



**NEUROSUBSTANCIAS EN LARVAS DE PARASITOS DIGENEOS:**

POSIBLE IMPLICACION EN LA REGULACION  
NEUROENDOCRINA  
Y EN LA RELACION HUESPED-PARASITO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

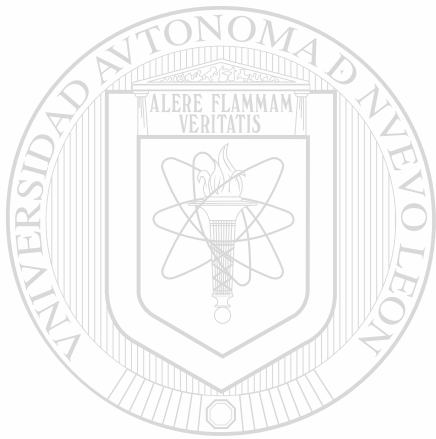
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

BIOL. Y M.C. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

MONTERREY N.L.

MAYO 1992



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

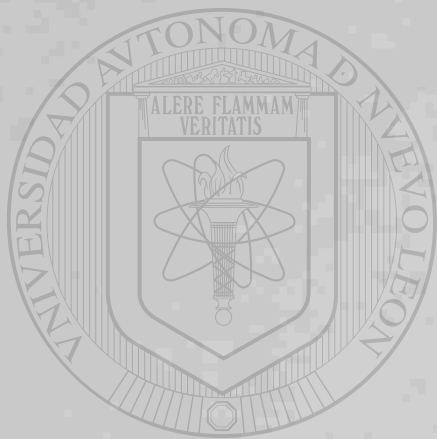
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
QE757  
S6  
c.1

12



1080074245



# UANL

---

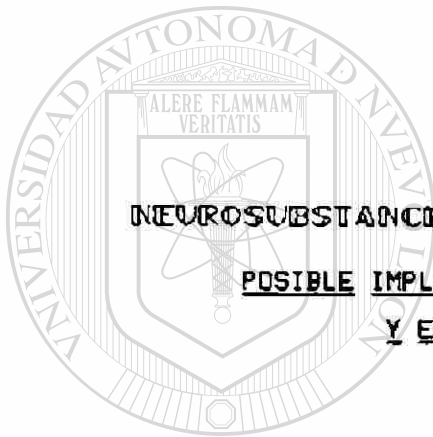
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**NEUROSUBSTANCIAS EN LARVAS DE PARÁSITOS DIGÉNEOS:  
POSIBLE IMPLICACION EN LA REGULACION NEUROENDOCRINA  
Y EN LA RELACION HUESPED-PARASITO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**DOCTOR EN CIENCIAS**

CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

**BIOL. Y M.C. JUAN MANUEL SOLIS SOTO**

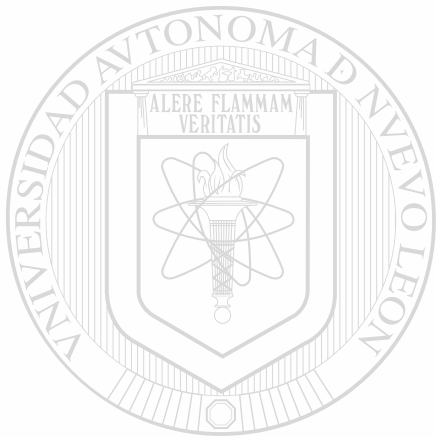
MONTERREY, N. L.

MAYO 1992.



TD  
QL757  
S6

o o  
(74245)



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NEUROSUBSTANCIAS EN LARVAS DE PARASITOS DIGENEOS:  
POSIBLE IMPLICACION EN LA REGULACION NEUROENDOCRINA  
Y EN LA RELACION HUESPED-PARASITO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

BIOL. Y M.C. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

APROBADA POR LA SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA FACULTAD  
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

COMITE DE TESIS:

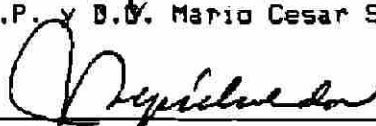
PRESIDENTE:

  
Biol. y Ph.D. Marijke De Jong-Brink.

SECRETARIO:

  
M.C.P. y D.V. Mario Cesar Salinas Carmona


1er. VOCAL:

  
M.C.P. Y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

2o. VOCAL:

  
M.C.P. y Dr. Med. Guadalupe Arredondo de Arreola

3er. VOCAL:

  
Biol. y D.C. Mario Morales Vallarta

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA DE LA

UNIVERSIDAD LIBRE (VRIJE UNIVERSITEIT),

EN AMSTERDAM, HOLANDA, BAJO LA ASESORIA DE LA

PH.D. MARIJKE DE JONG-BRINK



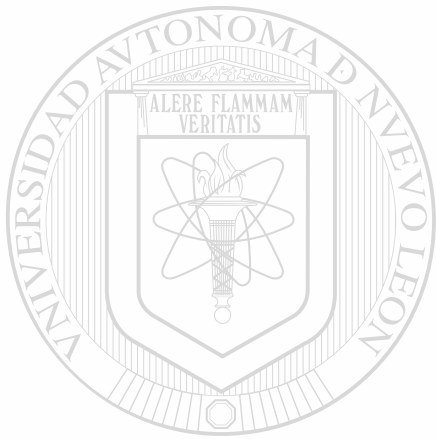
ASESOR INTERNO: PH.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA,

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA, U.A.N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

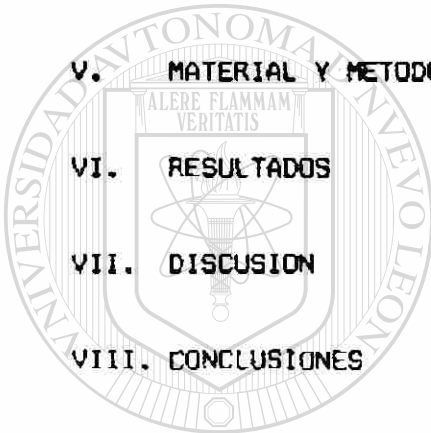
A MI PADRE



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **PORQUE SIEMPRE ESTAS CUANDO TE NECESITO...**

## INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	HIPOTESIS	8
IV.	OBJETIVOS	9
V.	MATERIAL Y METODOS	10
VI.	RESULTADOS	21
VII.	DISCUSION	68
VIII.	CONCLUSIONES	77
IX.	PERSPECTIVAS	79
X.	BIBLIOGRAFIA	80



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



TABLA 1. ANTISUEROS USADOS.....15

TABLA 2. PRESENCIA DE INMUNOREACTIVIDAD (IR) A PEPTIDOS  
DERIVADOS DE PRECURSORES OPIOIDES EN MIRACIDIA  
Y ESPOROCISTO MADRE DE *T. ocellata*.....22

TABLA 3. PRESENCIA DE IR A NEUROPEPTIDOS NATIVOS DE  
VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS EN CERCARIAS DE  
*T. ocellata*, *S. mansoni* y *D. spathaceum*.....22

TABLA 4. PRESENCIA DE IR A NEUROPEPTIDOS NATIVOS DE  
VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS EN LA MIRACIDIA DE  
*T. ocellata* Y EN LA METACERCARIA DE *D. spathaceum*.....23

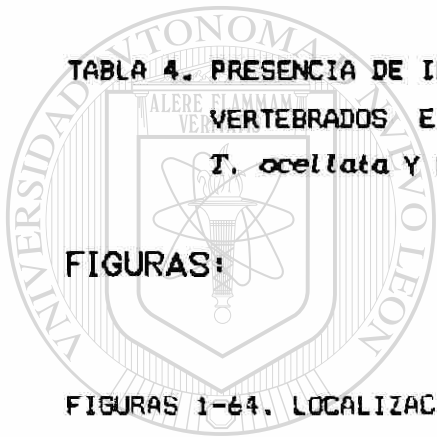
FIGURAS:

FIGURAS 1-64. LOCALIZACION DE LA INMUNOREACTIVIDAD A  
GLUTAMATO Y NEUROPEPTIDOS EN LARVAS DE  
PARASITOS DIGENEOS.....30-65

FIGURA 65-66. GLANDULAS DEL ALBUMEN DE *L. stagnalis*  
INCUBADAS CON SUERO DE *L. stagnalis*  
INFECTADO CON *T. ocellata* y *D. spathaceum*.....66

GRAFICA:

GRAFICA 1. EFECTO DE LA ESQUISTOSOMINA SOBRE LA ACCION  
DE LA CALFLUXINA EN LAS MITOCONDRIAS DE LAS  
CELULAS DE LA GLANDULA DEL ALBUMEN DE *L. STAGNALIS*.....67



UANL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESUMEN

Las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a cortes histológicos y montajes totales de larvas de parásitos digéneos han permitido detectar la presencia y localización de glutamato y neuropeptidos aislados de vertebrados e invertebrados. En *Trichobilharzia ocellata* se observó inmunoreactividad (IR) en: 1) En el sistema nervioso de la miracidia con antisueros dirigidos a Glutamato, Catch relaxing peptide (CARP), FMRFamida, APGWamida, Péptido  $\alpha$  de las células caudodorsales ( $\alpha$ -CDCP), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, Oxitocina, Dinorfina, y Hormona  $\alpha$  estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH). En las células germinales se detectó IR a Met-enkefalina. 2) En el esporocisto madre se observó IR en las células germinales con un antisuero contra Met-enkefalina. 3) En la cercaria se encontró IR en el sistema nervioso con antisueros en

contra de Glutamato, CARP, FMRFamida, Péptido cardíaco pequeño (SCP $\beta$ ), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, Prolactina y Substancia P. ®

Algunas neurosubstancias fueron localizadas en células no neuronales en esta especie de cercaria: FMRFamida en las glándulas de escape; APGWamida en células flamíferas; y Met-enkefalina en células indiferenciadas precursoras de músculo, y en algunas células de los conglomerados germinales.

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

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

En *Diplostomum spathaceum* se detectó IR en el sistema nervioso de:

1) La cercaria con antisueros en contra de CAPP, FMRFamida,  $\alpha$ -CGRP, Arg-Vasopresina, y Substancia P. IR a Met-enkefalina se observó en la misma localización que en las dos especies de cercarias anteriores. 2) En la metacercaria IR en el sistema nervioso fue detectada con Glutamato, CAPP, FMRFamida, APGWamida, SCPs,  $\alpha$ -CGRP, Hormona de las células caudodorsales I (CDCH-I), Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina, y Substancia P. En esta última etapa larval es notoria la inervación peptidérgica del órgano adhesivo-absortivo. Los resultados son discutidos con relación a las posibles funciones intrínsecas, y en relación a interacciones huésped-parásito.

A diferencia de los parásitos digeneos de la familia schistosomatidae, el suero de *L. stagnalis* infectado con *D.*

~~*spathaceum*~~ no afecta la acción de la calfluxina sobre las mitocondrias de células de la glándula del albumen, lo que puede

indicar que el parásito no ocasiona la liberación de esquistosomina del sistema nervioso central de su huésped intermediario.

## INTRODUCCION

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

Estos parásitos pertenecen al filo platelmintos, que son filogenéticamente los primeros organismos con centralización del sistema nervioso. En ausencia de glándulas endocrinas y de un sistema circulatorio adecuado, el componente neurosecretorio (peptidérgico) parece jugar un papel integrativo muy importante en este grupo de organismos. Existen varios datos que así lo

sugieren: 1) Fracciones neurosecretorias estimulan la síntesis de ARN y la mitosis; 2) Se ha observado material neurosecretorio relacionado a órganos sensoriales y en terminaciones nerviosas de uniones neuronales; 3) Parece tener un papel en la regulación de la maduración en las etapas larvales, y en la capacidad de regeneración en planarias; 4) Se ha observado que hay activación del material neurosecretorio durante el cambio de huésped (4-9,10,11,12). La identificación de sustancias regulatorias endógenas en gusanos planos, principalmente en trematodos digeneos, puede dar información interesante acerca de estrategias adaptativas, y desde el punto de vista médico y económico.

Los estudios dirigidos a identificar la naturaleza de las neurosubstancias de platelmintos han detectado la presencia de acetilcolina y aminas biogénicas en muchas especies de gusanos planos, y del aminoácido glutamato en una especie de cestodos (10-17). Estudios similares, con técnicas de inmunocitoquímica han mostrado la localización en el sistema nervioso de cerca de 30 neuropéptidos de vertebrados (18,19,21). Sin embargo, el papel fisiológico y la estructura molecular - actualmente solo el neuropeptido F ha sido aislado y completamente secuenciado (20) - de estos neuropeptidos permanece desconocida. Estudios con anticuerpos dirigidos en contra de neuropeptidos de especies más relacionadas filogenéticamente podrían ayudar en la identificación de elementos regulatorios de platelmintos. A la fecha, solo tres neuropeptidos aislados de invertebrados han sido reportados en este filo, FMRFamida y Péptido cardíaco pequeño B (SCP<sub>B</sub>) en las tres clases de platelmintos, y SALMFamida en turbelarios y cestodos (21-23).

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado también la presencia de neuropeptidos en células no neuronales de platelmintos: Peptido intestinal vasoactivo, somatostatina y prolactina en células tegumentales, y substancia P. polipeptido YY, y FMRFamida en células de la prostata (25-27,29,31). Estas substancias semejantes a neuropeptidos en localización extraneuronal, especialmente en células tegumentales y en células flamíferas, podrían ser secretadas dentro del huésped y jugar algún papel en las interacciones huésped-parásito. De hecho, se ha demostrado que algunas larvas del ciclo de vida de platelmintos producen y



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

Los trematodos digeneos utilizan caracoles de agua dulce como uno de sus huéspedes intermediarios, alrededor de la semana 5 postinfección causan en éstos una drástica reducción ó una inhibición total de la fecundidad (castración parasítica) y, cuando son infectados en etapas juveniles, una estimulación del crecimiento corporal (crecimiento gigante) (28). Estos efectos

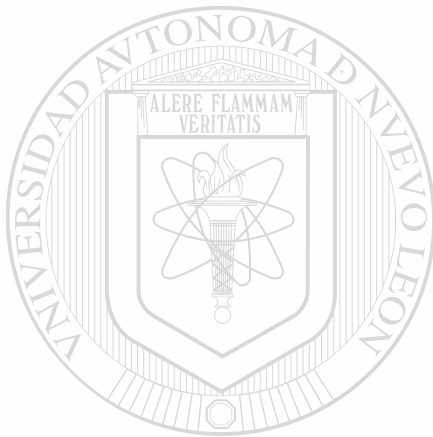
parecen ser causados por el neuropéptido esquistosomina, derivado del caracol (29), el cual antagoniza los efectos de las hormonas gonadotropicas del caracol sobre los órganos del aparato reproductor femenino (30-33). Un factor producido por la cercaria parece ser el responsable de la liberación de esquistosomina por el sistema nervioso central (SNC) del caracol (29), sin embargo, la naturaleza de este factor es desconocida. Neuropeptidos, aminoácidos, esteroides, entre otros, son posibles candidatos.

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

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

En etapas tempranas de infección *T. ocellata* afecta al sistema de defensa inmune de su huésped intermedio *L. stagnalis*, ocasionando primeramente un incremento en la actividad fagocítica de los hemocitos, por un factor derivado del parásito, y posteriormente una supresión de la actividad fagocítica, por un factor derivado del sistema nervioso del caracol. Un factor derivado del esporocisto madre parece inducir la liberación de este factor (95,30). Se ha planteado la hipótesis de que estos factores activadores y supresores de la actividad fagocítica son péptidos derivados de precursores de péptidos opioides, debido a que ha sido demostrado que estos péptidos afectan la conformación, migración y

adherencia de hemocitos de moluscos (97,98). Duvaux-Miret y col. (99) encontraron que dos oligonucleótidos con secuencias específicas para precursores de péptidos opioides mostraban hibridización significativa con el ADN de *Schistosoma mansoni*. Además, con radioinmunoensayos encontraron inmunoreactividad para  $\alpha$ -MSH, ACTH y  $\beta$ -Endorfina. Estudios inmunocitoquímicos a la fecha únicamente han detectado inmunoreactividad a Leu-Encefalina en trematodos (4,110).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## HIPOTESIS

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

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

## OBJETIVOS

### OBTENER ETAPAS LARVALES DE PARASITOS DIGENEOS:

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

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

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

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



## MATERIAL Y METODOS

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

#### Obtención de miracidias de los parásitos.

Huevos de *Schistosoma mansoni* (cepa Puerto Rico) fueron obtenidos de hígado de ratón (*Mus musculus*): Ratones (cepa CD1) fueron infectados con cercarias del digeneo (las colas fueron sumergidas por 10 min. en 50 ml. de agua con aproximadamente 200 cercarias). Después de sacrificar a los ratones por dislocación cervical, el hígado fue obtenido y homogenizado, centrifugado (5000rpm/5min), lavado dos ocasiones más en suero fisiológico, y posteriormente dos veces en agua libre de cobre. Todo el proceso a 4 °C. Los huevos aislados fueron colocados en agua libre de cobre, a una temperatura de 25 °C, con una fuente de luz de 100 watts. Después de dos horas las miracidias pudieron ser obtenidas.

Huevos de *Trichobilharzia ocellata* fueron obtenidos de excremento de pata (*Anas platyrhynchos*), como fue descrito por Mellink y Van den Bovenkamp (4). Las miracidias fueron estimuladas a emerger de los huevos aplicandoles una fuente de luz (100 watts).

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

huevo aplicados una fuente de luz (100 watts).

