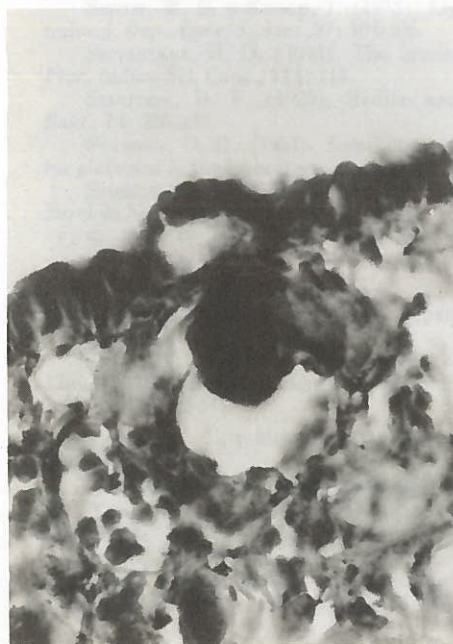


Fig. 3.—Cierre de la herida epitelial a la penetración del miracidio. 642 c. a. 20 minutos

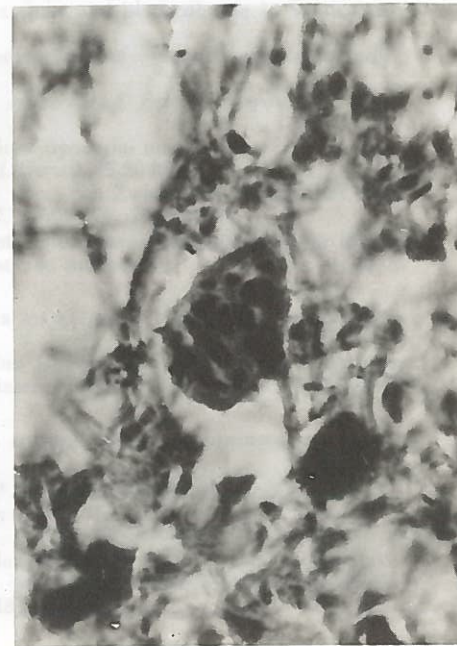


Fig. 4.—Esporocisto rodeado de elementos conjuntivos. 642 c. a. A las 12 horas de infestación.

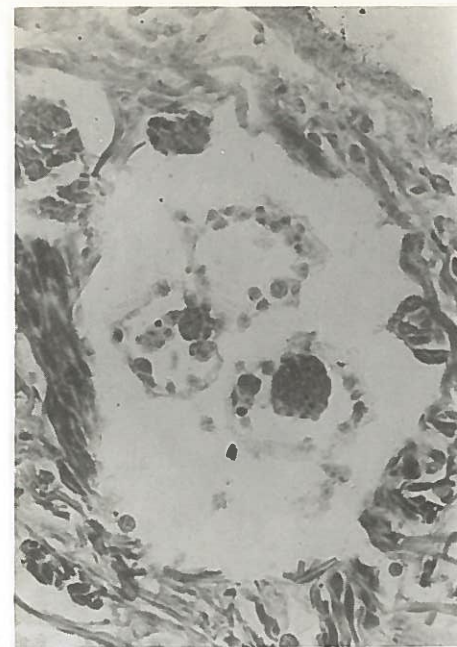


Fig. 5.—Varios esporocistos con cavidad única. 357 c. a. A las 2 horas de infestación.

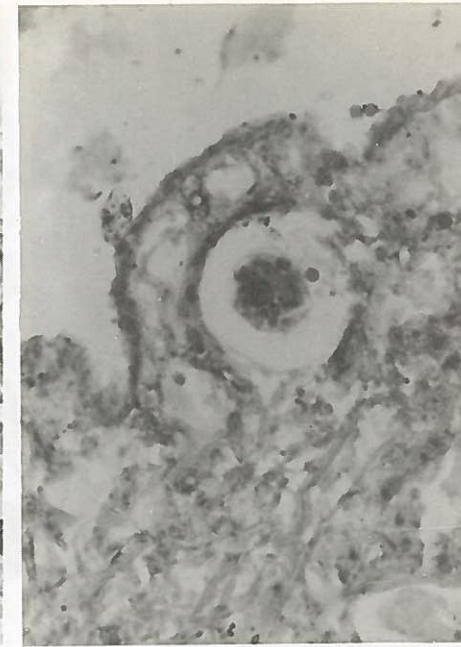


Fig. 6.—Esporocisto con cápsula reaccional. 357 c. a. A las 2 horas de infestación.

