

**HISTOPATOLOGIA DE LAS RELACIONES  
Neoststrongylus linearis (MAROTEL, 1913, GEBAUER,  
1932) Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis  
(ROSSMASSLER, 1854) y C (C) virgata (DA COSTA,  
1778) EN INFESTACION EXPERIMENTAL**

*Por M.<sup>a</sup> del Rosario Marcos Martínez*

**1. INTRODUCCION**

Las bronconeumonías verminosas ovinas son procesos patológicos causados por nematodos de las subfamilias *Protostrongylinae* y *Dictyocaulinae* que habitan en los bronquiolos y alveolos pulmonares, provocando alteraciones anatómicas del árbol respiratorio y parénquima pulmonar, cuya significación es considerable tanto desde el punto de vista clínico como económico por los daños causados por estos procesos. Daños directos (muerte de animales portadores de infestación masiva) o indirectos, por pérdidas económicas de difícil valoración, tales como merma del rendimiento de las canales, producción de leche y lana y decomisos de vísceras en el matadero.

Numerosos parásitos pertenecientes a la subfamilia *Protostrongylinae* necesitan utilizar moluscos como hospedadores intermediarios. *Neoststrongylus linearis* (MAROTEL, 1913) GEBAUER, 1932. Denunciado por primera vez en la Península Ibérica por RAMÍREZ, (1967) y posteriormente estudiado por ROJO (1963) y ROJO y CORDERO, (1974), no es ajeno a esta exigencia.

La total ausencia de datos existentes en la bibliografía mundial consultada sobre las reacciones celulares de moluscos ante la parasitación del citado nematodo, nos ha inducido a realizar un estudio de la histopatología de las relaciones *Neoststrongylus linearis*/Cernuella (*Xeromagna*) *cespitum arigonis* (ROSSMASSLER, 1854) y *Cernuella (C) virgata* (DA COSTA, 1778) en infestación experimental.

Consideramos que el mejor conocimiento de las condiciones en que se desenvuelve el ciclo vital de estos parásitos influirá en la posibilidad de llevar a cabo un eficaz control de estas nematodosis, que tan negativamente afectan a las producciones ovinas.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

#### 2.1.1. Comportamiento de los moluscos frente a *Protostrongylidae*

Desde los trabajos de HOBMAIER y HOBMAIER (1920d-1930a) se conoce que los *Protostrongylidae* utilizan moluscos como hospedadores intermediarios.

BURGER (1961), creía que las larvas de estos nematodos no tenían especificidad selectiva por determinadas especies de moluscos.

DAVTIAN (1937), considera que los moluscos no responden a la infestación de modo semejante, señalando que existen hospedadores «obligados», cuando las fases larvarias logran rápidamente su completo desarrollo; «subobligados», cuando el período de tiempo para realizar la fase larvaria infestante es mayor, y «facultativos», cuando presentan escasa receptividad. KASSAI (1947), utiliza el vocablo «óptimos» para designar a aquellos moluscos en los que el porcentaje de infestación es superior, permitiendo un completo desarrollo larvario en un tiempo mínimo.

KASSAI (1957), exige una nueva condición para los señalados como «óptimos»; la de presentar una mínima reacción hística ante los estadios larvarios. SOLTYS (1964), añade dos nuevos calificativos a los señalados por los autores anteriormente citados, el grupo «mortal» en el que las larvas penetran, pero no logran sobrevivir, y el «resistente», en el que, a pesar de ser sometidos a repetidos intentos de infestación, en los exámenes «postmortem» no revelan la presencia de larvas.

GERICHTER (1948), refiriéndose a la variable receptividad de las diversas especies de moluscos, para las fases larvarias de estos nematodos, mantenidos en idénticas condiciones de alimentación, humedad, temperatura, etc..., los divide en dos categorías: «apropiados» e «inapropiados»; en las especies pertenecientes a la primera, las larvas invasoras son numerosas y evolucionan en un período relativamente rápido. En los segundos, penetran un escaso número de larvas que alcanzan su completo desarrollo lentamente. Este autor admite que entre estas dos categorías pueden presentarse grados intermedios de comportamiento.

Existen numerosos factores que influyen en el desarrollo de estos parásitos dentro de los moluscos. Según KASSAI (1957), las especies de menor tamaño (*Abida frumentum*; DRAP (1801) son más intensamente parasitadas que las grandes (*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN (1844).

El comportamiento ante la parasitación también estará influenciado por las características individuales de los especímenes, HOBMAIER y HOBMAIER (1937-38), han comprobado que la tasa de infestación es superior en los individuos jóvenes que en los viejos. JOYEUX y GAUD (1946), señalan que en determinadas especies, únicamente los individuos jóvenes eran parasitados.

ZMORAY y SVARC (1968), comprueban que las larvas se desarrollan mucho más rápidamente en caracoles jóvenes que en los viejos, y que en los primeros, el porcentaje de larvas que alcanzan el estadio es del 30 %, mientras que, en los últimos es solamente el 4 %.

Para GERICHTER (1948), el desarrollo de las fases larvarias, estará influenciado por la temperatura ambiente. KASSAI (1957), además de la temperatura ambiente señala otros factores que influyen directamente en la evolución larvaria: especie de molusco, reacción tisular del hospedador intermediario y vitalidad de las larvas I.

Los períodos que los moluscos permanecen inactivos, no interfieren el desarrollo larvario, que evoluciona de modo semejante, no existe relación entre el grado de actividad y metabolismo del caracol con el desarrollo larvario, GERICHTER (1948).

#### 2.1.2. Vías de infestación de los moluscos

HITIER (1968), admite dos formas de infestación de los moluscos por larvas de nematodos: activa y pasiva. En la primera, los moluscos se infestan al ingerir junto con el alimento, material contaminante; en la segunda, son los nematodos los que penetran activamente por vía intrategumentaria.

La vía digestiva de infestación admitida por algunos investigadores: TARAZONA (1955), KNAPP (1966), RICHARDS y MERRIT (1967), HAMILTON (1969), etc..., no tendría significado en la epizootología de estas metastrongilosis, ya que las larvas, aunque logren penetrar en el molusco, mueren y son expulsadas rápidamente con las deyecciones del mismo, o se encapsulan en las paredes del

aparato digestivo, HOBMAIER y HOBMAIER (1934) y HAMILTON (1969). Los autores citados anteriormente juntamente con KASSAI (1958b), señalan que la larva penetra a través del epitelio de revestimiento externo del pie (vía transtegumentaria MACKERRAS y SANDARS (1955). COOURDURIER, GUILHON y MALARDE, (1969) están de acuerdo con CHENG y ALICATA (1955), que admite la infestación por vía digestiva y percutánea. La distribución de las larvas dentro del molusco no es regular. JOYEUX y GAUD (1946) y PETROW (1966), señalan que las larvas se localizan en la porción posterior del pie; este último autor apunta, que únicamente un caracol presentaba larvas alojadas en un tentáculo, localización señalada igualmente por KOPIRIN, DOBRIKOV y BURIKOVA (1965). WILLIAMS (1949), indica que el mayor número de larvas, se localizan en la región anterior del pie. HOBMAIER y HOBMAIER (1934), señala que las larvas se hallan confinadas a la suela del caracol. HAMILTON (1969), comprueba que sólo el 64 %, de las larvas de *Angiostrongylus cantonensis* se encuentran en el pie, el 36 % restante, se localiza en las vísceras.

#### 2.1.3. Supervivencia de las larvas dentro del molusco

La supervivencia de las larvas dentro del hospedador es muy alta. ROSE (1957), apunta que las larvas de *Muellerius capillaris* permanecen vivas durante más de un año. GERICHTER (1946-48), informa que la muerte de las larvas en los tejidos del hospedador «apropiado» es muy rara por lo que los caracoles infestados experimentalmente, permanecían al cabo de un año con una fuerte infestación. En un espécimen de *Helicella vestalis japonensis*, comprobó que albergaba larvas diecisiete meses después de la infestación experimental. Este autor apunta que la longevidad de las larvas corresponde a la de sus hospedadores intermediarios, por lo que una vez infestado el caracol, tendría la infestación durante toda su vida MARTÍNEZ MORALES (1967), observó que las larvas de *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* abandonan el hospedador intermediario, aunque en pequeño número, cuando éste es sumergido en agua.

#### 2.1.4. Reacciones celulares de los moluscos ante parásitos helmintos

En general, las publicaciones dedicadas a este tema, tratan de las reacciones histopatológicas de los moluscos parasitados por trematodos. Ahora bien, dado que esta clase de helmintos difieren considerablemente en organización, metabolismo, etc., y, además, presentan un ciclo biológico exógeno distinto en varios aspectos (localización, emigración, etc.) del protostrongilino estudiado, reseñaremos preferentemente los datos relacionados con las reacciones tisulares que tienen lugar dentro del hospedador intermediario, cuando los parásitos se alojan en el pie, por ser ésta la única región corporal del molusco en la que, salvo raras excepciones, hemos comprobado la presencia de *Neostongylus linearis*.

Asimismo, revisaremos las lesiones que se originan en los distintos órganos del hospedador intermediario consecutivos a emigraciones y multiplicación del parásito, que puedan servirnos de orientación en nuestras investigaciones.

##### 2.1.4.1. Trematodos

FAUST (1920), realizó un estudio sobre la histopatología de las fases larvarias de diversos trematodos, empleando como hospedadores intermediarios distintas especies de pulmonados de agua dulce, señalando, que las larvas que se localizaban en el interior del músculo del pie, eran incapaces de lograr un desarrollo total, mientras que, las que se albergaban en las lagunas hemáticas, emigraban fácilmente a la glándula digestiva del molusco sin que advirtiera ningún tipo de lesión.

AGESBORG (1924), hizo un estudio histopatológico de las fases larvarias de trematodos, en *Physa gyrina* y *Planorbis trivolvis*, comprobando hipersecreción de las células mucosas del hospedador, con el fin de neutralizar la acción tóxica de las excreciones, después de señalar las dificultades que entraña la confección de preparados histológicos a partir de los tejidos de los moluscos citados.

- a) Existe una secreción granulosa a partir de las células del hospedador intermediario.
- b) Los tejidos de los gasterópodos, en infestaciones masivas, se encuentran desintegrados.
- c) Cuando el molusco sobrevive a la infestación, las lesiones son reversibles, por lo que los tejidos del hospedador, una vez libre de parásitos, vuelven a la normalidad.



REES (1931), señaló que las lesiones más importantes producidas por *Cercaria patella* en *Patella vulgata* son de índole fisiológica más que mecánicas; los órganos en los cuales se localiza el parásito, sufren una atrofia causada por los productos tóxicos eliminados por éste.

FAUST y HOFMANN (1934), estudian los efectos producidos por *Schistosoma haematobium* en el hapatopáncreas de *Bulinus africanus*, comprobando al principio vacuolización de las células epiteliales y más tarde metaplasia escamosa del epitelio. Cuando el parásito aumenta de tamaño, observa una histólisis extensa.

PORTER (1938), realizó un estudio en distintos moluscos parasitados en infestación natural por *Schistosoma spp.*, señalando que las infestaciones masivas de *Schistosoma haematobium* en *Bulinus africanus* originan en los túbulos de la glándula digestiva, fuerte compresión, que ocasiona estenosis de su luz, así como metaplasia escamosa del epitelio simple. Los productos secretados por los parásitos se acumulan en el tejido conjuntivo intersticial, de donde pasan a la corriente hemática. Residuos no eliminados por esta vía, se depositan en el interior de las células hepáticas en forma de gránulos oscuros.

MALDONADO y ACOSTA MATIENZO (1947), estudiaron la evolución larvaria de *Schistosoma mansoni* en *Australorbis glabratus* comprobando que los miracidios penetran en el hospedador intermedio mediante la perforación de la epidermis. A los cuatro días postinfestación se presenta una fuerte tumefacción por la reacción local de los tejidos del hospedador.

NEWTON (1952), estudió la reacción hística de dos cepas de *Australorbis glabratus* procedentes respectivamente de Brasil y de Puerto Rico, ante la parasitación experimental de *Schistosoma mansoni*, comprobando, que en los primeros, existe una manifiesta reacción tisular consistente en un filtrado de células alrededor del parásito, o que origina la destrucción del mismo al cabo de 24-48 horas. Sin embargo, en los procedentes de Puerto Rico, los parásitos se desarrollaron perfectamente, no presentándose reacción por parte del molusco.

VASCONCELLOS (1957), señala que la reacción de *Australorbis glabratus* ante los miracidios de *Schistosoma mansoni*, frecuentemente localizados en la base de los tentáculos y en el pie, se caracteriza en su fase inicial por la presencia de un cortejo de amebocitos procedentes o de los tejidos adyacentes o de los vasos sanguíneos, afirmando que las características morfológicas de las células reaccionales, corresponden a las señaladas para el tipo II de WAGGE (1955), que son células de pequeño tamaño, que presentan contornos difíciles de precisar, por poseer pseudópodos y tener un movimiento constante; ofrecen un núcleo de gran tamaño con cromatina densa. El autor señala que transcurrido algún tiempo a partir de la infestación, el miracidio comienza a degenerar; los amebocitos presentan granulaciones acidófilas en su citoplasma y, posteriormente, se hacen alargados, adquiriendo los núcleos forma de bastón. Cuando el miracidio ha degenerado completamente, los amebocitos se hacen redondos y comienzan a fagocitar, observándose en el interior del citoplasma partículas de diversos tamaños, así como gránulos oscuros semejantes a los de melanina; finalmente los amebocitos desaparecen por vía hemática, no quedando restos del proceso respiratorio.

ESCUERO (1970), señala que los miracidios de *Fasciola hepática*, en el punto de penetración en *Lymnaea truncatula*, disgregan las células del epitelio de revestimiento externo, que posteriormente se hace estratificado, perdiendo las células los cilios. En *Lymnaea palustris* origina, en el lugar de penetración, la destrucción de las células del epitelio que son reparadas por los elementos epiteliales normales circundantes. Si el miracidio se localiza en regiones ricas en tejido fibroso, suelen degenerar, apareciendo rodeados de una cápsula de tejido fibroso.

En *L. palustris* observa ocasionalmente, en el seno de la cápsula conjuntiva células multinucleadas, parecidas a las de cuerpo extraño. En el hapatopáncreas, las redias provocan una compresión de los túbulos; el epitelio se metaplasia a estratificado plano y las células presentan vacuolas, así como depósitos de substancia basófila en su polo apical, que en ocasiones y por rotura de la membrana, pasan a la luz del túbulo.

#### 2.1.4.2. Nematodos

HAMILTON (1969), afirma que las larvas de *Angiostrongylus abstrusus* penetran por vía percutánea y se sitúan, en las primeras horas, en la región subepitelial, donde no producen alteración alguna. A las 48 horas, se encuentran rodeados de macrófagos. Al cabo de ocho días las células

aparecían aplastadas por las presiones ejercidas por las larvas al aumentar de tamaño. Finalmente, transcurridos tres meses, desapareció el nódulo reaccional parasitado.

CHENG (1966 b y c), en infestación experimental de *Crassostrea virginica* con larvas I de *Angiostrongylus cantonensis*, observa que a los diez-catorce días postinfestación existe una gran concentración de leucocitos alrededor de las larvas, señalando, que a pesar de la enorme atracción que el parásito ejerce sobre las células del hospedador, no existe una verdadera encapsulación. También indica que, al cabo de 10 días de haber realizado la infestación experimental, existía un incremento del número de leucocitos dentro de los vasos sanguíneos. Esta leucocitosis es considerada por el autor de acuerdo con lo ya expuesto por STAUDER (1961) y CHENG y SANDERS (1967), como un mecanismo interno de defensa celular, que serviría como pronóstico de fagocitosis o de encapsulación.

CHENG y RIFKIN (1972, realizan un estudio sobre las reacciones celulares de los moluscos marinos ante parasitosis helmínticas. Admiten la existencia de cuatro tipos de reacciones: fagocitosis, encapsulación, leucocitosis y nacarización. Afirman que los elementos histológicos, fibrocitos, histiocitos, células pigmentarias, leucocitos y distintos tipos de fibras. Señalando que la fagocitosis no sería la defensa más frecuente de los moluscos frente a helmintos, ya que éstos son demasiado grandes para poder ser fagocitados por leucocitos, pero no hay duda de que determinados tipos de encapsulación comenzarían con un intento frustrado de fagocitosis. Apuntan también, que la reacción más frecuente de los moluscos ante parasitosis por trematodos sería la encapsulación, y que, por el contrario, los nematodos difícilmente originarían este tipo de reacción, pues únicamente existen dos ejemplos al respecto, citados por CHENG (op. cit.), en el caso de un caracol gigante africano *Achantina fulica* y de la babosa *Deroceras laeve* parasitados por *Angiostrongylus cantonensis*.

## 2.2. REVISIÓN DE MÉTODOS

### 2.2.1. Cultivo de los moluscos en el laboratorio

El cultivo de los moluscos en el laboratorio, requiere el conocimiento de las necesidades ecológicas de la especie a cultivar. Los autores que han tratado esta faceta de la Malacología, señalan su intento de colocar a los caracoles en un medio parecido al que tienen en sus biótopos naturales y, frecuentemente, intensifican aquellos factores que favorecen el desarrollo de los pulmonados evitando, en lo posible, los que les son adversos, con el objeto de crear condiciones óptimas de cultivo.

GUILHON (1965), para el cultivo de determinadas especies de moluscos hospedadores intermedios de *Angiostrongylus vasorum*, utiliza el siguiente método: Los moluscos recogidos en su habitat natural, son trasladados rápidamente al terrario, constituido por cajas de madera enrejadas por una de sus caras, conteniendo tierra y cortezas de vegetales secas. Este biótomo artificial era mantenido constantemente húmedo, mediante diarias pulverizaciones acuosas, en semioscuridad y a una temperatura ambiente de 18-23°C.

KINSTON (1966) utiliza para el cultivo de los moluscos los procedimientos descritos por KRULL (1937) y KRULL y MAPES (1952); distribuyen los caracoles, según tamaño y especie, en distintos cristalizadores de 10 cm de diámetro, en los cuales introducían grava, arena fina, ceniza de hojas de arce y papel de filtro humedecido. Son alimentados con hojas de lechuga, a las que adicionan carbonato cálcico, así como con cenizas de hojas de arce, al mismo tiempo que mantenían el medio artificial húmedo, con pulverizaciones de agua libre de cloro, uno o dos veces por semana.

YANAGISAWA (1967), para alimentar pulmonados terrestres, hospedadores intermedios de *Angiostrongylus cantonensis* utiliza lechuga y arginato cálcico de Standen para gasterópodos.

SVARC, R., ZMORAY, I. y LESTAN, P. (1968), señalan que para el cultivo de *Cepaea vindobonensis* utilizan terrarios de 150 × 60 cm y de una altura de 70 cm cuyas paredes laterales están formadas por una malla de alambre fino, y la parte superior y el frente de plexiglas. En el fondo del terrario colocan, una capa de 15 cm de espesor formada por humus enriquecido por calcio, en la que cultivan plantas de *Chlorophytum comosum* y césped. En algunos rincones del terrario colocan cajas con la flora primitiva de los biótopos, de donde procedían los caracoles. La vegetación la mantenían fresca durante todo el invierno mediante la aplicación de frecuentes riegos. El terrario se hallaba en un lugar bien iluminado y a una temperatura de 18 a 21°C.

GUILHON et AFGHAMI (1969) para el cultivo de moluscos hospedadores intermediarios de *Angiostrongylus vasorum* (*Cochlodina laminata*, *Euparupha pisana*, *Cepaea nemoralis*, etc. Utilizan cajas de madera enrejadas, que contenían en una delgada capa de tierra y cortezas de vegetales, manteniéndolos a una temperatura de 18-23°C y en permanente semioscuridad. La humedad del biotopo artificial la consiguen por medio de pulverizaciones acuosas cotidianas.

#### 2.2.2. Infestación experimental de moluscos con larvas de nematodos

GERICHTER (op. cit.) procede de dos formas para infestar diversos moluscos, con varias especies de nematodos; una de ellas, consiste en hacer deslizar al caracol durante 15 minutos sobre el fondo de una placa de Petri, en la que previamente había vertido líquido rico en larvas de los distintos parásitos. La otra, la realiza introduciendo unas gotas de concentrado de larvas dentro de la abertura del molusco, y cuando éste, por la acción de la humedad extendía el pie, dejaba caer sobre él repetidamente gotas del mismo líquido infestante. El autor señala que con el método citado en segundo lugar, fue con el que obtuvo mejores resultados.

KASSAI (1957) infestó algunas especies de moluscos con larvas de *Cystocaulus ocreatus*, *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus* spp. siguiendo el procedimiento utilizado por DAWTIAN (1937). Extraía larvas de nódulos intrapulmonares, empleando los métodos de sedimentación y aislamiento y las introducía, con una pequeña cantidad de líquido, en una placa de Petri, donde seguidamente colocaba cinco o seis moluscos activos, manteniéndolos en contacto con las larvas durante períodos de tiempo variables y a una temperatura ambiente de 20-24°C. Este método con sólo ligeras variantes, ha sido posteriormente utilizado por otros investigadores (PETROW (1966), MARTÍNEZ MORALES (1967), RAMÍREZ FERNÁNDEZ (1967) y ROJO (1973), etc.).

GUILHON (1965), infestó con larvas de *Angiostrongylus vasorum* aisladas por el método de BAERMAN-WETZEL, a partir de heces de perro, varias especies de ariónidos de tres maneras diferentes: infestación libre, infestación por ingestión controlada e infestación por contacto.

En el primer modo de infestación, los moluscos tomaban contacto con numerosas larvas durante tiempo no determinado.

En la infestación por ingestión controlada, les administraba un número conocido de larvas; cada gota contenida de 20 a 100 larvas.

La infestación por contacto la realizaba dejando caer una gota de líquido infestante sobre la cara inferior del pie.

En 1967, COURDURIER, GUILHON y MALARDE, utilizando deyecciones de ratas en las que se había demostrado la presencia de larvas de *Angiostrongylus cantonesis*, infestaron varios ejemplares de *Australorbis glabratus*; humedecían las heces en un cristalizador en el que colocaba posteriormente un grupo de 10 a 12 planórbidos. Los moluscos se deslizaban activamente y hacían pequeñas oquedades en la masa estercorácea, lo que facilitaba el contacto con larvas. Pasadas 4 horas, los trasladaban al moluscario hasta el día siguiente en que eran infestados en condiciones similares a las descritas anteriormente.

YANAGISAWA (op. cit.), infestó con larvas de *A. cantonensis*, aisladas de heces de ratas contaminadas experimentalmente, varias especies de moluscos pulmonados terrestres, empleando la siguiente técnica: dejaba en ayuno a los moluscos durante dos días, al cabo de los cuales les administraba hojas de lechuga sobre las que había colocado un concentrado de larvas.

GUILHON y GAALON (1969), emplearon dos métodos distintos para infestar algunas especies de caracoles de agua dulce. El primer método consistía en colocar en un cristalizador conteniendo una pequeña cantidad de agua, 2.500 a 3.000 larvas de *Angiostrongylus vasorum*, introduciendo seguidamente los especímenes a infestar, haciéndoles permanecer en el recipiente durante 24 horas.

En el segundo método, los moluscos eran contaminados individualmente, depositándoles en la masa del pie varias gotas del concentrado de larvas.

HAMILTON (1969), logra la infestación de ejemplares de *Helix aspersa* sumergiéndoles durante cortos períodos de tiempo dentro de un recipiente con un nivel de 6 mm de agua a la que anteriormente había adicionado varios cientos de miles de larvas de *Aelerostrongylus abstrusus* aisladas de heces de gatos parasitados.

STOCKDALE y HULLAND (1970), señalan que para la infestación experimental de moluscos terrestres *Mesodon thyroidus* y *Triodopsis albolabris* con larvas de *Crenosoma vulpis*, les inoculan

en el pie con aguja hipodérmica, 0,2 ml de concentrado de larvas suspendido en una solución de 0,65 % de cloruro sódico a la que habían agregado 1.000 unidades internacionales de penicilina G. potásica y 1.000 microgramos de sulfato de estreptomicina por ml.

#### 2.2.3. Sacrificio de los moluscos

WRIGHT (1957), utiliza distintos procedimientos para la narcosis y sacrificio de los especímenes, introduciéndoles en agua hervida, evitando que haya burbujas de aire en el recipiente, a la que se añaden cristales de mentol. O bien sumergiéndolos en agua a 40°C hasta su muerte.

JOOSE y LEVER (1959), citados por SAINT-GUILLART (1968), realizan la narcosis previa a la fijación, mediante la introducción de los moluscos en una solución de nembutal al 0,08% y al cabo de 40 minutos de permanencia en la misma, los sumergen durante una hora en una mezcla al 50 % de solución de nembutal al 0,08 % y de MS222 al 0,3 %.

XAVIER y MARTÍNEZ (1966), los introducen dentro de tubos de vidrio repletos con una solución acuosa de mentol y una vez que los moluscos se encuentran totalmente anestesiados los sacrifican sumergiéndoles en agua a 70°C durante medio minuto.

PANTÍN (1968), también utiliza la solución de mentol en la que hace permanecer a los caracoles durante toda la noche.

KUNKENTHAL, MATTHES y RENNER (1969), colocan los caracoles en un recipiente alto lleno de agua hasta los bordes, al que tapan con un disco de vidrio evitando queden burbujas de aire en el mismo; para acelerar el proceso, adicionan hidrato de cloral, con lo que el estiramiento del molusco se logra en menor tiempo. Otra de las técnicas señaladas por estos autores, se basa en la inmersión de los moluscos durante 12 a 20 horas en una solución de hidroxilamina al 0,5 - 1 %.