#### Infección.

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

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

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

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

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

#### Obtención de esporocistos madre.

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

#### Obtención de esporocistos hijo y cercarias libres.

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

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

#### Obtención de metacercarias.

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

#### INMUNOCITOQUIMICA.

#### CORTES.

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

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

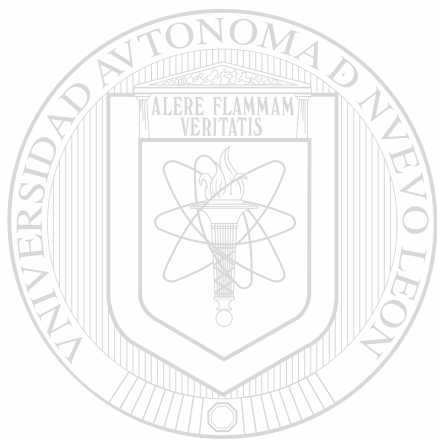
#### Montaje total

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

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

**Controles:**

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



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



Tabla 1: Antisueros usados.

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

Tabla 1. (Continuación).

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

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

Tabla 1. (Continuación).

**\*\*FUENTES DE LOS ANTICUERPOS:**

- (A)- Dr. R.M. Buijs, Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, Holanda.
- (B)- Prof. Claude-Roland Marchand, Laboratoire de Zoologie et Embriologie, Besançon Cédex, Francia.
- (C)- Prof. H.H. Boer y Dr. Jan Van Minnen, Department of Histology, Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda.
- (D)- Dr. J. Baguña, Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, España.
- (E)- Dr. F.J.H. Tilders y Dr. H.W. Steinbusch, Department of Pharmacology, Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda.
- (F)- Prof. C.K. Phares, University of Nebraska, USA.
- (G)- Prof. E. Roubos, Catholic University of Nijmegen, Nijmegen, Holanda.
- (H)- Prof. R. Goos, Utrecht Universiteit, Holanda.
- (I)- Dr. Y. Muneoka, Faculty of Integrates Arts & Sciences, University of Hiroshima, Japon.
- (J)- Dr. V. Kasakov, Pavlov Institute, Pelerburg, URSS.
- (K)- Dr. S. Kempf, University of Auburn, Alabama, USA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DETECCION DE ESQUISTOSOMINA EN LA HEMOLINFA DE CARACOLES.

### Suero de Caracoles.

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

### Aislamiento de la hormona Calfluxina (CaFl).

Comisuras cerebrales - el área donde las células caudodorsales secretan la hormona calfluxina en la hemolinfa (46) - de 30 caracoles adultos (*L. stagnalis*) no infectados, de aproximadamente 25 mm, fueron disecadas. Las comisuras fueron colectadas en tubos Eppendorf y colocadas sobre CO<sub>2</sub> sólido. Se añadió ácido acético (0.1M), y fueron calentadas en agua hirviendo por 10 minutos. Se homogenizó el tejido, se sonicó, y se centrifugó (12000 rpm/10 min). El sobrenadante fue colectado. La pildora fue resuspendida dos veces más y tratada de la misma forma que el homogenado. Los sobrenadantes combinados fueron liofilizados 16 hrs. La hormona fue disuelta en solución de Ringer.

### Incubaciones.

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

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

Grupo 1: Ringer.

Grupo 2: Ringer + CaFl.

Grupo 3: Suero de caracoles no infectados + CaFl.

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

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

#### Demostración de depósitos de Calcio.

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

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

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

#### Análisis Estadístico.

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



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESULTADOS

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

Inmunoreactividad a glutamato fue observada en miracidias de *T. ocellata*, cercarias de *T. ocellata* y *S. mansoni*, y en la metacercaria de *D. spathaceum*. En la miracidia IR fue observada en el neuropilo central, así como en los troncos nerviosos anteriores y posteriores (Fig.1). Tanto en la cercaria intraesporocística como en la cercaria libre de *T. ocellata* una gran IR fue detectada en el sistema nervioso, ésta estuvo presente en los ganglios centrales,

la comisura principal, y en los troncos nerviosos anteriores y posteriores (Figs.2-5). En *S. mansoni*, menor IR fue observada en la cercaria libre, en la misma localización que la cercaria de *T. ocellata*. En la metacercaria IR fue observada en la comisura anterior, troncos nerviosos ventrales, cordones nerviosos anteriores, y en fibras nerviosas de la musculatura subtegumental (Figs.6-7).

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

Tabla 2. Presencia de IR a péptidos derivados de precursores opioides en miracidia y esporocisto madre de *T. ocellata*. 22

ANTISUERO	MIRACIDIA	ESPOROCISTO MADRE
Dinorfina	+	-
$\alpha$ -Endorfina	-	-
$\beta$ -Endorfina	-	-
ACTH(1-24)	-	-
ACTH(25-39)	-	-
ACTH(4-10)	-	-
ACTH(10-13)	-	-
ACTH(11-17)	-	-
ACTH(18-24)	-	-
$\alpha$ -MSH	+++	-
Met-Enkefalina	+++	++

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

ANTISUERO	<i>T. ocellata</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>D. spathaceum</i>
CARP	+++	+++	+++
$\alpha$ -CDCP	-	+	+
APGWamida	+++	-	-
FMRFamida	+++	+++	+++
SCP <sub>B</sub>	-	-	-
Vasotocina	+++	-	-
Vasopresina	++	-	+++
Oxitocina	-	-	-
Prolactina	++	-	-
Substancia P	++	-	+++
Colecistocinina	-	++	-
Somatostatina	-	+++	-
Met-enkefalina	+++	+++	++

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



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

ANTISUERO	MIRACIDIA	METACERCARIA
ALMA 6	-	-
APGWamida	++	+++
CaF1	-	-
GARP	+++	+++
4M5m	-	-
FMRFamida	+++	+++
CDCH I	-	+
CDCH Ia	-	-
CDCH II	-	-
DBH	-	-
MIP B	-	-
MIP C	-	-
$\alpha$ -CDCP	++	+
$\beta$ -CDCP	-	-
SCP <sub>B</sub>	-	++
Vasotocina	++	+
Vasopresina	++	+++
Oxitocina	+	-
Substancia P	++	+++
Met-enkefalina	+++	-

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

**Miracidia de *T. ocellata*:**

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

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

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

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

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

**Esporocisto madre de *T. ocellata*:**

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

### Cercarias:

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

### Cercaria de *T. ocellata*:

La cercaria intraesporocística completamente desarrollada y la cercaria libre presentaron IR en el sistema nervioso con los siguientes antisueros: CAPP, SCP<sub>8</sub>, FMRFamida, Arg-Vasotocina, Arg-Vasopresina, Prolactina y sustancia P. La mas fuerte IR fue con antisueros en contra de FMRFamida y CAPP, ésta fue observada en fibras nerviosas del neuropilo y de la comisura central, así como en los troncos nerviosos longitudinales anteriores y posteriores.

(Figs.20-21). Fibras nerviosas de la cola que terminan en la furca también mostraron IR con estos neuropeptidos nativos de invertebrados (Figs.22-24).

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

IR a neuropeptidos localizada extraneuronamente fue detectada en esta especie: IR con el antisuero en contra de APGWamida estuvo localizada en las células flamígeras de la cercaria libre, en la cercaria intraesporocística totalmente desarrollada (Figs.31-35). Algunas células en la pared del esporocisto hijo también mostraron

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

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

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

Cercaria de *S. mansoni*:

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

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

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

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

Met-encefalina mostró idéntica distribución que en las cercarias de

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

Cercaria de *D. spathaceum*:

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

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

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

Metacercaria de *D. spathaceum*:

De los antisueros tratados, IR en el sistema nervioso fue observada con: FMRFamida, CARP, APGWamida, SCP<sub>1</sub>,  $\alpha$ -CDCP, CDCH-I, Arg-Vasopresina, Arg-Vasotocina y Substancia P.

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

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

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

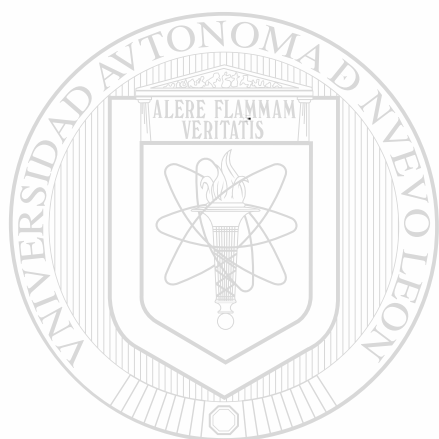
SCP<sub>a</sub> y CDCH I estan menos distribuidos, IR fue observada unicamente en los ganglios anteriores, la comisura principal y comisuras nerviosas subtegumentales (Fig.62-63). El poro excretorio mostró fibras inmunoreactivas a SCP<sub>a</sub> (Fig.64). Inervación del organo adhesivo-absortivo fue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

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

#### Detección de esquistosomina en hemolinfa.

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

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



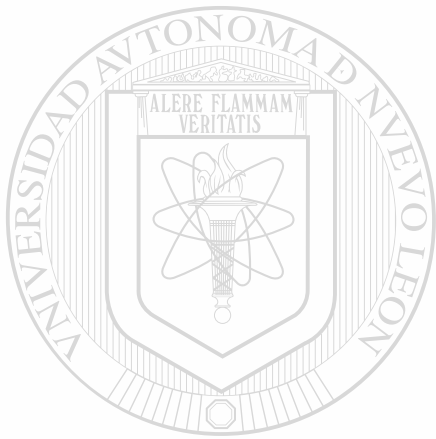
# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FIGURAS

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





Fig.1. Corte longitudinal de la miracidia de *T. ocellata*.  
Inmunoreactividad (IR) a glutamato en la masa central y parte de  
los troncos nerviosos anteriores (flechas), (a) glándula  
anterior. Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).  
Criosecado-Paraformaldehido (C-PF). Barra=5µm.

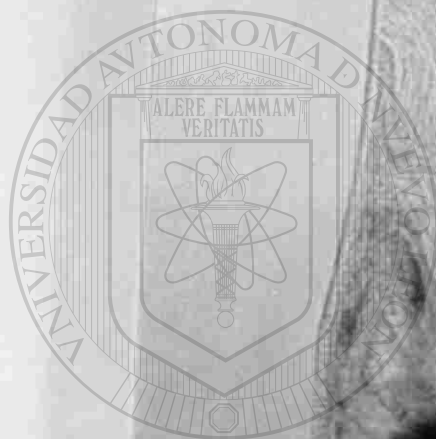


Fig. 2. Corte longitudinal de la cercaria intraesporocística de *T. ocellata*. IR a glutamato en la comisura central (flecha), (a) glándulas postacetabulares, (b) ventosa anterior. PAP. C-PF. Barra=8µm.

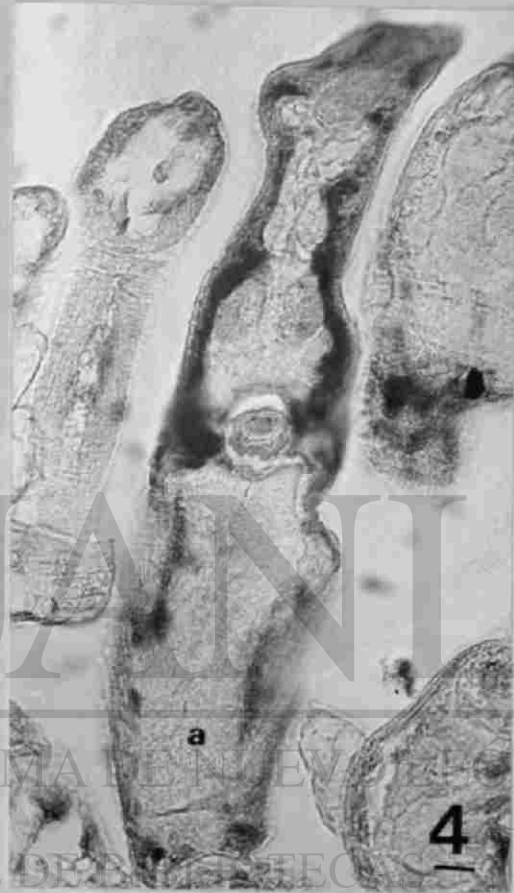
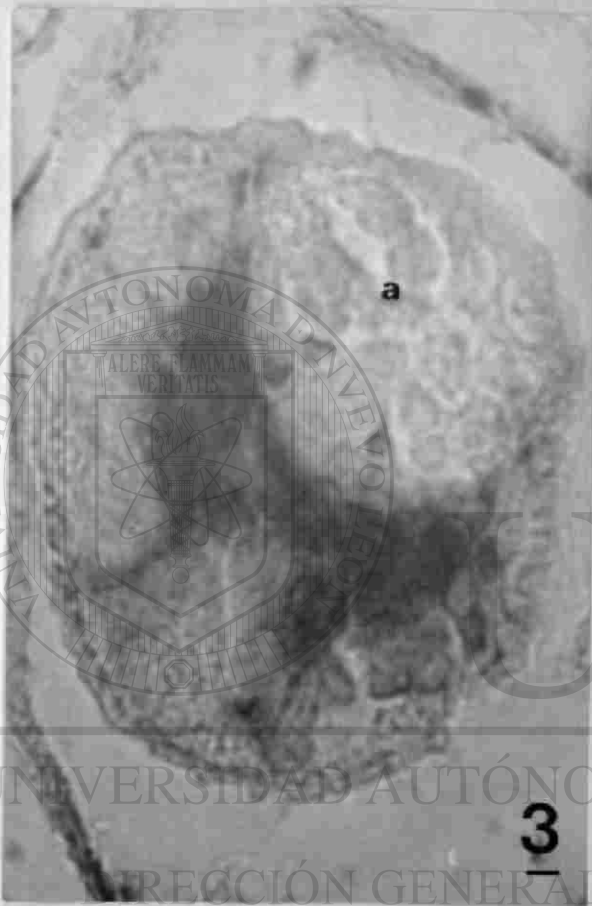
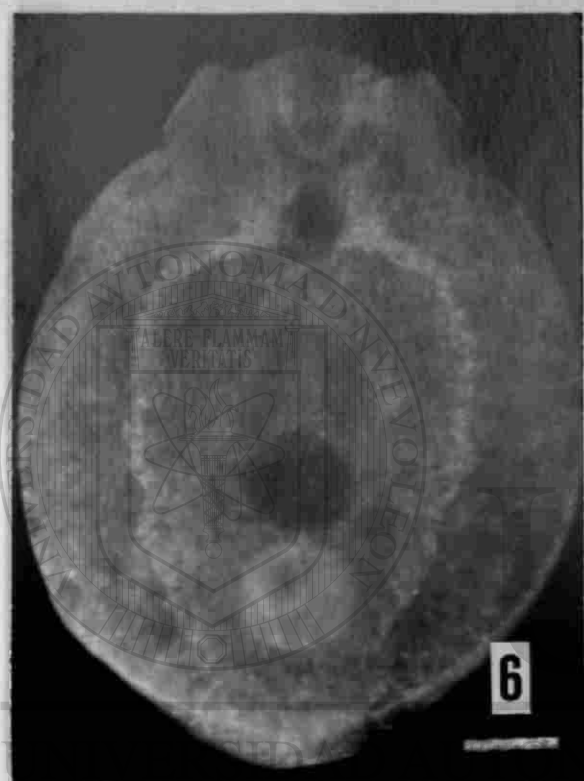


Fig.3. Corte transversal de la cercaria intraesporocistica de *T. ocellata*. IR a glutamato en los ganglios centrales y fibras de la comisura, (a) conductos de las glándulas acetabulares. PAP. C-PF. Barra=5 $\mu$ m.

Fig.4. Corte longitudinal de la cercaria libre de *T. ocellata*. IR a glutamato en los troncos nerviosos anteriores y posteriores, (a) glándulas postacetabulares, (b) cola. PAP. C-PF. Barra=20 $\mu$ m.



Fig.3. Corte longitudinal de la cercaria libre de *T. ocellata*. IP a glutamato en los ganglios y troncos nerviosos longitudinales, (a) glándulas acetabulares, (b) ventosa ventral. PAP. C-PF. Barra=8 $\mu$ m.



®

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

8

Fig.6. Montaje total de la metacercaria de *D. spathaceum*. IR a glutamato en los troncos nerviosos ventrales. Fluoresceína. Barra=40 $\mu$ m.

Fig.7 Montaje total de la metacercaria de *D. spathaceum*. IR a glutamato en las comisuras transversas subtegumentales. Fluoresceína. Barra=40 $\mu$ m.