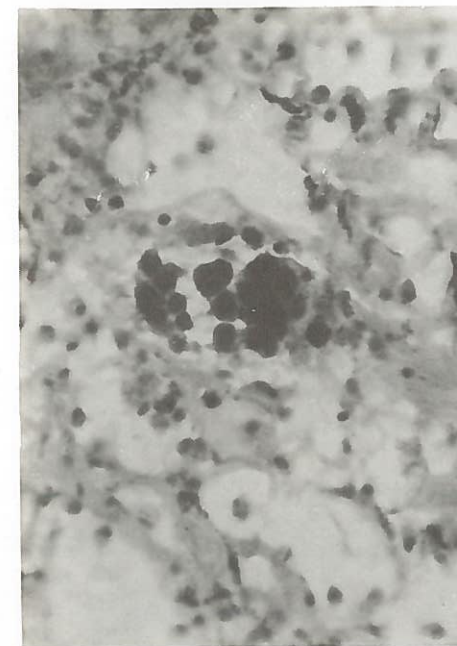


Fig. 7.—Esporocisto en vías de degeneración. 642 c. a. A las 6 horas de infestación

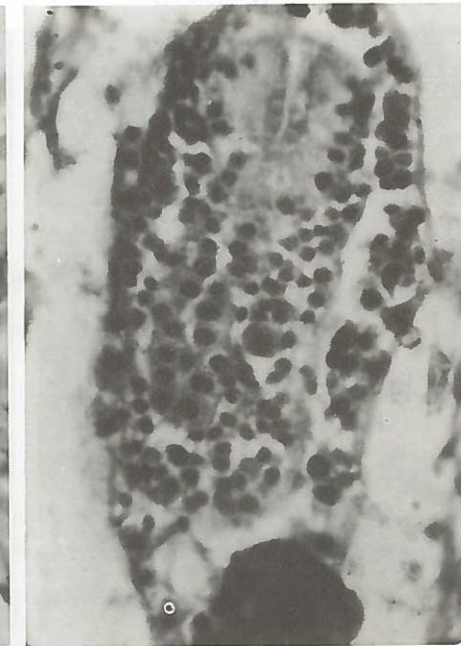


Fig. 8.—Redia en evolución dentro del saco esporocístico. Características del saco gástrico. 642 c. a. A los 9 días de infestación.



Fig. 9.—Miracidios penetrando en la cavidad pulmonar a través del pneumostoma. 142 c. a. A las 4 horas de la infestación.



Fig. 10.—Detalle de la microfotografía anterior. 642 c. a.



Fig. 11.—Esporcisto con intensa reacción conjuntiva. 357 c. a. A las 6 horas de infestación.

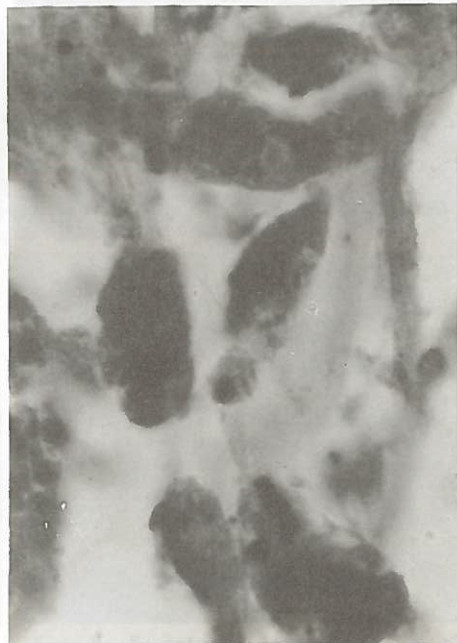


Fig. 12.—Células fagocitarias rodeando a un esporocisto. 1428 c. a. A los 2 días de infestación.