ESPAÑOL (1972), señala que después de ensayar varios métodos para lograr una completa extensión de los caracoles -asfixia por gas, por acción de la corriente eléctrica, por vapores de cloroformo, mediante soluciones salinas- comprobó que los mejores resultados se obtenían sacrificándoles por inmersión en agua hervida o carbónica.

### 3. INVESTIGACIONES PERSONALES

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1.1. Recolección y aislamiento del material parasitológico

Las larvas I necesarias para realizar la infestación de los moluscos, fueron recogidas de una oveja de raza churra, de dos años de edad y 40 kilos de peso, parasitada en infestación natural por *Neostromylus linearis*, y de un cordero de la misma raza, de 20 kilos de peso, infestado experimentalmente, mediante la administración por vía oral, de un bolo de heno seco al que se añadieron triturados los moluscos *Cernuella (Xeromagna) cepitum arigonis* y *C. (C) virgata* infestados artificialmente por larvas I del citado parásito, tres meses antes\*.

Los animales se mantuvieron en perfectas condiciones higiénicas, con el fin de impedir que fueran infestados por otras especies de nematodos. En las épocas de recogida de heces, permanecían encerrados en jaulas metabólicas individuales, en las que previamente se había colocado una rejilla sobre las

\* Los animales infestados pertenecían al Departamento de Patología Infecciosa y Parasitaria de la Facultad de Veterinaria de León, dirigido por el Prof. doctor CORDERO DEL CAMPILLO, dentro de cuyas investigaciones sobre *Neostromylus linearis*, se inscribe nuestro trabajo.



que quedaban retenidas las deyecciones sólidas. Con este sencillo dispositivo, las heces permanecían aisladas del suelo, siendo fácil su recogida, evitándose a la vez, la posible contaminación con cualquier tipo de parásitos, así como las molestias que producirían en los animales, al ser extraídas directamente del recto, durante períodos prolongados de recogida. Las heces se recolectaban dos veces al día, aproximadamente a las 9 y 6 de la tarde. El método empleado para aislar el primer estadio larvario, fue el de BAERMANN-WETZEL. Como material se emplearon embudos de vidrio de 18 cm de diámetro a los que se prolongaba el cono con un tubo de goma de 15 cm de longitud, que permanecía cerrado por medio de una pinza metálica. La técnica empleada consistió en rellenar los embudos hasta sus dos terceras partes con agua templada (35-37°C) y sumergir 10 gramos de heces envueltas en malla de gasa fina soportadas indistintamente por coladores o mallas de plástico. Las heces permanecían en el embudo de 6 a 8 horas y en la recogida de la tarde durante toda la noche. Mediante la apertura de la pinza, vertíamos 10 mililitros del líquido conteniendo posibles larvas I en suspensión, en tubos de centrifuga milimetrados, sometidos a continuación a un proceso de centrifugación con un régimen de 500 a 2.000 revoluciones por minuto durante 2 a 4 minutos. El sedimento obtenido, después de lavado 2-3 veces con agua destilada, se llevaba por medio de capilar de vidrio a la cámara de MacMaster, y con ayuda de la lupa realizábamos el recuento. Según el número de larvas libres obtenidas, y teniendo en cuenta el lote de moluscos a infestar, a veces era necesario acumular las de varios días, en cuyo caso se mantenían en frigorífico a 5°C durante períodos que no sobrepasaron nunca los 8 días. Sin embargo, lo más frecuente fue, que las larvas recogidas se pusieran inmediatamente en contacto con el molusco, puesto que consideramos que la mayor vitalidad de aquéllas, supone una mayor capacidad de infestación.

### 3.1.2. Hospedadores intermediarios

#### 3.1.2.1. Elección

El hecho de no haber hallado al comienzo de nuestro estudio en los trabajos consultados, información sobre la existencia de moluscos, en los que se hubiera demostrado la presencia de larvas de *Neostromylus linearis* con capacidad para infestar experimentalmente al hospedador definitivo, nos llevó a realizar una revisión de los distintos géneros de moluscos citados como hospedadores intermediarios de los nematodos causantes de «bronconeumonías verminosas», por considerar que la proximidad filogenética existente entre las diversas especies de metastrongílidos, implicaría una afinidad en el desarrollo de su ciclo biológico. Se comprobó que los caracoles terrestres mencionados mayor número de veces, son los helícidos (lám. I). Por este motivo, se eligió en principio un lote de moluscos integrado por ejemplares

pertenecientes a los géneros *Helix*, *Helicella* y *Cepaea*, los cuales fueron colocados en contacto con el primer estadio larvario de *Neostromylus linearis*, con el fin de observar su posterior comportamiento. Al mismo tiempo realizamos el estudio microscópico de cortes histológicos en dichos moluscos, con el fin de comprobar alguna diferencia histológica capaz de influir en la penetración del parásito.

La demostración por el método de digestión de que los moluscos de la subfamilia Helicellinae sacrificados a los sesenta y dos días postinfestación albergaban numerosas larvas III, y la prodigalidad con que se presentan estos moluscos en prados, bordes de charcas, sendas y rastros, lugares de elección para el pasto de ovinos durante todo el año, nos hicieron pensar en el importante papel que desempeñarían en la propagación de este tipo de nematodosis si los mismos se comportan como hospedadores «obligados» o «subobligados». Las circunstancias apuntadas, fueron la causa por las que definitivamente elegimos caracoles de la subfamilia Helicellinae para llevar a cabo la investigación que inicialmente nos habíamos propuesto.

#### 3.1.2.2. Identificación

La identificación de las especies de los helícidos utilizados en nuestro trabajo, supuso una gran dificultad, dado que la divergencia existente respecto a las posiciones de los distintos autores en relación con la sistemática empleada para los moluscos terrestres, se acentúan aún más en este caso, ya que son moluscos de origen reciente (no existieron en las primeras fases del cuaternario) por lo que sus especies están en plena evolución hacia la especiación y sus caracteres no están netamente fijados.

Para su determinación se recurrió al estudio anatómico de determinadas estructuras; concretamente estudiamos las características morfológicas de los órganos del aparato genital, concha, mandíbula, dardo y rádula, ya que dado el polimorfismo de coloración que estos caracoles presentan, la identificación solamente por los caracteres conculológicos, podría originar errores en su determinación.

#### 3.1.2.2.1. Disección

Para realizar la disección seguimos una ligera variante de los métodos descritos por JAMMES, L. (1904); MADARIAGA, E. (1965); ROWETT, H. G. y KUKENTHAL, W. MATHES, E. y RENNER (1967).

La técnica por nosotros utilizada consistió en colocar al molusco, después de su extracción de la concha, para lo que previamente le habíamos mantenido durante 18 a 24 horas dentro de un recipiente repleto de agua hervida y cerrado herméticamente, extendido sobre una plancha de parafina, fijándolo con alfileres por la región centrocefálica, extremo posterior del pie y bordes

laterales de la suela. A continuación realizábamos un primer corte desde el neumostoma hasta la región cardíaca; una segunda sección que partiendo desde la glándula de BOJANUS prolongábamos hasta la aorta, uniéndose con el primer corte, con lo cual ya podíamos levantar la pared superior del pulmón quedando al descubierto el techo de la cavidad paleal. Con un tercer corte que iniciábamos en la región centro superior del orificio bucal y terminábamos a través del reborde del manto, quedaban visibles los órganos internos, que aislábamos seccionando las trabéculas de tejido que los unía. Finalmente, después de lavado, observábamos al microscopio o a la lupa estereoscópica, las características morfológicas típicas para cada especie, de los órganos anteriormente citados.

Para la obtención de la rádula y mandíbula, fue necesario hervir durante dos a tres minutos los órganos bucal y faríngeo en una solución de potasa al 5 %, lavándolos posteriormente en agua destilada y montándolos en líquido de Hoyer.

#### 3.1.2.2.2. Morfo-Eco-Biología y posición sistemática

Dado que los dos tipos de moluscos utilizados en nuestro estudio, pueden presentar variaciones, tanto en la coloración de su concha como en los órganos internos, variaciones que pueden originar errores de determinación, consideramos imprescindible describir, aunque brevemente, las características morfológicas que nos han inducido a identificarlos como *Cernuella (Xeromagna) cespitum arizonis* (ROSSMASSIER, 1854) y *Cernuella (C) virgata* (DA COSTA, 1778). Para este fin hemos utilizado fundamentalmente, las obras de HIDALGO, J. G. (1910), CASTAÑOS FERNÁNDEZ, E. (1917), HASS, F. (1929), GERMAIN, L. (1930), FORKAT, MANDAHN-BARTH, G. (1943), ORTIZ DE ZARATE y LÓPEZ, R. (1943), ADAM, W. (1960), PERRIER (1963), GITTEMBERGER, E., BACKHUY, W. y RIPKEN, Th E. J. (1972), etc.

Las características organográficas que a continuación describimos pertenecen a ejemplares adultos, dado que la disección siempre se realizó en los individuos disponibles de mayor tamaño, cuyo diámetro máximo nunca era menor de 13 mm y que presentaban evidente «rodete» interno, con lo que no había la menor duda de que eran caracoles que ya habían alcanzado la completa madurez sexual.

Los moluscos estudiados y determinados en primer lugar, presentaron las siguientes características: concha globulosa, deprimida, de color blanco grisáceo, unicolora o adornada con un número variable de franjas de distintos tonos de marrón, las bandas pueden estar más o menos marcadas, presentar interrupciones o ser continuas. Espira subcónica formada por 3 a 5 anfractos subconvexos, el último de los cuales es el de mayor tamaño y tiene forma redondeada; suturas superficiales y superficie con finas estrías longitudinales

oblicuas. Abertura redondeada, con bordes marginales convergentes, peristoma derecho con uno o dos «rodetes» internos de color blanco asalmonado; borde columelar blanco amarillento y ligeramente reflejado. Poseen ombligo ancho que deja ver los enrollamientos internos. Las dimensiones de la concha son muy variables; los tamaños más frecuentes alcanzados por los adultos oscilan entre los 9-11 mm de longitud, y 13-18 de diámetro máximo. Los moluscos nacidos en los primeros meses del año, tienen en primavera un diámetro aproximado de 8 a 10 mm. Este tamaño de moluscos fue preferentemente utilizado en nuestras infestaciones.

El cuerpo de estos gasterópodos es delgado, de forma redondeada en la región anterior y puntiagudo en las posteriores; en su superficie se encuentran numerosos tubérculos redondeados y poco salientes, excepto en la planta de arrastre que es lisa. La coloración del animal es variable según la región examinada; la porción dorsal es grisácea y puede llegar a ser casi negra en los bordes del manto, los costados son blanco grisáceos y la región de la suela blanca transparente.

El cerebro está constituido por una masa ganglionar dispuesta en forma de anillo incompleto alrededor del esófago.

La boca situada ligeramente por debajo de la línea media de la región cefálica, contiene dos potentes aparatos de masticación: la mandíbula y la rádula. La mandíbula es de tipo odontognato, situada en la masa muscular del techo de la boca; es una pieza córnea de 4 mm de longitud y 1,5 mm de ancho, tiene forma arqueada y color pardo rojizo, consta de 8 a 9 costillas denticuladas siendo las centrales anchas y rectas.

La rádula es una delicada lámina córnea, que al microscopio se la observa formada por 50 filas de pequeñísimos dientecillos de aproximadamente 34 micras de longitud, de forma variable; los centrales son tricuspidados y de mayor tamaño que el resto; a ambos lados de esta fila central existen 42 filas de dientes bicuspidados que van disminuyendo gradualmente de tamaño hasta llegar a los marginales que son considerablemente más pequeños. La cifra de dientecillos que hemos dado son aproximados, ya que pueden variar el número de filas y el de dientes que componen cada fila en relación con la edad de los ejemplares.

El orificio externo del aparato genital se abre cerca del tentáculo oculífero derecho, cuyo músculo retractor se mantiene independiente del aparato genital. El pene es piriforme con el epífalo de mayor tamaño que éste, el flagelo es delgado terminado en punta. Los sacos del dardo situados a un lado de la vagina, tienen distintas dimensiones y solamente el mayor contiene un dardo sencillo y de color blanco calcáreo y extremo puntiagudo (lám. I). Las glándulas multífidas se implantan en la vagina unos mm más abajo que los sacos del dardo y están formadas por 10 troncos de vesículas que se dividen en sus extremos en dos o tres tubos terminales (lám. I).



El epifragma es delgado ligeramente transparente y a veces, presenta irisaciones.

La puesta la realizan en otoño, pero también hemos observado posturas en enero y primeros días de febrero. Los huevos son de color blanco mate y de dos mm de diámetro. No hemos recogido datos del período de eclosión en el laboratorio, pues aunque hemos colocado huevos recogidos de ejemplares que vivían en libertad, en distintos medios y a temperaturas variables, no hemos logrado su eclosión.

Esta especie vive en las zonas soleadas de terrenos calcáreos cubiertos de césped, sobre tallos de plantas bajas adosadas a los muros y debajo de cardos. En las primeras horas de la mañana se mantienen en actividad que se puede prolongar a toda la jornada diurna en días de lluvia moderada y temperatura suave. En los meses de verano, cuando las temperaturas alcanzan valores muy altos, se resguardan en las oquedades del suelo y permanecen en «estivación». En inviernos de nieves abundantes y temperaturas muy bajas pasan a «hibernación». En el Moluscario cuando el grado de humedad es bajo, frecuentemente se los encuentra adosados a las paredes del terrario, formando en este último caso un delgado epifragma.

Confrontando los datos expuestos anteriormente, con los señalados por los distintos autores citados, hemos llegado a la conclusión de que se trata de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (ROSSMASSLER, 1854), cuya sinonimia transcribimos a continuación:

*Helicella (Xeromagna) arigonis* (ROSSMASSLER).

*Helix arigonis* ROSSMASSLER: Icon., III 1854, pág. 21, taf. LXVI, figs. 823-824. HIDALGO: cat. icon. y descrip. de los mol. terr. de Esp., Port y las Baleares, 1875-84, pág. 189, lám. 15, figuras 145-48. SCHMIDT (A.): Der Geschlechtsapparat der Stylommatophoren, etc. 1885, pág. 31, taf. VII, fig. 43.

*Helix cespitum* HIDALGO: Cat. icon. 1875-84, pág. 193, lám. 20, figs. 213-215.

*Helix arigonis* SERVAIN: Etude sur les moll. rec. en Espagne et en Portugal, 1880, pág. 75.

*Helix (Xerophila) arigonis* BOFILL (A.), HASS (E.) y AGUILAR AMAT (J. J.): Estudi sobre la mal. de les valls pirinaiques, V, 1920, pág. 453, lám. I, figs. 18-25; VI, pág. 298, fig. 19.

*Helicella (Cernuella) arigonis* HASS: Faune mal. terr. y de agua dulce de Cataluña, 1929, pág. 203, fig. 49.

*Helicella (Xeromagna) arigonis*, GERMAIN: Faune de France, 21, pág. 295, pl. VI, figs. 144-145.

*Helicella (Xeromagna) arigonis*, ORTIZ DE ZÁRATE y LÓPEZ, R. 1950: Observaciones anatómicas y posición sist. etc., págs. 67-71.

Los moluscos infestados en segundo lugar, que en principio consideramos similares a los estudiados anteriormente por encontrarse en biotopos muy

próximos y poseer características conculógicas parecidas, presentan los siguientes caracteres:

Concha globulosa cónica, elevada en su parte superior y bombeada en la inferior, de color leonado más o menos intenso, unicolor o frecuentemente adornada con franjas marrones continuas o interrumpidas. Espiras formadas por seis anfractos convexos; suturas profundas; escultura con estrías finas apretadas y desiguales. Vértice acuminado. Abertura subcircular u ovalada, con bordes marginales convergentes. Peristoma derecho interrumpido, borde columelar de color blanco ocre y ligeramente reflejado, «rodete» interno de color amarillento, rosa o rojizo. Ombligo estrecho. Las dimensiones de la concha, más frecuentes, suelen ser de 9-11 mm de longitud y de 15 a 17 mm de diámetro máximo.

Cuerpo robusto, guarnecido de tubérculos, terminado en punta en la parte posterior, de color gris que se oscurece ampliamente en la región dorsal y se hace casi blanco en la suela de arrastre.

Orificio respiratorio grande, de forma subovalada.

Orificio genital externo, poco evidente, situado en la región posteroinferior del tentáculo derecho. Pene corto prolongado por un epífalo cilíndrico y de mayor longitud que éste, flagelo rudimentario. Saco del dardo potente de color blanco brillante, en cuyo interior se aloja un dardo puntiagudo, de 3 mm de longitud y 0,3 de anchura y provisto en su extremo de dos aristas (lám. II). Bolsa copuladora algo más ancha por delante que por detrás, canal seminal largo y que desemboca en el oviducto próximo a donde se implantan de dos a 4 troncos de glándulas multífidas, divididas cada una en dos a cinco tubos terminales.

No describimos las características de la rádula y del maxilar porque son semejantes a las apuntadas anteriormente para *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*.

Epifragma de color blanco mate.

Viven en lugares soleados, preferentemente en las orillas de carreteras y caminos, sobre plantas de diversos tipos entre hojas y tallos desecados, siempre en terrenos calizos.

Los caracteres organográficos descritos nos han llevado a determinar que estos moluscos son *Cernuella (C) virgata* (DA COSTA 1778) de la que vamos a citar solamente algunos de los múltiples sinónimos, con que ha sido designada esta especie, debido sin duda, al gran polimorfismo de coloración que puede presentar su concha.

*Helicella (Cernuella) virgata*.

*Helix virgata* (DA COSTA). BRIT. Conch. 1779, pág. 72, lám. 4 figs., 7 noviembre, 1930, pág. 85. Est. 3 figs. 27.

*Helix variabilis* (DRAPARNAUD). Tableaux, etc., pág. 73. His. nat. de Moll., etc., 1805, pág. 84, lám. V, figs. 11-13.

*Helicella (Cernuella) variabilis* GERMAIN: Faune de France, 1930, pág. 303, lám. VI, figs. 182-185. (ORTIZ DE ZARATE ROCANDIA, A.). y *Helicelle virgata* 17. ADAM, W. (1960). *Faune de Belgique. Mollusques Terrestres et Dulcicoles*. Tomo I, pág. 291.

Como consecuencia de lo anteriormente reseñado, las especies de moluscos utilizados en nuestra investigación tienen la siguiente posición sistemática.

	Identificados en primer lugar	Identificados en segundo lugar
PHYLUM	MOLLUSCA	MOLLUSCA
CLASE	GASTEROPODA	GASTEROPODA
SUBCLASE	PULMONATA	PULMONATA
ORDEN	ESTILOMATOPHORA	ESTILOMATOPHORA
FAMILIA	HELICIDAE	HELICIDAE
SUBFAMILIA	HELICELLINAE	HELICELLINAE
GENERO	Cernuella	Cernuella
SUBGENERO	(Xeromagna)	(Cernuella)
ESPECIE	cespitum	virgata
VARIEDAD	arionis	

3.1.2.3. *Biotopos naturales, recogida y traslado al moluscario*

Los moluscos infestados en los primeros ensayos, fueron recogidos en jardines y alrededores de la capital de León así como de diversos pueblos de esta provincia: Cistierna, Puente Villarente, Villamoros de Mansilla, Valverde Enrique y Virgen del Camino. Posteriormente, para un más fácil control de su estado sanitario y de su identidad, seleccionamos tres microhabitat situados en Puente Villarente, Virgen del Camino (mapa I) y en la ciudad de León (plano I), de donde definitivamente fueron recogidos los especímenes utilizados en nuestro trabajo.

La recolección de los caracoles, se efectuaba a distintas horas, dependientes de la época del año y de las condiciones ambientales (humedad, temperatura, luminosidad, etc...). En otoño y primavera, la realizábamos en las primeras horas de la mañana y, en los días templados de lluvias moderadas, durante toda la jornada diurna.

En verano, en las primeras horas del día, excepto en los meses de gran sequía y de temperaturas altas, en los que los especímenes permanecen en «estivación» escondidos en oquedades del terreno de difícil acceso. En invierno, se efectuaba en horas próximas al mediodía (entre las 11 y las 15 horas) con exclusión de los meses de temperaturas muy bajas y de frecuentes nevadas, en los que los caracoles pasando a «hibernación» desaparecen del medio externo.

Los moluscos, recogidos directamente con la mano o mediante pinzas de extremos afilados en el caso de los recién eclosionados o muy jóvenes, eran introducidos, según tamaño y especie, en distintos frascos de plástico con tapas perforadas o en pequeñas bolsas de arpillera y plástico, que una vez etiquetados con la fecha y lugar de recogida, eran trasladados rápidamente al moluscario.

3.1.2.4. *Cultivo*

Previamente al comienzo del cultivo de los moluscos en régimen de cautividad, realizamos un estudio de las características biológicas (tipo de vegetales) y físicas (temperatura, humedad, etc.) de los biótopos naturales de los moluscos a cultivar, pues consideramos, que el más exacto conocimiento de las necesidades ecológicas de estos, favorecen la creación del medio adecuado para la supervivencia, reproducción y normal desarrollo de los caracoles en el biótomo artificial.

El moluscario lo situamos en la zona del laboratorio de temperatura más constante (18-22°C), orientado al mediodía, con luminosidad media, y al que solamente llegaban los rayos de sol a media tarde; estaba constituido por jardineras de uralita de 50 × 20 × 15 cm y de 90 × 20 × 15, y por cajas de madera de aproximadamente 20 × 10 × 10 cm en las que se colocaba un sustrato formado por tierra procedente del biotopo natural, cortezas de vegetales y pequeñas piedras. Con relativa frecuencia, cuando los recipientes permanecían vacíos, sembrábamos césped o leguminosas y al alcanzar el cultivo una altura de 5 a 6 cm, instalábamos allí los moluscos. Cuando las condiciones del sustrato no eran idóneas, por la existencia de demasiados residuos de alimentos, los moluscos eran trasladados a otros recipientes con sustratos renovados.

El alimento administrado a los moluscos dos o tres veces por semana, consistía en hojas de lechuga (*Lectuca sativa*) previamente humedecidas, trozos de zanahoria (*Daucus carotta*) y restos de frutas (pera, manzana, etc...). A veces, les administrábamos hojas y tallos de vegetales recogidos en los biótopos naturales. Cada tres o cuatro días, dependiente de la sequía, realizábamos pulverizaciones acuosas sobre los moluscos, que en períodos de lluvia suave, eran sustituidos por ésta, mediante el traslado de las jaulas a la terraza del laboratorio.

3.1.2.5. *Infestación experimental*

Hemos seguido procedimientos para la infestación de los moluscos: según tamaño, período de postinfestación al que iban a ser sacrificados, horas del día en que se realizaba ésta, etc. Inicialmente infestamos tres especímenes depositando sobre la suela del concentrado larvario (GUILHON, 1965) y otras veces



mediante la inoculación con aguja hipodérmica, de 0,2 mml de material parasitológico al que previamente se le había añadido penicilina G. potásica y sulfato de streptomycin (SOTOCKADE, PH. y HULLAND, 1970); ambos métodos fueron desechados por considerar que el primero es inseguro e incómodo, ya que es difícil el mantenimiento del molusco en la posición requerida para la infestación, y el segundo, por admitir que el trauma producido por la inyección podría enmascarar las reacciones histológicas iniciales del hospedador frente al parásito; así como la localización de las larvas, por lo que definitivamente decidimos utilizar, aunque con ligeras modificaciones, el método señalado por KASSAI (1957), por presentar mayor analogía con la infestación natural. La técnica consistió en colocar individualmente a los moluscos en placas de Petri, en las que anteriormente se había depositado 200 larvas recientemente obtenidas. Cuando se infestaron moluscos muy jóvenes o sometidos a un período de permanencia en el líquido infestante menor a los 30 minutos, fueron colocados en placas de seroaglutinación tipo OMS, en las que previamente se había colocado el concentrado larvario. Los moluscos cuyo período de infestación osciló entre los 30 minutos y las dos horas, se infestaron en vidrios de reloj. Solamente un lote integrado por especímenes grandes e infestados durante la noche, fueron colocados en tubos de centrifuga de dos centímetros de diámetro que contenían 0,5 ml de concentrado larvario, obligándoles a permanecer en continuo contacto con las larvas mediante un dispositivo que consistió en colocar sobre el ápice de la concha una pieza de plástico, de forma esférica, con un diámetro ligeramente menor al del tubo, que presionada por una torunda de algodón, les impedía cambiar de posición.

La temperatura ambiente osciló entre los 18-22°C, aunque en algunos lotes infestados en verano superó los 23°C. El tiempo de permanencia con el material contaminante para aquellos especímenes que fueron sacrificados en períodos de tiempo superiores a las 10 horas fue de 6-16 horas. Durante el transcurso de la infestación, ventilábamos la placa y obligábamos a los caracoles a su continua permanencia con el concentrado larvario. Previamente a toda infestación, se pulverizaba con agua artesiana a los caracoles y sólo aquellos que mostraban gran vitalidad, eran elegidos para la infestación. Los especímenes una vez infestados eran medidos y etiquetados, se les señalaba con distintos signos antes de pasar al moluscario junto a los testigos con el fin de que en todo momento fuera fácil su identificación.

#### 3.1.2.6. Anestesia y sacrificio

En los primeros ensayos de sacrificio los moluscos fueron anestesiados en una solución acuosa de mentol, siguiendo uno de los procesos de narcosis reseñado por WRIGHT (1957), o introduciéndoles durante dos horas en una solución de nembutal al 0,08 % y a continuación en otra constituida por

solución de nembutal al 0,08 % y por MS 222 al 3 % (JOOSE y LEVER, cit. por SAINT GUILLAR (op. cit.)). Posteriormente, una vez comprobados los resultados obtenidos utilizando el método descrito por KUNKENTAL et al. (op. cit.) optamos por emplear definitivamente este método para el resto de las experiencias. La técnica realizada por nosotros consistió en introducir los especímenes en cristalizadores de SCHIEFFERDECKER repletos indistintamente, de agua hervida o destilada, evitando que al taparlo quedaran burbujas de aire. La temperatura a que se realizaba era de 18-22°C. El tiempo de permanencia en el recipiente variaba según tamaño del caracol, en general, osciló entre las 18-24 horas, al cabo de las cuales, se podía comprobar que el caracol estaba completamente estirado y paralizado, momento en el que, una vez extraído de la concha con ayuda de unas pinzas, el cuerpo completo del caracol o solamente la porción cefalopodiosa, mediante sección con tijeras, se depositaba en la mezcla fijadora elegida.