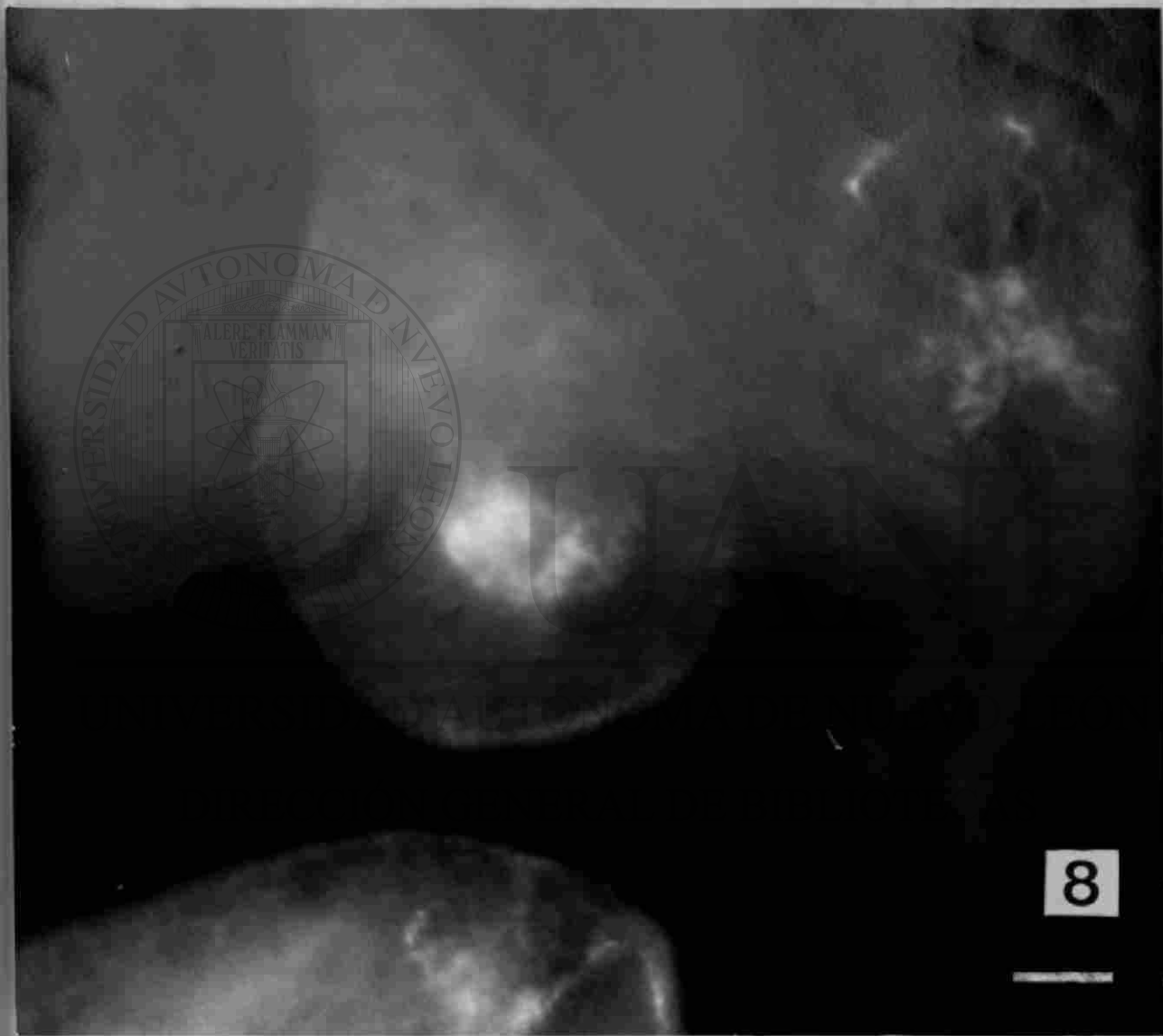
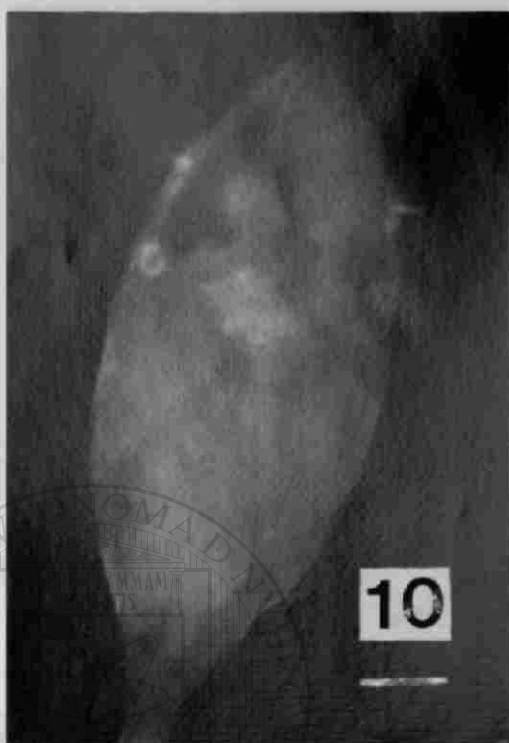


Fig. 8. Montaje total de miracidias de *T. ocellata*. IR a FMRFamida en algunas neuronas, la masa central y en los troncos nerviosos longitudinales. Fluoresceína. Barra=12 $\mu$ m.



Fig.9. Montaje total de una miracidia de *T. ocellata*. IR a CARRP en la masa central y en los troncos nerviosos anteriores y posteriores. Fluoresceína. Barra=6µm.



Figs.10,12. Montaña total de miracidias de *T. ocellata*. IR a  $\alpha$ -MSH en la masa central y neuronas alrededor de esta. Fluoresceína. Fig.10. Barra=12 $\mu$ m. Fig.12. Barra=13 $\mu$ m.  
Fig.11. Corte longitudinal de una miracidia de *T. ocellata*. IR a  $\alpha$ -MSH en una neurona cerca de la masa central. PAP. C-PF. Barra=14 $\mu$ m.



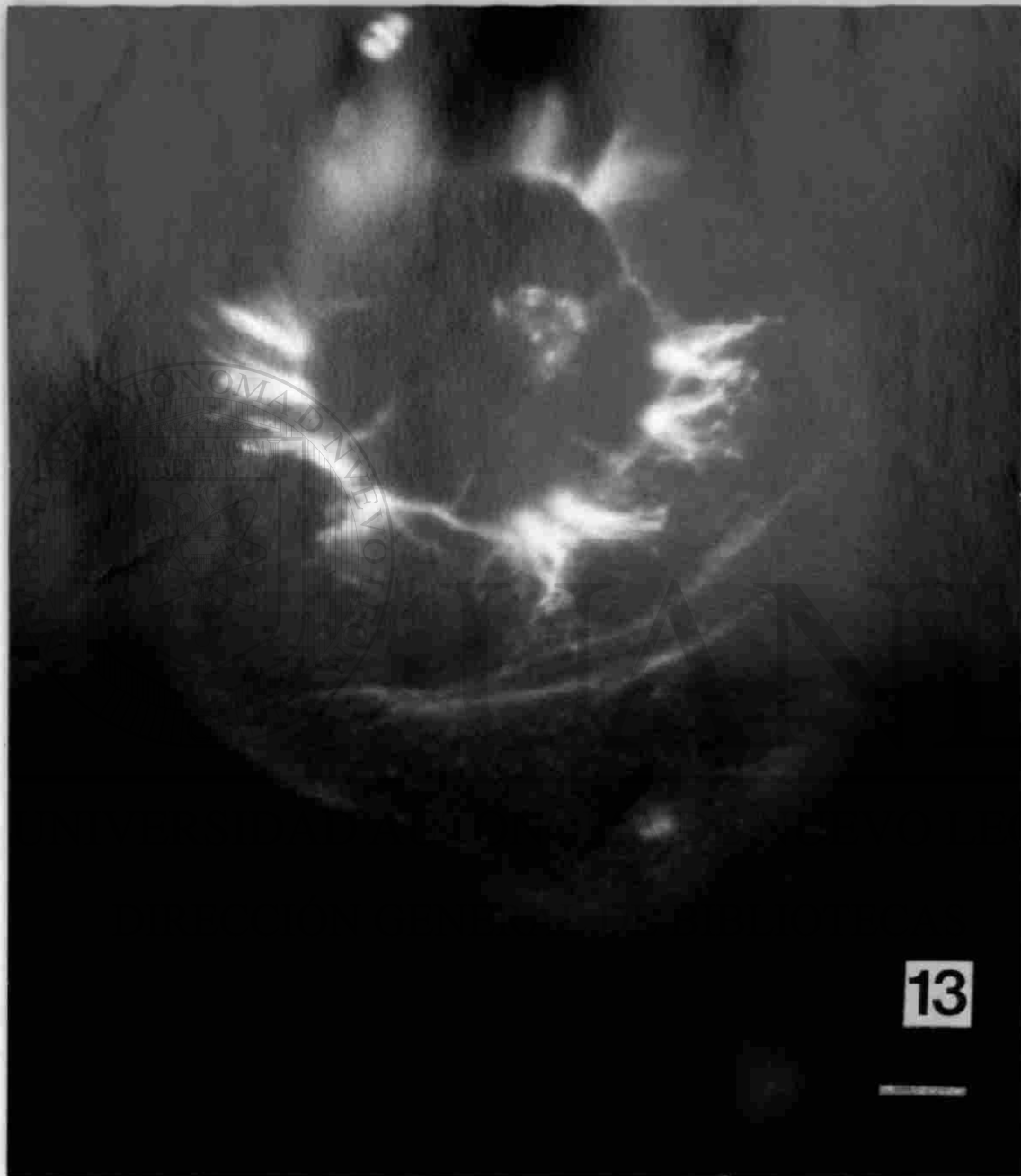


Fig.13. Montaje total de una miracidia de *T. ocellata*. IR a  $\alpha$ -MSH en 6 pares de terminaciones nerviosas ciliadas entre la primera y segunda hilera de placas ciliadas. Fluoresceína. Barra=5 $\mu$ m.

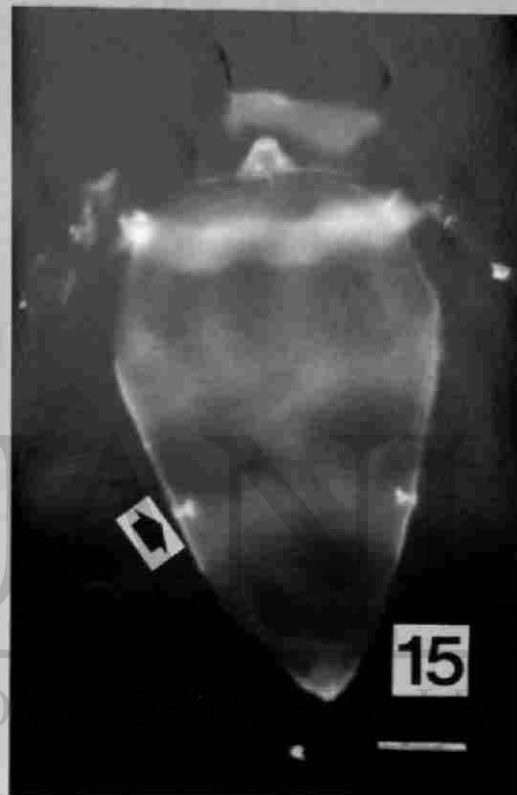
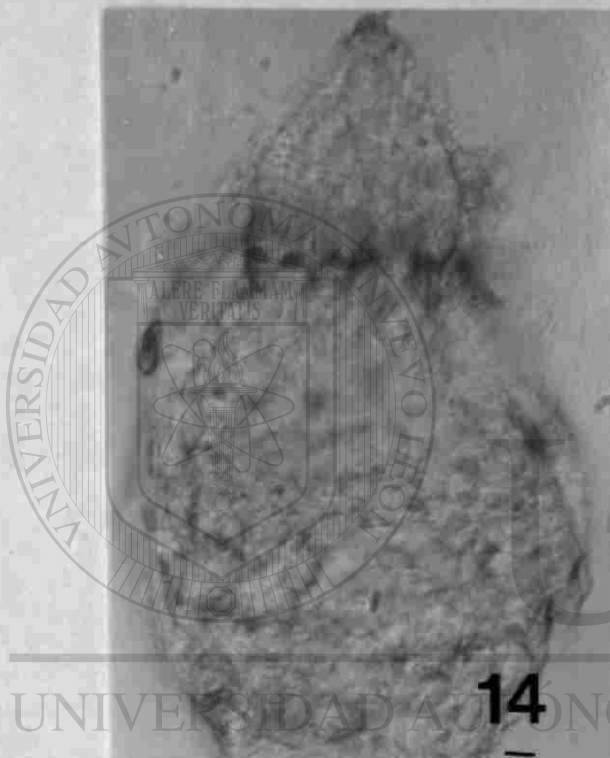
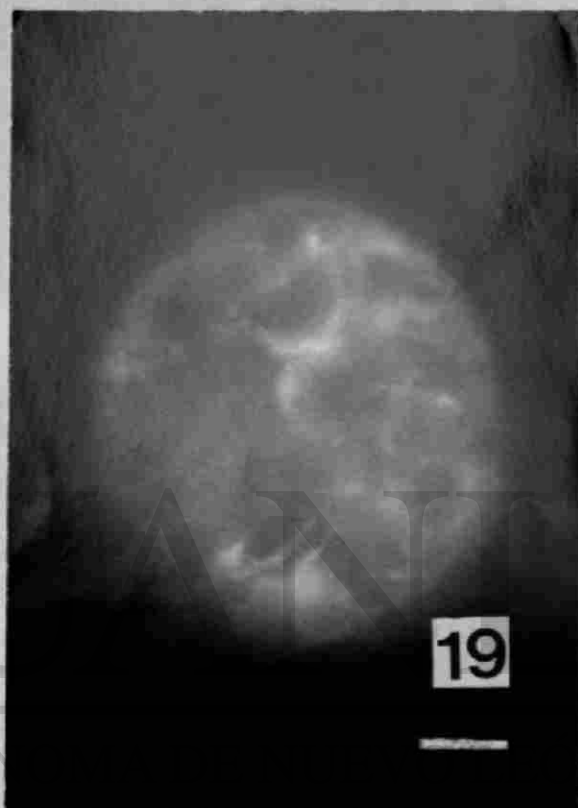
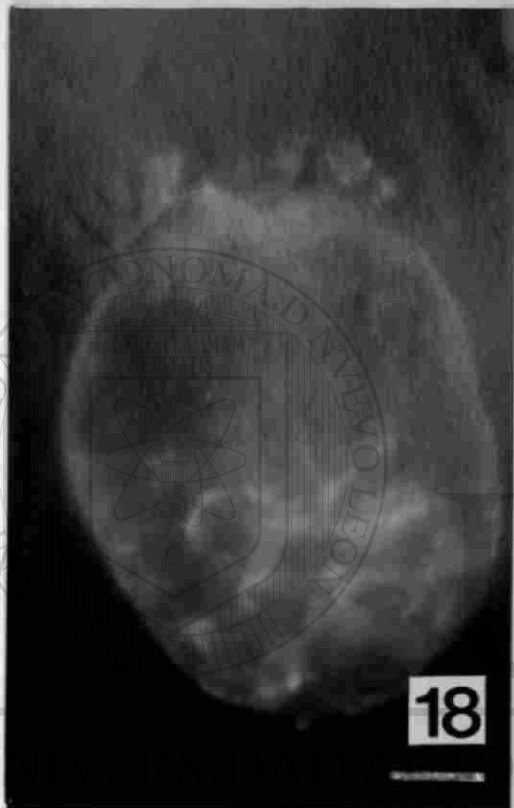


Fig.14. Corte longitudinal de la miracidia de *T. ocellata*. IR a  $\alpha$ -MSH en terminaciones nerviosas ciliadas. PAP. C-PF. Barra=5 $\mu$ m.  
Fig.15. Montaje total de la miracidia de *T. ocellata*. IR a  $\alpha$ -MSH en papilas nerviosas laterales (flechas). Fluoresceína. Barra=9 $\mu$ m.



Fig.16. Montaje total de la miracidia de *T. ocellata*. IR a Met-enkefalina en las células germinales. Fluorescencia. Barra=10 $\mu$ m.

Fig.17. Corte longitudinal y transversal de la miracidia de *T. ocellata*. IR a Met-enkefalina en las células germinales. PAP. C-PR. Barra=5 $\mu$ m.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figs. 18-19. Montaje total de esporocistos madre de *T. ocellata*.  
72 horas en cultivo. IR a Met-enkefalina en células germinales.  
Fluoresceína. Fig. 18. Barra=10µm. Fig. 19. Barra=10µm.

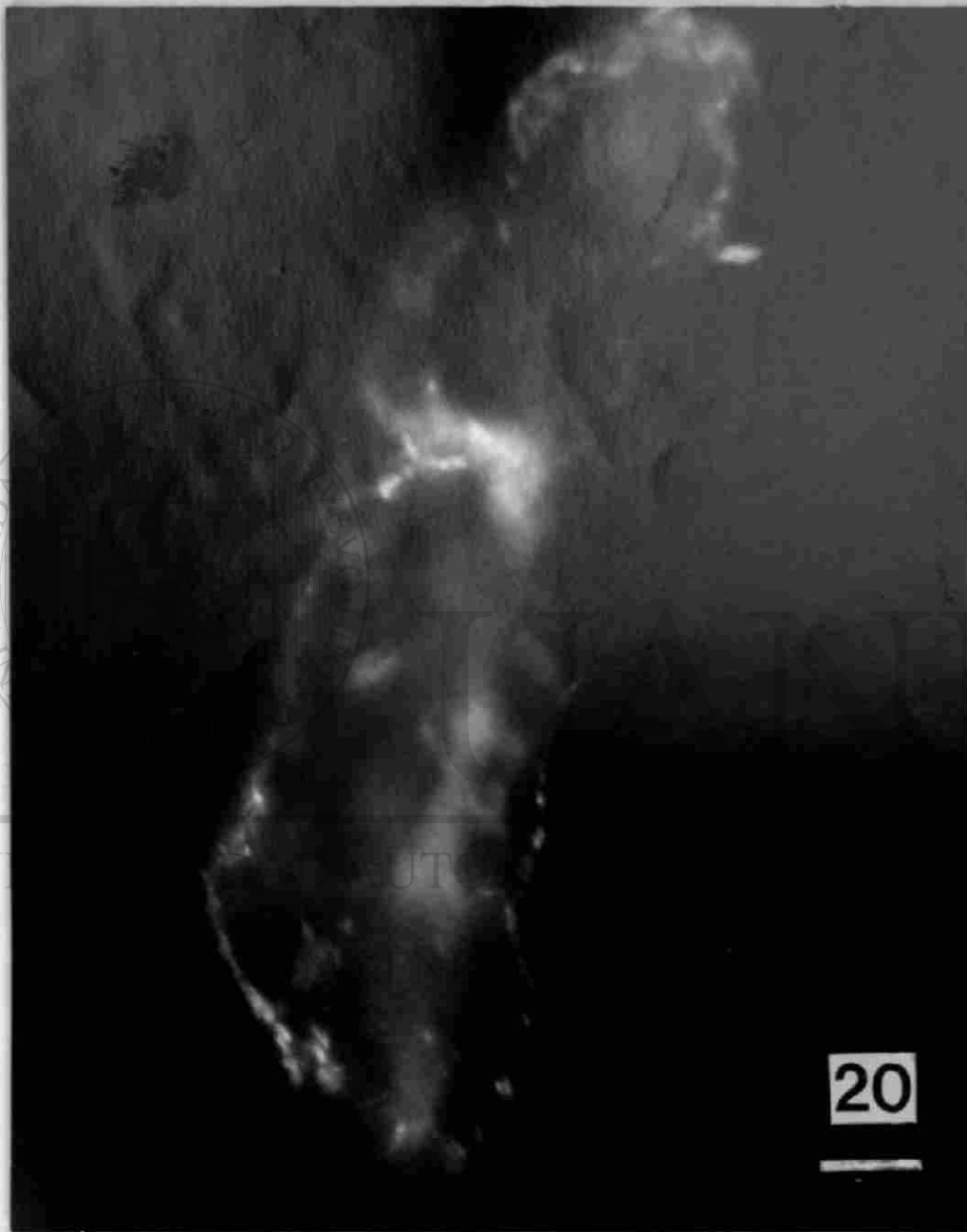
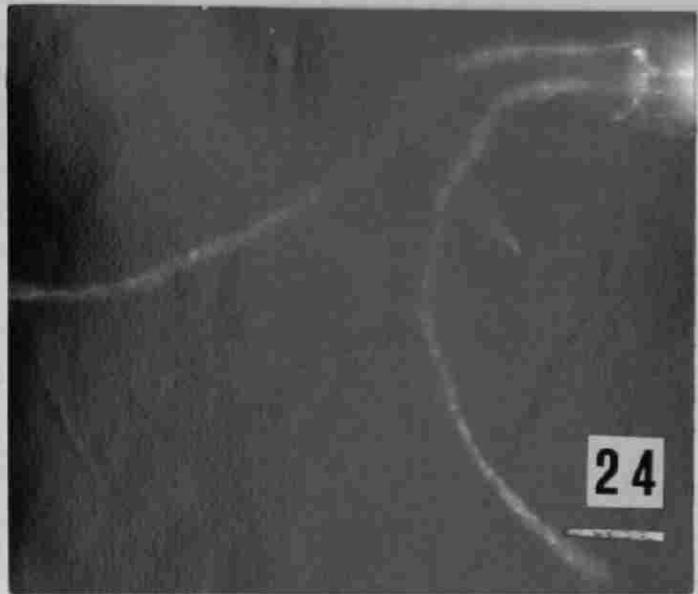


Fig.20. Montaje total de una cercaria de *T. ocellata*.  
Inmunoreactividad a FMRFamida en la comisura y troncos nerviosos  
longitudinales. Fluoresceína. Barra=15µm.