Fig. 13.—Redia localizada en el pie. 357 c. a. A los 19 días de infestación.



Fig. 14.—Redia a nivel del ojo. 142 c. a. A los 21 días de infestación.

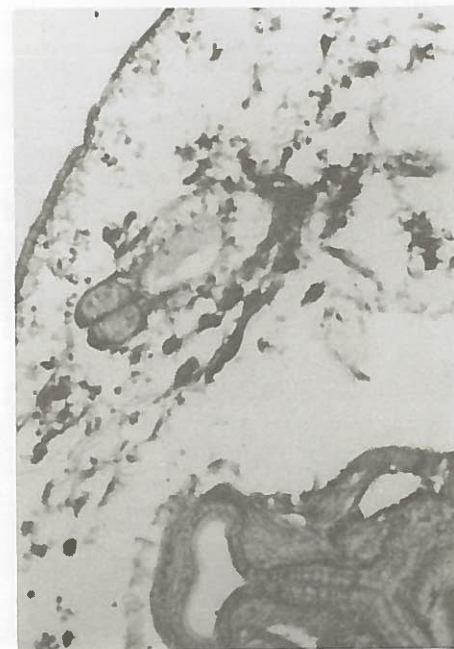


Fig. 15.—Redia a los 12 días de evolución. 142 c. a.

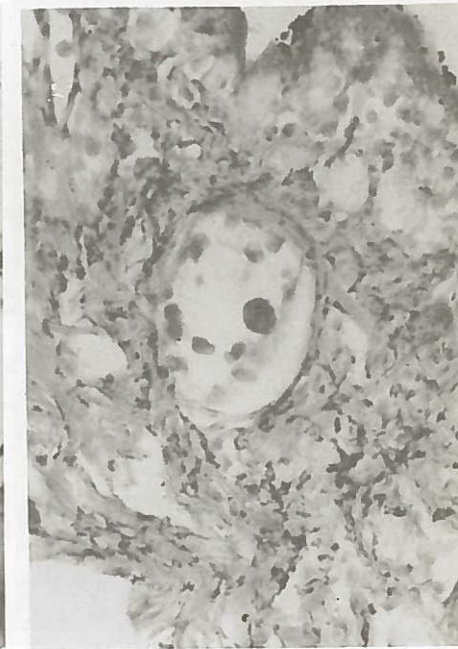


Fig. 16.—Esporcisto en regresión. 357 c. a. A los 13 días de infestación.

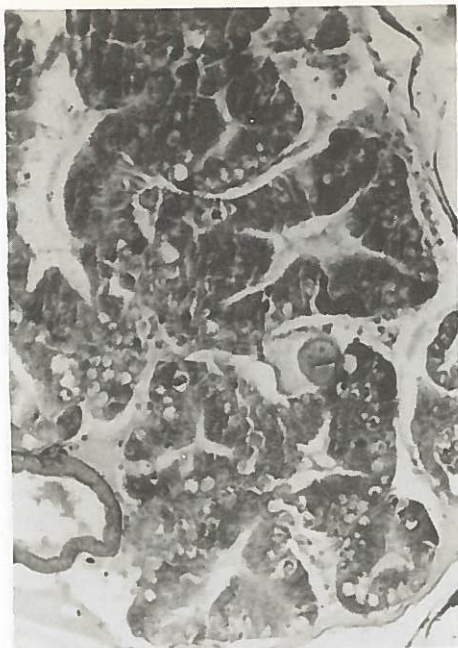


Fig. 17.—Redias en el hepatopáncreas. 142 c. a. A los 20 días de infestación.