#### 3.1.2.7. Fijación

Las mezclas fijadoras de elección y con las que hemos obtenido buenos resultados fueron el líquido de CARNOY variedad HETHERINGTON reseñado por AGESBOR (op. cit.), y el líquido de BOUIN, aunque también hemos utilizado la solución de ZENKER. En las primeras experiencias fijábamos el cuerpo completo del caracol, pero cuando comprobamos la localización de las fases larvarias dentro de éste, solamente introducíamos en el fijador la porción cefalopodiosa.

El período de permanencia de las muestras en los líquidos fijadores, aunque con ligeras variantes dependientes del tamaño del espécimen, ha sido el siguiente para las distintas mezclas:

CARNOY variedad HETHERINGTON, de dos a cinco horas, pasando la muestra directamente al alcohol de 96 %.

BOUIN de diez y siete horas a 5 días, comprobando, que aquellas piezas que por diversas causas permanecieron más tiempo, no sufrieron alteraciones notables. Posteriormente a la fijación en este líquido, se pasaban las muestras por sucesivos baños en alcohol de 70 y 80 % hasta la desaparición del color amarillo (nunca totalmente).

ZENKER, de doce a veinticuatro horas con posteriores lavados en agua para la eliminación del dicromato potásico y en alcohol yodado al 70 % para la del sublimado. Este fijador lo utilizamos selectivamente para las muestras que iban a ser teñidas con los métodos tricómicos de MALLORY y de MASSON (variante de GOLGNER).

#### 3.1.2.8. Inclusión

Para la inclusión en parafina utilizamos como líquido intermediarios toluol

o benzol, y para la impregnación y realización del bloque, parafina MERK de 52-54° y de 44-46 según la temperatura ambiente.

Los cortes en número superior a los 10.000, fueron obtenidos con Microtomo Reichert. Cada espécimen perfectamente etiquetado, era seccionado en cortes seriados con un espesor de 6-8 micras. Para adherir los cortes se utilizó albúmina glicerizada. Para desparafinar empleamos xilol.

### 3.1.2.9. Tinción y fotomicrografía

Los cortes fueron teñidos sistemáticamente con los métodos de coloración hematoxilina-cosina (hematoxilina fórmula de BOHMER) y de GALLEGO (fucsina de ZIHEL acética y Picrocarmín de índigo) y una vez comprobado que la infestación había sido positiva, así como localizados los estadios larvarios, se realizaron las siguientes tinciones específicas: VAN GIESON para tejido conjuntivo (hematoxilina férrica de WEIGERT y picrofucsina ácida de Van Gieson); impregnación argéntica de GOMORI; P.A.S. según el proceder de MACMANUS; P.A.S. Azul Alcian; tricómicos de MALLORY y MASSON (variante de GOLNER), y el método de GALLEGO para fibras elásticas.

Los dibujos se llevaron a cabo utilizando cámara clara acoplada a estereomicroscopio ZEISS.

Las fotomicrografías fueron obtenidas con cámara ORTHOMAT sobre microscopio ORTHOLUX de LEITZ y película Panatomix -x KODAK.

## 3.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 3.2.1. Infestación de diversas especies de moluscos

#### 3.2.1.1. Experiencia I

Un grupo integrado por nueve moluscos jóvenes, recogidos de distintos biótopos naturales próximos a la ciudad de León, de las especies *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, *C (C) virgata* y *Cepaea nemoralis*, fueron puestos en contacto con numerosas larvas de *Neostromylus linearis* depositadas en placas de Petri, y expuestos al contagio durante seis horas a una temperatura ambiente de 18-23°C. El objeto de este preliminar ensayo de infestación fue el de comprobar la receptividad de las especies citadas con el fin de elegir hospedadores intermediarios idóneos para llevar a efecto la investigación propuesta. Los especímenes se sacrificaron a los 62 días postinfestación.

#### 3.2.1.2. Experiencia II

18 ejemplares *C (X) cespitum arigonis* de dos a cuatro meses de edad, cuyas dimensiones oscilaron entre los 7-11 mm de longitud y los 9-12 de

diámetro máximo, fueron colocados en pocillos de placas de seroaglutinación, que contenían 200 larvas I, durante seis horas y media, la finalidad de esta experiencia fue la de comprobar la posible influencia de los estadios larvarios del nematodo estudiado, en el crecimiento de estos hospedadores intermediarios. Un número similar de moluscos no infestados y de características semejantes (edad, tamaño, etc.) fueron colocados como testigos en condiciones idénticas de alimentación, humedad y temperatura. Con el fin de confrontar los índices de crecimientos de ambos lotes. Se controló su crecimiento durante siete semanas, momento en el que, con el fin de provocar experimentalmente neostromilosis fueron administrados a los hospedadores definitivos.

#### 3.2.1.3. Experiencia III

Un lote integrado por 10 moluscos, de diversos tamaños, y pertenecientes a las especies seleccionadas: *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y *C (C) virgata*, fueron colocados aisladamente en placas de Petri, en las que previamente se habían colocado 0,5 ml de concentrado larvario, conteniendo aproximadamente 200 larvas de *Neostromylus linearis*. El período de exposición fue de ocho horas y la temperatura ambiente de 19-24°. Los moluscos fueron sacrificados al cabo de 10, 20, 30, 40 días de infestación, con el fin de comprobar la localización de las distintas fases larvarias dentro del organismo de ambas especies de hospedadores intermediarios.

### 3.2.2. Infestación de cerņuella (*Xeromagna*) *cespitum arigonis*

#### 3.2.2.1. Experiencia IV

Un grupo constituido por veinte moluscos jóvenes de tres a cuatro meses de edad, cuyas medidas oscilaban entre los 5-7 mm de longitud y los 10-12 de diámetro mayor, fueron depositados individualmente en placas de seroaglutinación tipo O.M.S., que contenían 300 larvas recientemente aisladas, y sacrificados en lotes de 5 al cabo de 30 segundos, 5, 10 y 30 minutos respectivamente. El objeto de esta infestación fue comprobar las lesiones que se producían durante la penetración y localización del parásito.

#### 3.2.2.2. Experiencia V

Diez moluscos de características, semejantes a los utilizados en la experiencia anterior, fueron colocados en vidrios de reloj humedecidos, en los que previamente se había depositado 200 larvas; fueron sacrificados en dos lotes de 5 especímenes cada uno, después de haber permanecido durante una y dos horas respectivamente en contacto con el concentrado larvario. El fin de esta experiencia fue el de conocer el comportamiento larvario, así como las posibles



lesiones ocasionadas por éstas en el epitelio de revestimiento externo del hospedador.

#### 3.2.2.3. *Experiencia VI*

Dieciséis moluscos cuyas dimensiones oscilaban entre los 7-9 mm de longitud y los 11-13 de diámetro máximo, fueron colocados individualmente en placas de Petri, que contenían 200 larvas, durante seis horas a temperatura ambiente (18-22°C), y sacrificados, seis especímenes a las 10 horas postinfestación, y el resto, distribuidos en dos lotes de cinco a las 24 y 48 horas respectivamente. El fin perseguido en esta prueba fue el de comprobar la localización del parásito y las lesiones producidas en el hospedador en estos períodos de infestación.

#### 3.2.2.4. *Experiencia VII*

Un lote de 34 moluscos fueron infestados en condiciones semejantes a las señaladas en la experiencia anterior: fueron sacrificados con intervalos de dos días en los períodos comprendidos entre los 10 y 20 días postinfestación, con el objeto de estudiar las lesiones producidas por las larvas en los tejidos del hospedador.

#### 3.2.2.5. *Experiencia VIII*

26 caracoles de diversos tamaños, fueron colocados en placas de Petri conteniendo aproximadamente 190 larvas, a una temperatura de 20-24°; el período de permanencia con el material contaminante fue de 6 horas y media, realizándose el sacrificio de los especímenes al cabo de 4, 7, 24 y 26 días postinfestación. El objeto de esta experiencia fue comprobar las reacciones provocadas por las larvas en los tejidos de los moluscos.

#### 3.2.2.6. *Experiencia IX*

Un lote de 17 moluscos distribuidos individualmente en placas de Petri conteniendo aproximadamente 200 larvas, fueron mantenidos en contacto durante 7 horas y sacrificados al cabo de 30, 32 y 36 días. El objeto de esta experiencia fue comprobar las reacciones histológicas del hospedador frente a la evolución del parásito en los períodos de tiempo reseñados.

Un lote integrado por 49 caracoles de diferentes tamaños, fueron colocados individualmente en tubos de centrifuga, en los que previamente se había depositado medio mililitro de agua exenta de cloro conteniendo 400 larvas. Los especímenes fueron obligados a permanecer en continuo contacto con el lí-

quido infestante, durante 16 horas, mediante la presión ejercida por una torunda de algodón sobre una pieza esférica de plástico adosada al ápice de la concha de los gasterópodos. El sacrificio de los moluscos se realizó a los 40, 50, 60, 100, 120 y 150 días de infestación.

#### 3.2.3. *Infestación de Cernuella (C) virgata*

##### 3.2.3.1. *Experiencia XI*

Han sido infestados un total de 70 *C (C) virgata*, recogidos del biótomo natural situado en la Virgen del Camino, cuyos tamaños oscilaron entre 6-11 mm de longitud y 10-15 de diámetro máximo. Los gasterópodos fueron distribuidos en 9 lotes, integrados por un número muy variable de ejemplares, dependientes siempre de la cantidad de larvas viables disponibles. Las condiciones en que se realizaron las infestaciones, fueron semejantes a las señaladas en las experiencias anteriores. Los períodos de postinfestación en que fueron sacrificados, fueron de 10, 16, 18, 20, 26, 40, 50 y 62 días. El objeto de la experiencia fue el de comprobar la localización y evolución de las fases larvarias así como las reacciones histológicas de esta especie de hospedador intermediario.

#### 3.3.3. *Examen del líquido en el que los moluscos fueron sacrificados*

Considerando la posibilidad de que el medio en el que se introdujo a los moluscos, fuera idóneo para que las larvas III abandonaran activamente el organismo de estos, en aquellos hospedadores intermediarios sacrificados en períodos de infestación superiores a los 30 días se estudió microscópicamente el líquido en que fueron sumergidos hasta ocasionar su muerte, que mediante centrifugación y decantación se reducía en volumen a 2-4 l y era colocado posteriormente en cámaras de FAVATI, para facilitar su observación. El objeto de esta prueba fue el de comprobar la existencia de larvas infestantes emigradas del caracol.

#### 3.3.4. *Emigración del estado sanitario de los moluscos recogidos en los biótopos naturales*

El hecho de no haber logrado moluscos nacidos en el laboratorio en número suficiente para llevar a efecto la totalidad de las investigaciones propuestas, nos indujo a utilizar ejemplares procedentes de biótopos naturales, con el consiguiente riesgo de que los mismos estuvieran ya parasitados. Por ello, a fin de obviar esta posibilidad, en cada recogida, se controlaba el estado sanitario de un número variable de moluscos, dependiente de la cantidad recolectada. Para realizar el estado microscópico de los especímenes fueron

colocados entre dos portaobjetos o entre dos placas de las empleadas en triquineloscopia; y, a veces, se controló mediante el examen del filtrado obtenido tras la digestión de los caracoles, en una solución en agua destilada de clorhídrico al 7 % y de pepsina seca al 5 % (MARTÍNEZ MORALES, 1967).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1. HISTOLOGÍA NORMAL DE AQUELLAS ESTRUCTURAS QUE VAN A SERVIR DE ALBERGUE A LAS LARVAS.

###### 4.1.1. Estructura del epitelio que reviste el pie

El pie de los moluscos utilizados en nuestras experiencias está tapizado por un epitelio simple ciliado. Su superficie no es lisa, sino que muestra una serie de entrantes y salientes, adoptando en conjunto un aspecto papilar, más o menos pronunciado en función del grado de contracción del animal.

La forma de las células es distinta según su localización, mientras que en la porción anterior y posterior del pie del molusco son cilíndricas, en las porciones laterales se hacen cúbicas bajas.

###### *Parte anterior y posterior del pie.*

###### *Células cilíndricas*

Se caracteriza este tipo de célula, por el polo apical fuertemente acidófilo, un núcleo localizado en el polo basal, alargado, con el eje mayor perpendicular a la base de la célula, rico en cromatina y con un nucléolo muy evidente. Entre estas células, pueden observarse elementos de citoplasma claro, por la existencia en él de una gran vacuola, recordando a las células caliciformes. Son las células mucosas, que contribuyen a la formación de la «baba».

Estas células, de localización en la porción anterior y posterior del pie del molusco, poseen un grueso ribete en cepillo en su borde libre, mucho más evidente que en las células epiteliales de localización lateral.

###### *Partes laterales del pie*

###### *Células cúbicas*

Se caracteriza este tipo de células por poseer un citoplasma ligeramente acidófilo, homogéneo, y un voluminoso núcleo, en disposición basal; es relativamente rico en cromatina la cual se dispone generalmente, en forma irregular. En gran parte de las células es posible detectar la existencia de un gran nucléolo en posición central, o ligeramente excéntrico. No hemos observado en el epitelio de localización lateral, la existencia de células de aspecto calici-

forme, señaladas por algunos autores y denominadas células mucosas o de LEYDIG. Las células, en esta región, se identifican por su núcleo, ya que no es posible la diferenciación de los límites celulares.

###### 4.1.2. Características estructurales de la membrana basal

Las células epiteliales que recubren la superficie externa del pie, están separadas del conjuntivo muscular subyacente por una evidente membrana basal. Histológicamente está constituida por fibras de reticulina que se tiñen intensamente de negro por colorantes de plata, en general se observa como constituidas por grupos paralelos de fibras en íntima relación con el polo basal de la célula. En aquellos lugares donde, debido a la contracción del molusco, el epitelio aparece con invaginaciones, las fibras que constituyen la membrana basal aparecen festonadas como introduciéndose entre las células. Entre las fibras de reticulina existe un material PAS positivo.

###### 4.1.3. Estructura del tejido conjuntivo del pie

El tejido conjuntivo subepitelial, no solamente protege a los órganos de la cavidad general del cuerpo, sino que en unión del tejido muscular, constituye el armazón del pie. Se trata de un tejido conjuntivo denso, con un número proporcionado de células y elementos fibrilares desordenadamente dispuestos.

Las células que entran a formar parte del tejido conjuntivo de los moluscos utilizados en nuestras experiencias son: *fibroblastos*, *células vesiculares*, *células pigmentarias* y *células mucosas*.

Los elementos fibrilares están fundamentalmente constituidos por fibras colágenas.

###### 4.1.3.1. Estructura histológica del fibroblasto

Los fibroblastos relativamente numerosos en el tejido conjuntivo del pie, tienen forma estrellada, con largas prolongaciones que establecen relación con las prolongaciones de fibroblastos vecinos. El citoplasma celular, así como la membrana, son difíciles de observar con los distintos métodos de tinción, identificándose este tipo de célula por las características del núcleo. Este es voluminoso, ocupando casi la totalidad del citoplasma, generalmente ovalado, pobre en cromatina que aparece dispuesta en forma de pequeños gránulos. Posee un nucléolo muy evidente. El resto del protoplasma celular es homogéneo.

###### 4.1.3.2. Estructura histológica de las células vesiculares

Las células vesiculares son elementos voluminosos y relativamente esca-



sos en el pie del molusco. Aparecen constituyendo grupos más o menos grandes con preferencia en el seno del tejido conjuntivo de la pared dorsal de la cavidad bucal. Son células muy irregulares, aunque en general adoptan forma estrellada, provistas de un núcleo relativamente rico en cromatina, que aparece dispuesta en forma de bandas. En algunos núcleos es posible observar la existencia de uno o dos nucléolos. El citoplasma ligeramente basófilo, presenta en general aspecto reticulado.

#### 4.1.3.3. Estructura histológica de las células pigmentarias

Constituyen uno de los componentes celulares del tejido conjuntivo del pie; suelen estar diseminadas o constituyendo pequeños grupos. Tienen forma irregular, con núcleo pequeño esférico y ligeramente excéntrico, rico en cromatina. El citoplasma presenta una serie de esférulas pequeñas de color que varía entre el amarillo claro hasta el negro.

#### 4.1.3.4. Células mucosas

Aparecen localizadas preferentemente en el pie del molusco, y dentro de este órgano se acumulan en su porción anterior en situación dermo-epidérmica.

Son células de gran tamaño que aisladas presentan una forma esférica y cuando constituyen grupos se hacen polimorfas. Tienen un núcleo esférico, central, rico en cromatina. El citoplasma, frecuentemente ocupado por gran cantidad de formaciones alargadas basófilas. En ocasiones, cuando el contenido del citoplasma es menos abundante aparece con una disposición radiada por la presencia de dichas formaciones, que partiendo de la periferia del núcleo se dirigen hacia la membrana celular.

#### 4.1.3.5. Estructura histológica de las fibras conjuntivas

Con los métodos de coloración Gomori, Van Gieson y Gallego, así como la tricrómica de Mallory, se descubre la presencia en el pie, de fibras colágenas; son más abundantes que las fibras musculares y más delgadas. En general aparecen independientes o en pequeños grupos, con prolongaciones que establecen relación con las de las fibras vecinas, originando en conjunto una red de amplias mallas. Las fibras colágenas se relacionan igualmente con los fibroblastos, y en los puntos de entrecruzamiento de fibras es frecuente la existencia de algún fibroblasto. El tejido conjuntivo del pie de estos moluscos, pueden ser incluidos dentro de la variedad de conjuntivo laxo.

Entre las fibras conjuntivas del pie del molusco, se halla una moderada cantidad de fibras musculares. Este tipo de fibras, y en relación con su localización, o aparecen aisladas como ocurre en las porciones periféricas o

bien constituyendo fascículos como es propio de la porción media de dicho órgano.

Con distintos medios de coloración y en particular con la hematoxilina férrica de Heidenhain, se las interpreta como pertenecientes a la variedad lisa, dada la ausencia de estriación transversal; presentan un núcleo muy evidente en posición central, alargado y con la cromatina en disposición granular.

#### 4.2. REACCIONES HISTOLÓGICAS DE LOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS FRENTE A LA PENETRACIÓN, LOCALIZACIÓN Y EVOLUCIÓN LARVARIA

Las larvas I de *Neostromylus linearis* en presencia de los moluscos, realizan rápidos movimientos en diversas direcciones. Establecido el contacto de la larva/molusco, la primera realiza una serie de contracciones ondulatorias que recorren todo lo largo del cuerpo. El molusco se muestra inquieto, presentando contracciones de las regiones expuestas y, a intervalos, se esconde en el interior de la concha.

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

La localización de las larvas en el molusco hospedador, para realizar la penetración, parece tener cierta especificidad, puesto que, en la serie de experiencias realizadas, les hallamos únicamente en las porciones inferolaterales del pie. Tal extremo, es posible se deba a la talla de los moluscos, al que serían inaccesibles regiones tales como los tentáculos, región subtentacular, borde del manto, etc.

Las larvas penetran en general por los surcos del pie, si bien es posible la penetración por la parte superior de la papila originada entre dos presiones. En este caso puede observarse cómo al realizar el contacto, los tejidos del molusco se contraen originando una invaginación (fot. 1) que se observa, igualmente, en el punto de penetración, cuando se realiza a través de los surcos del pie.

#### Histopatología

En los primeros cinco minutos de infestación, encontramos larvas parcialmente introducidas (fot. 2). Durante el momento de la penetración la larva inserta su extremo anterior a través de las células epiteliales, provocando en principio una destrucción del ribete ciliado y posteriormente destrucción de las células epiteliales, puesto que en las vecindades del extremo de la larva introducida, existen detritus celulares, lo que origina una solución de continuidad ocupado por la misma. Dada la pequeña cantidad de detritus celulares

existentes, creemos que en la penetración se combinan dos factores: uno mecánico con destrucción celular, y otro de tipo enzimático. La larva segregaría algún material encargado de disolver el cemento intercelular, creando una solución de continuidad a través de la cual realizaría la penetración, total. Aboga en favor de esta última tesis el hecho de que el epitelio de la zona próxima al punto de penetración, presenta una mayor estratificación y las células han perdido su polaridad, como si las que estaban localizadas en el punto de penetración se hubiesen introducido entre las más cercanas.

Una vez que la larva ha penetrado, el orificio debe obstruirse simultáneamente por contracción de los tejidos del molusco, ya que en ningún momento hemos observado lesiones epiteliales consecutivas a la penetración de la larva.

A los cinco minutos de la infestación experimental, hemos encontrado larvas totalmente introducidas (fot. 3). En todas las series de experiencias realizadas por nosotros, hemos observado que la implantación en este momento de la infestación, se hace inmediatamente debajo de la membrana basal del epitelio, localizándose, la larva, entre las células secretoras muy abundantes en esta zona. En ocasiones, la localización es tan inmediata a la lámina basal, que ésta queda ligeramente rechazada.

La disposición de la larva es en general enrollada, si bien no es raro encontrar secciones con la larva sin enrollar; aparece rodeada de un halo claro, llamada en otro tipo de infestaciones experimentales «zona de lisis» (CHANDRA RAO, 1966). Nosotros, de acuerdo con ESCUDERO (op. cit.), consideramos que no se trata de lisis celular (fot. 4), sino que el espacio claro se debe a la contracción de las estructuras orgánicas del molusco. Los tejidos que rodean a las larvas I, son en general células secretoras, pero en la zona en contacto con el espacio claro, puede observarse cómo las células, que ofrecen la característica de los fibroblastos, se disponen a modo de cápsula originando una especie de barrera que aísla a la larva del resto de los tejidos del molusco. Por otra parte no hemos encontrado ninguna otra alteración, lo que demuestra que, al menos en los primeros períodos de larva es perfectamente tolerada por los tejidos del hospedador.

A los 30 minutos de la infestación experimental, las larvas aparecen localizadas en el tejido conjuntivo-muscular, a poca distancia del epitelio. La forma adoptada por la misma, ofrece gran variabilidad, ya que junto a larvas totalmente estiradas, encontramos otras enrolladas o semienrolladas.

La reacción tisular, en este momento de la infestación, es muy semejante a la que observábamos a los 5 minutos. La larva se rodea del espacio claro que a su vez ofrece una tenue valla de fibroblastos.

En la serie de cortes observados, hemos visto larvas en posición subepitelial, que carecían del espacio claro, pero que estaban rodeadas de un cortejo de fibroblastos y otras células de pequeño tamaño que identificamos como amebocitos. Estas células no sólo rodean la larva sino que se extienden hacia

el epitelio como indicando el camino seguido por la misma en su penetración (fot. 5). El epitelio, en el punto en que contacta con la esfera celular anteriormente indicada, ofrece en el polo apical de sus células, una mayor apetencia por los colorantes básicos. Esta forma de reacción tisular, parece indicar que la larva tiene muy pocas posibilidades de evolucionar y por el contrario, que su acción será neutralizada por las defensas orgánicas del hospedador.

A la primera hora después de la infestación experimental, no hemos observado ninguna diferencia estructural sustancial. Las larvas en posición subepitelial, continúan rodeadas por el espacio claro, el cual, exteriormente se rodea de un pequeño número de fibroblastos. En estas formaciones larvarias y con el empleo de la fucsina ácida de Van Gieson, hemos detectado un intento de encapsulación, caracterizado por la presencia de fibras colágenas que se disponen alrededor de la larva: estas fibras aparecen jaladas por fibroblastos (fot. 25).

Debido al poco tiempo transcurrido desde el inicio de la infestación experimental, consideramos que las fibras colágenas que rodean a la larva no se han formado «ex novo», sino que representarían fibras preexistentes en las vecindades del parásito.

Algunas de las larvas carecen del espacio claro, no observándose, alrededor de ellas, ninguna reacción tisular.

A las dos horas, hemos observado alrededor de las larvas, una mayor afluencia de fibroblastos, que se disponen constituyendo un verdadero nódulo. Los fibroblastos aparecen con sus expansiones retraídas, adoptando en conjunto una disposición epitelioides, con el citoplasma claro; por toda formación nodular, existen detritus celulares de aspecto pulverulento, y pequeñas cantidades de un pigmento marrón, el cual aparece también con frecuencia en el citoplasma de los fibroblastos, creemos que este tipo de reacción tiene como consecuencia impedir el desarrollo de la larva.

Por el contrario, en este mismo período de infestación, hemos encontrado larvas que no presentaban reacción alguna en el lugar de implantación, e incluso carecían del espacio claro es decir, son larvas perfectamente toleradas por los tejidos del hospedador.

A las 10 horas de la infestación experimental, existe alrededor de algunas larvas, un proceso de encapsulación fibroblástica. La larva, sin límites precisos con los tejidos del hospedador, por la ausencia del espacio claro, se rodea de capas más o menos concéntricas de fibroblastos. Esta cápsula exteriormente está protegida por una capa de células mucosas.

Los fibroblastos han perdido la disposición epitelioides que observábamos en infestaciones más reciente. El número y la densidad celular son mayores, por lo que los límites de la membrana del fibroblasto son difíciles de identificar, siendo por el contrario claramente perceptible sus núcleos (foto 6).

Seguimos insistiendo en que posiblemente, estas larvas no lleguen nunca



a adquirir la madurez, y por el contrario sean destruidas por mecanismos de defensa de los tejidos del molusco.