Fig.21. Corte longitudinal de una cercaria de *T. ocellata*. IR a CARP en la comisura central y en troncos nerviosos longitudinales posteriores, (flechas), (a) ventosa ventral. PAP. C-PE. Barra=8 $\mu$ m.



Figs.22-24. Montajes totales<sup>®</sup>  
 de cercarias de *T. ocellata*.  
 IR a FMRFamida en: Fig.22.  
 fibras nerviosas de la unión  
 cuerpo cola (Barra=13µm.);  
 Fig.23. fibras a lo largo  
 de la cola (Barra=14µm.);  
 Fig.24. fibras que terminan  
 en la furca (Barra=20µm.)  
 Fluoresceína.

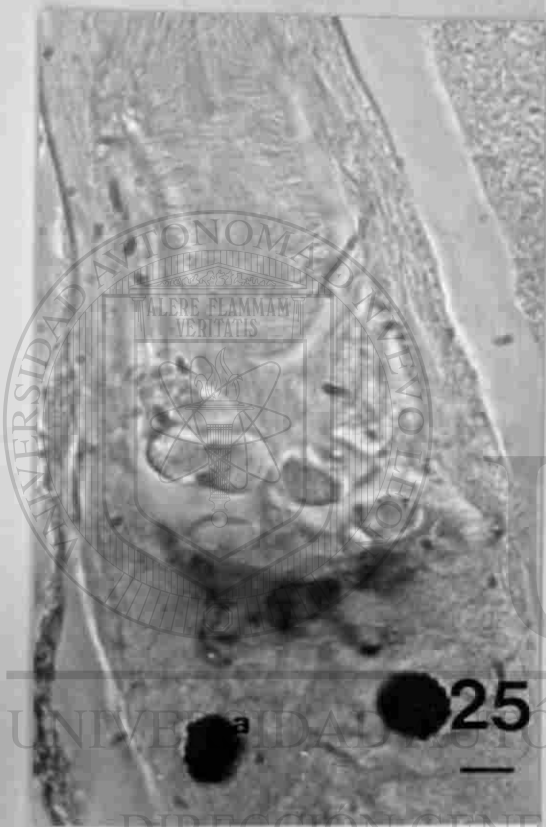


Fig.25. Corte longitudinal de la cercaria de *T. ocellata*. IR a Vasotecina en la comisura, (a) manchas oculares. PAP. C-PF. Barra=9 $\mu$ m.

Fig.26. Montaje total de la cercaria de *T. ocellata*. IR a Prolactina en la comisura. Fluoresceina. Barra=12 $\mu$ m.



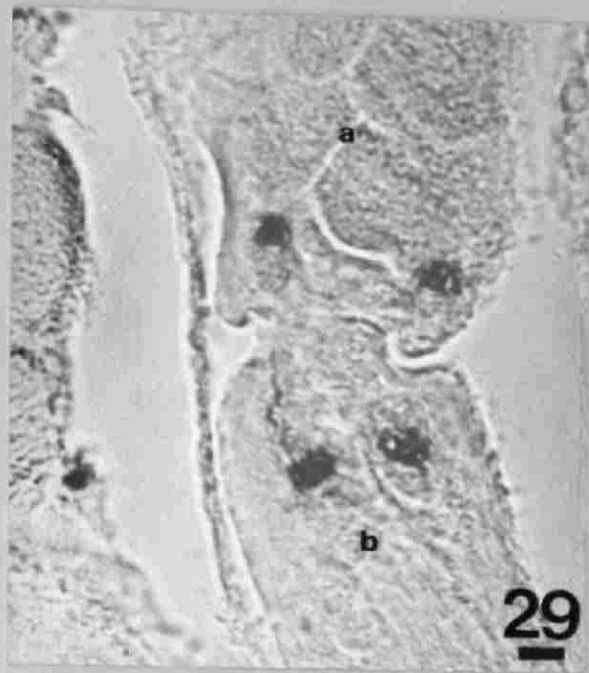
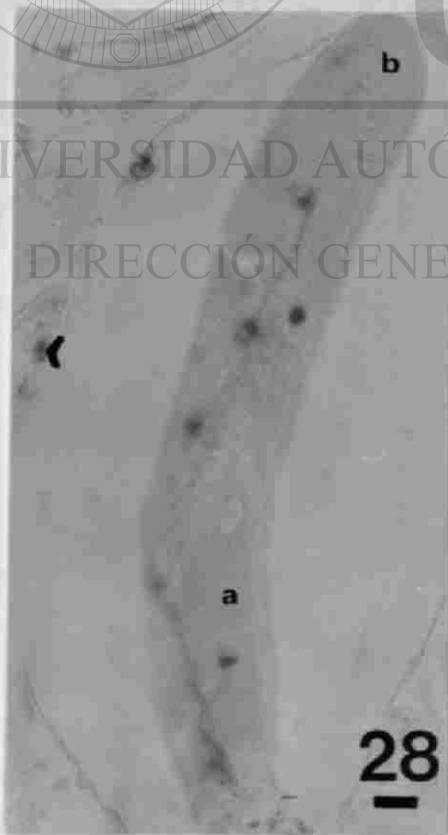


Fig.27. Cercaria libre de *T. ocellata*. IR a APGWamida en las células flamigeras, (a) glándulas postacetabulares, (b) glándulas preacetabulares, (c) ventosa ventral, (d) ventosa anterior. PAP. C-PF. Barra=30µm.

Figs.28 y 29. Cercarias intra-esporocísticas de *T. ocellata* Fig.28. IR a APGWamida en las células flamígeras a lo largo del cuerpo y en células de la pared del esporocisto hijo (flechas), (a) glándulas acetabulares, (b) ventosa anterior. PAP. C-PF. Barra=30µm. Fig.29. IR a APGWamida en la región cuerpo-cola, (a) glándulas postacetabulares, (b) cola. PAP. C-PF. 29-Barra=7µm.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figs. 30-31. Cortes transversales de cercarias intrasporocísticas de *T. ocellata*. Fig. 30. IR a APGWamida en células flamigeras (flechas), (a) glándulas postacetabulares. PAP. C-PF. Barra=7µm. Fig. 31. IR a APGWamida en una célula flamigera de la cercaria y en células de la pared del esporocisto hijo (flechas), (a) glándulas postacetabulares. PAP. C-PF. Barra=9µm.

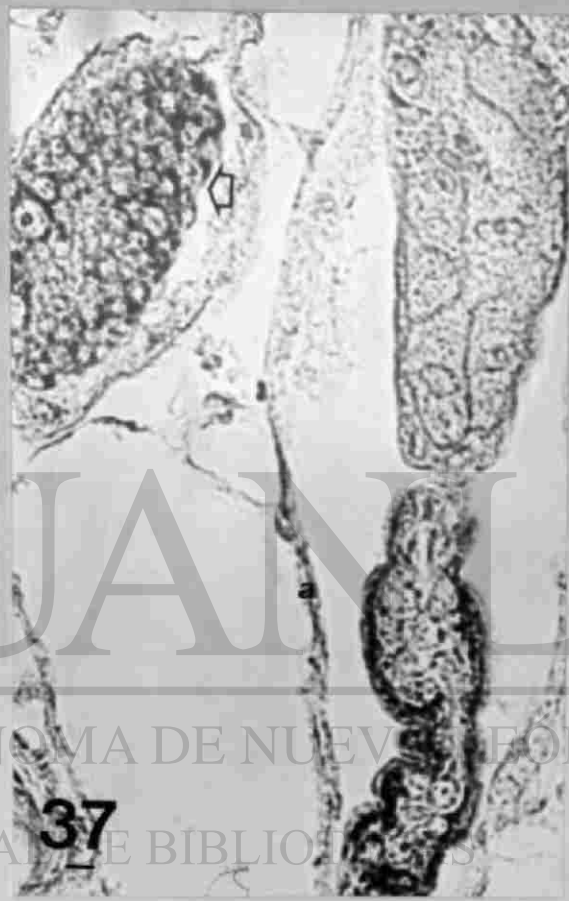


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

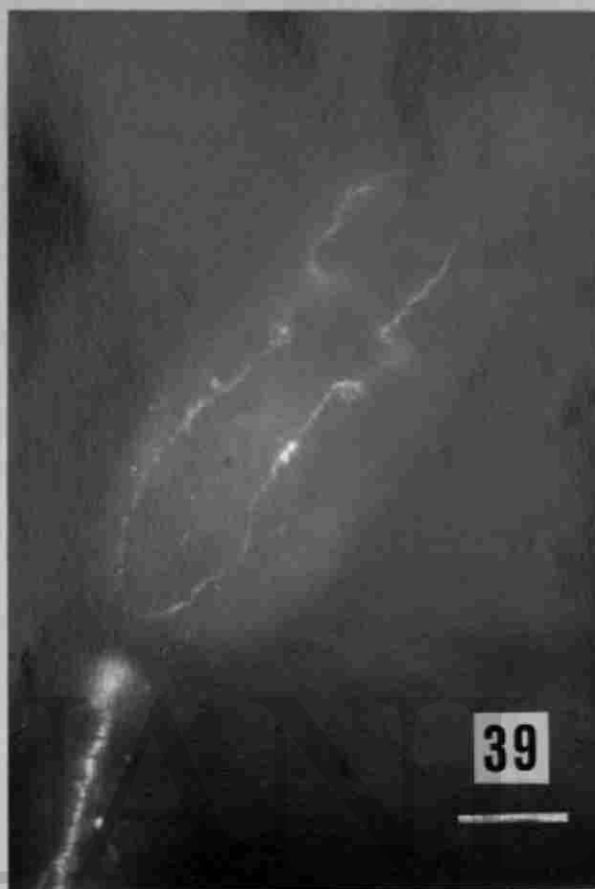
Figs.32-33. Cortes longitudinales de cercarias de *T. ocellata*. IR a FMRFamida en las glándulas de escape y sus conductos (flechas), (a) glándulas preacetabulares, (b) mancha ocular. PAP. C-PP. Fig.32. Barra=10µm. Fig.33. Barra=12µm.



Figs.34-35. Cortes de la parte anterior de cercarias de *T. ocellata*. IR a FMRFamida en los conductos de las glándulas de escape (flechas), (a) ventosa anterior. PAP. C-PF. Fig.34. Barra=6µm. Fig.35. Barra=7µm.



Figs. 36-37. Cortes de cercarias en desarrollo de *T. ocellata*. IR a Met-enkefalina en células de la región anterior, de la cola, y de los conglomerados germinales (flechas), (a) pared del esporocisto hijo. PAP, C-PF. Barras=12 $\mu$ m.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 BIBLIOTECA CENTRAL DE BIBLIOTECAS

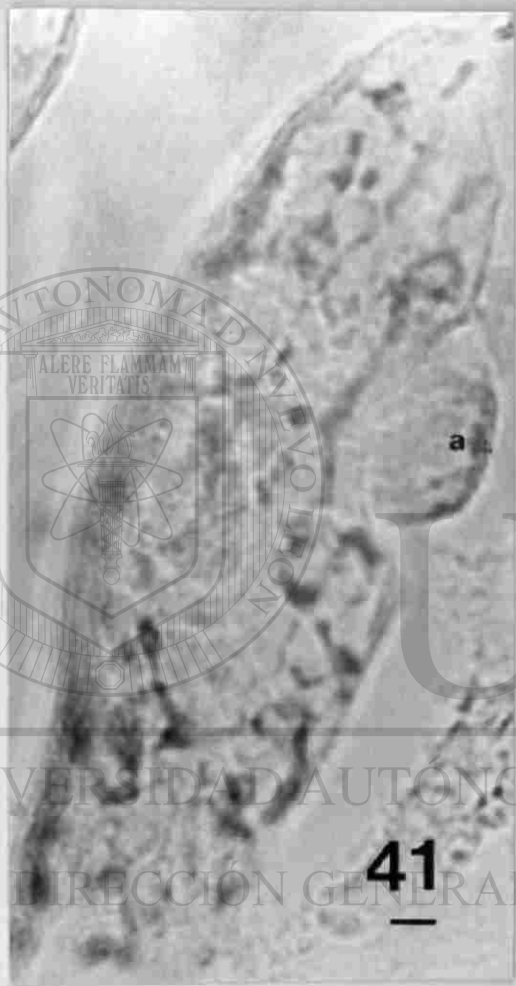
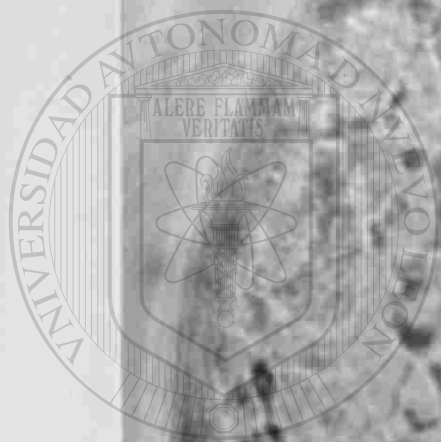
Figs.38-39. Montajes totales de cercarias de *S. mansoni*. IR a FMRFamida en la comisura, troncos nerviosos longitudinales, fibras de la cola, y un par de neuronas que envían axones a los troncos nerviosos longitudinales posteriores. Fluorescencia.

Fig.38. Barra=18µm.

Fig.39. Barra=18µm.



Fig.40. Corte longitudinal de una cercaria intrasporocitaria de *S. mansoni*. IR a CAPP en parte de los ganglios centrales y en los troncos nerviosos anteriores (flechas), (a) glándulas acetabulares, (b) cola, (c) pared del esporocisto hijo. PAP. C-PP. Barra=7µm.