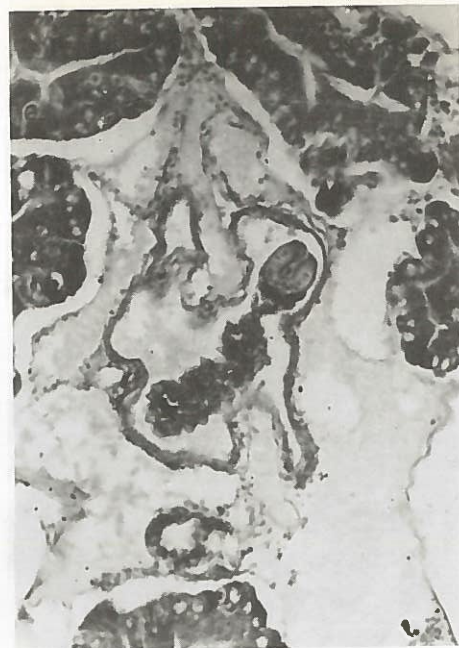


Fig. 18.—Redia en localización intraluminal en el hepatopáncreas. 142 c. a. A los 20 después de la infestación.

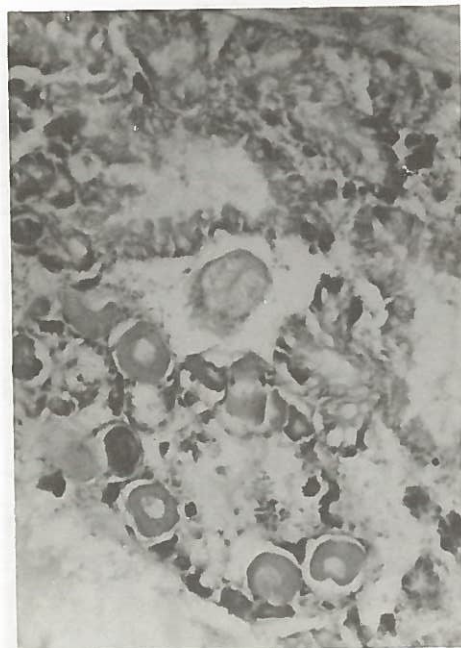


Fig. 19.—Redias en el ovotestis. 142 c. a. A los 20 días después de la infestación.

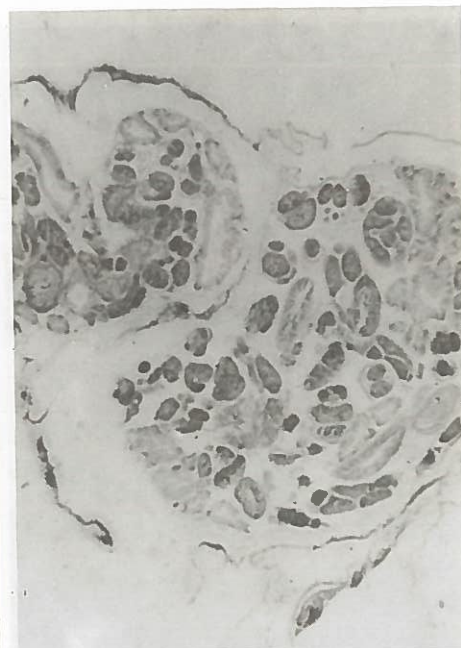


Fig. 20.—Hepatopáncreas con cercarias. 35 c. a. A los 30 días después de la infestación.



Fig. 21.—Hepatopáncreas con células vacuolizadas conteniendo gránulos. 357 c. a. A los 30 días después de la infestación.

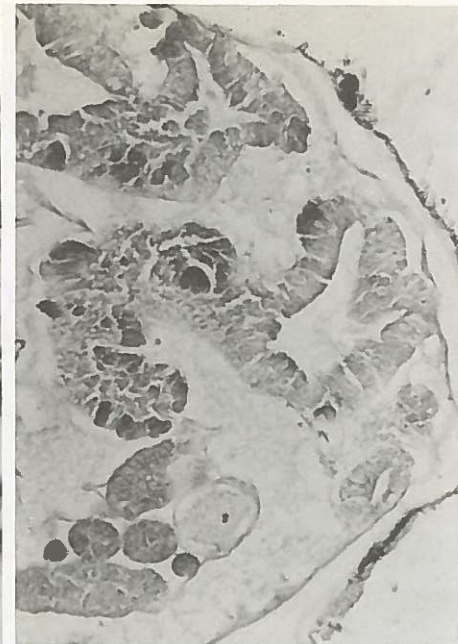


Fig. 22.—Característica de los túbulos en hepatopáncreas infestado. 142 c. a. A los 30 días después de la infestación.