En las distintas series estudiadas histológicamente, hemos encontrado siempre la misma disposición nodular. En lugares en donde el conectivo-muscular es más laxo, se evidencian más claramente la presencia del nódulo parasitario con su cortejo de fibroblastos, como expresión de una reacción orgánica (foto 7).

En aquellas zonas del pie en las que existe un mayor número de células mucosas, la presencia del parásito provoca una destrucción de las mismas y en este período de infestación son sustituidas, por la formación de la cápsula fibroblástica, observándose en estas circunstancias, una disposición concéntrica de gran uniformidad (foto 8).

A las 24 horas después de la infestación experimental, el nódulo parasitario sigue evolucionando. Existen larvas rodeadas de fibroblastos, cuya disposición va siendo cada vez más ordenada, constituyendo capas concéntricas que originan en conjunto una formación nodular, que aísla perfectamente la larva del resto del tejido conjuntivo-muscular del pie del molusco (foto 9).

Por el contrario, encontramos larvas normalmente estructuradas, que siguen manteniendo las mismas características reaccionales con los tejidos del hospedador, que encontrábamos en los primeros estadios de la infestación experimental, es decir, conservan el espacio claro, si bien ligeramente disminuido, pero sin reacción tisular alguna. Esto, corrobora nuestra tesis, respecto a que aquellas larvas con gran reacción tisular no llegan a alcanzar la madurez que alcanzarán aquellas que son perfectamente toleradas por el molusco.

En otras experiencias realizadas y observadas en el mismo período de infestación, observamos nódulos parasitarios, en los cuales es posible apreciar la existencia de alteraciones de la propia larva, fundamentalmente en aumento de la basofilia, de las células que constituyen el segmento intestinal. En general estas células aparecen con el núcleo fuertemente picnótico, con las características semejantes a estructuras con necrosis inicial.

A los 2 días, existen larvas en perfecto estado de desarrollo, con una discreta reacción tisular. La reacción consiste en una mayor afluencia de células conjuntivas que se condensan alrededor de la larva, sin que hayamos podido sorprender disposición nodular alguna; dichas células conjuntivas contactan íntimamente con la larva, ya que en general en este período de infestación ha desaparecido la zona clara.

Al lado de este tipo de larvas, caracterizadas por la escasa reacción tisular, encontramos otras que siguen parcialmente conservando el espacio y sin reacción alguna.

Las larvas que consideramos en regresión, a medida que avanza el tiempo de infestación, no solamente presentan modificaciones de la cápsula reaccional, sino también del propio parásito. El nódulo larvario aparece perfecta-

mente formado, con la disposición típica concéntrica de los fibroblastos; exteriormente se rodea de una cápsula fibrosa delgada, demostrable por tinciones específicas, así como es típica la presencia de pequeñas cantidades de un pigmento marrón, extremo este último observado por distintos autores en otro tipo de infestaciones. ESCUDERO (op. cit.) lo observó en *Lymnaea truncatula* infestada con miracidios de *Fasciola hepatica*. La larva, ofrece únicamente el revestimiento externo, apareciendo en los preparados histológicos la porción interna, óptimamente vacía.

La localización de las larvas en este período de infestación es la misma que en los primeros minutos, lo que demuestra que las larvas no emigran, desarrollándose en el mismo lugar de penetración.

A los cuatro días, encontramos larvas que no han sufrido ninguna modificación estructural, ofreciendo tanto esta última como los tejidos del molusco que le rodean, aspecto semejante al de los primeros momentos de la infestación.

Igualmente existen larvas que sin presentar reacción tisular alguna, no presentan espacio claro, de tal manera que la larva y tejidos del molusco se continúan de forma insensible, siendo a veces difícil la identificación de la primera.

Debido a la escasa infestación en las experiencias realizadas en este tiempo, no hemos encontrado larvas rodeadas por una importante reacción conjuntiva, lo que parece demostrar que en pequeñas infestaciones, las larvas son mejor toleradas por los tejidos del hospedador que cuando penetran mayor número de ellas.

A los 7 días, encontramos larvas en localización subepitelial, las cuales conservan las mismas características estructurales que las encontradas en infestaciones más tempranas. En general, y en este período de infestación, observamos que las larvas aparecen rodeadas por el espacio claro sin reacción tisular por parte de los tejidos del molusco.

En algunos casos hemos advertido, en larvas rodeadas del espacio claro, la existencia de una tenue cápsula conjuntiva, constituida por escaso número de fibras, que no hacen más que marcar los límites existentes entre la larva y los tejidos sanos del hospedador. Finalmente, y en contadas ocasiones, existe algún fibroblasto entre las fibras, pero siempre y en este momento de la infestación experimental, la escasa o falta reacción tisular constituye el denominador común.

No hemos encontrado ninguna larva en regresión, como con frecuencia encontramos en experiencias anteriores. Hay que hacer constancia, de que en esta fase de experimentación, el número de larvas halladas, ha sido pequeño, por lo que suponemos que la falta de reacción tisular es debida al número de larvas y que dicha reacción por parte de los tejidos del hospedador únicamente se pone en marcha cuando existen infestaciones masivas.

A los 10 días después de la infestación experimental y en las distintas experiencias realizadas, hemos encontrado en la casi totalidad de las larvas, la existencia de una cápsula fibroblástica reaccional, que juntamente con la larva constituye el nódulo parasitario, y que en experiencias anteriores señalábamos como pertenecientes a larvas en regresión. Sin embargo, hay que destacar ligeras modificaciones a través de los 10 días de infestación. El nódulo de forma esférica, ha aumentado de tamaño, los fibroblastos ya no se disponen de forma tan regularmente concéntrica, como era característica en infestaciones más tempranas; aparecen íntimamente unidos entre sí, sin límites precisos, por lo que únicamente son identificados por su núcleo, el cual parece haber perdido cromatina, distribuyéndose en forma granular con lo que es posible advertir la existencia de un nucléolo central. Algunos nódulos parasitarios, en su porción externa, no presentan delimitación clara con los tejidos circundantes sanos del molusco, continuándose con ellos de una manera insensible. Otras veces, principalmente si el nódulo parasitario está localizado en una zona del pie constituida por un tejido conjuntivo-muscular laxo, se delimita por medio de una zona clara pobre en células. Por último, en zonas donde existe gran cantidad de células mucosas, el nódulo se rodea por una capa de este tipo de células.

Las estructuras y morfología del nódulo verminoso es clara y precisa en zonas del pie donde no existe gran afluencia celular. La larva se rodea de fibroblastos, adoptando una disposición esférica perfectamente delimitada por los tejidos circundantes (foto 11); de tal manera, que en aquellas reacciones donde no ha sido interesada la larva, se sospecha la existencia del nódulo parasitario por la desaparición de la normal arquitectura de los tejidos del molusco y la sustitución por un tejido de granulación cuyas células adoptan una disposición epiteloide.

Con métodos apropiados se observa en los nódulos parasitarios, la existencia, entre las células, de fibras conjuntivas que llevan en general una disposición concéntrica a la larva. estas fibras conjuntivas se condensan en la parte periférica constituyendo una tenue cápsula limitante, fibras conjuntivas que consideramos formadas «ex novo» como resultado de la estimulación parasitaria.

Las larvas contenidas en el interior de los nódulos adoptan una morfología variada, unas veces se rodean del espacio claro característico sin que parezca que existan procesos alterativos de sus células; otras veces presentan claros signos alterativos que consisten en la retracción de los tejidos de la larva, por lo que el espacio claro es más amplio, así como pérdida de la basofilia del citoplasma de las células que toman una reacción ligeramente acidófila.

En la serie de infestaciones realizadas, hemos encontrado también pequeño número de larvas sin reacción tisular, presentando prácticamente las mismas características morfológicas que encontramos en períodos más recién-

tes. Algunas veces se rodea, la larva de un pequeño cortejo de fibroblastos pero sin llegar a tomar la disposición típica del nódulo parasitario. Se trataría de un comienzo de encapsulación fibroblástica diferido.

Las larvas, en este momento de la infestación siguen ofreciendo una localización subepitelial, no realizan ningún tipo de emigración. Los nódulos parasitarios localizados inmediatamente por debajo de la lámina basal del epitelio, provocan una elevación del revestimiento epitelial que les recubre a modo de cúpula (foto 12). En cortes paralelos a la superficie del pie, es posible comprobar que la porción anterior y posterior, sobre todo en aquellos cortes que interesan la cavidad general del cuerpo.

Las larvas que no ofrecen signos degenerativos de sus estructuras, ofrecen en este momento de la infestación experimental una doble cutícula.

A los 12 días los nódulos parasitarios ofrecen las mismas características estructurales que encontramos a los 10 días postinfestación. Las larvas no parecen haber sufrido alteración alguna y por otra parte no existen modificaciones en su evolución.

Una característica diferencial que observamos en este período de la infestación experimental es la falta de delimitación de los nódulos; la larva con su cápsula fibroblástica, se continúa insensiblemente con los tejidos sanos del molusco. Esta forma de reacción posiblemente sea propia de infestaciones con pequeño número de larvas penetradas, como hemos podido comprobar mediante los estudios histológicos. En otra ocasión hemos apuntado que el mayor número de larvas existentes en los tejidos del caracol pueden condicionar la puesta en marcha e intensidad de las defensas orgánicas.

Como en ocasiones anteriores, en este momento de las experiencias, hemos encontrado larvas que no presentaban ninguna reacción tisular por parte del hospedador.

A los 14 días observamos un comportamiento distinto de las larvas que asientan en el pie del molusco.

En primer lugar existen nódulos en los cuales no se ha interesado la larva en el corte. Estos nódulos están constituidos por un acúmulo irregular de fibroblastos que han perdido totalmente la disposición concéntrica adoptando el aspecto granulomatoso; además de la falta de ordenación de las células, se observan pequeños espacios claros debido a que las células ya no se unen apretadamente sino que lo hacen de manera más laxa. Exteriormente el nódulo se rodea de una cápsula conjuntiva perfectamente constituida que separa a esta estructura del resto de los tejidos del molusco.

En aquellos nódulos parasitarios que interesan la larva en el corte, el comportamiento de la misma difiere de las experiencias anteriores, la larva, que en todo momento la habíamos encontrado en el centro del nódulo parasitario, ha sufrido un claro desplazamiento hacia la parte externa del mismo, quedando en relación con la cápsula conjuntiva.



Las células mensenquimales quedan regularmente concentradas en uno de los polos, de tal forma que la larva, que en este momento se vuelve a rodear de un espacio claro muy evidente, no presenta acúmulo de fibroblastos en el punto de contacto con la cápsula conjuntiva. En un principio pensamos que tal disposición fuera debido a la dirección tangencial del corte, esto no es posible porque la serie de experiencias realizadas con presencia de gran cantidad de larvas en los tejidos del molusco, casi la totalidad, ofrecían esta disposición.

Por último, igual que en experiencias anteriores, hemos encontrado abundantes larvas que no presentan ninguna reacción fibroblástica o es muy escasa. La larva, en este caso ofrece una estructura normal, sin que hayamos encontrado ningún tipo de proceso regresivo. En este período de infestación hemos sorprendido que la cutícula externa, de la mayoría de las larvas era más gruesa que en infestaciones precedentes, lo que nos lleva a la conclusión de que se están preparando para su transformación en larvas de tipo II.

A los 16 días postinfestación, el nódulo parasitario no parece haber experimentado ninguna evolución; presenta las mismas características que observamos a los 14 días.

En esta fase de la experiencia, hemos encontrado cantidad de larvas de localización tan subepitelial, que el tejido de granulación del nódulo larvario destruye el propio epitelio. En aquellos casos en los que existen dos larvas próximas, pueden verse cómo el tejido de granulación de ambas, se funde constituyendo un sólo nódulo de forma irregular.

Una característica que no habíamos observado anteriormente con relación al espacio claro que rodea a la larva en este momento de la infestación, consiste en la condensación de elementos conjuntivos para constituir una especie de cápsula, de tal manera que el parásito queda de esta forma como aislado del tejido de granulación.

Igualmente que en experiencias anteriores seguimos encontrando larvas con ninguna o escasa reacción fibroblástica.

La larva, en este momento de la experiencia ha aumentado ligeramente de volumen, advirtiéndose una doble cutícula aunque no muy evidente, recubriendo la porción externa de la misma (foto 13).

La reacción fibroblástica, no se limita exclusivamente alrededor de la larva. En aquellas que se disponen enroscadas en forma de corona, el tejido de granulación invade igualmente la porción central de la corona.

En esta fase de la infestación hemos encontrado escasos nódulos parasitarios en localización lateral del pie; el nódulo no ofrece más características, que la presencia alrededor de la cápsula externa, de un tipo especial de células. Son células grandes de citoplasma claro, con núcleo pequeño, picnótico y de localización tan periférica que provoca una ligera prominencia de la membrana; en conjunto, toma el aspecto de células en anillo de sello, estructura típica de las células vacuoladas. Posiblemente se trata de los mismos fibro-

blastos del tejido conjuntivo del pie que debido a trastornos metabólicos inducidos por el parásito han acumulado sustancias en el interior del citoplasma (foto 14). Este proceso ya había sido observado alrededor de las formaciones larvarias de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea truncatula* por ESCUDERO (op. cit.).

A los 18 días después de la infestación experimental, hemos encontrado escasas estructuras diferenciales con respecto a los hallados en días precedentes.

Toda la serie de cortes de varios pies de moluscos en este momento de la infestación, presentan en posición subepitelial y en porciones anterior y posterior del mismo, gran cantidad de nódulos larvarios; estos aparecen perfectamente formados, y en general delimitados por una cápsula conjuntiva, del resto de los tejidos sanos del molusco. Las células que constituyen el tejido de granulación aparecen con disposición cada vez más laxa e irregular dando lugar a que aparezcan espacios claros más o menos amplios (fotos 15 y 27). Los nódulos que tienen su asiento sobre el conjuntivo muscular laxo, la disposición del nódulo parasitario sigue ofreciendo una disposición compacta de las células y perfecta delimitación.

Las larvas incluidas en el interior del tejido de granulación no sufren proceso regresivo alguno, por el contrario puede observar la lenta evolución siendo cada vez más clara la existencia de la doble cutícula (foto 16). Igual que en infestaciones anteriores la larva no se sitúa en el centro del tejido de granulación sino que lo hace totalmente en posición periférica.

En este momento de la infestación hemos encontrado igual que en días anteriores, larvas sin ninguna o escasa reacción de los tejidos circundantes; en este último caso, el tejido de granulación se continúa con los del hospedador sin la existencia de una cápsula conjuntiva.

A los 20 días, el nódulo larvario no parece haber sufrido ninguna modificación sustancial. Sigue siendo de localización subepitelial; la larva está rodeada del espacio claro y todo ello circundado por células de aspecto epitelial, con una capa externa más espesa a modo de cápsula limitante.

Con respecto a la larva, observamos en este momento de infestación que se trata de una larva III por la existencia de tres capas anhistas, sin estructura, de las cuales las dos más externas aparecen frecuentemente separadas del cuerpo del parásito (foto 17).

En aquellos moluscos en los cuales hemos sorprendido infestaciones masivas, los nódulos larvarios aparecen independientes y las células que constituyen la cápsula fibroblástica, adoptan una disposición concéntrica, adoptando en conjunto la forma de bulbo de cebolla.

A los 24 días, sigue sin apreciarse cambios importantes, tanto en la forma como en la estructura del nódulo larvario. Sin embargo, en este momento de la infestación, es fácil identificar a la larva como III, por la existencia de tres

capas que la recubren exteriormente (foto 18). Estas capas son PAS positivas, al ser teñidas con el ácido periódico de Schiff.

A los 24 días, no han sido observados cambios importantes en la estructura del nódulo larvario. Con el crecimiento de la larva, los referidos nódulos aumentan sensiblemente de tamaño; los fibroblastos se disponen de manera más o menos compacta. Todo ello se delimita exteriormente por una cápsula de aspecto conjuntivo (fotos 19, 20 y 29).

En aquellos cortes, en los cuales la larva aparece en corte longitudinal, es evidente la existencia de las tres cutículas correspondientes a la larva III.

En otras experiencias realizadas en este mismo momento de infestación, hemos encontrado larvas que han penetrado más profundamente y apenas si se observa reacción tisular por parte de los tejidos del molusco. Exteriormente se rodean por una condensación del conjuntivo-muscular, sin que se aprecie la existencia de fibras conjuntivas constituyendo una verdadera cápsula. Sin embargo, con métodos de impregnación argéntica se aprecia que el nódulo parasitario está perfectamente delimitado por una delgada capa de fibras reticulares.

A los 30 días postinfestación el nódulo parasitario sigue sin sufrir ninguna modificación aparente. Es de destacar la perfecta delimitación del mismo, de los tejidos sanos del molusco.

Las células que circundan a la larva, para constituir la cápsula fibroblástica, aparecen unidas unas a otras; la forma de las mismas es variable ya que existen células de forma estrellada, esféricas y poliédricas por presiones recíprocas, en este último caso, morfológicamente, presentan las características estructurales de los fibroblastos, si bien en esta fase de infestación aparecen con el citoplasma claro, siendo bien perceptibles los límites celulares. El nódulo ha empobrecido en cromatina y ostenta uno o dos nucléolos muy evidentes. En algunos nódulos parasitarios hemos observado con alguna frecuencia la existencia de células binucleadas, seguramente por división endomitótica del núcleo sin la correspondiente escisión del citoplasma (foto 21).

La larva, sigue manteniendo la tendencia a localizarse en la porción periférica del nódulo parasitario.

La localización de los nódulos parasitarios dentro del pie del caracol, sigue siendo subepidérmica, y en general en estrecha relación con el borde dermoepidérmico, lo que demuestra que durante los 30 primeros días después de la infestación experimental, la larva no ha realizado movimiento alguno. En infestaciones masivas, los nódulos están perfectamente constituidos y delimitados de los tejidos sanos, ofreciendo en su estructura la presencia de células de pequeño tamaño que identificamos como amebocitos dispersos entre los fibroblastos que se disponen más o menos concéntricamente.

A los 32 días, no se observa ninguna diferencia con relación a las características observadas a los 30 días.

A los 36 días igual que en experiencias anteriores, no existen modificaciones aparentes tanto en el nódulo larvario como en los tejidos circundantes.

A los 40 días, el nódulo larvario sigue estabilizado, su forma es en general perfectamente esférica; la larva en situación central o periférica, la zona clara que rodea a la misma es menos amplia que en fases anteriores de infestación y el tejido de granulación que rodea a la larva ofrece la disposición epitelioides típica. En algunas ocasiones es frecuente observar alguna célula pigmentaria en zonas externas del nódulo. La separación del nódulo larvario del resto de los tejidos del molusco es clara, sin que se advierta alteración alguna por parte de estas últimas estructuras. Exteriormente, algunas cápsulas fibroblásticas se condensan, en un intento de encapsulación fibrosa (foto 22).

A los 50 días, el nódulo larvario parece haber sufrido serias modificaciones. La larva está rodeada de células mesenquimales en disposición muy laxa, de tal manera, que exteriormente se continúan insensiblemente con los tejidos sanos del molusco, sin existir límite alguno como observábamos en otros períodos de infestación. A mayor abundancia, hemos encontrado larvas que parecen estar alojadas en tejidos del molusco perfectamente sanos.

La localización de la larva sigue siendo la misma que hallábamos en los primeros estadios de la infestación. Después de la penetración no sufre ningún tipo de desplazamiento.

A los 60 días, hemos encontrado nódulos larvarios de distinta constitución. Indudablemente, no todas las larvas que penetran por el pie del caracol, sufren el proceso evolutivo normal; en algunos casos, éstas, por determinadas circunstancias, son enquistadas sufriendo posteriormente un proceso de calcificación, la larva aparece rodeada por una verdadera cápsula conjuntiva, acidófila, espesa, en cuyo interior se encuentra la larva sin estructura, con aumento de la basofilia de sus tejidos y en vías de calcificación distrófica (foto 23).

Por el contrario, aquellas larvas ya evolucionadas, lo mismo que en la experiencia anterior, llama la atención las grandes modificaciones sufridas por el nódulo larvario. La larva, está alojada en un espacio claro, labrado en el seno de los tejidos del molusco; no existen ya, células mesenquimales rodeándola y la línea de demarcación entre la larva y los tejidos sanos, es apenas imperceptible, traduciéndose por una disposición en empalizada que adoptan las células en contacto con la misma. La larva aparece perfectamente estructurada sin que se observe en ningún momento proceso de tipo alterativo en las mismas.

A los 100 días, los nódulos larvarios evolucionados siguen en la misma situación que observábamos en la experiencia anterior.

A los 120 días, la modificación más aparente observada, consiste en la desaparición del tejido de granulación que rodea a la larva. En este momento de infestación, la larva normalmente estructurada se rodea de un gran espacio



claro que se continúa insensiblemente con los tejidos del molusco, los cuales morfológicamente no ofrecen alteración alguna (foto 24).

En otras series de preparaciones examinadas en el mismo período de infestación observamos, que a pesar de lo indicado en el párrafo anterior, la persistencia del tejido de granulación se mantiene en alguno de los nódulos, si bien la separación con los tejidos del molusco no es tan patente como en infestaciones precedentes.

La localización del parásito sigue siendo la primitiva, y cuando está localizado inmediatamente debajo del borde-epidérmico, la dermis se evagina y rodea al nódulo larvario a manera de cúpula.

Con distintas técnicas de tinción se observa cómo van desapareciendo las células del tejido de granulación del nódulo larvario, hasta quedar las larvas inmersas en un espacio vacío. En un estudio anterior se apreciaba que las células van disolviéndose quedando sólo pequeños grupos entre las fibras conjuntivas que partiendo de la zona periférica del nódulo se dirigen hacia el interior. El nódulo larvario en estas condiciones se rodea y aísla de los tejidos sanos del molusco por una delgada capa constituida de elementos conjuntivos (foto 39). A los 150 días, se observa la total disolución del tejido de granulación quedando la larva entre los tejidos morfológicamente sanos del molusco.

En el curso de nuestras experiencias, hemos observado que las dos especies de moluscos, *Cerquaria (Xeromagna) cespitum arizonis* y *Cerquaria (C) virgata*, no sólo ofrecen la misma estructura histológica del epitelio y tejido conjuntivo muscular del pie, sino que el comportamiento frente a la infestación por larvas de *Neostongylus linearis*, es semejante, motivo por el cual no se especifican las reacciones de cada molusco independientemente, con el fin de evitar repeticiones.

Aceptando los tipos de infestación señalados por HITIER (op. cit.) se infestan de modo pasivo, las larvas penetran activamente a través del epitelio de revestimiento externo del pie del molusco.

La edad de los caracoles no influyó en la mayor o menor tasa de infestación ya que el número de larvas albergadas en el organismo de ejemplares jóvenes ha sido semejante a las de los de mayor tamaño. Aunque sin duda, el papel epizootológico alcanza mayor significado en el caso de los primeros, que por tener pequeño tamaño y concha más frágil, pueden ser más fácilmente ingeridos junto con el alimento por el hospedador definitivo.

En general, los moluscos infestados no mostraron signos externos que evidenciaran su estado, únicamente cuando concurrieron en un mismo espécimen las características de poseer una región plantar blanquecina y una fuerte infestación, se podía observar macroscópicamente a través de la suela unos diminutos puntos de tonos grisáceos correspondientes a los nódulos parasitarios.

El porcentaje de muertes espontáneas de los especímenes infestados

experimentalmente, superó en un 4,8 % al de los testigos, observándose que el mayor número de bajas ocurrieron en los primeros seis días de infestación.

No hemos comprobado la existencia de larvas III en el interior de los cristalizadores donde se colocaron los ejemplares infestados para su sacrificio, así como tampoco se ha observado en los estudios microscópicos de cortes, señales que evidencien que las larvas, abandonen a sus hospedadores intermediarios (MARTÍNEZ MORALES, 1967).

No existen diferencias significativas entre el crecimiento de los moluscos infestados y el de los testigos, según los resultados obtenidos mediante el análisis de «t» de Student, aplicado a los datos del cuadro II. Lógicamente, por la localización de las larvas, no se presenta el gigantismo señalado para otros hospedadores intermediarios de trematodos, cuyas fases larvarias al alojarse en las gónadas provocarían castración parasitaria (GARNAUL, 1889).

La infestación experimental se realiza por vía percutánea, localizándose las larvas, en el tejido conjuntivo muscular subepitelial del pie, sin que ejecuten tipo alguno de emigración durante los períodos de infestación estudiados.

Las larvas una vez localizadas en el interior de los moluscos, provocan varios tipos de reacción tisular; o bien reacciones mínimas con perfecta tolerancia de la larva, la cual en períodos sucesivos sufrirá un proceso evolutivo hasta alcanzar el estado infestante, o reacciones de tipo fibroblástico con distintos grados de evolución a medida que transcurre el tiempo de infestación. En este último caso, la reacción fibroblástica, expresión defensiva del organismo del hospedador frente al huésped, puede ocasionar la muerte y destrucción de este último, o por el contrario, a pesar de la reacción fibroblástica continuar su evolución.

En las primeras horas después de la infestación experimental, aquellas larvas que van a provocar una reacción defensiva, se rodean de una capa constituida por fibroblastos; exteriormente esta capa se limita por haces de fibras colágenas, no se han formado «ex novo», ya que creemos son fibras preexistentes en las vecindades de la larva que al aproximarse dan la impresión de un inicio de reacción conjuntiva fibrosa.

A medida que avanza el período de infestación, va haciéndose más patente la formación de una verdadera cápsula fibroblástica, cuyas células adoptan una disposición epitelioides y se colocan concéntricamente a la larva, originando en conjunto una disposición nodular. En esta situación, las larvas en regresión que no alcanzarán su estado evolutivo, ofrecen signos degenerativos.