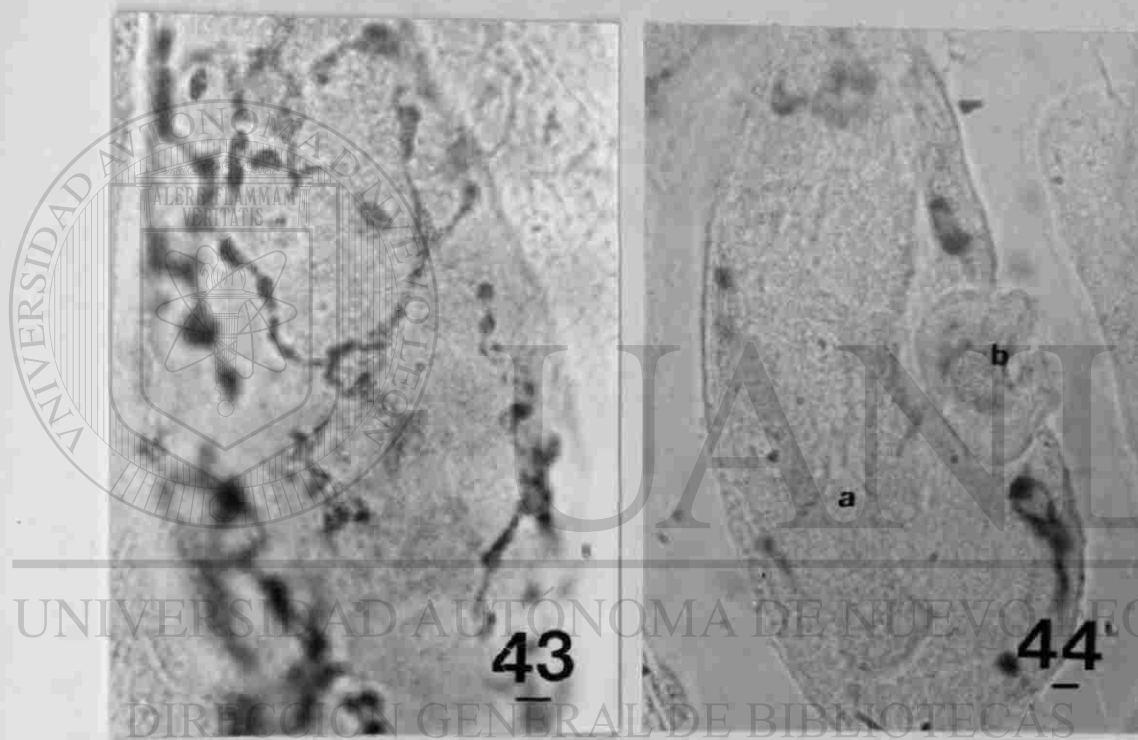
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECA

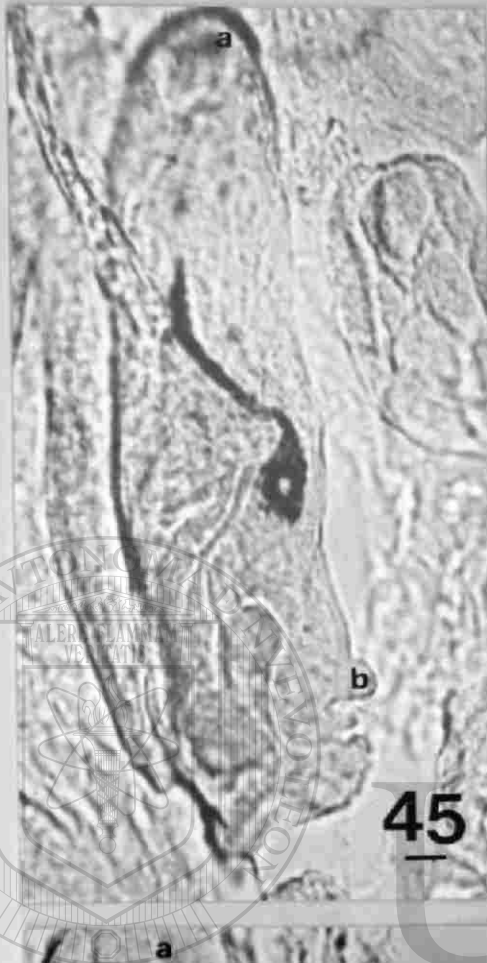
®

Figs.41-42. Cortes longitudinales de cercarias de *S. mansoni*. (a) somatostatina en células sincitiales subtegumentales. (b) ventosa ventral, (c) ventosa anterior. PAP. C-PP. Barras=10µm.

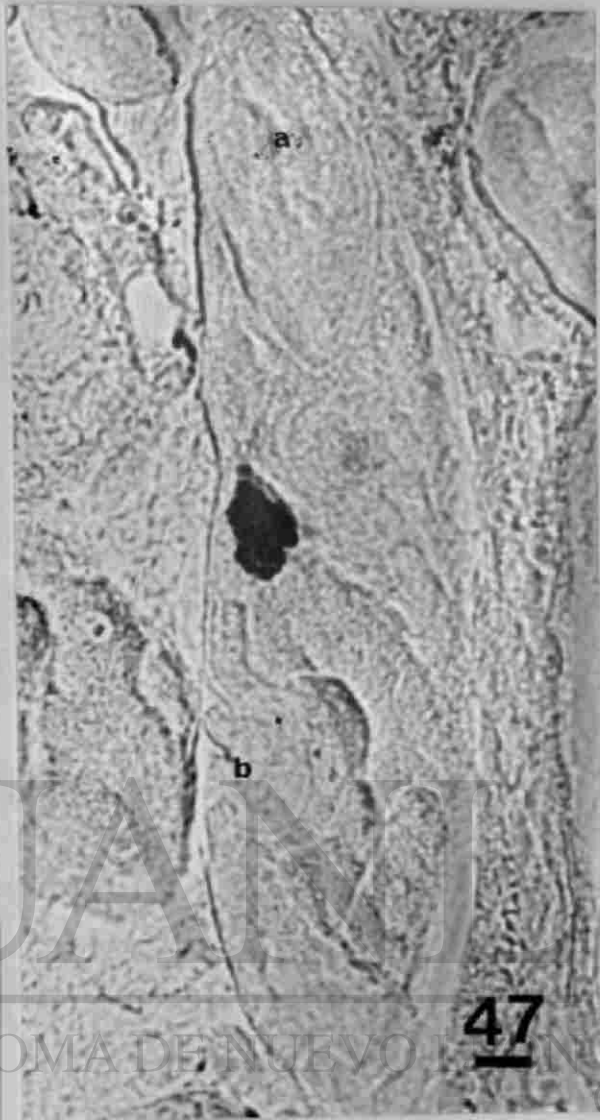




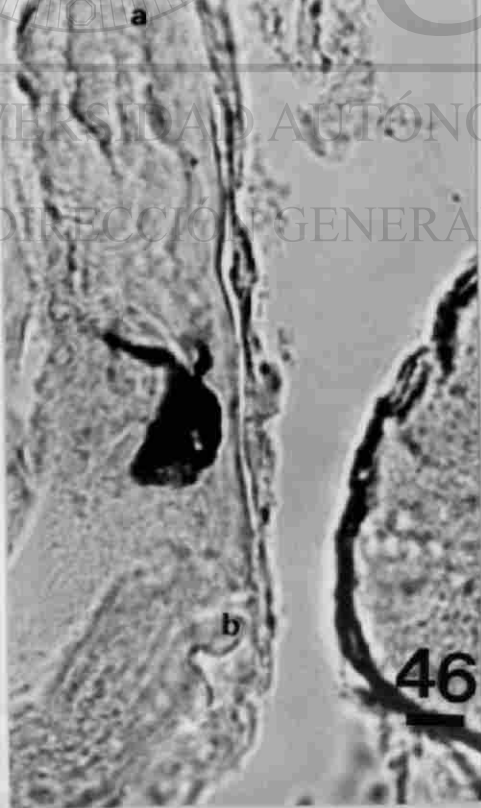
Figs. 43-44. Cortes longitudinales de cercarias intraesporocísticas de *S. mansoni*. IR a somatostatina en células sincitiales subtegumentales, (a) glándulas acetabulares, (b) ventosa ventral. PAP. C-PF. Barras=5µm.



45



47



46

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figs.45-47. Cortes longitudinales de cercarias intraesporocísticas de *S. mansoni*. IR a FMRFamida en las glándulas de escape y sus conductos, (a) ventosa anterior, (b) ventosa ventral. PAR. C-PF.

Fig.45. Barra=12µm.

Figs.46 y 47. Barras=13µm.



Fig.48. Corte de cercaria intraesporocística de *S. mansoni*. IR a Met-encefalina en células de la cola de la cercaria en desarrollo, y en células de los conglomerados germinales. PAP. Bouin. Barra=14 $\mu$ m.

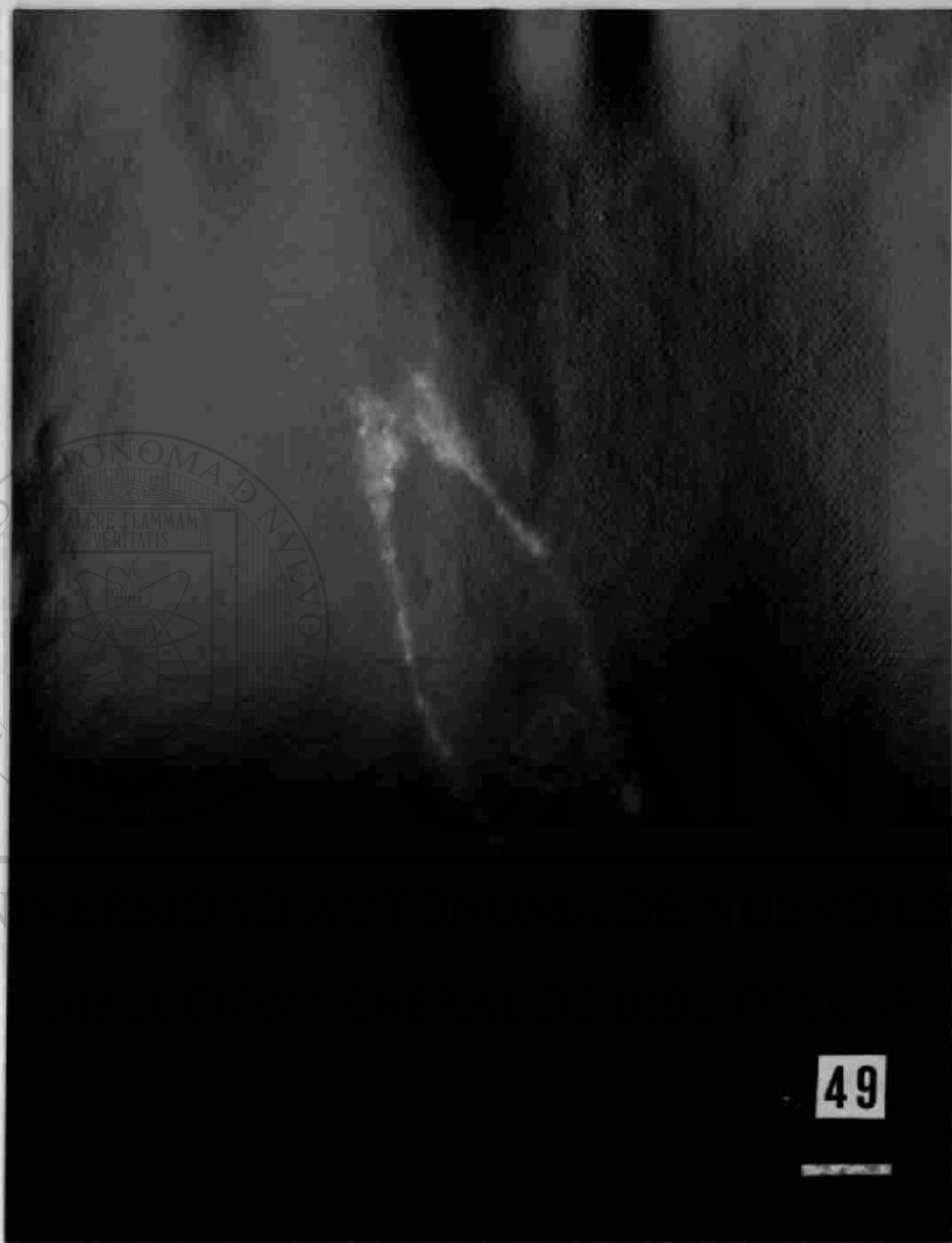
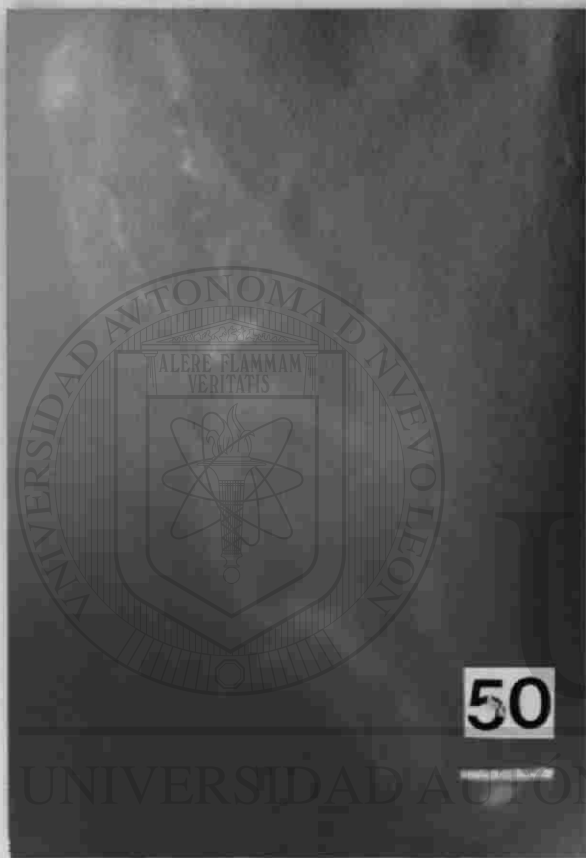
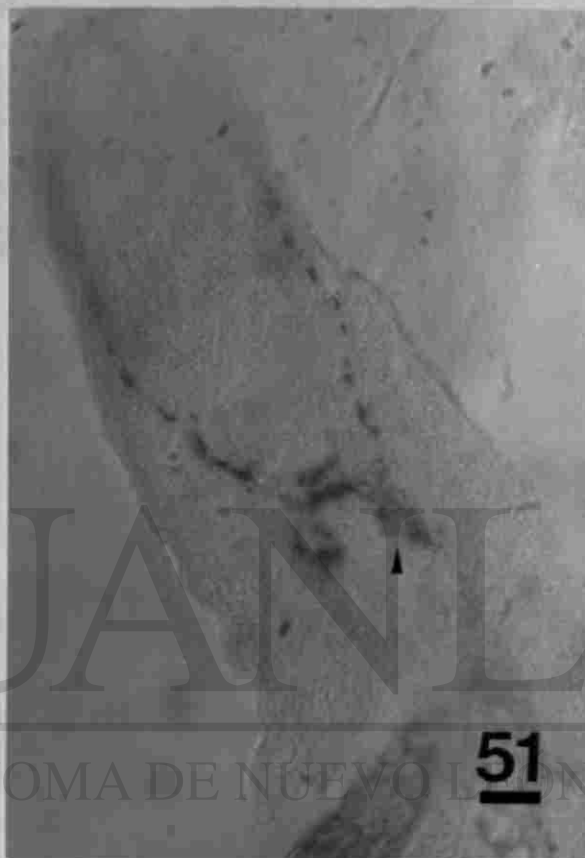


Fig.49. Montaje total de una cercaria de *D. spathaceum*. IR a FMRFamida en los ganglios centrales, troncos nerviosos longitudinales y comisuras transversales (flechas). Fluoresceína. Barra=13µm.



50



51

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig.50. Montaje total de una cercaria de *D. spathaceum*. IR a substancia P en dos neuronas de los ganglios laterales. Fluoresceína. Barra=15µm.

Fig.51. Corte longitudinal de una cercaria intraesporocística de *D. spathaceum*. IR a substancia P en neuronas de los ganglios centrales. PAP. C-PF. Barra=8µm.