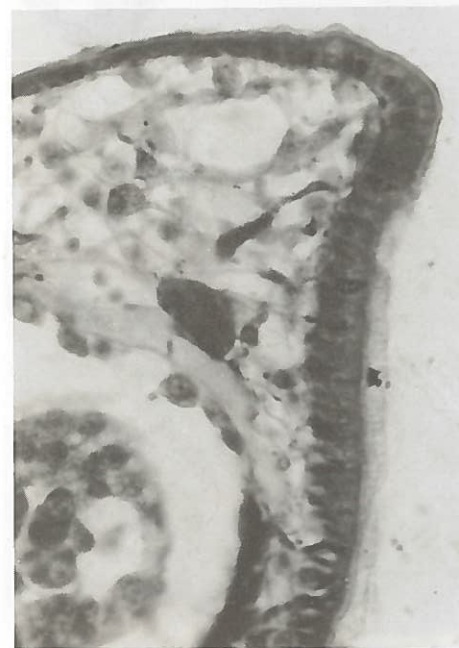


Fig. 23.—Existencia de células gigantes en un esporocisto localizado en el pie. 642 c. a. A los 13 días después de la infestación.

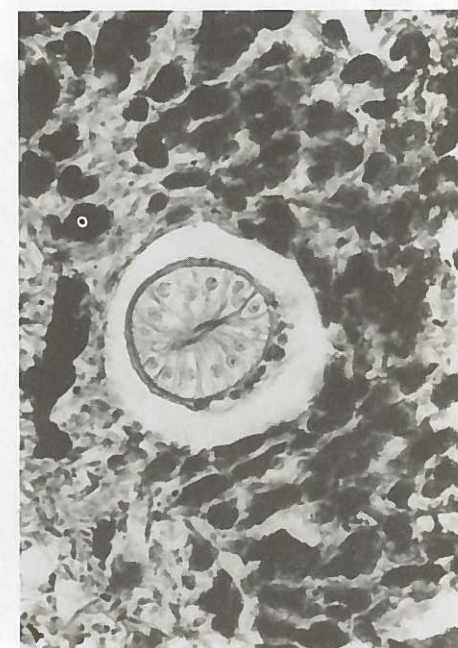


Fig. 24.—Redia localizada en el pie. 357 c. a. A los 19 días después de la infestación.

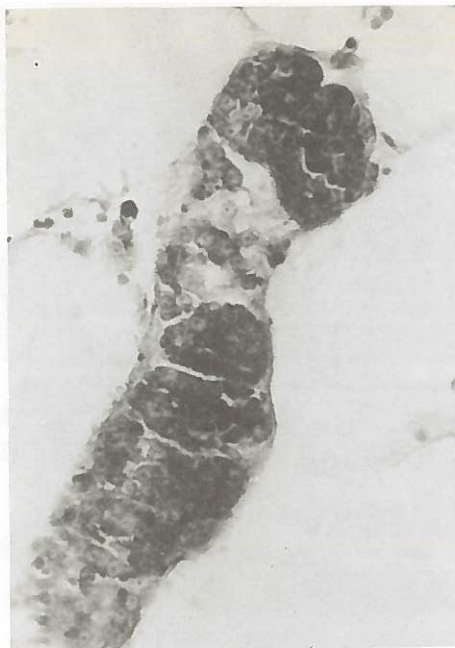


Fig. 25.—Redia libre alimentándose. 357 c. a. A los 13 días después de la infestación.

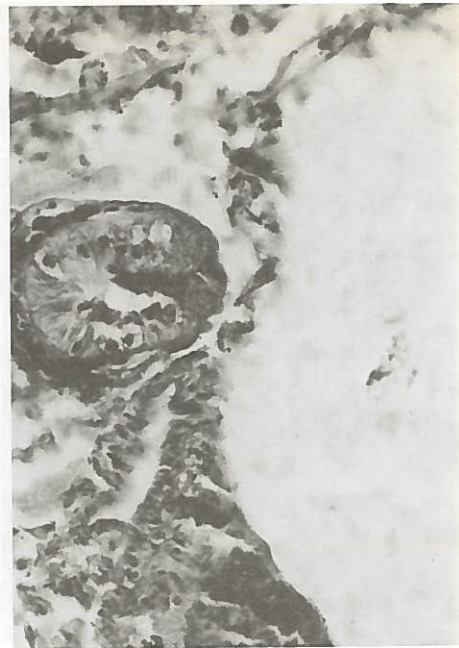


Fig. 26.—Redia emigrando. 357 c. a. A los 20 días después de la infestación.