A los 14 días postinfestación, la reacción fibroblástica es intensa y exteriormente, el nódulo larvario, se rodea de una capa de fibras colágenas de formación «ex novo», como resultado de la estimulación parasitaria. Las larvas vivas ofrecen en este período de infestación, una doble cutícula; se han

transformado en larvas II. Por el contrario, las larvas de regresión, además de las alteraciones estructurales, están retraídas y se disponen excéntricamente en la porción interna del nódulo larvario.

Posteriormente, las células que constituyen la cápsula fibroblástica y que adoptan disposiciones epitelioides, van separándose dejando entre ellas espacios claros, que contienen fibras argirófilas. A los 20 días postinfestación las larvas evolucionadas ofrecen una triple cutícula.

A partir de los 60 días postinfestación, las larvas infestantes ofrecen escasa reacción fibroblástica; a la disposición laxa de los fibroblastos sucede la disolución o emigración de los mismos. Sin embargo, en larvas destruidas, encontramos una intensa reacción fibroblástica así como un intento de calcificación distrófica.

En los últimos períodos las larvas se encuentran, indistintamente, en el seno de tejidos aparentemente sanos del molusco, o rodeados de una ligera reacción fibroblástica.

## 5. CONCLUSIONES

1) *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y *Cerneuella (C) virgata*, ofrecen las mismas características reaccionales frente a la infestación experimental por larvas I de *Neostromylus linearis*.

2) Durante la penetración, las larvas destruyen en principio el ribete ciliado de las células epiteliales del pie del molusco y posteriormente las propias células, localizándose en el tejido conjuntivo muscular subepitelial, sin emigración posterior. El orificio epitelial se obstruye una vez concluida la total penetración por la contracción de los tejidos del molusco.

3) Los procesos reaccionales de los tejidos del molusco frente a la acción lesiva de las larvas, ofrecen a lo largo de nuestras experiencias distinta intensidad, que varía desde reacciones mínimas con formación exclusiva de un halo claro alrededor de la larva, hasta la existencia de una *cápsula fibroblástica*.

4) Las larvas que provocan pequeñas reacciones tisulares evolucionan transformándose en larva II a los 14-16 días y alcanzando el tercer estadio a los 18-20.

5) Las larvas que provocan la formación a su alrededor de una cápsula fibroblástica, unas evolucionan normalmente hasta alcanzar la fase infestante y otras por el contrario son destruidas.

6) La cápsula que rodea a las larvas que ofrecen un proceso evolutivo normal, está constituida por fibroblastos que adoptan disposición epitelioides y concéntrica alrededor de la larva. Entre los fibroblastos existe pequeña cantidad de fibras argirófilas. Exteriormente la cápsula fibroblástica se rodea de

una capa fina de fibras colágenas. A medida que avanza el tiempo de infestación, se produce gradualmente la disolución de la cápsula, para finalmente y ya en fase de larva III, rodearse por tejidos del molusco, aparentemente sanos, o por una ligera reacción de fibroblastos.

7) Las larvas en regresión siguen conservando su cápsula fibroblástica y en los últimos períodos de la infestación existe un intento de calcificación distrófica.

## 6. RESUMEN

Con el fin de estudiar las reacciones histológicas de los moluscos *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y *C. (C) virgata*, ante la parasitación experimental de *Neostromylus linearis*, (uno de los Protostrongylinae causantes de las bronconeumonías ovinas en la región leonesa) inicialmente se revisa la bibliografía mundial dedicada a la morfo-eco-biología y sistemática de los moluscos estudiados, así como de la metodología de infestación y de cultivo de los hospedadores intermediarios. Seguidamente, tras determinar las especies de moluscos seleccionados, se lleva a efecto la infestación experimental de los mismos, utilizando el método de KASSAI, a veces, ligeramente modificado, debido a los condicionamientos específicos, del momento de la infestación y de los fines perseguidos en la experiencia.

Los especímenes se sacrificaron al cabo de períodos de infestación comprendidos entre los 30 segundos y los 150 días, fueron incluidos en bloques de parafina, y seccionados en cortes seriados de 8-10 micras de espesor.

El examen al microscopio óptico, de los cortes histológicos demostró que:

a) Durante la penetración, las larvas destruyen en principio el ribete ciliado de las células epiteliales del pie del molusco y posteriormente las propias células, localizándose en el tejido conjuntivo muscular subepitelial, sin emigración posterior. El orificio epitelial se obstruye una vez concluida la total penetración por la contracción de los tejidos del molusco.

b) Los procesos reaccionales de los tejidos del molusco frente a la acción lesiva de las larvas, ofrecen a lo largo de nuestras experiencias distinta intensidad, que varía desde reacciones mínimas con formación exclusiva de un halo claro alrededor de la larva, hasta la existencia de una *cápsula fibroblástica*.

c) Las larvas que provocan ligeras reacciones tisulares evolucionan transformándose en larva II a los 14-16 días y alcanzando el tercer estadio a los 18-20.

d) Las larvas que provocan la formación, a su alrededor de una cápsula fibroblástica, unas evolucionan hasta alcanzar la fase infestante y otras, por el contrario, son destruidas.



e) La cápsula que rodea a las larvas que ofrecen un proceso evolutivo normal, está constituida por fibroblastos que adoptan disposición epiteloide y concéntrica alrededor de la larva. Entre los fibroblastos existe pequeña cantidad de fibras argirófilas. Exteriormente la cápsula fibroblástica se rodea de una fina capa de fibras colágenas. A medida que avanza el período de infestación, se produce gradualmente la disolución de la cápsula, para finalmente y ya en fase III, rodearse por tejidos del molusco, aparentemente sanos, o por una ligera reacción de fibroblastos.

f) Las larvas en regresión son poco numerosas, siguen conservando su cápsula fibroblástica y en los últimos períodos de infestación existe un intento de calcificación distrófica.

### RÉSUMÉ

A fin d'étudier les réactions histologiques des mollusques *Cernuella* (*Xeromagna*) *cespitum arigonis* et *C. (C) virgata* avec la parasitation expérimentale de *Neostromylus linearis* (l'un des Protostrongylineae qui causent les broncho-pneumonies ovines dans la province de León), nous avons révisé la littérature mondiale sur la morpho-eco-biologie et la systématique des mollusques étudiés, ainsi que celle de la méthodologie d'infestation et de culture des hôtes intermédiaires. Ensuite, après avoir déterminé les espèces des mollusques sélectionnés, on a effectué leur infestation expérimentale, en utilisant la méthode de KASSAI, quelquefois modifiée dû au conditionnement spécifique du moment de l'infestation et du but poursuivi dans l'expérience.

Les spécimens furent tués au bout des périodes de l'infestation comprises entre les 30 secondes et les 150 jours; ils furent mis dans des blocks de paraffine et sectionnés dans des coupures en séries de 8-10 microns d'épaisseur.

L'examen microscopique optique démontra que:

a) Pendant leur pénétration les larves détruisent, en principe, le bord cilié des cellules épithéliales du pied du mollusques, et après les cellules elles mêmes, se plaçant ensuite dans le tissu conjonctif musculaire sous-épithélial. L'orifice épithélial s'obstrue par la concentration des tissus du mollusque.

b) Les procès réactionnels des tissus du mollusque à l'action lésionnelle des larves ont une intensité différente tout le long de nos expériences; cette intensité varie dès réactions les plus petites qui forment exclusivement un halo bien défini autour de la larve, jusqu'à l'existence ou présence d'une capsule fibroblastique.

c) Les larves qui provoquent de légères réactions tissulaires évoluent et se transforment en larve II au 14-16 jours et atteignent leur troisième stade au 18-20 jours.

d) Quelques unes des larves qui provoquent la formation d'une capsule fibroblastique à leur alentour, évoluent jusqu'à atteindre la phase d'infestation, et d'autres, au contraire, sont détruites.

e) La capsule qui entoure les larves qui ont un procès évolutif normal est formée par des fibroblastes qui adoptent une position épithéliale et concentrique autour de la larve. Entre les fibroblastes il y a un petit nombre de fibres argirophiles. A l'extérieur, la capsule fibroblastique est entourée d'une mince couche de fibres collagènes. A mesure que la période d'infestation avance, la capsule se dissout graduellement et, finalement, une fois dans sa phase III, elle est entourée de tissus du mollusque, apparemment sains, ou d'une légère réaction de fibroblastes.

f) Les larves en regression sont peu nombreuses. Elles conservent toujours leur capsule fibroblastique, et dans les dernières périodes d'infestation il y a un essai de calcification disatrophisée.

### SUMMARY

In order to study the histological reactions of *Cernuella* (*Xeromagna*) *cespitum arigonis* and *C. (C) virgata* mollusks against the experimental parasitation of *Neostromylus linearis* (one of Protostrongylineae causing ovine broncho-pneumoniae in the province of León), we have firstly revised the word literature on morpho-eco-biology and systematics of mollusks studied, and also the systematic method of infestation and of culturing intermediate hosts. Then, after having determined the species of the mollusks selected, we have infested them experimentally by using KASSAI method, sometimes slightly modified due to the specific conditioning at the moment of infestation and to the purposes of the experiments.

The controls were killed after infestation periods between 30 seconds and 150 days, they were kept in paraffin blocks and sectionned in 8-10 microns-thick cuts.

The observation on optical microscope of histological cuts demonstrated that:

a) During their penetration the larvae destroy the ciliate edge of epithelial cells of mollusk podium and subsequently the cells themselves; then they settle in the sub-epithelial muscular conjunctive tissue. The epithelial opening is blocked by the contraction of mollusk tissues once the penetration of larvae is completed.

b) The reacting processes of mollusk tissues against the injurious action of larvae present or have a different intensity throughout our experiments; this intensity varies from minimum reactions forming exclusively a definite halo round the larva to the presence of a fibroblast capsule.

c) The larvae provoking slight tissue reactions develop and are transformed into larva II at 14-16 days and attain the 3rd stage at 18-20 days.

d) Some of the larvae provoking the formation of a fibroblast capsule round them can evolve until attaining the infestation phase, and others, on the contrary, are destroyed.

e) The capsule round the larvae having a normal evolutive process is formed by fibroblasts adopting an epithelial and concentric position round the larva. Between the fibroblasts there are some argyrophile fibers. The fibroblast capsule outside is surrounded by a thin coat of collagenic fibers. As the infestation period proceeds the capsule dissolves gradually and finally, when it is already in its stage III, it is surrounded by apparently healthy mollusk tissues or by a slight reaction of fibroblasts.

f) The larvae in regression —not very numerous— retain their fibroblast capsule and in the last infestation periods there is an attempt of a disatrophic calcification.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a los Profesores: doctor A. ESCUDERO DÍEZ, director de esta tesis, por su ayuda y consejo a lo largo de todo el trabajo y especialmente por la preparación del material fotográfico.

Doctor M. CORDERO DEL CAMPILLO, quien nos sugirió el tema, proporcionó el material técnico-parasitológico y supervisó el original.

Doctor P. GARCÍA PARTIDA, por sus valiosas sugerencias en la redacción del original, y por su desinteresado esfuerzo en la ultimación del mismo.

Doctor E. ZORITA TOMILLO y colaboradores, por las facilidades dadas para el alojamiento de animales experimentales.

Doctor A. SUÁREZ y SUÁREZ y colaboradores, por las facilidades otorgadas para el mecanografiado del texto.

Quiero agradecer también la ayuda prestada por los miembros del Departamento de Patología Infecciosa y Parasitaria, en especial, a la señorita Y. MANGA GONZÁLEZ, por su colaboración en la determinación de los moluscos y confección de dibujos.

Asimismo, expreso mi gratitud a mis alumnos que proporcionando un constante estímulo, han convertido el esfuerzo agotador, que he necesitado realizar para llevar a término este trabajo, en ligera y atractiva carga, muy especialmente, a los internos I. MENÉS ALVAREZ y V. GONZÁLEZ RODRÍGUEZ.

Señorita M.<sup>a</sup> L. CARCEDO GARCÍA, por su excelente trabajo mecanográfico.

Finalmente, mi sincero reconocimiento, a todas aquellas personas que por uno u otro motivo han cooperado en el logro de esta tesis.

#### 7. BIBLIOGRAFIA

- ADAM, W. (1960): *Fauna de Belgique, Mollusques Terrestres et Dulcicolus* Vol. 1. Insti. R. Scienc. Nat. Bel. Bruselas.
- AGERSBORG, H. P. K. (1924): Studies on the effect of parasitism upon tissues. 1. With special reference to gastropod molluscs *Q. Jl. microsc. Sci.* **68**: 361-401.
- ALTIMIRA, C., BALCELLS, R. (1972): Formas malacológicas del Alto Aragón occidental obtenidas en agosto de 1970 y junio de 1971. *Pirineos* **104**: 15-18. Jaca.

- ASH, L. R., (1970): Diagnostic morphology of the third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *A. vasorum Aelurostrongylus abstrusus* and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea) *J. Parasit.*, **56**: (2) 249-253.
- BABOS, S. (1961): Zur Kenntnis der Protostrongylinosen der Leporiden, unter besonderer Berücksichtigung der in Ungarn vorkommenden *Protostrongylus*-Arten. *Helminthologia*, **3**: 13-37.
- BAECKER, R. (1932): Die Micromorphologie von *Helix pomatia* und einigen anderen Stylomatophoren. *Erg. Ant. und Entwickl.*, **29**: 449-585.
- BASCH, P. F., LIE, K. J. & HEYNEMAN, F. (1969): Antagonistic interaction between and schistosome sporocysts within a snail host. *J. Parasit.* **55**: 753-758.
- BAYLIS, H. A. (1929): *Manual of Helminthology, medical and veterinary*. W. Wood and Co. London.
- BORCHERT, A. (1964): *Parasitologia Veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- BURCK, H. CH. (1969): *Técnica Histológica*. Ed. Paz Montalvo. Madrid.
- BURGER, H. J. (1961): *Zur wirtsspezifität der Protostrongyliden und Ankylostomen des Schafes*. Inaug. Diss., Hannover.
- CASTAÑOS FERNÁNDEZ, E. (1917): *Práctica de Historia Natural* (colección de claves dicotómicas para la clasificación de los tres reinos de la naturaleza).
- CASTILLO, J. DEL (1958): *Rôle des mollusques dans la transmissions des helminthoses des animaux domestiques*. Incidences étiologiques. Thesis. Lyon. 104. pp.
- CAPRON, A., BIGUET, J. VERNES, A. & AFGHAIN, D. (1968): Structure antigenique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol., Paris*. **16** (3/4): 121-138.
- CLYDE, J. (1965): *Observations on the Laboratory Rearing of Terrestrial Molluscs*. Department of Biology, Tulane University, New Orleans, Louisiana.
- COURDURIER, J. G. GUILLON, y MALARDE, L. (1967): Realisation du cycle *D'Angiostrongylus cantonensis* (CHEN). Au laboratoire. *Bull. Soc. Path. ex.* **2**: 165-173.
- COUTURIER, H. A. J. (1962): *Le bouquetin des Alpes «Capra aegagrus ibex ibex»* L. Grenoble. Francia.
- CHENG, T. y RIFKIN, E.: *A symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. SNIESZKO, S. F. Ed. Special Publ. No. 55. Am. Fish. Soc. Washington D. C.: 443-496.
- CHENG, T. C., SHUSTER, C. N., and ANDERSON, A. (1966): A comparative study of the susceptibility and response of eight species of marine pelecypods to the trematode *Himasthla quissetensis*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **85**: 284-295.
- CHENG, T. C., THAKUR, A. S. and RIFKIN (1970): Phagocytosis as an internal defense mechanism in the Mollusca: with an experimental study of the role of leucocytes in the removal of ink particles in *Littorina scabra* Linn. In Symposium on Mollusca. *Marine Biol. Assoc. India*: 517-546.
- CHROST, K. & DYK, V. (1968): *Neostongylus linearis* from mouflon in the woods of Vranov near Brno. *Folia parasit., zpraha*. **15** (2): 178.
- DAWES, B. (1959): Penetration on the liver-fluke, *Fasciola hepatica* into the snail *Limnaea truncatula* Nature. **184**: 1.334-1.335.
- DASKALOV, P. V. et al (1961a): Sur les nematodes pulmonaires des moutons en Bulgarie. *Izvest Tsentr. khelminth. Lab.*, **6**: 59-67.
- DAWTJAN, E. A. (1937): Kizuchoni u biologii legonochnogo gelmintu ovets i koz *Synthetocaulus kochi* SCHULZ, ORLOW et KUTASS, 1933 (sobre el ciclo biológico de *Synthetocaulus kochi* SCHULZ, ORLOW y KUTASS, 1933 un verme pulmonar de la oveja y de la cabra). *Rab. po gelmint.* Skrbj 105-122.
- DAWTJAN, E. A. (1947): Srawnitolnaja wospriimtschiwost molluskow k inwasirowaniu litschinkami. *M. capillaris*, *C. ocreatus* i *Synthetocaulus* spp. (La relativa receptividad de los caracoles a la invasión por larvas de *M. capillaris*, *C. ocreatus* y *Synthetocaulus* spp.) Trud. Arm. Niwi. **5**: 3-20.
- (1949): Cíkl raswitiija nematod legkich owjec i kos Armenil (El ciclo evolutivo de los nematodos pulmonares de la oveja y de la cabra en Armenia). *Zool. Sbornik A. N. Arm. Niwi*, **6**: 185-266.
- DOUCHERTY, E. C. (1946): The genus *Protostrongylus kamenskii* (Nematoda: Metastrongylidae) and its relatives. Preliminary note. *J. Parasitol.*, **32**: 7-16.
- EGOROV, Y. G. (1960): Biology of *Muellerius capillaris*. Tr. Nauchn-Issled. Vet. Inst. Minsk. **1**: 160-170.
- ENICK, K. & HILDEBRAN, J. (1969): Susceptibility of ruminants to *Dictyocaulus viviparus* and *D. Filaris* (Strongyloidea, Nematoda). *Zentbl. Vet. Med.* **168**: 65-67.
- ESCUDERO, A. (1971): *Histopatología y relaciones Fasciola hepática-Lymnaea truncatula y L. palustris en infestación experimental*. Tesis Doct. León.
- ESPAÑOL, J. (1967): Métodos para el estudio histológico de *Physa acuta*, DRAP (Pulmonado Basomatóforo). *Miscelanea Zoológica. Vol. II. Fase 2*: 13-15. Barcelona.



- EUZEBY, J. (1958): *Diagnostic experimental des helminthoses animales*. Vigot Freres, Editeurs. Paris.
- (1961): *Les maladies vermineuses des animaux domestiques. I. Maladies des aux Nematelminthes*. Vigot Freres, Editeurs. Paris.
- FAUST, E. C. (1920): *Pathological changes in the gasteropod liver produced by fluke infection*. John Hopkins. Hosp. Bull., **31**: (349): 78-84.
- FAUST, E. C., & HOFFMAN, W. A. (1934): Studies on Schistosomiasis Mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 1. The extra-mammalian phases of the life cycle. *Puerto Rico J. Publ. Hlth trop. Med.*, **10**: (1): 1-47.
- FAVATI, V. (1958): Sulla diffusione delle strongilosi degli ovini in Toscana. *Att. Soc. Ital. Sci. Vet.*, **12**: 445-447.
- FORCAT, L.: *Mollusques Terrestres et d'eau douce petits Atlas de Poche Payot*, N. 9 Libriere Payot. Lausanne.
- FORRESTER, D. J. FORRESTER, G. M. and SINGER, C. M. (1966): A contribution toward a bibliography on the lung nematodes of mammals. *J. Helminth. (Suppl.)* **40**: 1-122.
- FREEMAN, W. H. & BRACEGIRDLE, B. (1971): *An atlas of In vertebrate Structure*. Heinemann Educational Books (H. E. B.) London.
- GALTSOFF, P. S. (1937): *Culture methods for invertebrate animals*. Ithaca, N. Y. Comstock Pub. Co.
- GARCÍA SAN NICOLÁS, E.: Estudios sobre la biología, la anatomía y la sistemática del género *Iberus* MONFORT, 1910. *Bol. R. Sdad. Hist. Nat. Secc. Bol.* **55**: 199-390.
- GARNAULT, P. (1869): «La castration parasitaire chez *Helix aspersa*. *Bull. Sc. Fr. et Belg.* **20**». **5**: 137.
- GEBAUER, O. (1932): «Zur kenntnis der Parasitenfauna der Gemse». *Z. Parasitenk* **4** (2): 147-219.
- GERICHTER, CH. B. (1948): «Observations on the life history of lung nematodes using snails as intermediate hosts.» *Am. J. Vet. Res.* **9**: 109-112.
- (1951): Studies on the lung nematodes of sheep and goats in the levant. *Parasitology*, **41**: 166-183.
- GERMAIN, L. (1969): *Mollusques terrestres et fluviatiles. Faune de France*. Tomo XXI: 1.<sup>a</sup> part. y tomo XXII: 2.<sup>a</sup> part. Paul Lechevalier. Paris.
- GIBSON, T. E. (1960): *Helminthology, en The Veterinary Annual*, J. Wright & Sons, Britol.
- GOLUBEV, N. F. (1957b): Questions on the epizootiology of the most important helminth diseases of sheep in the Leningrad region, *Sb. Tr. Leningr. Nauchn. Isled. Vet. Inst.* **7**: 147-157.
- GRASSE, P. P. (1968): *Traité de Zoologie, Anatomia, Systematique, Biologie. V. Mollusques gastéropodes et scaphodes*. (fascicule III). Masson et Cie Editeurs Paris.
- GUILHON, Y. J. (1965): *Evolution larvaire d'Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) dans l'organisme d'Arionides C. R. Acad. Sc. Paris, 261 Groupe **12**: 4.225-4.227.
- GUILHON, J. et AFGHAHI, A. (1969): Evolution larvaire d'Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1865) dans l'organisme de diverses espèces de mollusques terrestres. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 268.
- & GAALON, A. DE (1969): Evolución larvaire d'un nématode parasite de l'appareil circulatoire du chien dans l'organisme de mollusques dulcaquiales». *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Sér. D.* **268** (3): 612-615.
- HAAS, F. (1929): *Fauna malacológica terrestre y de agua dulce de Cataluña*. Trabajos del museo de Ciencias Naturales de Barcelona. Vol. XIII.
- HAMILTON, J. M. (1968): Studies on re-infestation the cat with *Aelurostrongylus abstrusus*. *J. comp. Path.* **78**: 69-72.
- (1969): On the migration, distribution, longevity and pathogenicity of larvae of *Aelurostrongylus abstrusus* in the snail, *Helix aspersa* *J. Helminth.* **43**: (3/4): 319-325.
- HIDALGO, J. G. (1875): *Catálogo iconográfico y descriptivo de los moluscos terrestres de España, Portugal y Baleares*. Parte I. Parte II. Parte III. Madrid.
- (1909): *Estudios preliminares sobre los moluscos terrestres y marinos de España, Portugal y Baleares*. Memoria de la Real Academia de Ciencias Exactas. Físicas y Naturales de Madrid. Tomo XV. (Suplementos) 1913, y Tomo XV (Suplemento 2.) Índice General, 1913.
- HITIER, P. J. (1968): *Rôle des limaces dans l'évolution et la transmission des helminthes*. Thèse Doct. Vet. Toulouse.
- HOBMAIER, A. and HOBMAIER, M. (1929d): Über die Entwicklung der Lungenwürmer des genus *Synthetocaulus* Berl. *Munch. tierärztl. Wschr.* **80** (28): 497-500.
- (1930a): *Limax und Succinea* zwei Zwischenwirte von *Muellerius* (*Synthetocaulus*) *capillaris* des Schafes und der Ziege. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* **81** (23): 285-287.
- HOBMAIER, M. (1929): «Über die Entwicklung des Lunggenwürmes *Synthetocaulus capillaris* in Nacktweg-Und Schnirkelschnecken. *Munch. Tierärztl. Wschr.* **36**: 497-500.
- (1930): Life history of *Protostrongylus rufescens*. *Proc. Soc. Exper. Bio. Med., N. Y.*, **28**: 156-158.
- (1934a): Lungwurmlarven in Mollusken. *Zschr. Parasitenk.* **6**: 642-648.
- (1936): The route of infestation and the site of localization of lungworms in molluscs. *Science, N. S.* **80**: 229.
- HYMAN (1967): *The invertebrates Mollusca VI*. New York.
- JAMES, B. L. (1965): The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal prosobranch *Littorina saxatilis* (Oliv) subsp. *brosa* (Montagu). *Parasitology*, **25** (1): 93-115.
- JAMMES, L. (1904): *Zoologie pratique* (Basee sur le dissection) Masson et compgnie, Editeurs. Libraires de l'Academie de Medicine 120 Boulevard Saint-Cermain. Paris.
- JOYEUX y GAUD, J. (1946): Recherches helminthologiques marocaines. Etude sur la pneumonie vermineuse. *Arch. Inst. Pasteur. Maroc.* **3**: 383-461.
- KASSAI, T. (1957a): Über die geographische Verbreitung der Protostrongylidose des Schafes. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.* **7**: 165-173.
- (1957b): Schnecken als Zwischenwirte der Protostrongyliden. *Z. Parasitenk.* **18**: 5-19.
- (1958): Vizsgálatok a juhok göcs tüdőfegességéről. *Magy. állorv. Lap.* **7**: 125-127.
- KASSAI, T. and HOLLO, F. (1957): (Investigation on nodular verminous pneumonia. Part V. Differential diagnosis on the first larvae of the luorm the of sheeo in Hungary) *Magy. Álla Lap ja.* **12** (7/9): 232-234.
- KAZUBSKI, S. L. (1961): Zastosowanie metody wielokrotnych obserwaracji przyżyciowych do badania pasożytów ślimaków lądowych. (Use of microscopic observation methode *in vivo* for the study of parasites of land snails. (abstract). *Wiad. Parazyt.* **7** (2): suppl pp. 159-160. E. P. 160-161.
- KENDALL, S. B. (1964): Some fastors influencing the development and behaviour of trematodes in their molluscan hosts. In: *Hos-parasite relationships in vertebrate host*. Symposium of the British Society for Parasitology, November 1963. Oxford: Black well Scientific Publications: 51-73.
- KERSTEN, W. (1961): Ein Beitrag zum Vorkommen und zur Diagnostik der kleinen Lungenwürmer es Schafes *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **68**: 494-497.
- KINGSTON, N. (1966): «Observations on the laboratory rearing of terrestrial molluscs. *Am. Midll Nat.* **76** (2): 528-532.
- KITTEL, R. (1956): «Untersuchngen über den Geruchsnveschmackiin bei den Gattungen *Arion* und *Limax*. *Zool. Anz.*, 157». *Traité de Zoologie*: 5. 185.
- KOTLAN, A. (1960): *Helminthologie*. Akademia Kiadó. Budapes.
- KOPIRIN, A. V., DOBRIKOV, D. M. y BURILOVA, In. V. (1966): Epizootiology of Mülleriasis of sheep. En petrov, A. M. *Contributions to Helminthology*. Israel prog. Sci. Transl., Jerusalem.
- KOTRLY, A. (1958): Plinic Helminthofauna Spárkaté Zvere V CST. *Cesk. Parasit.* **1**, **5**: 101-110.
- KRULL, W. H. (1937): *Rearing terrestrial snails, en GALTSOFF, P. S. Culture Mthods for Invertebrate Animals*, Ithaca. N. Y. Comstock. Pub. Co.
- LÄMMLER, G. y SAUPE, E. (1968): Infektionsversuche mit dem Lungenwurm des Igels, *Crenosoma striatum* (Zeder, 1800). *z. f. Parasitenk.*, **3**: 87-100.
- LAPAGE, G. (1971): *Parasitología Veterinaria*. Compañía Editorial Continental, S. A. México. España.
- LAZZO GONZÁLEZ, A. (1970): *Vermiosis pulmonar ovina, Resultados de su tratamiento con citrato de carbamanzina*. Ed. Biohorm.
- LEWIS, P. D. (1967): Some helminth parasites of terrestrial molluscs in Nebraska. *Diss. Abstr.* **8** (6): 2.666 B.
- MACKERRAS (M. J.) et SANDARS, D. F. (1954): Life history of the rat lung-worm and its migration through the brain of its host *Nature. London.* **173**: 956-957.
- MANDAHL-BARTH, G. (1943): *Systematische Untersuchungen über die Heliciden-Fauna von Madeira. Abhandlungen der Senckenbergischen Naturgorschenden Gesells chaft*. Abh, senckenberg, naturf. Ges. 469 Seit 1-93 Frankfurt a M., 20. 12.
- MAPES, C. R. y BAKER, D. W. (1950): «Studies on the Protostrongylinae lungworms of sheep *J. am. vet. Ass.* **116**: 133-135.
- MAPES, C. R. y KRULL (1951): Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (RUDOLPHI, 1819) LOOSS, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host *Cionella lubrica* (MULLER) II. Collection of the snail, *Cionella lubrica*, and its maintenance in the laboratory. *Cornell Vet.* **41**: 433-444.
- MAROTEL, G. (1913): Nouvel agent de la pneumonie vermineuse chez le mouton. *Bull. Soc. Vét. et Soc. méd. vét. Lyon et Sud. Est.* **16**: 42-46.
- MARSHALL, A. J. ú WILLIAMS, W. D. (1972): *Zoology Invertebrates* Vol. 1. Fletcher and Son. Ltd. Macmillan Press London.