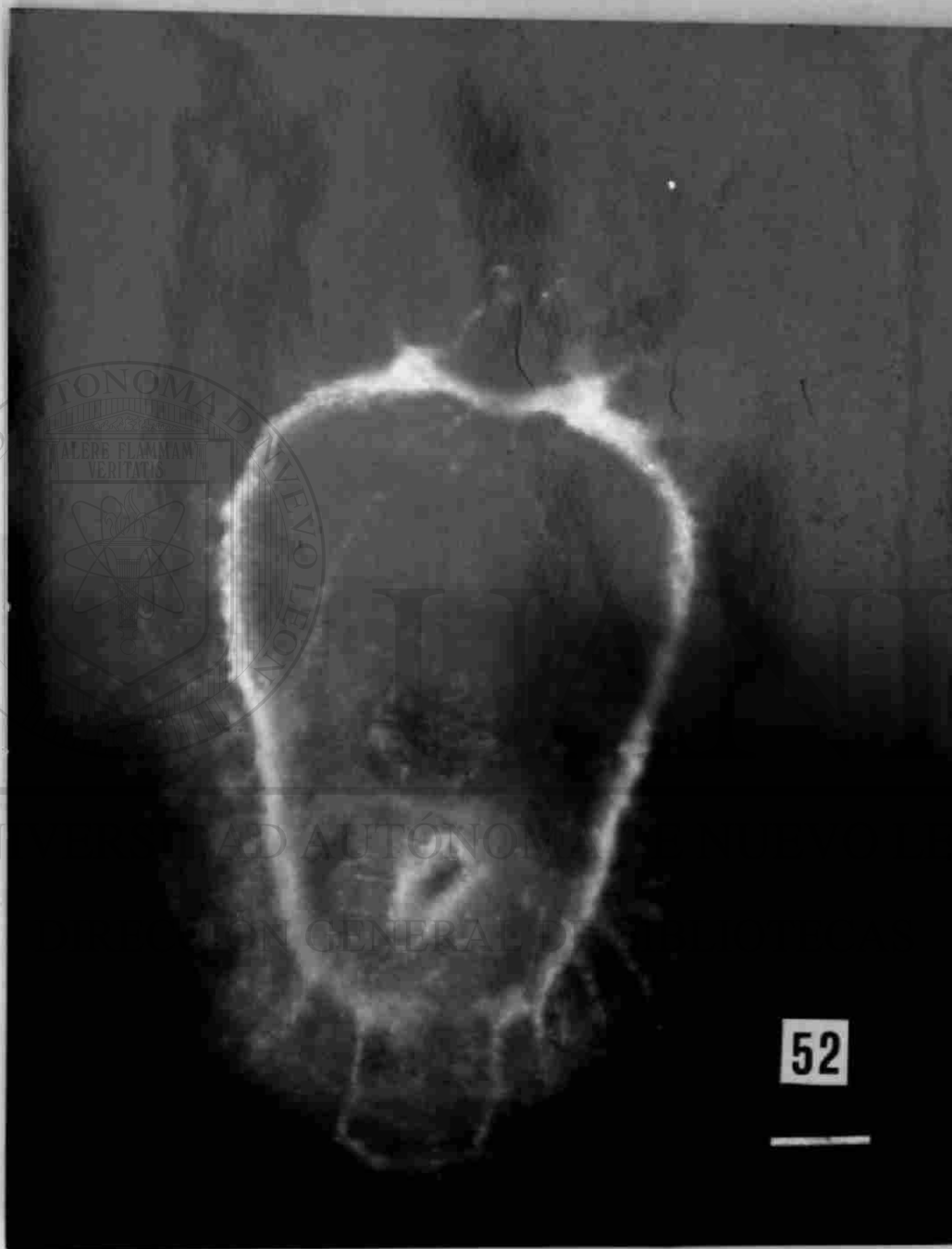
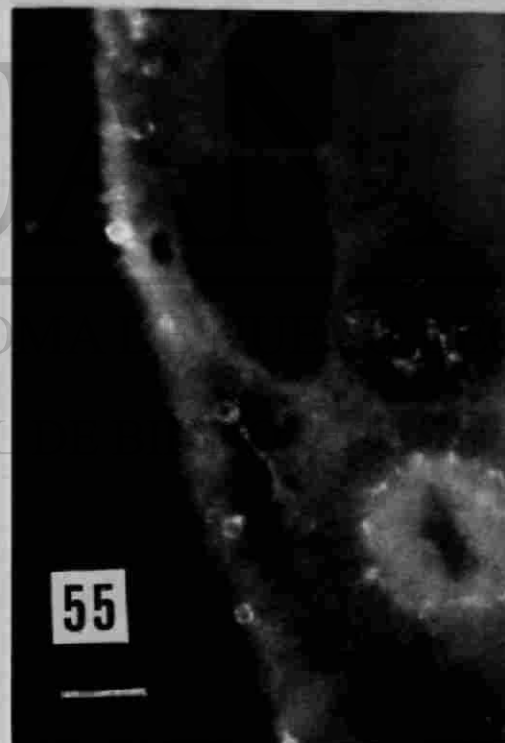
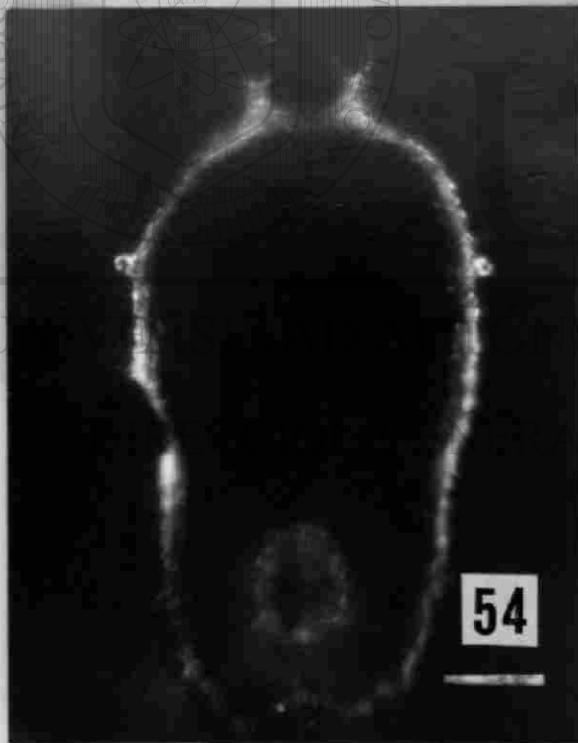
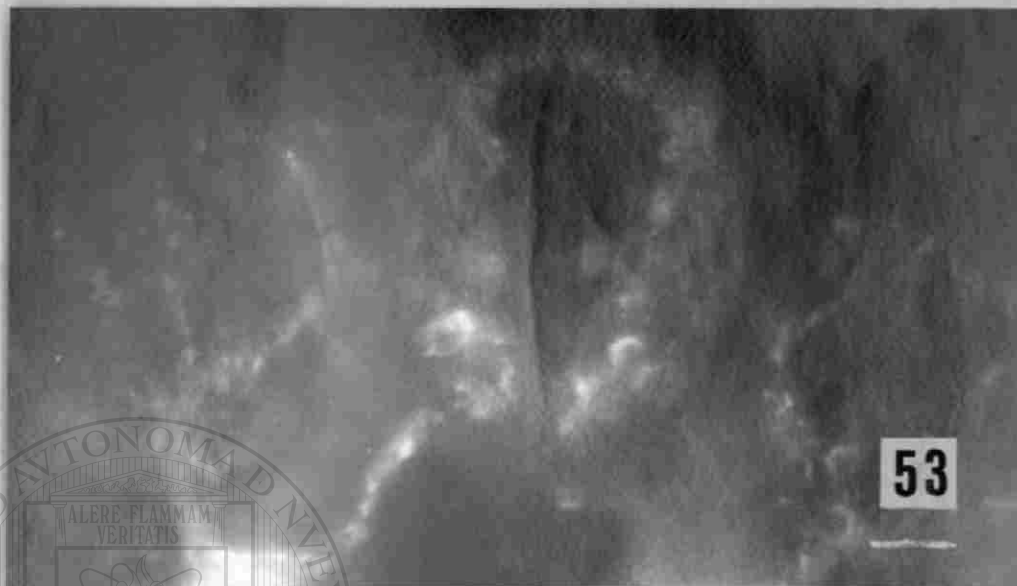
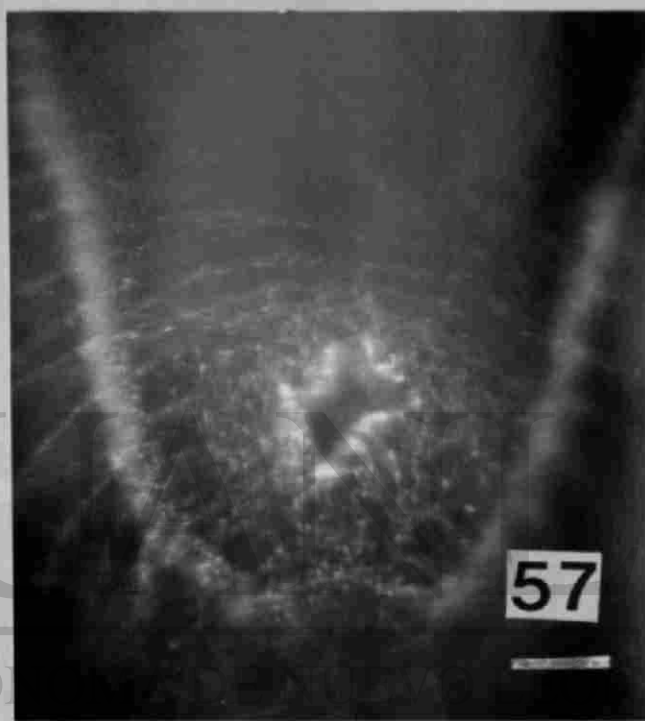
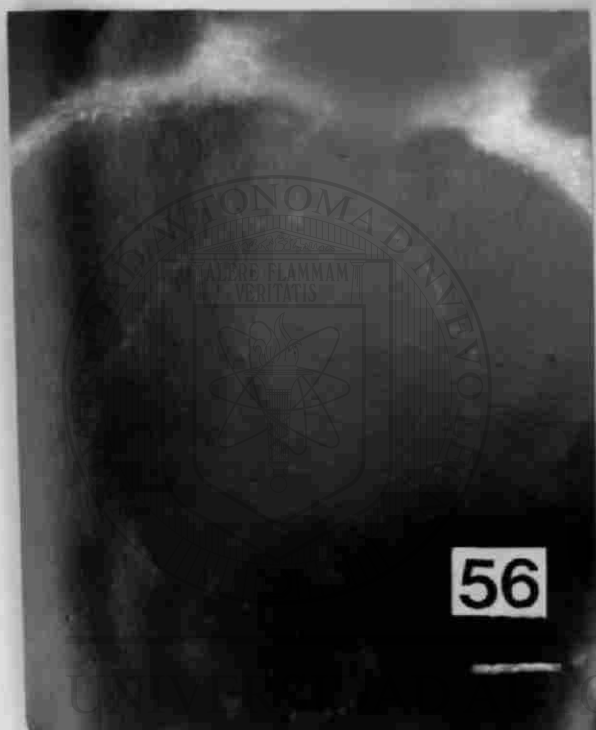


Fig.52. Montaje total de una metacercaria de *D. spathaceum*. IR a FMRFamida ampliamente distribuida en el sistema nervioso. Fluoresceína. Barra=30µm.



Figs. 53-55. Montajes totales de metacercarias de *D. spathaceum*. IR a FMR familia en: Fig. 53, neuronas cerca de la ventosa anterior (Barras=10 $\mu$ m); Figs. 54 y 55, y neuronas a lo largo de los troncos nerviosos ventrales, Fluoresceína. Fig. 53. Barras=10 $\mu$ m. Fig. 54. Barras=20 $\mu$ m. Fig. 55. Barras=12 $\mu$ m.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figs. 56-57. Mandíbulas totales de Metacercaria de *D. spathaceum*.  
IR a Familia en: Fig. 56. los troncos nerviosos longitudinales  
posteriores dorsales; Fig. 57. y en el órgano adhesivo-absorptivo.  
Fluoresceína. Fig. 56. Barra=10µm. Fig. 57. Barra=15µm.



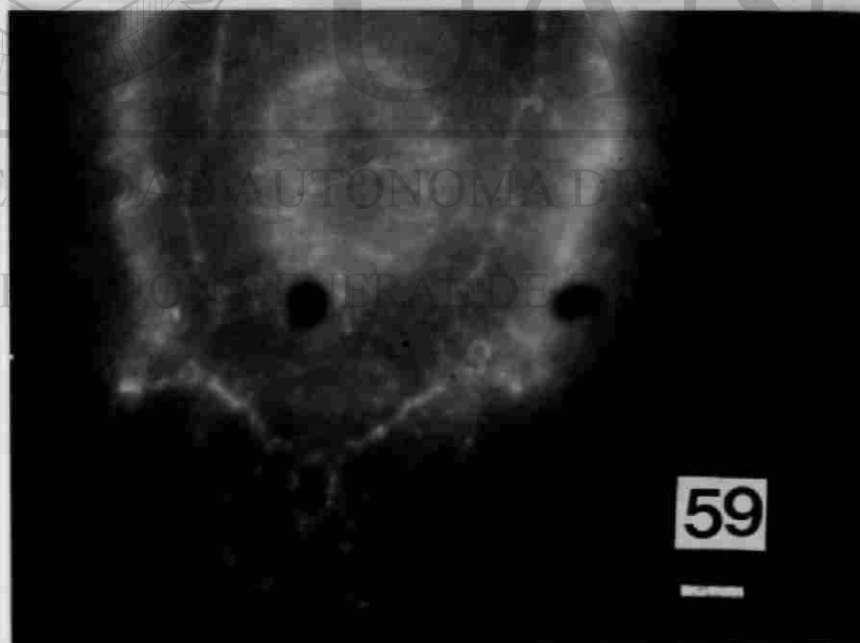
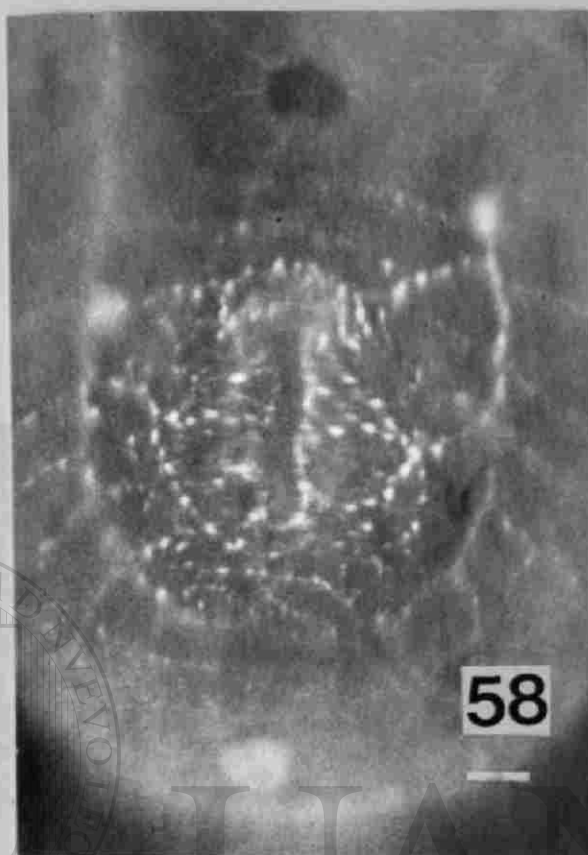
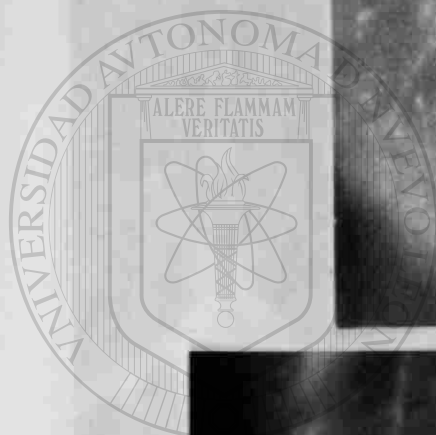
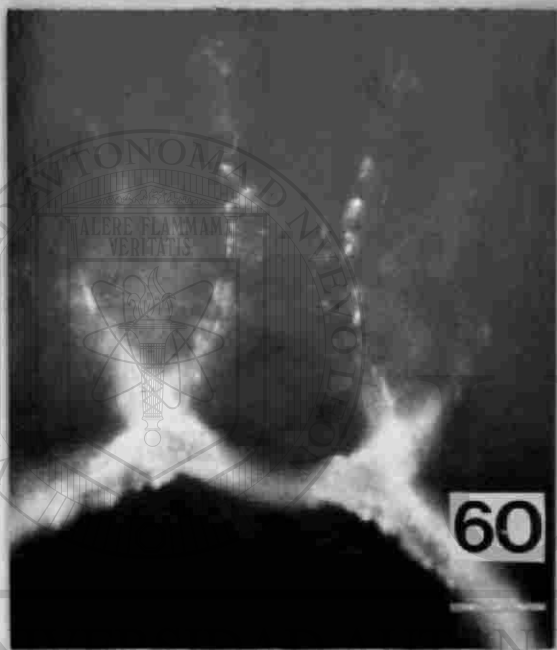
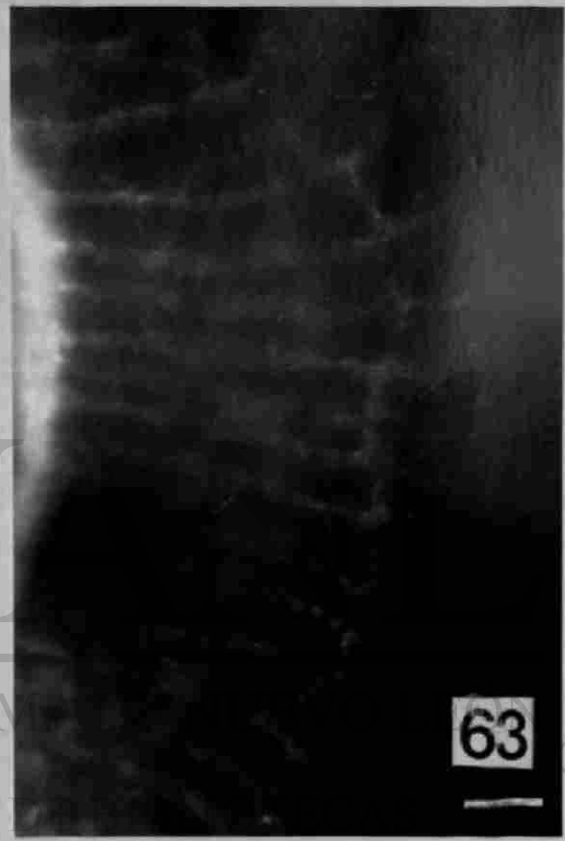


Fig.58-59. Montajes totales de mesadencartas de *D. spathaceum*.  
Fig.58. IR a APGWamida en el órgano adhesivo-absorptivo. Barra=15 $\mu$ m. Fig.59. IR a Substancia P en fibras nerviosas del poro excretorio. Barra=15 $\mu$ m. Fluoresceína.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figs.60-61. Montajes totales de metacercarias de *D. spatulaceum*.  
Fig.60. IR a vasopresina en los troncos nerviosos longitudinales anteriores. Barra=20 $\mu$ m. Fig.61. IR a CARR en las comisuras transversales dorsales. Barra=18 $\mu$ m. Fluorescencia:



Figs. 62-63. Montajes totales de metacercarias de *D. spathaceum*.  
 Fig. 62. IR a CDCH I en los ganglios anteriores y parte de los troncos nerviosos ventrales. Barra=25µm. Fig. 63. IR a GCPs en las comisuras subsegmentales. Barra=15µm. Fluorescencia.