Fig. 27.—Lóbulos glandulares de un hepatopáncreas infestado 357 c. a. A los 19 días después de la infestación.

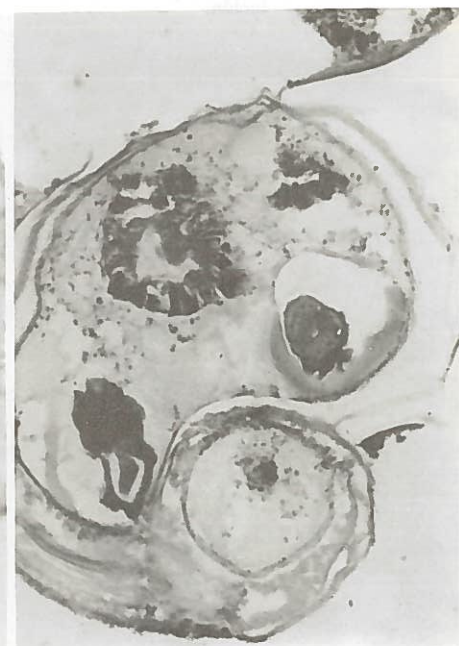


Fig. 28.—Redias en el hepatopáncreas. 142 c. a. A los 21 días de la infestación.



Fig. 29.—Hepatopáncreas con redias. 142. c. a. A los 21 días de la infestación.

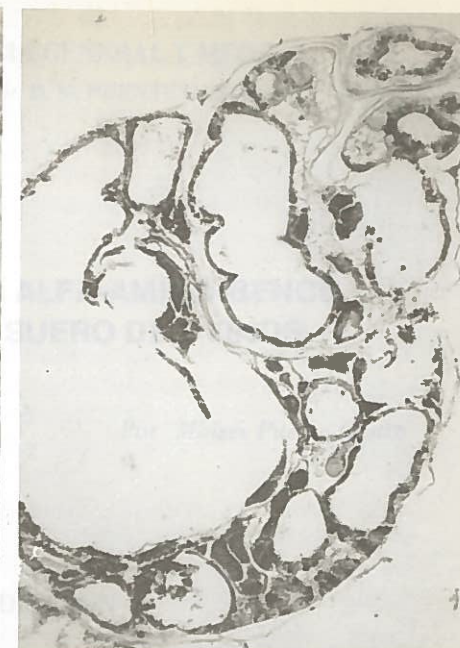


Fig. 30.—Hipertrofia tubular. 50 c. a. A los 28 días de la infestación.

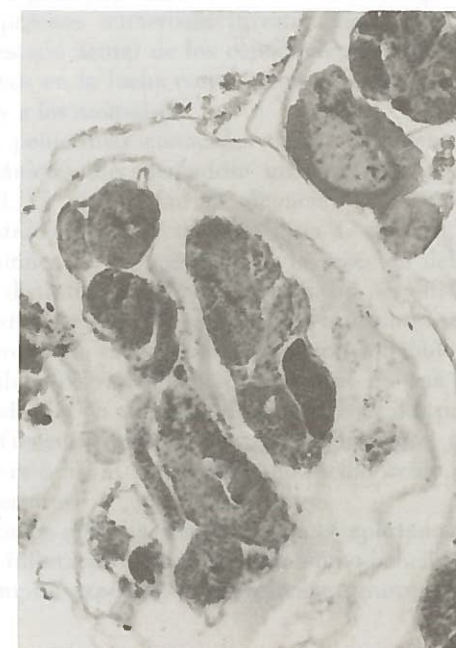


Fig. 31.—Redias y cercarias libres en hepatopáncreas. 142 c. a. A los 37 días después de la infestación.