MARTÍNEZ MORALES, E. (1964): *Zur Kenntnis der Epidemiologie der Protostrongyliden*. Inaugural Dissertation. Giessen.

MARTÍNEZ MORALES, E. (1967): Algunos factores de la infestación ovina con protostrongilidos. *An. Fac. Vet. León*. **13**: 109-134.

MARTOJA, R. y MARTOJA-PIERSON, M. (1970): *Técnica de Histología Animal*. Ed. Torray y Masson, S. A. Barcelona.

Mc CANLEY, J. E. (1958): A new method for examining snails for trematode parasites. *Jour. Parasit.* **44** (2): 243-244.

MORTON, J. E. y YONGE, C. M. (1964): *Classification and structure of the mollusca*. In Wibur y Yongue (Editors), *Physiology of Mollusca*. New York: Academic Press: 1-58.

MÜLLER, F. R. (1934): Ein Beitrag zur Entwicklung des Lungwurmes *Neostongylus linearis* (MAROTEL, 1913) *Sitzungsber. Ges. Naturf. Fr. Berlin* pt. **2**: 158-161.

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

ORTIZ DE ZARATE LÓPEZ, A. (1950): Observaciones anatómicas y posición sistemática de varios helminchos españoles. (Especies de los subgéneros *Candidula*, *Helicella*, *Xeromagna* y *Pseudoxerotracha*. *Bol. R. Sdad. Hist. Nat.* **48**: 21-85.

— y ORTIZ DE ZARATE ROCANDIO, A. (1950): Contribución al conocimiento de la distribución de los moluscos terrestres de las provincias vascongadas y Norte de Navarra. *Bol. Soc. Esp. Hist. nat.* **47**: 397-432.

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

— (1963): Some biochemical and immunological aspects of host-parasite relationships. Generalized and facial tissue responses in the snail, *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. *And. N. Y. Acad. Sci.* **113** (1): 475-485.

PANTIN, C. F. A. (1968): «Técnicas microscópicas para Zoólogos». Editorial Academia. León (España).

PAVLOV, P. (1937): Recherches experimentales sur le cycle évolutif de *Synthetocaulus capillaris*. *Ann. Parasit. hum. comp.* **15**: 500-503.

PERRIER, R. (1964): *La Faune de la France. Fasc. 9. Bryozoaires, Brachipodes, Mollusques, Protocardes (Amphiosus Tuniciers)*. Delagrave. Paris.

PESIGAN, T. P., HAIRSTON, N. G., JAUREGUI, J. J., GARCÍA, E. G., SANTOS, A. T., SANTOS, B. C. y BESA, A. S. (1958): Studies on *Schistosoma japonicum* infection in the Philippines. 2. The molluscan host. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, **18** (4): 481-578.

PETROW, A. M. (1966): Epizootiology of Mulleriosis of sheep. Contributions to Helminthology Jerusalem, 326-327.

PILSBRY, H. A. (1949): *Land Mollusks of North America* (North of México). Acad. Sci., Philadelphia.

PORTER, A. (1938): *The larval trematoda found in certain South African Mollusca. With special reference to schistosomiasis (bilharziasis)*. South African Institute for Medical Research. Johannesburg.

POYNTER, D. y SELWAY, S. (1966): Diseases caused by Lungworms. *Helminth. Abst.* **35**: 105-127.

PROBERT, A. J. (1969): Morphological and histochemical studies on the larval stages of *Metastrongylus* spp. (lungworms of swine) in the earthworm intermediate host, *Eisenia foetida*, (Savigny 1826). *Parasitology*. **59**: 269-277.

RAMÍREZ FERNÁNDEZ, A. P. (1967): Epizootología de las bronconeumonías verminosas ovinas en León. *An. Fac. Vet. León*. **13**: 135-210.

REES, W. J. (1936): The effect of parasitism by larval trematodes on the tissues of *Littorina littorea* (Linné). *Proc. zool. Soc. Lond.* 357-368.

RICHARDS, C. S. y MERRITT, J. W. (1967): Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in mollusca intermediate host. *J. Parasit.* **53** (2): 282-388.

RIFKIN, E. and T. C. CHENG (1968): The origin, structure, and histochemical characterization of encapsulating cysts in the cyster *Crassostrea virginica* parasitized by the cestode *Tylocephalum* sp. *J. Invert. Pathol.* **10**: 54-64.

RÍO LOZANO, J. DEL (1967): Epizootología de la microceliosis en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*. **13**: 211-286.

ROJO VÁZQUEZ, F. (1973): Bronconeumonías verminosas ovinas en León con especial atención al ciclo biológico de *Neostongylus linearis* (MAROTEL, 1913), GEBAUER (1932). *An. Fac. Vet. León*. **19**: 147-197.

ROJO VÁZQUEZ, F. A. et CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1974): Le cycle biologique de *Neostongylus linearis* (MAROTEL, 1913) GEBAUER, 1932. *Annals. Parasit. hum. (Paris)* **49** 6: 685-699.

ROMERO RODRÍGUEZ, J. (1970): Metastrongilosis Bronco-pulmonares en la Ganadería Española. *Rev. Iber. Parasitol.* **30**: (2-3).

ROSE, J. H. (1957): Observation on the larval stages of *Muellerius capillaris* within the intermediate hosts *Agriolimus agrestis* and *A. Reticulatus*. *J. Helminth.* **31**: 1-16.

— (1957b): Observation on the bionomics of the freeliving first larvae of the sheep lungworm *Muellerius capillaris*. *J. Helminth.* **31**: 17-28.

— (1958): Sire of development of the lungworm *J. comp. Path.* **68**: 359-362.

— (1959): Experimental infection of with *Muellerius capillaris*. *J. comp. Path. Therap.* **69**: 414-422.

— (1961): Three lungworms recently recorded from British sheep. *Res. Vet. Sci.* **2**: 253-258.

— (1973): *Lungworms of the Domestic Pig and sheep*. Adv. in Parasit. **2**: 559-599.

ROSE, J. H. MICHEL, J. H. y HARRISS, (1957): Lungworms of British sheep. *Vet. Rec.* **69**: 561.

ROTHSCHILD, M. (1963): Gigantism and variation in *Peringia ulvae* Pennant 1777, caused by infection with larval trematodes *J. mar. biol. Ass. U. K.* **20** (3): 537-546.

ROWETT, H. G. Q.: *Dissection Guides: V. Invertebrates* Jhon Murray. London.

RYBAK, V. F. (1962): Land molluscs from the vicinity of village Konchezero and their significance in the spread of Muelleriosis. *Tr. Karel'sk. Fil. Akad. Nauk S.S.S.R.* **30**: 92-96.

SAINT-GUILLART, M. (1968): Etude histologique des premiers stades évolutifs de *F. Hepática*, L. *Acta pót. Antwerp.* **46**: 77-132.

SAIZ MORENO, L. (1963): *Epizootología de las helmintiasis del ganado lanar en la realidad de nuestras explotaciones*. Junta de Fomento Pecuario. Ciudad Real. **32**: 37-38, 43.

— (1970): *Los moluscos como los principales vectores de algunas helmintiasis*. V. Semana Nacional Veterinaria, Pon. 4. Común. 17.

SILVA LEITAO, J. L. DA (1963): *Parasitas dos animais domesticos en Portugal Metropolitano*. Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisboa.

SIMÓN VICENTE, F. (1961): Estudios sobre vermes parásitos pulmonares de óvinos y caprinos. *An. Inst. Invest. Vet. Madrid.* **9**: 101-139.

SKRJABIN, K. I. SHIKHOBALOVA, N. D., SCHULZ, R. S., POPOVA, T. L., BOEV, S. N. y DELYAMURE, S. L. (1961): *Key to Parasitic Nematodes. III Strongylata*. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem.

SOLTYS, A. (1964): Slimaki-ć-sredn žiwiciel nicieni Protostrongylidae u owice woj-lubelskiego (Snails-intermediate hosts of Protostrongylidae in sheep of the Lublin region). *Wiad. patazyt.* **10** (4/5): 490-491.

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

STOCKDALE, P. H. G. y HULLAND, T. J. (1970b): The pathogenesis, Route of Migration, and Development of *Crenosoma vulpis* in the Dog. *Path. vet.* **7**: 28-42.

SUMNALIEV, P. (1966): On the infestation of *Helicella obvia* (Hartman, 1840) and *Zebrina detrita* (Müller, 1774) in the Sofia district with Protostrongylid larvae. *Bull. Central Helminth. Lab. KH.* **11**: 111-117.

SUPPERER, R. (1956): Beitrag zur Kenntniss des Enhüllungs prozes der Larven von *Muellerius capillaris*. *Helminthologia*, **2**: 133-139.

SVARČ, R., ZMORAY, I. y LESTAND, P. (1968): Morphologische Veränderungen der Larven von *Müllerius capillaris* im Zwischenwirt *Cepaea vindobonensis* *Biologia, Bratisl.* **23** (8): 569-581.

TAKATSUKI, S. (1943a): On the nature and functions of the amoebocytes of *Ostrea edulis*. *J. Microsc. Sci.* **76**: 379-431.

TARAZONA VILAS, J. M. (1955): Estudios sobre ciclos evolutivos y la terapéutica de las estrongilosis pulmonares ovinas. *Supl. Cient. Cons. Gen. Col. Vet. España.* **9**: 271-301 y 345-362.

TAZI RIFFI, J. (1972): *Contribution a l'étude de la lutte contre le principaux mollusques vecteurs d'helminthes au Maroc*. Thèse Doc. Vet. Alfort.

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

WILLIAMS, C. H. GROSS, P. R. (1957): Pigmentation in the foot of *Littorina littorea* as a means of recognition of infection with trematode larvae. *J. Parasit.* **43** (3): 324-327.

WILLIAMS, D. W. (1942): Studies on the biology of the larva of the nematode lungworm *Müllerius capillaris* in molluscs *J. anim. Ecol.* **11**: 1-8.

WRIGHT, H. (1857): *A guide to molluscan anatomy for parasitologists in Africa*. British Museum (Natural History). London.

WRIGHT, C. A. (1960): Relationships between trematodes and molluscs. *Ann. trop. Med. Parasit.* **54**: (1): 1-7.

— (1966): The pathogenesis of Helminths in the Mollusca. *Helminth. Abstr.* **35** (3): 207-224.

— (1971): *Flukes and snails*. Ed. Georgen Allen & Unwin Ltd. London. Clarke, Doble & Brendon Ltd.



- YAMAGUTI, S. (1958): *Systema Helminthum. The nematodes of vertebrates*. Interscience Publishes, Inc., New York.
- YANAGISAWA, T. (1967): Some common species of pulmonate snails as the experimental intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Japon. *Jap. J. Parasitol.* **16** (5): 324-330.
- ZMORAY, I. and GUTTEKOVA, A. (1968): Structure of subcutaneous muscles and their ecological analysis by pneumohelminths. *Biologia, Bratislava.* **23**: 582-589.
- ZMORAY, I. and SVARC, R. (1960): Morphology of larvae of *Protostrongylus rufescens* and epidemiology. *Helminthologia.* **2**: 209-233.
- , ——— (1967): Ecology of lungworms of ruminants. *Vet. Med., Praha.* **12**: 703-708.

TABLA I

Moluscos citados como hospedadores intermediarios de «*Neoststrongylus linearis*» y de otros vermes filogenéticamente próximos a este

<i>Neoststrongylus linearis</i> (MAROTEL, 1913), GEBAUER (1932).	
<i>Deroceras</i> ( <i>Agriolimax</i> ) <i>agreste</i> LINNE, 1758.	
<i>Arion subfuscus</i> DRAPARNAUD, 1805.	
<i>Arion hostensis</i> FERUSSAC, 1819.	
<i>Fructicolica striolata</i> C. PFEIFFER, 1829.	
<i>Cepaea nemoralis</i> LINNE, 1758.	
<i>Cepaea hortensis</i> (MULLER, 1774), GERMAIN (1929).	
<i>Arianta arbustorum</i> LINNE, 1758.	
<i>Helix pomatia</i> LINNE, 1758.	
MULLER, 1934.	
<i>Helicella obvia</i> (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.	
<i>Zebrina detrita</i> MULLER, 1774.	
SUMNALIEV, 1966 Bulgaria	
<i>Cepaea nemoralis</i> L., 1758.	
<i>Helix</i> ( <i>Cryptomphalus</i> ) <i>aspersus</i> MULLER, 1774.	
<i>Helicella</i> ( <i>Xeromagna</i> ) <i>neglecta</i> DRAPARNAUD, 1805.	
<i>Helicella</i> ( <i>Cernuella</i> ) <i>variabilis</i> ROSSMASSLER, 1854.	
<i>Helicella apicina</i>	
ROJO VÁZQUEZ, 1973. España (León)	
<i>Cystocaulus</i> spp	
<i>Pupilla</i> spp	
<i>Chondrula</i> spp	
<i>Helicella</i> spp	
<i>Levantina escheriana</i>	
DAVTIAN, 1945	
<i>Monacha syriaca</i> EHRBG.	
GERITCHER, 1951. Israel.	
<i>Euparypha pisana</i> , MULLER, 1774.	
JOYEUX y BAUER, 1951.	

<i>Cochicella ventricosa</i> DRAPARNAUD, 1801.	
<i>Monacha carthusiana</i> MULLER, 1774.	
<i>Helix</i> spp.	
SIMÓN VICENTE, 1954. España (Salamanca)	
<i>Helicella obvia</i> (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.	
<i>Zebrina detrita</i> MULLER, 1774.	
<i>Cepaea vindobonensis</i> C. PFEIFFER.	
<i>Theba carthusiana</i> MULLER, 1774.	
<i>Abida frumentum</i> DRAPARNAUD, 1805.	
<i>Condrula tridens</i> MULLER, 1774.	
KASSAI, 1957. Hungría.	
<i>Agriolimax reticulatus</i> MULLER, 1774.	
ROSE, 1961; 1965a. Gran Bretaña.	
<i>Helicella ericetorum</i> MULLER, 1774.	
<i>Helicella variabilis</i> DRAPARNAUD, 1801.	
<i>Helicella arigonis</i> ROSSMASSIER, 1854.	
<i>Helicella apicina</i> De LAMARK.	
<i>Cochlicella acuta</i> MULLER, 1774.	
<i>Cochliella ventricosa</i> DRAPARNAUD, 1801.	
<i>Chondrina avenacea</i> BRUGUIERE, 1792.	
<i>Chondrina</i> ( <i>Jaminea</i> ) sp.	
<i>Cepaea nemoralis</i> L. 1758.	
<i>Helix</i> ( <i>Cryptomphalus</i> ) <i>aspersa</i> MULLER, 1774.	
<i>Theba carthusiana</i> MULLER, 1774.	
<i>Vitrina</i> spp. DRAPARNAUD, 1801.	
RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 1967. España (León)	
<i>Agriolimax agrestis</i> LINNE, 1758.	
<i>Agriolimax reticulatus</i> MULLER, 1774.	
<i>Cepaea vindobonensis</i> C. PFEIFFER, 1828.	
<i>Chondrula tridens</i> MULLER, 1774.	
<i>Cochlicella acuta</i> MULLER, 1774.	
<i>Helix pomatia</i> LIN, 1758.	
<i>Helicella obvia</i> (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.	
<i>Theba carthusiana</i> MULLER, 1774.	
<i>Zebrina detrita</i> MULLER, 1774.	
<i>Euparypha pisana</i> MULLER, 1774.	
<i>Chondrula septemdentata</i>	
<i>Monacha syriaca</i>	
<i>Retinella nitellina</i>	
ROSE, 1973	
<i>Muellerius capillaris</i> (MULLER, 1889) CAMERON (1927).	
<i>Agriolimax</i> spp.	
<i>Limax</i> spp.	
<i>Succinea</i> spp.	
<i>Arion</i> spp.	
<i>Monacha</i> spp.	
HOBMAIER y HOBMAIER (1929-1930).	
DAVTIAN, 1937	
<i>Hyalina cellaria</i> MULLER, 1774.	
<i>Milax sowerbyi</i> FERUSSAC	
WILLIAMS 1942	
<i>Cochlicella acuta</i> MULL.	
<i>Euparypha pisana</i> MULLER, 1774.	
JOYEUX y GAUD, 1946. Marruecos.	
<i>Deroceras reticulatum</i> MULLER, 1774	
BAKER, 1950. U.S.A.	

*Zonitoides arboreus*  
 MAPES y BAKER 1950.  
*Helicella barbesiana*.  
*Monacha syriaca*.  
 GERICHTER, 1951-52. Israel.  
*Lymnaea* spp.  
*Phanorbis* spp.  
 KOPYRIN y COL. 1953. Israel.  
*Abida frumentum* DRAPARNAUD, 1801.  
 KASSAI, 1957. Hungría.  
*Agriolimax reticulatus* MÜLLER, 1774.  
*A. agrestis* LINNE, 1758.  
*S. putris* LINNE, 1758.  
*Trichia hispida* LINNE, 1758.  
 GOLUBEV 1957b.  
*Retinella peronella* CHARPENTIER, 1853.  
*Helicolimax reticulatus*  
*Agriolimax laevis* MÜLLER, 1774.  
*Anisus leucostoma* MILLET, 1813.  
*Anisus contortus*.  
*Gyraulus laevis* ALDER, 1838.  
*Radix peregra* MÜLLER, 1774.  
 EGOROV, 1960.  
*A. agrestis* LINNE, 1758.  
*Petinella Petronella* CHARPENTIER, 1853.  
 RYBAK, 1962. U.S.S.R.  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, (1844).  
*Succinea putris* LINNE, 1758.  
*Cepaea vindobonensis* C. PFEIFFER PFEIFFER.  
*Helix pomatialis*. 1758  
*Deroceras agreste* MÜLLER, 1774.  
*Helicigona arbostorum* LINNE, 1758.  
*Lymnaea stagnalis* LINNE, 1758.  
 SOLTYS, 1964. Checoslovaquia.  
*Agriolimax reticulatus* MÜLLER, 1774.  
 ROSE, 1965. Gran Bretaña.  
*Limax* spp.  
*Agriolimax* spp.  
*Helix* spp.  
*Succinea* spp.  
 DEL CASTILLO, 1965. Francia.  
*Helix* spp.  
*Succinea* spp.  
*Limax* spp.  
*Agriolimax* spp.  
*Arion* spp.  
 POYNTER y SELWAY, 1966  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, (1844)  
*Zebrina detrita* MÜLLER, 1774.  
 SUMNALIEV, 1966. Bulgaria.  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
 GERICHTER, 1951. Israel.  
*Euleta fruticum* MÜLLER, 1774.  
*Helix pomatia*.  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
*Zebrina detrita* MÜLLER, 1774.

*Cepaea vindobonensis* C. PFEIFFER, 1828.  
*Theba carthusiana* MÜLLER, 1774.  
*Abida frumentum* DRAPARNAUD, 1801.  
*Chondrula tridens* MÜLLER, 1774.  
 KASSAI, 1957. Hungría.  
*Monacha carthusiana* MÜLLER, 1774.  
*Gochlicella ventricosa* DRAPARNAUD, 1801.  
 SIMÓN VICENTE, 1957. España.  
*Monochoides incarnata* MÜLLER, 1774.  
*Zebrina detrita* MÜLLER, 1774.  
*Cepaea vindobonensis* C. PFEIFFER, 1828.  
*Decrocerus reticulatum*  
*Euomphalia strigella* DRAPARNAUD, 1801.  
*Fruticicola fruticum* HARTMANN, 1844.  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
*Helicigona faustina* ROSSMASSLER, 1835.  
 ZMORNAY y SVARC 1960.  
*Succinea putris* LINNE, 1758  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
 PROTOSTRONGYLUS spp.  
*Cepaea nemoralis* L., 1758.  
*Arianta arbostorum* L., 1758.  
*Arion hortensis* DE FERUSSAC 1819.  
 HOBMAIER y HOBMAIER, 1829. Polonia.  
*Helicella ericetorum* MÜLLER, 1774.  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
*Helicella bolli*.  
 HOBMAIER y HOBMAIER 1930b  
*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.  
 PAVLOV, 1937. Bulgaria.  
*Zebrina hohenackeri*.  
*Oxuchilus cellarina* MÜLLER, 1774.  
*Limax* spp.  
*Helicella bollenensis* LOCARD, 1882.  
*Frutico camphylaca marzanensis*  
*Helix pomatia* LINNE, 1758.  
*Helix globulla*  
*Limax* sp.  
*Helicella derbentina*.  
 DAVTIAN, 1937  
*Helicella barbesiana*.  
*Helicella vestalis*.  
*Helicella vestalis joppensis*.  
*Monacha syriaca*.  
*Cepaea vindobonensis* C. PFEIFFER.  
*Deroceras agreste* L., 1758.  
 SOLTYS, 1964. Checoslovaquia.  
*Euparypha pisana* MÜLLER, 1774.  
*Helicella rugosiuscula* MICHAUD, 1831.  
*Cepaea (Helix) nemoralis* L., 1758.  
*Colchlicella (Helix) acuta* MÜLLER, 1774.  
*Helix Faux-nigra* BOURGUIGNAT; 1867.  
 DEL CASTILLO, 1965. Francia.  
*Helicella* spp.  
 POYNTER y SELWAY,



*Helicella obvia* (ZIEGIER) HARTMANN, 1844.  
*Zebrina detrita* MULLER, 1774.

SUMNALIEV, 1966. Bulgaria.

*Helicella ericetorum* MOLLER, 1774.  
*Helicella variabilis* DRAPARNAUD, 1801  
*Helicella arigonis* ROSSMASSIER  
*Helicella apicina* DE LAMARCK, 1822.  
*Cochlicella acuta* MOLLER, 1774.  
*Cochlicella ventricosa* DRAPARNAUD, 1801  
*Chondrina avenacea* BRUGUIERE, 1792.  
*Chondrina (Jaminea) spp.*  
*Cepaea nemoralis*, L., 1758.  
*Theba cartusiana* MOLLER, 1774.  
*Vitrina spp.*  
*Helix (Cryptomphalus) aspersus* MOLLER, 1774.

RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 1967, España (León)

*Eucomphalia strigella*  
*Monachoidas incarnata*  
*Retinella nitellina*.  
*Helicella rugosiuscula* MICHAUD, 1831  
*Deroceras reticulatum* MOLLER, 1774.