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LEÓN

D

S

®

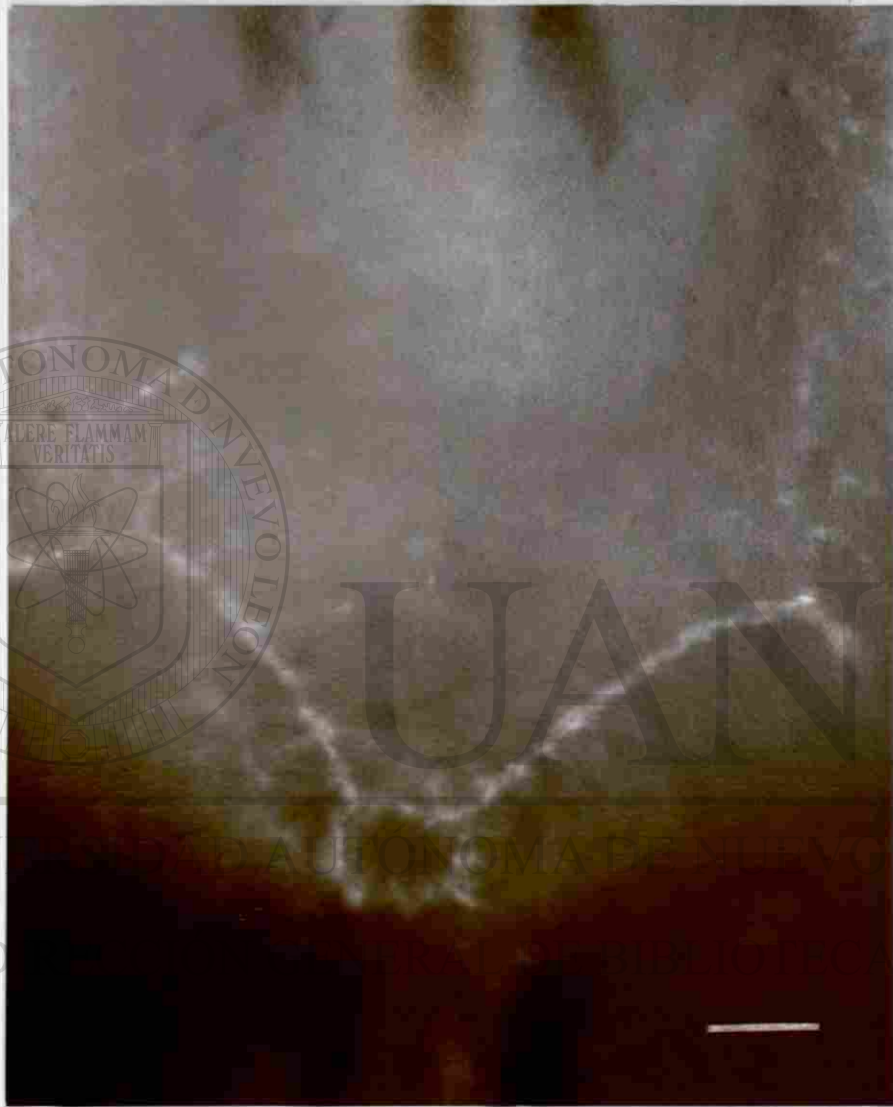


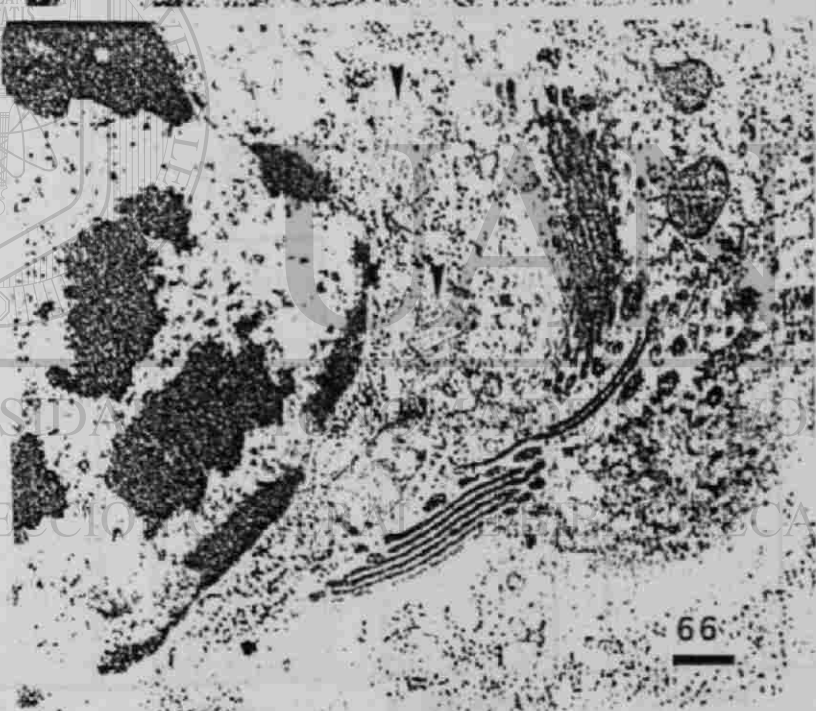
Fig. 63-65. Diversas fases del ciclo de vida de la metacercaria de *D. spathaceum*. IR a SCPa en fibras del poro excretorio. Barra=15µm. Fluoresceína.

Fig. 66. Huevo de la metacercaria de *D. spathaceum*. IR a SCPa en fibras del poro excretorio. Barra=15µm. Fluoresceína.

Fig. 64. Montaje total de una metacercaria de *D. spathaceum*. IR a SCPa en fibras del poro excretorio. Barra=15µm. Fluoresceína.



65



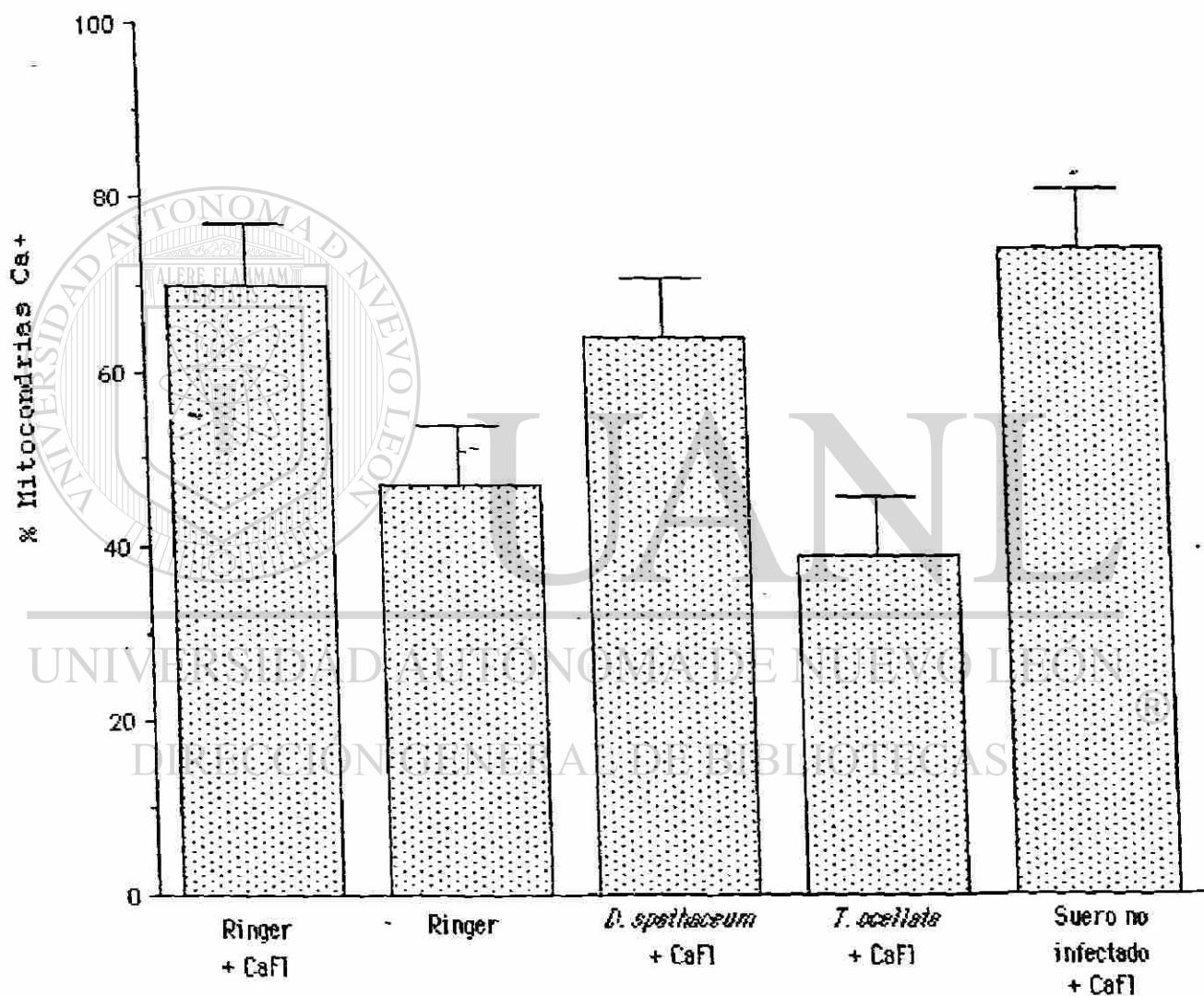
66

Figs.65-66. Microfotografías de células de glándulas del albumen de *L. stagnalis* después de incubarlas con CaFl.

Fig.65. Glándula del albumen incubada con suero de *L. stagnalis* infectado con *T. ocellata*, observe las mitocondrias sin depósitos de calcio (flechas). Barra=250nm.

Fig.66. Glándula del albumen incubada con suero de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum*, observe los depósitos de calcio en las mitocondrias (flechas). Barra=300nm.

## EFFECTO DE LA ESQUISTOSOMINA SOBRE LA CALFLUXINA



Grafica 1. PORCENTAJE DE MITOCONDRIAS CON DEPOSITOS DE CALCIO DE LAS GLANDULAS DEL ALBUMEN DE *L. stagnalis* INCUBADAS CON SUERO DE CARACOLES INFECTADOS CON *D. spathaceum*

## DISCUSION

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

Los métodos inmunocitoquímicos únicamente permiten delinear conclusiones acerca de la similitud del determinante antigénico, pero no de exacta identidad. Por consiguiente, no es posible saber si el antisuero reconoció la misma molécula empleada como antígeno, o a un posible precursor filogenético de esta molécula, ó bien a otra molécula completamente diferente con alguna similitud en la estructura primaria. De igual manera, los resultados negativos

obtenidos deberán ser interpretados con cuidado, debido a que la variabilidad en técnicas de fijación, el procesamiento de los tejidos, el método inmunológico usado, tanto como los niveles detectables del antígeno (esto principalmente en las pequeñas células de las larvas de digeneos), pueden originar discrepancias con observaciones de otros investigadores.

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

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

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



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

Desde que FMRFamida fue aislado de el molusco *Macrocallista nimbosa* (62), varios péptidos relacionados a FMRFamida han sido aislados y caracterizados en diferentes especies de la mayoría de los filos animales (63-68). En platelmintos inmunoreactividad a este tetrapéptido ha sido reportada en el sistema nervioso de especies de las tres clases (21) y se ha sugerido que actua como neurotransmisor ó neuromodulador, posiblemente coordinando la actividad muscular (69). En este estudio, además de la fuerte inmunoreactividad en el sistema nervioso en todas las etapas larvales, se encontró la presencia extraneuronal de FMRFamida en las glándulas de escape de las cercarias de *T. ocellata* y *S. mansoni*. Estas glándulas liberan su contenido cuando la cercaria

emerge del caracol, el posible papel que juega esta sustancia al ser liberada dentro del caracol es desconocida de momento. En *L. stagnalis* (caracol), la inmunoreactividad a FMRFamida esta ampliamente distribuida, y FMRFamida y otros péptidos relacionados han sido aislados y caracterizados de esta especie de molusco (66). Un reporte previo ha demostrado que las glándulas de escape de la cercaria de *S. mansoni* muestran inmunoreactividad a polipéptido pancreático, neuropéptido Y, péptido YY, y también a FMRFamida (70). Sin embargo, estas glándulas fueron reportadas como células nerviosas, también porque presentaban inmunoreactividad a enolasa.

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

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

CARP fue aislado de el ganglio pedal del molusco bivalvo *Mytilus edulis* (71). Tiene efectos inhibitorios y excitatorios sobre neuronas de el cerebro del caracol *Helix*, y efectos modulatorios sobre la contracción de músculos de varias especies de moluscos (72,73). La amplia distribución de la inmunoreactividad obtenida con el antisuero dirigido contra este neuropeptido en el sistema nervioso de todas las etapas larvales de digéneos, sugiere que esta substancia juega un papel importante como elemento neuroregulatorio en este grupo de gusanos planos.

APGWamida fue aislado y caracterizado de otro molusco, *Fusinus ferrugineus* (74). En varias especies de moluscos se ha demostrado que tiene efectos modulatorios sobre la contracción de varios

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

Este estudio reporta la presencia de somatostatina en células subtegumentales de la cercaria de *S. mansoni*. Estudios ultraestructurales (78), junto con la demostración de los componentes colinérgico (79-81), aminérgico (82), y peptidérgico (70) han demostrado que la cercaria de *S. mansoni* tiene la misma organización básica de otras cercarias de trematodos: un neuropilo con cuerpos celulares asociados, y troncos nerviosos anteriores y

posteriores (83-84). En las células inmunoreactivas a somatostatina no hay antecedentes de actividad a acetilcolinesterasa, catecolaminas, ó inmunoreactividad a otros neuropeptidos.

La presencia de inmunoreactividad a péptidos biológicamente activos en células tegumentales ha sido reportada en otros gusanos planos.

Fairweather y colaboradores (85) encontraron también somatostatina en el cestodo *Trilocularia acanthiae vulgaris*. Kumazawa y Moriki

(86) reportaron la presencia de prolactina en otro cestodo, *Hymenolepis nana*. Thorndyke y Whitfield (87) encontraron VIP en el

trematodo *Echinostoma liei*. Estos últimos autores sugirieron que la secreción de este material inmunoreactivo podría ser la causa de la

patología del huésped. Estudios ultraestructurales en la cercaria de *S. mansoni* han mostrado que la mayoría de las células

subtegumentales (células con somatostatina) contienen grandes complejos de Golgi y muchos cuerpos densos, como los observados en el tegumento, pero no fueron observadas conexiones de estas células

con el tegumento (88). Después de que la cercaria ha penetrado al huésped definitivo y se transforma en esquistosomula, se ha

observado que estas células hacen conexión con el tegumento y vacuolas de estas células pasan hacia el tegumento (89,90). Se

conoce que la esquistosomula llega a ser protegida contra anticuerpos en huéspedes permisivos, sin embargo, no se conoce cómo

tan pronto después de la penetración expresan antígenos del huésped para evadir su respuesta inmune. Es de notar que las células

tegumentales en la cercaria de *S. mansoni*, para la cual el humano es un huésped permisivo, muestran inmunoreactividad con un

antisuero dirigido en contra de somatostatina, mientras las

cercarias de *T. ocellata* y *D. spathaceum*, las cuales tienen aves como huéspedes definitivos, no muestran inmunoreactividad con este antisuero. Esto podría sugerir que este material inmunoreactivo a somatostatina en la cercaria de *S. mansoni* juega una función sobre la evasión de la respuesta inmune del huésped mamífero. Tal función para somatostatina no es improbable, ya que existen reportes que indican que somatostatina suprime la proliferación de linfocitos T, y la liberación de histamina y leucotrieno D<sub>4</sub> de basófilos (91,92).

Adicionalmente, somatostatina muestra una amplia distribución en el cuerpo de vertebrados, y muchas y variadas acciones (93,94). Ha sido sugerido que somatostatina no actúa como una hormona clásica sino que puede tener diferentes funciones dependiendo de su localización. Así, este péptido puede actuar a nivel neuroendocrino, paracrino, ó como regulador neuronal, dependiendo del lugar de su liberación (95). Por otra parte, somatostatina parece tener una amplia distribución filogenética, hay reportes de

inmunoreactividad a somatostatina de bacterias a cordados (96-104). Además, algunos reportes indican que la estructura primaria de 14 aminoácidos de este péptido es idéntica de peces a mamíferos (105-109). La producción potencialmente ilimitada de cercarias por la etapa intramolusca (esporocista hijo) de *S. mansoni*, hace esta etapa larval un excelente modelo para estudios de análisis de secuencia. Esta caracterización puede apoyar en el estudio de la filogenia de somatostatina.

IR a péptidos de la familia vasopresina/oxitocina ha sido reportada en turbelarios y cestodos (11,112,113,115), sin embargo, a la fecha, estudios en trematodos han fallado para detectar estas

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

A pesar de que radioinmunoensayos han reportado la presencia de péptidos derivados de precursores opioides en *S. mansoni* (90), en nuestro estudio inmunocitoquímico únicamente  $\alpha$ -MSH, dinorfina y Met-Encefalina fueron detectadas en algunas etapas larvales. La causa de estas diferencias en la detección de neurosubstancias aún en diferentes etapas de una misma especie es difícil de explicar.

En otras especies de platelmintos han sido reportadas discrepancias en la detección de neuropéptidos por radioinmunoensayo y métodos inmunocitoquímicos (109-111), y algunos factores influenciando estos resultados han sido discutidos por Fairweather y Halton (10).

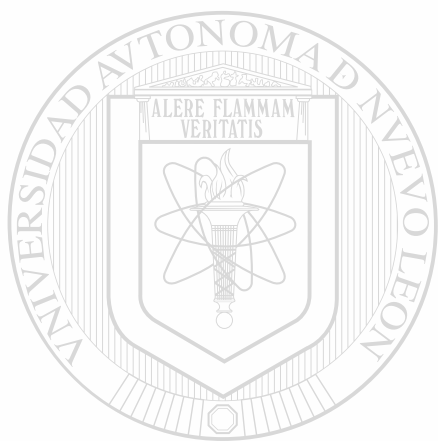
Es inesperado el hallazgo de la ausencia de esquistosmina en la hemolinfa de *L. stagnalis* infectado con *D. spathaceum*, debido a que los efectos causados sobre la reproducción por este parásito son semejantes a los ocasionados por parásitos de la familia

schistosomatidae. Ahora nace la cuestión de cual es el mecanismo que causa la castración parasítica en especies infectadas con otros trematodos que no son de la familia schistosomatidae. Ha sido

sugerido que la castración parasítica causada por el trematodo *Zoogonus lasius* sobre el caracol huésped *Ilyanassa obsoleta* es originada por un factor producido por el parásito y que actúa directamente sobre la gametogénesis en la gónada (120).

Posiblemente un mecanismo semejante es empleado por *D. spathaceum*. Por otra parte, la distribución de *D. spathaceum* dentro del caracol huésped es diferente a especies de la familia

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



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CONCLUSIONES

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

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

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

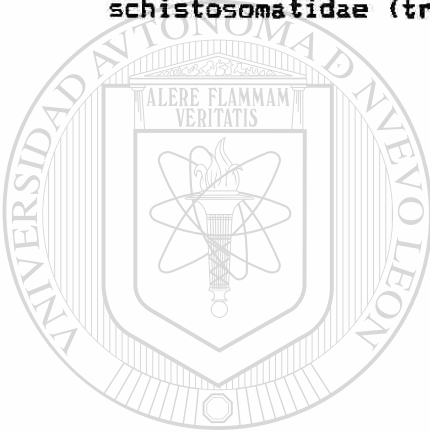
La presencia y localización de inmunoreactividad a péptidos de la familia vasopresina/oxitocina es demostrada por primera vez en trematodos.