ROSE, 1973

CUADRO I  
Primera experiencia de infestación

N.º del espécimen	spp.	Dimensiones long. y día. máx. en mm.	Período de infestación	Técnica de sacrificio	Método de comprobación de larvas III
1	<i>Cernuella (C) virgata</i>	9,3	62 días	Sol. Nembutal 0,08 % y Nembutal 0,08 % más MS 222 0,3 %	Digestión
2	»	9,5	»	»	»
3	»	9,4	»	»	»
4	»	9,3	»	»	Cortes histológicos
5	<i>Cepaea nemoralis</i>	4,0	»	Sol. mentol.	»
6	»	4,0	»	»	»
7	<i>C (C) cespitum arigonis</i>	5,7	62 días	Sol. Nembutal 0,08 % y Nembutal 0,08 % más MS 222 0,3 %	Digestión
8	»	5,8	»	»	Cortes histológicos
9	»	9,0	»	»	»

Temperatura: 18-23°C.  
Tiempo de exposición 23 horas.  
Método KASSAL.  
Fecha: 4 de marzo 1972.

CUADRO II  
Segunda experiencia de infestación

N.º del espécimen	ssp.	Dimensiones long. y día máx. en mm. en el momento de la infestación	Período de infestación	Dimensiones long. y día máx. en el momento del sacrificio	Observaciones
10	<i>C. (X) cespitum arigonis</i>	5	50 días	5,3	Administrado al hosp. definitivo
11	»	4,7	»	5,6	»
12	»	4,7	»	5,3	»
13	»	4,6	»	5,0	»
14	»	5,8	»	6,0	»
15	»	6,0	»	7,0	»
16	»	5,0	»	5,6	»
17	»	5,0	»	5,2	»
18	»	5,0	»	5,2	»
21	»	5,7	»	5,9	»
22	»	5,0	»	5,2	»
25	»	4,6	»	4,8	»
19	»	4,6	»	—	Baja
20	»	6,0	»	—	»
27	»	5,0	»	—	»
23	»	5,9	»	7,0	Cortes histológ.
24	»	5,8	»	6,0	»
26	»	5,3	»	5,6	»

Dosis infestante por molusco: 200 larvas.  
Tiempo de exposición 6 horas y 30 minutos.  
Métodos KASSAI en placas de seraglutinación.  
Fecha: 27 de junio 1.972.

CUADRO II (Continuación)  
Testigos

N.º espécimen	Spp.	Dimensiones long. y día. máx. en mm. en el momento de infestación lote II		Dimensiones long. y día. máx. en el momento del sacrificio lote II		Observaciones
1	<i>C. (X) cespitum arigonis</i>	4,6	8,3	4,7	8,5	
2	»	4,7	7,8	5,3	10,5	
3	»	5,8	9,5	6,2	9,8	
4	»	6,0	10,0	—	—	Baja
5	»	5,0	9,4	5,6	10,0	
6	»	5,0	8,9	5,6	10,0	
8	»	5,3	9,4	5,5	9,8	
9	»	5,8	9,5	6,1	9,8	
10	»	5,7	9,5	7,0	11,0	
11	»	4,7	7,5	5,0	8,0	
12	»	5,0	8,4	5,3	8,8	
13	»	4,6	8,6	4,8	9,5	
14	»	5,8	9,4	—	—	Baja
15	»	5,3	9,0	7,0	11,0	
16	»	5,5	10,0	—	—	Baja
17	»	4,6	8,6	5,0	8,8	
18	»	5,0	8,6	5,2	8,9	

CUADRO III  
Tercera experiencia de infestación

N.º del espécimen	spp.	Dimensiones long. y día. máx. en mm.		Período de infestación	Técnica de sacrificio	Método de comprobación de larvas III
28	<i>Cernuella (C) virgata</i>	9,0	13,0	10 días	Inmersión en agua destilada	Digestión
29	»	9,0	14,8	20 días	»	»
30	»	9,6	14,0	—	—	Baja
31	»	9,5	17,0	30 días	Inmersión en agua destilada	Digestión
32	»	8,0	12,6	40 días	»	»
33	<i>C. (C) cespitum arigonis</i>	7,6	16,0	10 días	»	»
34	»	8,6	17,5	20 días	»	»
35	»	6,4	13,7	30 días	»	»
36	»	8,0	14,0	—	—	Baja
37	»	8,0	13,5	40 »	Inmersión en agua destilada	Digestión

Dosis infestante por molusco: 200 larvas.  
Temperatura: 19-24°C.  
Tiempo de exposición: 8 horas.  
Fecha: 8 de julio 1972.



**CUADRO IV**  
**Cuarta experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.		Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
38-42: Lote 1	4-7	8-11	30 segundos	Sección región cefalopediosa	CARNOY-HETHERINGTON: 38, 39 y 40 BOUIN: 41 y 42
43-47: Lote 2	4-7	8-11	5 minutos	»	CARNOY-HETHERINGTON: 43, 44 y 46 43, 44 y 46 BOUIN: 45 y 47
48-52: Lote 3	4-7	8-11	15 minutos	»	CARNOY-HETHERINGTON: 48, 49 y 50 BOUIN: 51 y 52.
53-57: Lote 4	4-7	8-11	30 minutos	»	CARNOY-HETHERINGTON: 53, 54 y 55 BOUIN: 56 y 57

Dosis de infestación por molusco: 300 larvas.  
Temperatura: 20-40°C.  
Método KASSAI en placas de seroaglutinación.  
Fecha: 16 julio 1972.

**CUADRO V**  
**Quinta experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.		Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
58-62: Lote 5	4-7	8-11	1 hora	Sección región cefalopediosa	CARNOY-HETHERINGTON: 58, 59 y 61 BOUIN: 60 y 62
63-67: Lote 6	4-7	8-11	2 horas	»	CARNOY-HETHERINGTON: 63, 64 y 65 BOUIN: 66 y 67

Dosis infestante por molusco: 200 larvas  
Temperatura: 20-24°C.  
Método: KASSAI en vidrio de reloj  
Fecha: 7 de agosto 1972.

**CUADRO VI**  
**Sexta experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.		Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
68-73: Lote 7	7-9	11-13	10 horas	Solución mentol 4 %	CARNOY-HETHERINGTON: 68, 69, 70 y 73 BOUIN: 71 y 72
74-78: Lote 8	7-9	11-13	10 horas	»	CARNOY-HETHERINGTON: 74, 75 y 76 BOUIN: 77 y 78
79-83: Lote 9	7-9	11-13	10 horas	»	CARNOY-HETHERINGTON: 79, 80 y 81 BOUIN: 82 y 83

Dosis de infestación por molusco: 200 larvas  
Tiempo de exposición: 6 horas.  
Temperatura: 18-22°C.  
Método de KASSAI.  
Fecha: 16 de septiembre 1972.

**CUADRO VII**  
**Séptima experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.		Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
84- 88: Lote 10	7-9	11-13	10 días	Inmersión en agua destilada	CARNOY-HETHERINGTON: 84, 85 y 87 BOUIN: 86
90- 94: Lote 11	7-9	11-13	12 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 90, 91 y 92 BOUIN: 93 y 94
95- 99: Lote 12	7-9	11-13	14 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 95, 96 y 97 BOUIN: 98 y 99
100-104: Lote 13	9-7	11-13	16 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 100, 101 y 103 BOUIN: 102 y 104
107-111: Lote 14	9-7	11-13	18 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 107, 108 y 109 BOUIN: 110 y 111
112-116: Lote 15	9-7	11-13	20 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 112, 113 y 114 BOUIN: 115 y 116

Dosis de infestación por molusco: 200 larvas.  
Tiempo de exposición: 6 horas.  
Método de KASSAI.  
Temperatura: 18-22°C.  
Fecha: 1 diciembre 1972.

**CUADRO VIII**  
**Octava experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.	Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
117-121: Lote 16	Variables	4 días	Inmersión en agua hervida	CARNOY-HETHERINGTON: 117, 118 y 119 BOUIN: 120 y 121
122-126: Lote 17	»	7 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 122, 123 y 125 BOUIN: 124 y 126
127-131: Lote 18	»	24 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 127, 128 y 129 BOUIN: 130 y 131
133-137: Lote 19	»	26 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 134, 135 y 136 BOUIN: 133 y 137

Dosis infestante por molusco: 195 larvas.  
Temperatura: 20-24°C.  
Tiempo de exposición: 6 horas y media.  
Método KASSAI.  
Fecha: 16 marzo 1973.

**CUADRO IX**  
**Novena experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.	Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
164-169: Lote 20	variables	30 días	Inmersión en agua destilada	CARNOY-HETHERINGTON: 164, 165 y 166 BOUIN: 168 y 169
171-175: Lote 21	»	32 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 171, 172 y 173 BOUIN: 174 y 175
178-181: Lote 22	»	36 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 178, 179 y 180 BOUIN: 181

Dosis infestante por molusco: 200 larvas.  
Temperatura: 18-22°C.  
Tiempo de exposición: 7 horas.  
Método KASSAI.  
Fecha: 30 marzo 1973.

**CUADRO X**  
**Décima experiencia de infestación**

*Sp: C (X) cespitum arigonis*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.	Período de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
182-186: Lote 23	variables	40 días	Inmersión en agua hervida	CARNOY-HETHERINGTON: 182, 183 y 184 BOUIN: 185 y 186
188-192: Lote 24	»	50 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 188, 189 y 190 BOUIN: 191 y 192
195-199: Lote 25	»	60 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 195, 196 y 197 BOUIN: 198 y 199
200-204: Lote 26	»	70 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 200, 201 y 202 BOUIN: 203 y 204
210-215: Lote 27	»	100 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 211, 212 y 213 BOUIN: 210 y 214 ZENKER: 215
218-222: Lote 28	»	120 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 218, 219 y 220 BOUIN: 221 y 222
227-230: Lote 29	»	150 días	»	CARNOY-HETHERINGTON:

Dosis infestante por molusco: 400 larvas.  
Temperatura: 18-23°C.  
Tiempo de exposición: 16 horas.  
Método KASSAI en tubo de centrifuga.  
Fecha: 19 abril 1973.



# CUADRO XI

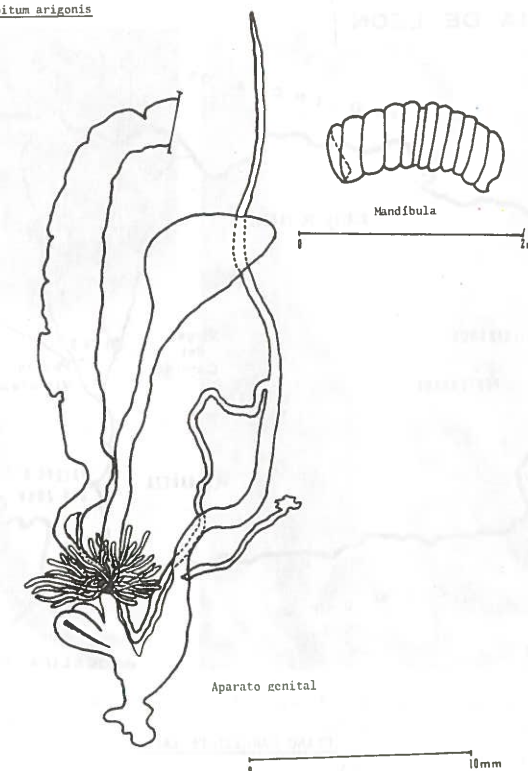
## Undécima experiencia de infestación

Sp.: *Cernuella (C) virgata*

N.º del espécimen y del lote	Dimensiones long. y diá. máx. en mm.	Periodo de infestación	Técnica de sacrificio	Fijador
248-254; Lote 30	8-11 12-15	10 días	Inmersión en agua destilada	CARNOY-HETHERINGTON: 248, 249 y 250 BOUIN: 251 y 252
257-261; Lote 31	8-11 12-15	16 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 257, 258 y 259 BOUIN: 260 y 261
265,270; Lote 32	6-11 12-15	20 días	»	
272-276; Lote 33	6-11 12-15	26 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 272, 273 y 274 BOUIN: 275 y 276
280-287; Lote 34	6-11 12-15	30 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 280, 284 y 285 BOUIN: 287
289-295; Lote 35	6-11 12-15	50 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 289, 290 y 294 BOUIN: 295
297-304; Lote 36	6-11 12-15	62 días	»	CARNOY-HETHERINGTON: 297 y 298 BOUIN: 304

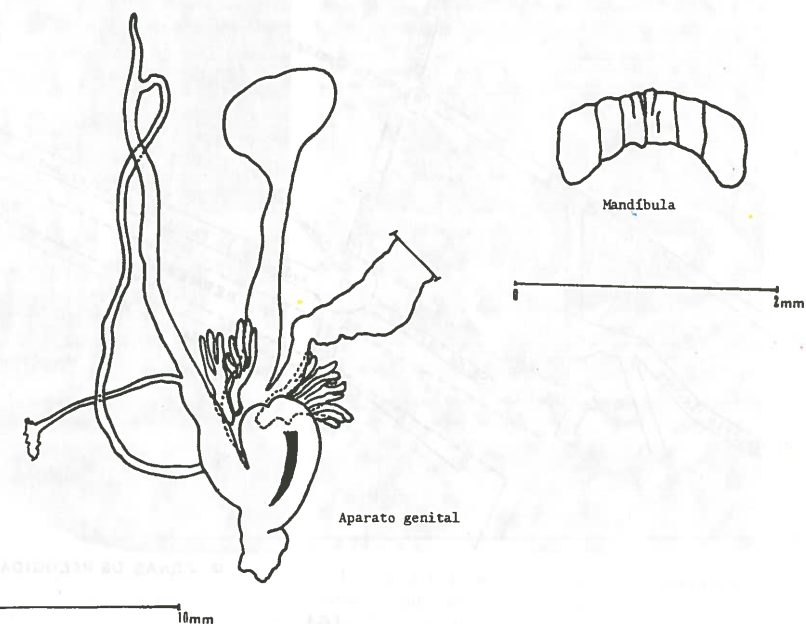
LAMINA I

*Cernuella (X) cespitum arizonis*



LAMINA II

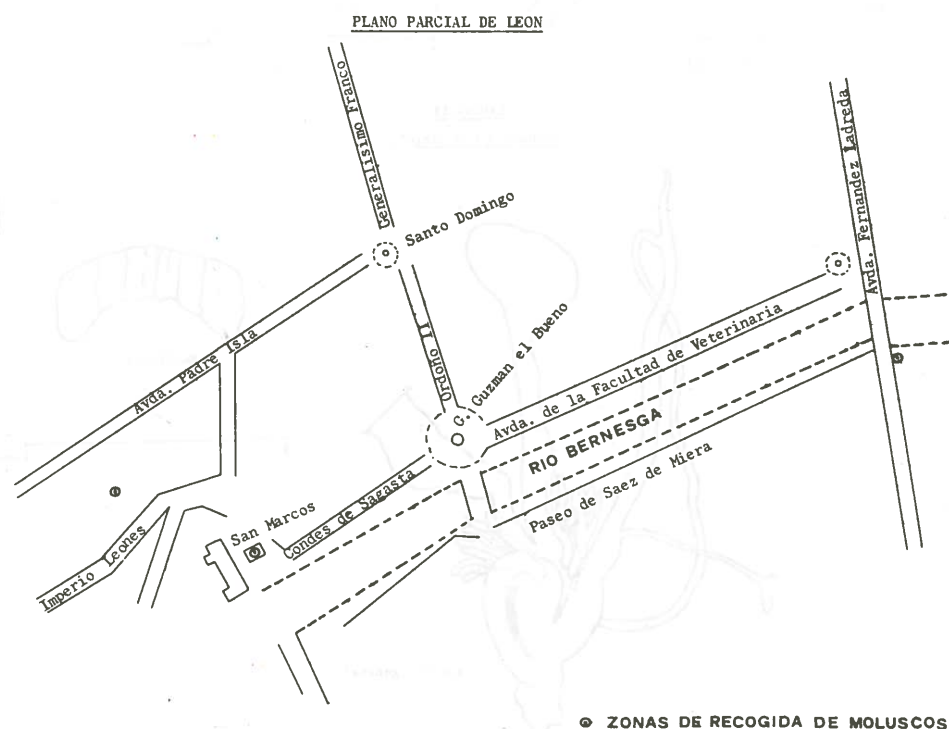
*Cernuella (C) virgata*



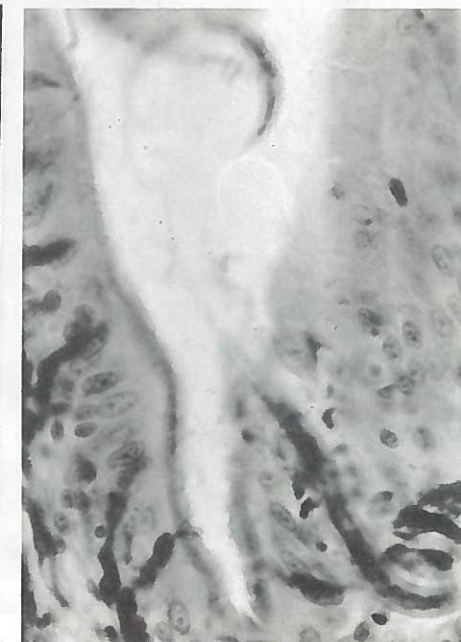
# PROVINCIA DE LEON



• LOCALIDADES DE RECOGIDA DE MOLUSCOS



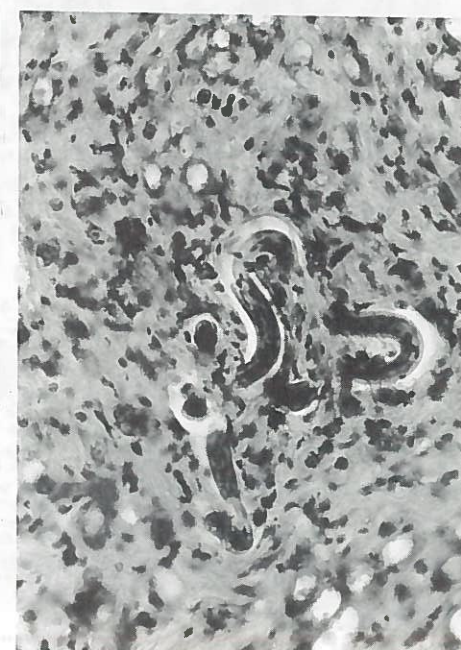
1. Larva I. penetrando. 642 c. a 5 minutos postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.



2. Larva I. introduciéndose en el pie. 642 c. a 5 minutos postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.

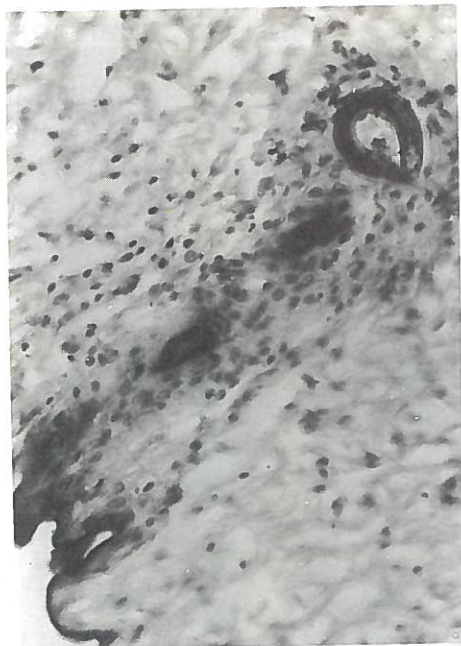


3. Larva recién alojada conservando su posición de entrada. 357 c. a 5 minutos postinfestación. Tinción hematoxilina-eosina.

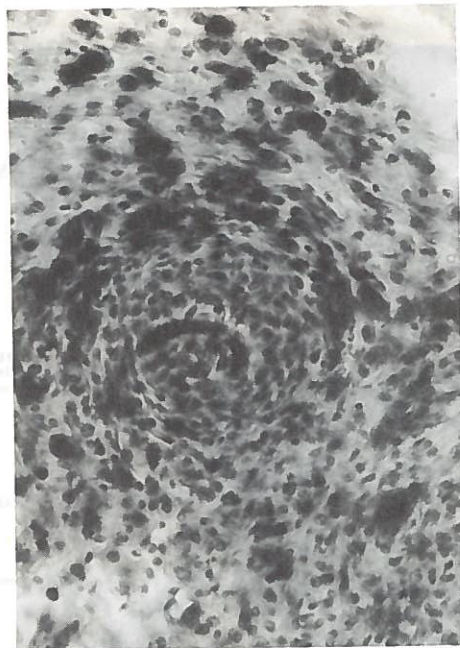


4. Larva I. localizada en el tejido conjuntivo subepitelial. 357 c. a, 5 minutos postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.

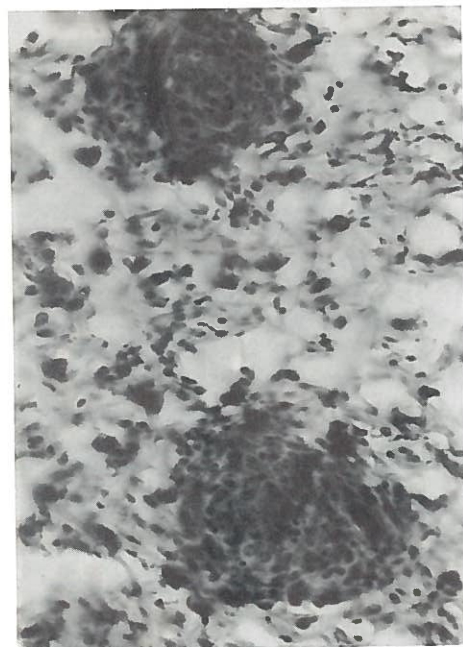




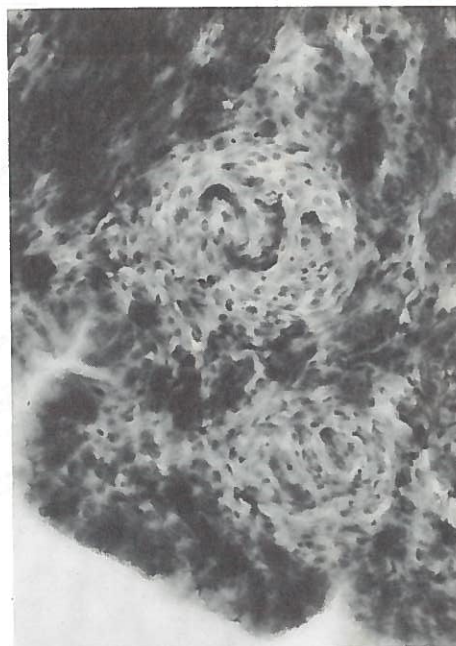
5. Larva I. recién introducida que se rodea de células inflamatorias señalando el punto de penetración. 30 minutos postinfestación. 357 c. a.



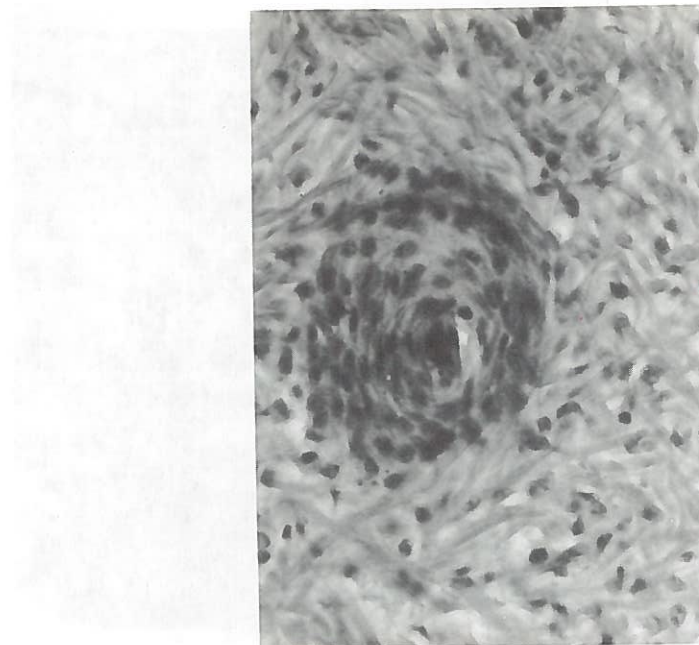
6. Larva I. rodeada de fibroblastos. Tinción hematoxilina-eosina. 357 c. a.



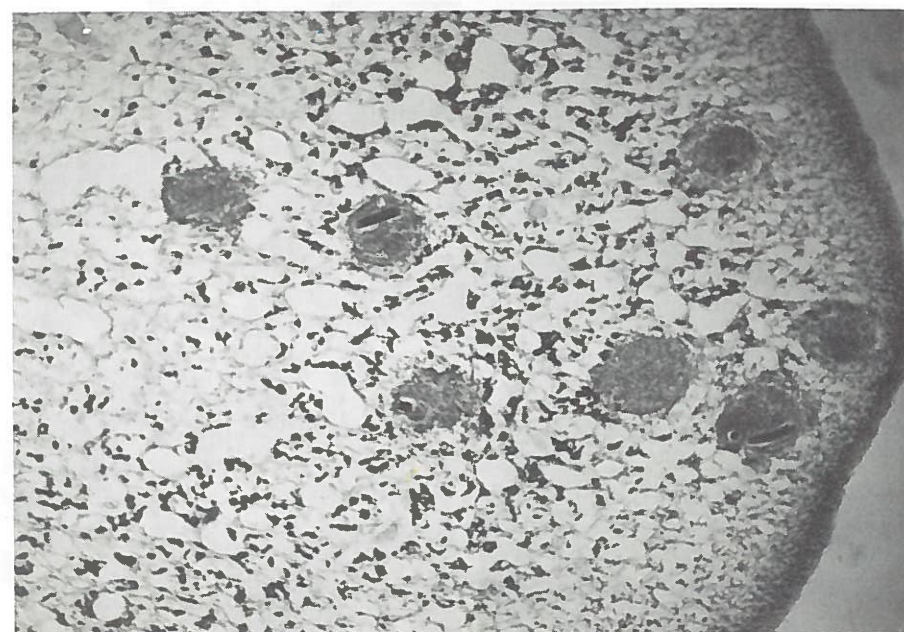
7. Nódulos parasitarios en el seno del tejido conjuntivo. Tinción: Gallego (fucsina acética y picrocarmin de indigo) 357 c.a.



8. Larvas I enrolladas y con cápsulas fibroblásticas. Tinción hematoxilina-eosina. 537 c. a.

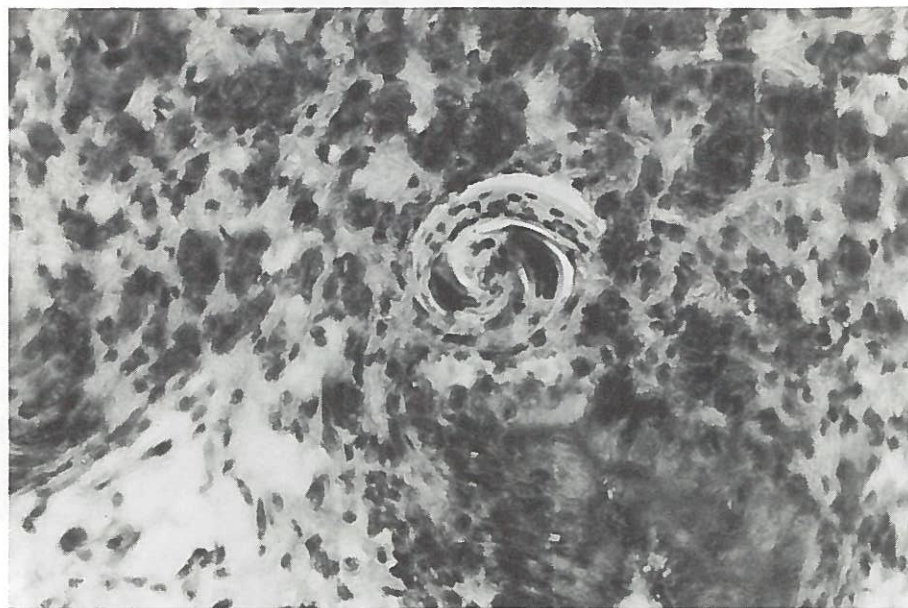


9. Nódulo larvario entre mallas de tejidos muscular y conectivo del pie del molusco. Tinción: hematoxilina-eosina. 357 c. a.



10. Porción subepitelial que muestra numerosos nódulos larvarios. 142 c. a. Tinción Hematoxilina-Eosina.





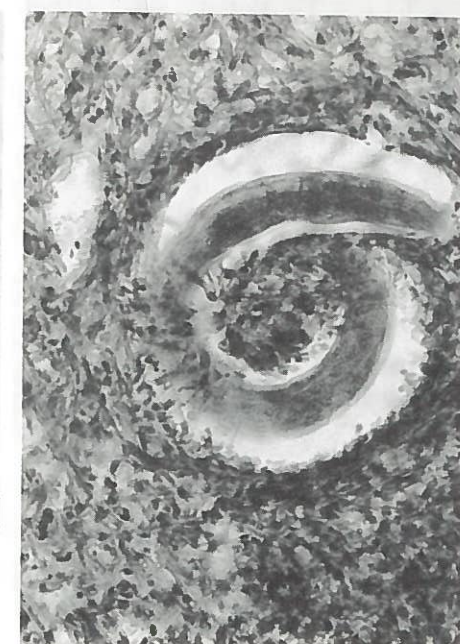
10<sup>bis</sup>. Larva I con escasa reacción tisular. 357 c. a. Tinción Hematoxilina Eosina.



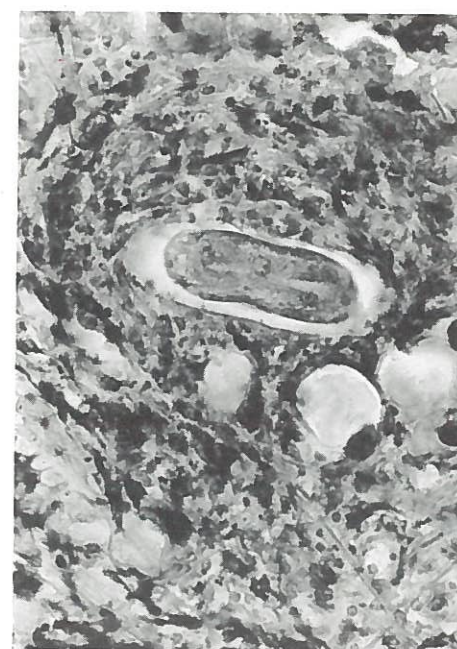
11. Nódulo verminoso. 142 c. a. 10 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.



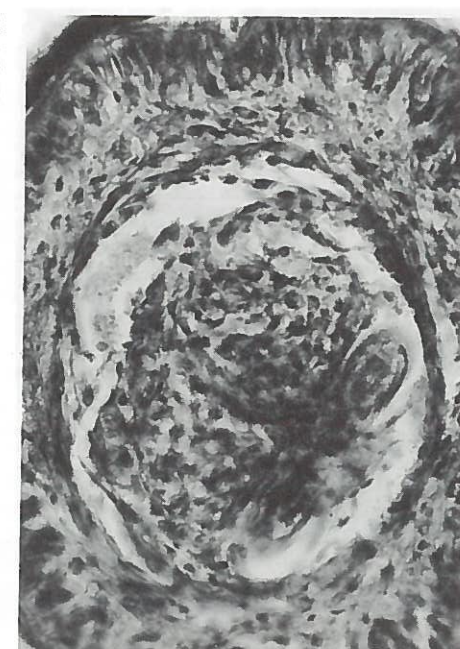
12. Larvas. 142 c. a. 10 días post infestación. Tinción: hematoxilina eosina.



13. Larva portando doble cutícula. 357 c. a. 16 días postinfestación. Tinción: hematoxilina - eosina.

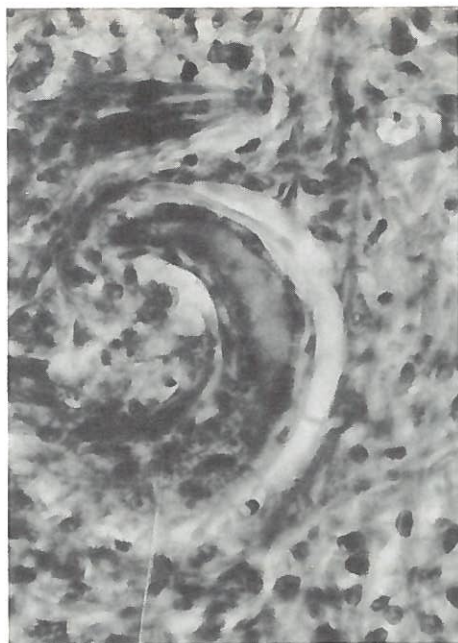


14. Larva rodeada por células en forma de «anillo de sello» 357 c. a. 16 días postinfestación. tinción: hematoxilina-eosina.

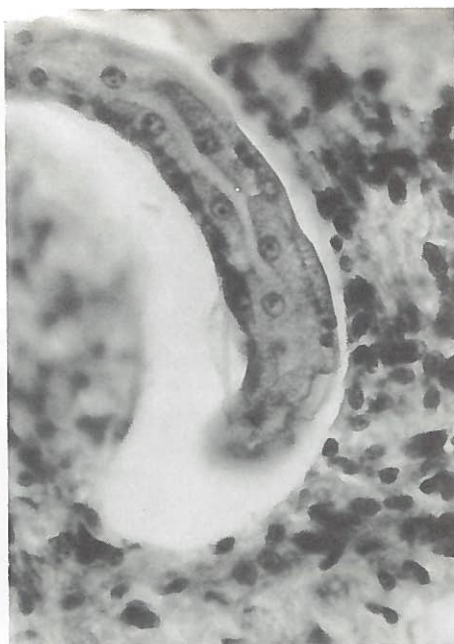


15. Nódulo cuyas células reaccionales se disponen de forma laxa. 357 c. a. 18 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.





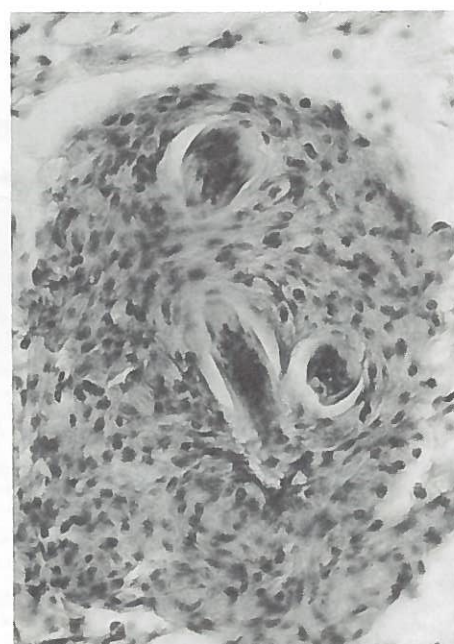
16. Larva con doble cutícula. 642 c. a. 18 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.



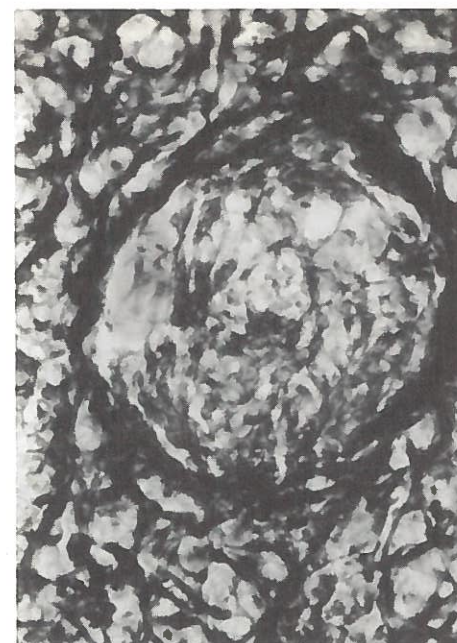
17. Larva III. 642 c. a. 20 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.



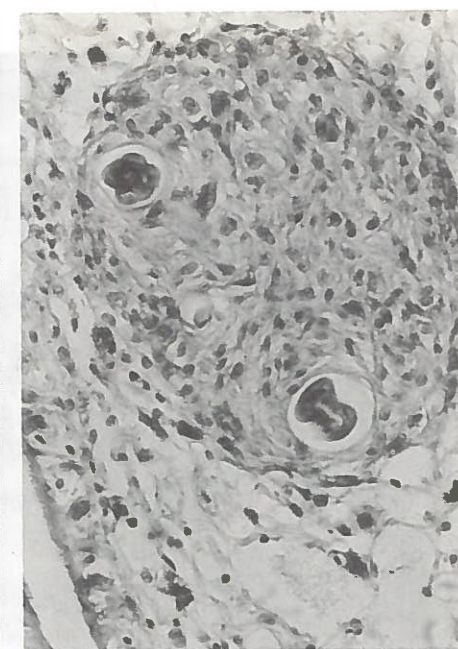
18. Sección de larva III. 24 días postinfestación. Tinción: PA-SCHIFF.



19. Nódulo parasitario 26 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina. 357 c. a.



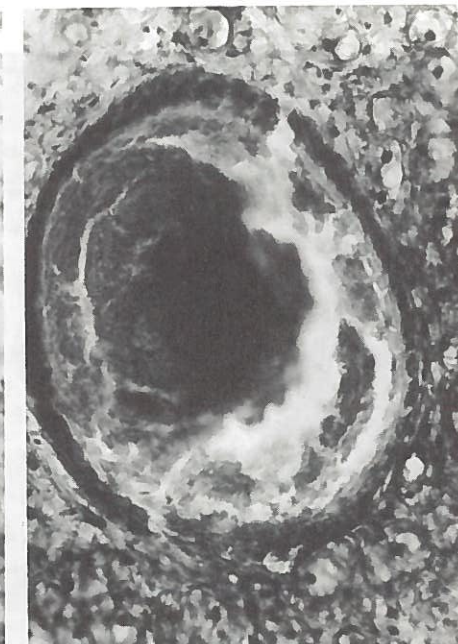
20. Nódulo parasitario delimitado por cápsula conjuntiva. Tinción: Tricómico de Masson. 357 c. a.



21. Nódulo larvario. 30 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina. 357 c. a.

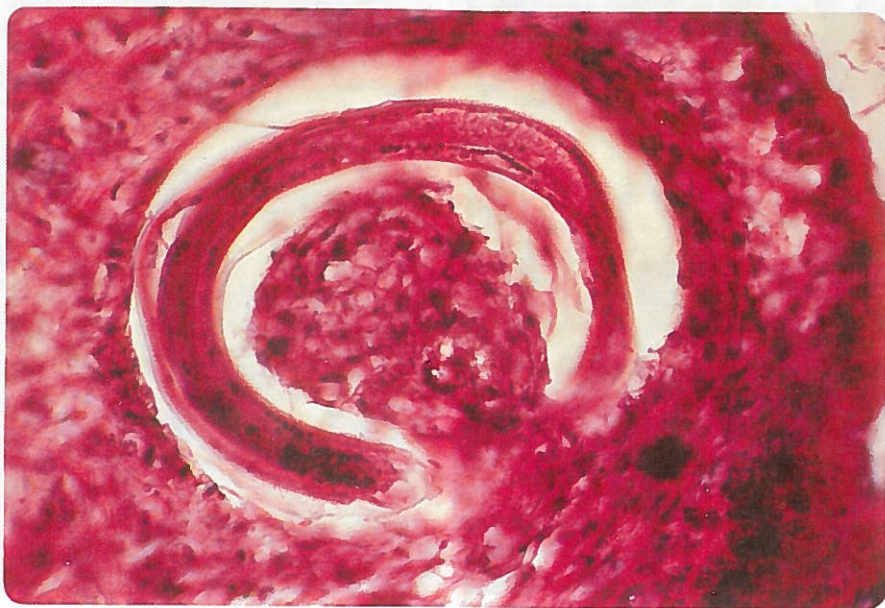


22. Nódulo parasitario con cápsula fibrosa. 40 días postinfestación. Tinción: Van Gieson. 357 c. a.

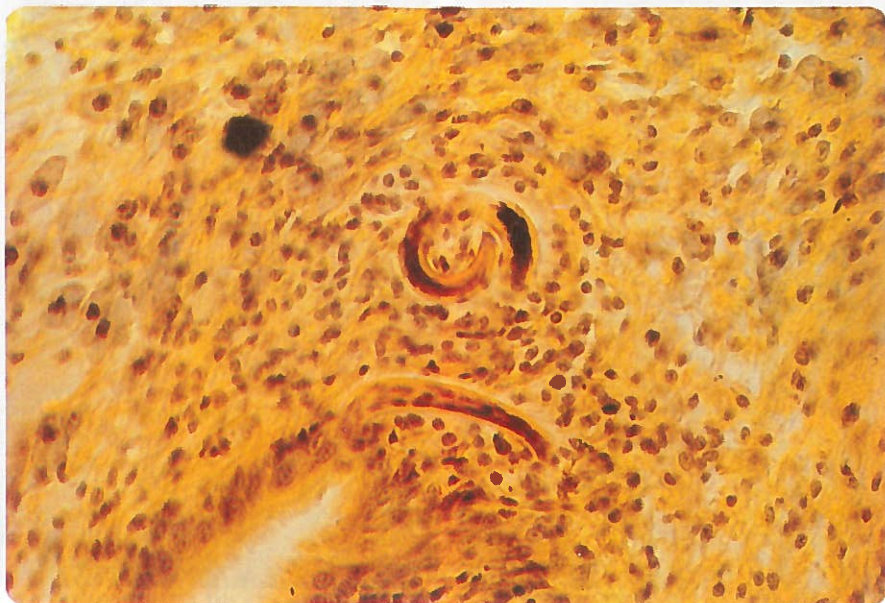


23. Nódulo larvario calcificado. 60 días postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina.

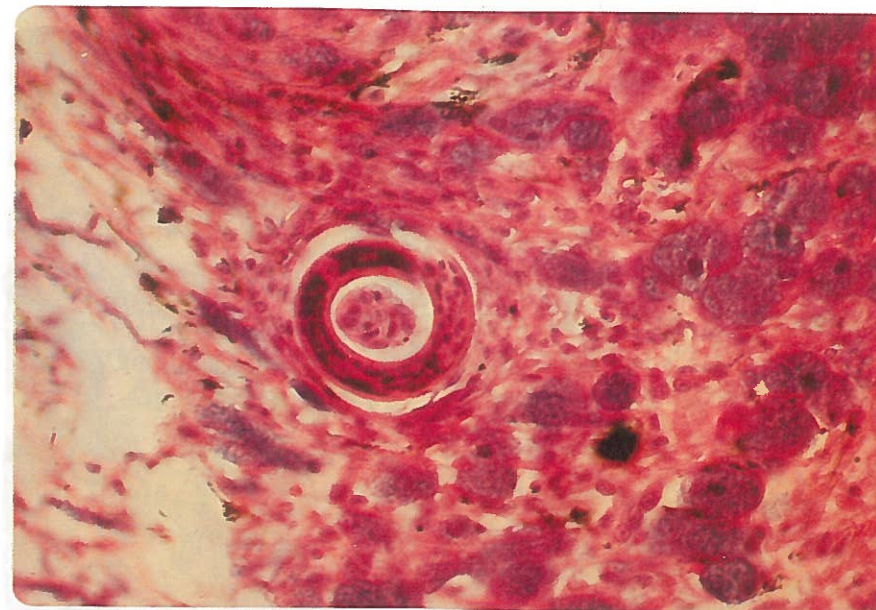




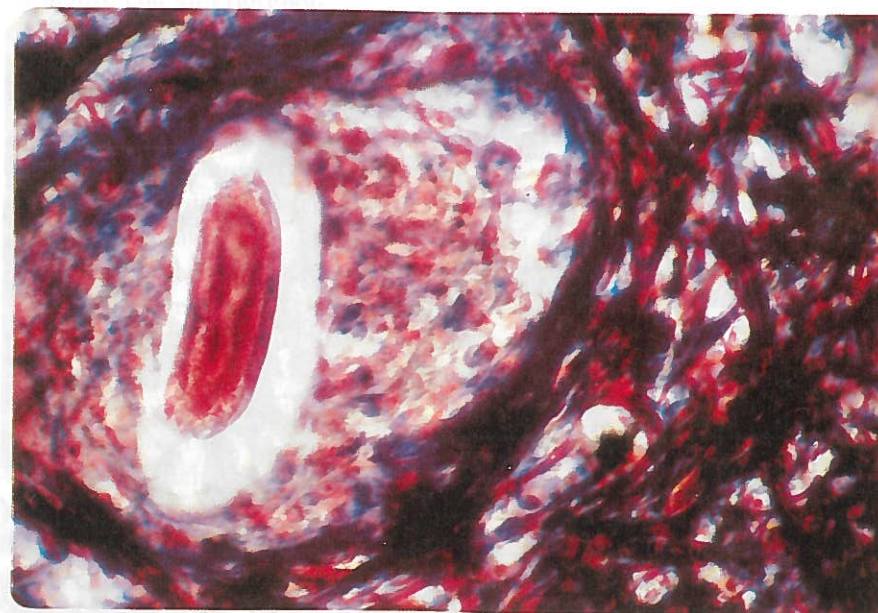
24. Larva III, normalmente estructurada. 120 días postinfestación. Tinción hematoxilina-eosina. 357 c. a.



25. Larvas I a los 60 minutos de infestación experimental. Tinción: Van Gieson. 357 c. a.

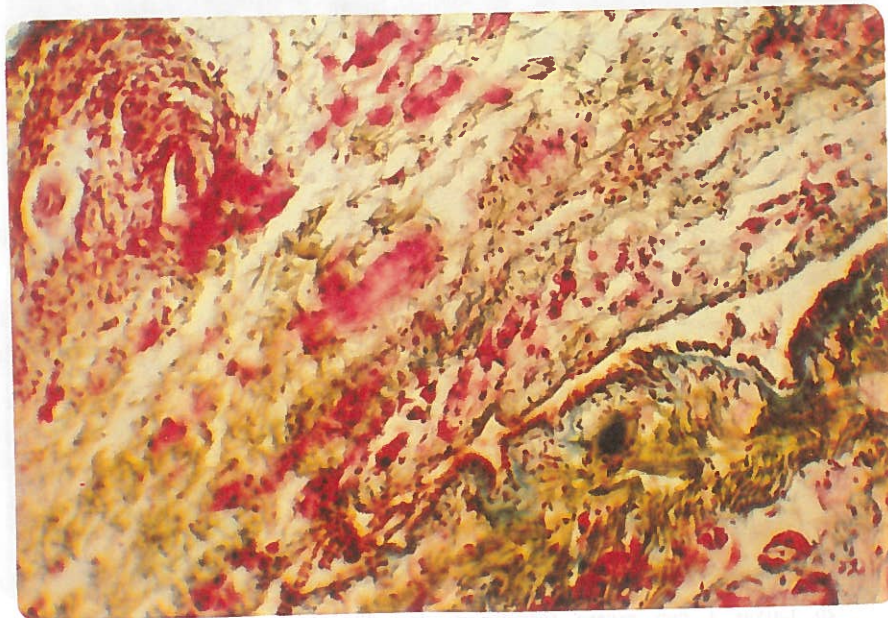


26. Larvas I con escasa reacción tisular. 48 horas postinfestación. Tinción: hematoxilina-eosina. 357 c. a.

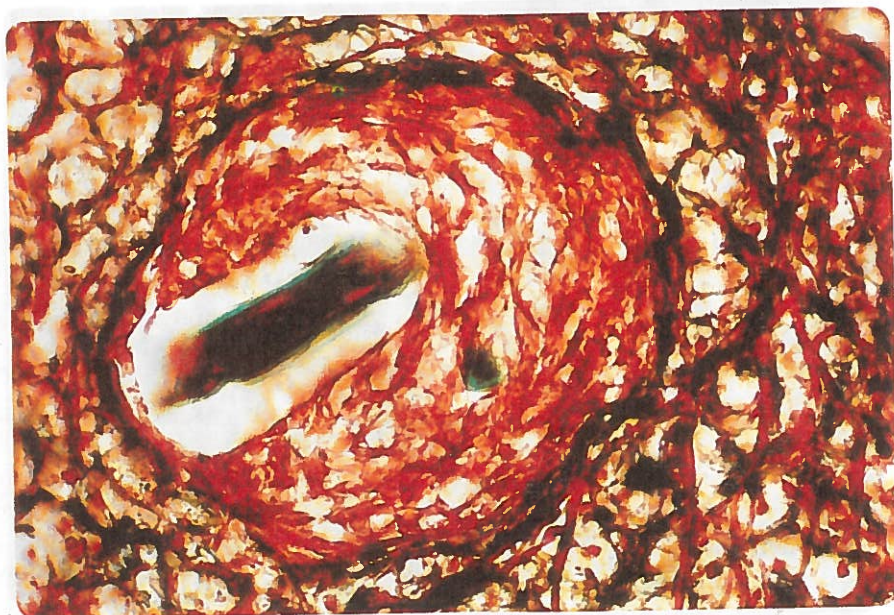


27. Larva circundada por un amplio espacio. Tinción: Tricómico de MALLORY. 356 c. a.





28. Nódulo larvario 20 días postinfestación. Tinción: GALLEGO. 142 c. a.



29. Nódulo parasitario delimitado por cápsula conjuntiva fibrosa. Tinción: Tricómico de MASSON.

## ESTUDIO DE LA CRISIS DEL DESTETE, EL CRECIMIENTO SUBSIGUIENTE Y LA INGESTION DE AGUA Y ALIMENTOS CONCENTRADOS Y GROSEROS, EN CORDEROS DESTETADOS A LOS 28 DIAS DE EDAD.\*

Por R. Sanz Arias  
R. Peláez

### INTRODUCCION

Se considera que el destete consiste en la supresión de la ingestión de leche o sustitutivos lácteos en animales que pueden haber sido separados de su madre con anterioridad.

En condiciones de crianza naturales, los corderos prolongan la lactancia de forma que el destete tiene lugar de un modo gradual y sin que se altere apreciablemente su ritmo de crecimiento. Por el contrario, al acortar el período de ingestión de leche o sustitutivos lácteos durante la crianza natural o artificial, se produce la denominada crisis del destete, caracterizada por la detención o la disminución del ritmo de crecimiento de los animales durante períodos de tiempo variables. En general, la duración e intensidad de la crisis está relacionada con la edad de los animales en el momento en que se suprime la alimentación láctea. Si los animales son muy jóvenes, la duración de la crisis se prolonga, habiéndose observado no sólo la detención del crecimiento sino una pérdida de peso en los mismos.

El destete se ha intentado con corderos de dos días de edad, aunque sin éxito (MUNRO, 1969). Los corderos de una semana de edad, son capaces de ingerir únicamente heno y concentrados, pero LARGE (1965) observó en estos animales una crisis intensa y prolongada, consiguiendo mejores resultados al destetar a los 17 días de edad. En los corderos destetados a edades comprendidas entre los 15 y los 21 días, los distintos autores han observado pérdidas de peso (CHARLET-LERY, LEROY y ZELTER, 1954; BONELLI, 1961), crecimiento lento de los animales (BROWN, 1964; LARGE, 1965) o solamente una ligera reducción del ritmo de crecimiento (KISCHGESSNER y ROTH MAIER, 1972).