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



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

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



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

## PERSPECTIVAS

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

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

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

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Butterworth, A.E. (1988). Control of Schistosomiasis in Man. En: The Biology of Parasitism. (Paul T. Englund & Alan Sher, eds.) New York: Alan R. Liss, Inc. pag. 43-59.
- 2.- Chubb, J.C. (1979). Seasonal Occurrence of Helminths in Freshwater Fishes, Part II. Trematoda. Advances in Parasitology 18: 141-295.
- 3.- Ginetsinskaya, T.A. (1961). Parasitology of Fishes. (V.A. Dogiel, G.K. Petrushevski y Y. Polyanski, eds.) pag. 170.
- 4.- Webb, R.A. & Friedel, T. (1978). Isolation of a neurosecretory substance which stimulates RNA synthesis in regenerating planarians. *Experientia* 35: 657-658.
- 5.- Friedell, T. & Webb, R.A. (1979). Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by a neurosecretory fraction. *Can. J. Zool.* 57: 1818-1819.
- 6.- Gustafsson, M.K.S. (1987). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the nervous system of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 74: 168-174.
- 7.- Harris, K.R. & Cheng, T.C. (1972) Presumptive neurosecretion in *Leucachlaridiomorpha constantiae* (Trematoda) and its possible role in governing maturation. *Int. J. Parasitol.* 2:361-367.
- 8.- Bautz, A. & Schilt, J. (1986). Somatostatin-like Peptide and Regeneration Capacities in Planarians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 267-272.
- 9.- Gustafsson, M.K.S. & Wikgren, M.C. (1981). Activation of the peptidergic neurosecretory system in *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Parasitology* 83: 243-247.
- 10.- Lee, M.B., Bueding, E. & Schiller, E.L. (1978). The occurrence and distribution of 5-hydroxytryptamine in *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*. *J. Parasitol.* 64: 257-264.
- 11.- Bennett, J. & Bueding, E. (1971). Localization of Biogenic Amines in *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 859-867.

12.- Fairweather, I., Maule, A.G., Mitchell, S.H., Johnston, C.F. & Halton, D.W. (1987). Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitol. Res.* 73: 255-258.

13.- Gustafsson, M.K.S., Wikgren, M.C., Karhi, T.J. & Schot, L.P.C. (1985). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*. *Cell Tissue Res.* 240: 255-260.

14.- Niewiadomska, K. & Moczon, T. (1987). The nervous system of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomatidae) III. Structure of the nervous system in the adult stage. *Parasitol. Res.* 73: 46-49.

15.- Grébdá-Kazubská, B. & Moczon, T. (1991). The nervous system in sporocysts and adult *Opisthioglyphus ranæ* (Frelich, 1791) (Trematoda, Plagiorchiidae). *Acta Parasitologica Polonica* 36(3): 125-130.

16.- Gustafsson, M.K.S. & Eriksson, K. (1991). Localization and identification of catecholamines in the nervous system of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Parasitol. Res.* 77: 498-502.

17.- Samii, S.I. & Webb, R.A. (1990). Acetylcholine-like immunoreactivity in the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Brain Res.* 513: 161-165.

18.- Halton, D.W., Fairweather, I., Shaw, C. & Johnston, C.F. (1990). Regulatory Peptides in Parasitic Platyhelminths. *Parasitology Today* 6: 284-290.

19.- Fairweather, I. & Halton, D.W. (1991). Neuropeptides in platyhelminths. *Parasitology* 102: S77-S92.

20.- Maule, A.G., Shaw, C., Halton, D.W., Thim, L., Johnston, C.F., Fairweather, I. & Buchanan, K.O. (1991). Neuropeptide F: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Parasitology* 102: 309-316.

21.- Reuter, M. & Gustafsson, M. (1989). "Neuroendocrine Cells" in Flatworms - Progenitors to Metazoan Neurons? *Arch. Histol. Cytol.* 52: 253-263.

22.- Eriksson, K., Timoschkin, O. & Reuter, M. (1990). Neuroactive substances in an endemic flatworm from lake Baikal. En: *The Early Brain*. (M.K.S. Gustafsson and M. Reuter, eds.). Abo Akademis Förlag - Abo Academy Press.

23.- Wikgren, M.C. & Thorndyke, M.C. (1990). An echinoderm neuropeptide in flatworms? En: *The Early Brain*. (M.K.S. Gustafsson and M. Reuter, eds.). Abo Akademis Förlag - Abo Academy Press.

24.- Phares, C.K. (1987). Plerocercoid Growth Factor: a Homologue of Human Growth Hormone. *Parasitol. Today* 3: 346-349.

25.- Phares, C.K. & Booth, B.J.M. (1987). Antihuman Growth Hormone (GH) Antibodies Cross-React with the GH-Like Factor from Plerocercoids of the Tapeworm *Spirometra mansonioides*. *Endocrinology* 121(5): 1839-1844.

26.- Phares, C.K. & Cox, G.S. (1987). Molecular hybridization and immunological data support the hypothesis that the tapeworm, *Spirometra mansonioides*, has acquired a growth hormone gene. En: *Molecular paradigms for eradicating helminthic parasites*. (A.J. MacInnis, ed.). New York: Alan R. Liss Inc. pag. 391-405.

27.- Phares, C.K. & Watts, D.J. (1988). The Growth hormone-Like Factor Produced by the Tapeworm *Spirometra mansonioides* Specifically Binds Receptors on cultured Human Lymphocytes. *J. Parasitol.* 74: 896-898.

28.- Hurd, H. (1990). Physiological and Behavioural Interactions Between Parasites and Invertebrate Hosts. *Advances in Parasitology* 29: 271-317.

29.- Schallig, H.D.F.H., Hordijk, P.L., Oosthoek, P.W. & De Jong-Brink, M. (1991). Schistosomin, a peptide present in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail's central nervous system. *Parasitol. Res.* 77: 152-156.

30.- De Jong-Brink, M., Elsaadany, M.M. & Boer, H.H. (1988). Schistosomin, an Antagonist of Calfluxin. *Exp. Parasitol.* 65: 109-118.

31.- De Jong-Brink, M., Elsaadany, M.M. & Boer, H.H. (1988). *Trichobilharzia ocellata*. Interface with Endocrine Control of Female Reproduction of *Lymnaea stagnalis*. *Exp. Parasitol.* 65: 91-100.

32.- De Jong-Brink, M. & Bergamin-Sassen, M.J.M. (1989). *Trichobilharzia ocellata*. Influence of Infection on the Interaction between the Dorsal Body Hormone, a Female Gonadotropic Hormone, and the Follicle Cells in the Gonad of the Intermediate Snail Host *Lymnaea stagnalis*. *Exp. parasitol.* 68: 93-98.

33.- Hordijk, P.L., Van Loenhout, H., Ebberink, R.H.M., De Jong-Brink, M. & Joosse, J. (1992). The neuropeptide schistosomin inhibits ovulation in vivo in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. J. Exp. Zool., en prensa.

34.- Hordijk, P.L., Schallig, H.D.F.H., Ebberink, R.H.M., De Jong-Brink, M. & Joosse, J. (1992). Primary structure and origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Biochem J., en prensa.

35.- Amen, R.J., Baggen, J.M.C., Bezemer, P.D. & De Jong-Brink, M. (1992). Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitology 104, en prensa.

36.- Amen, R.J. & De Jong-Brink, M. (1992). An in vitro study on the effects of *Trichobilharzia ocellata* on the internal defence system of the snail host *Lymnaea stagnalis* and the role of the central nervous system of the host. Parasitology, Submitted.

37.- Stefano, G.B., Leung, M.K., Zhao, X. & Scharrer, B. (1989). Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 626-630.

38.- Stefano, G.B., Cadet, P. & Scharrer, B. (1989). Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: Evidence for a subtype of receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6307-6311.

39.- Duvaux-Miret, O., Dissous, C., Gaultron, J.P., Pattou, E., Kordon, C. & Capron, A. (1990). The Helminth *Schistosoma mansoni* Expresses a Peptide Similar to Human  $\mu$ -Endorphin and Possesses a Proopiomelanocortin-Related Gene. The New Biologist 2: 93-99.

40.- Gustafsson, M.K.S. & Wikgren, M. C. (1981). Release of neurosecretory material by protrusions of bounding membranes extending through the exolemma, in *Diphyllobothrium dendriticum* (cestoda). Cell Tissue Res. 220: 473-479.

41.- Mellink, J.J. & Bovenkamp, W. van den. (1985). In vitro culture of intramolluscan stages of the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Z. Parasitenkd. 71: 337-351.

42.- Schallig, H.D.F.H., Schut, A., Knaap, W.P.W. van der & De Jong-Brink, M. (1990). A simplified medium for the *in vitro* culture of mother sporocysts of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitol. Res. 76: 278-279.

43.- Sluifers, J.F., Brussaard-Wüst, C.M. & Meuleman, E.A. (1980). The Relationship Between Miracidial Dose, Production of Cercariae, and Reproductive Activity of the Host in the Combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. Z. Parasitenkd. 63: 13-26.

44.- Sternberger, L.A. (1986). Immunocytochemistry. 3a. Ed. New York: Wiley.

45.- Sminia, T., Van Der Knaap, W.P.W. & Edelenbosch, P. (1979). The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Develop. Comp. Immunol. 3: 37-44.

46.- Roubos, E.W. & Van de Ven, A.M.H. (1987). Morphology of neurosecretory cells in Basommatophoran snails homologous with egg-laying and growth-hormone producing cells of *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 67: 7-23.

47.- Dictus, W.J.A.G. & De Jong-Brink, M. (1987). Morphometrical, enzyme cytochemical and biochemical studies on the secretory activity of a female accessory sex gland (albumen gland) of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen C90: 257-271.

48.- Slocum, R.D. & Roux, J.R. (1982). An improved method for the subcellular localization of calcium using a modification of the antimonate precipitation technique. J Histochem. Cytochem. 30: 617-629.

49.- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1969). Biometry. San Francisco: Freeman.

50.- Bliss, C.J. (1967). Statistics in Biology. Vol. I. New York: McGraw-Hill.

51.- Wilk, M.B. & Shapiro, S.S. (1968). The joint assessment of normality of several independent samples. Technometrics 10: 825-839.

52.- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1960). Principles and Procedures of Statistics. New York, Toronto, London: McGraw-Hill.

53.- Keenan, L. & Koopowitz, H. (1982). Physiology And *in situ* Identification of Putative Aminergic Neurotransmitters in the Nervous System of *Gyrocotyle sibirica*, a Parasitic Flatworm. J. Neurobiology 13: 9-21.



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



64.- Dockray, G.J., Reeve Jr., J.R., Shively, J., Gayton, R.J. & Barnard, C.S. (1983). A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* 305: 328-330.

65.- Joosse, J. & Geraerts, W.P.M. (1990). Neuropeptides: Unity and Diversity, A Molecular Approach. En: *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. (A.B. Borkovec y E.P. Masler, eds.). The Humana Press Inc. pag. 3-38.

66.- Ebberink, R.H.M., Price, D.A., Loenhout, H. van, Doble, K.E., Riehm, J.P., Geraerts, W.P.M. & Greenberg, M.J. (1987). The Brain of *Lymnaea* Contains a Family of FMRFamide-Like Peptides. *Peptides* 8: 515-522.

67.- Cottrell, G.A. (1989). The biology of the FMRFamide-series of peptides in molluscs with special reference to *Helix* Comp. Biochem. Physiol. 93A: 41-45.

68.- De Loof, A. & Schoofs, L. (1990). Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 459-468.

69.- Magee, R.M., Fairweather, I., Johnston, C.F., Halton, D.W. & Shaw, C. (1989). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology* 98: 227-238.

70.- Skuce, P.J., Johnston, C.F., Fairweather, I., Halton, D.W. & Shaw, C. (1990). A confocal scanning laser microscope study of the peptidergic and serotonergic components of the nervous system in larval *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 101: 227-234.

71.- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N. & Muneoka, Y. (1987). Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. *Brain Res.* 422: 374-376.

72.- Hirata, T., Kubota, I., Imada, M., Muneoka, Y. & Kobayashi, M. (1989). Effects of the Catch-Relaxing Peptide on Molluscan Muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C: 283-288.

73.- Walker, R.J., Mat Jais, A.M., Sharma, R., Pedder, S., Kubota, I. & Muneoka, Y. (1991). Actions of catch relaxing peptide, CARP, and other peptides on *Helix* central neurons. En: *Molluscan Neurobiology*. (K.S. Kits, H.H. Boer and J. Joosse, eds.). North Holland Publishing Company, Amsterdam. pag. 97-102.

74.- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Fujisawa, Y., Ikeda, T., Miura, A., Minamitake, Y. & Muneoka, Y. (1990). A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone RCPH. *Biochem. Biophysical Res. Comm.* 167: 273-279.

75.- Croll, R.P., Minnen, J. van, Kits, K.S. & Smit, A.B. (1991). APGWamide: Molecular, histological and physiological examination of a novel neuropeptide involved with reproduction in the snail, *Lymnaea stagnalis*. En: *Molluscan Neurobiology*. (K.S. Kits, H.H. Boer and J. Joosse, eds.). North Holland Publishing Company, Amsterdam. pag. 248-254.

76.- Webster, L.A. & Wilson, R.A. (1970). The chemical composition of protonephridial canal fluid from the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 201-209.

77.- Barrett, J. (1991). Amino Acid Metabolism in Helminths. *Advances in Parasitology* 30: 39-105.

78.- Cousin, C.E. & Dorsey, C.H. (1991). Nervous system of *Schistosoma mansoni* cercaria: organization and fine structure. *Parasitol. Res.* 77: 132-141.

79.- Lewert, R.M. & Hopkins, D.R. (1965). Cholinesterase activity in *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Parasitol.* 51: 616.

80.- Fripp, P.J. (1967). Histochemical localization of esterase activity in schistosomes. *Exp. Parasitol.* 21: 380-390.

81.- Bruckner, D.A. & Voge, M. (1974). The nervous system of larval *Schistosoma mansoni* as revealed by acetylcholinesterase staining. *J. Parasitol.* 60: 437-446.

82.- Orido, Y. (1989). Histochemical evidence of the catecholamine-associated nervous system in certain schistosome cercariae. *Parasitol. Res.* 76: 146-149.

83.- Grabda-Kazubska, B. & Moczon, T. (1981). Nervous system and chaetotaxy in the cercaria of *Haplometra cylindracea* (Zeder, 1800) (Digenea, Plagiorchiidae). *Z. Parasitenkd.* 65:53-61.

84.- Niewiadomska, K. & Moczon, T. (1982). The nervous system of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, (Digenea, Diplostomatidae). *Z. Parasitenkd.* 68: 295-304.

85.- Fairweather, I., Mahendrasingam, S., Johnston, C.F., Halton, D.W. & Shaw, C. (1990). Peptidergic nerve elements in three developmental stages of the

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

97.- Berelowitz, M., LeRoith, D., Schenk, H. von, Newgard, C., Szabo, M., Frohman, L.A., Shiloach, J. & Roth, J. (1982). Somatostatin-like immunoreactivity and biological activity is present in *Tetrahymena pyriformis*, a ciliated protozoan. *Endocrinology* 110: 1939-1944.

98.- Bautz, A., Schilt, J., Richoux, J. P. & Dubois, M.P. (1980). Detection immunocytoologique, denombrement et localisation des cellules a somatostatine (SRIF) chez deux especes de Planaires, *Dugesia lugubris* et *Dendrocoelum lacteum* (Turbellaries, Tricelodes). *C.R. Acad. Sc. Paris 291 (Serie D)*: 833-836.

99.- Leake, L.D., Crowe, R. & Burnstock, G. (1986). Localisation of substance P-, somatostatin-, vasoactive intestinal polypeptide- and met-enkephalin-immunoreactive nerves in the peripheral and central nervous systems of the leech (*Hiruda medicinalis*). *Cell Tissue Res.* 243: 345-351.

100.- Dhainaut-Courtois, N., Tramu, G., Beauvillain, J.C. & Masson, M. (1986). A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. *Neurochem. Int.* 8: 327-338.

101.- Schot, L.P.C., Boer, H.H., Swaab, D.F. & Noorden, S. van. (1981). Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates. *Cell Tissue Res.* 216: 273-291.

102.- Martin, G. & Dubois, M.P. (1981). A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod *Porcellia dilatatus* Brandt. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45: 125-130.

103.- El-Salhy, M., Falkmer, S., Krømer, K.J. & Speirs, R.D. (1983). Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca, and corpora allata of an adult lepidopteran insect, *Manduca sexta* (L.). *Cell Tissue Res.* 232: 295-317.

104.- Fritsch, H.A.R., Van Noorden, S. & Pearse, A.G.E. (1979). Localization of somatostatin-, substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of *Ciona intestinalis* L. (Ascidiaeae). *Cell Tissue Res.* 202: 263-274.

105.- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. & Guillemin, R. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.

106.- Benoit, R., Bohlen, P., Brazeau, P., Ling, N. & Guillemin, R. (1980). Isolation and characterization of rat pancreatic somatostatin. *Endocrinology* 107: 2127-2129.

107.- Noe, B.D., Spiess, J., Rivier, J.E. & Vale, W. (1979). Isolation and characterization of somatostatin from anglerfish pancreatic islet. *Endocrinology* 105: 1410-1415.

108.- Plisetskaya, E.M., Pollock, H.G., Rouse, J.B., Hamilton, J.W., Kimmel, J.R., Andrews, P.C. & Gorbman, A. (1986). Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 252-263.

109.- Magee, R.M., Fairweather, I., Shaw, C., McKillop, J.M., Montgomery, W.I., Johnston, C.F. & Halton, D.W. (1991). Quantification and partial characterization of regulatory peptides in the liver fluke, *Fasciola hepatica*, from different mammalian hosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 201-207.

110.- McKay, D.M., Shaw, C., Halton, D.W., Johnston, C.F., Fairweather, I. & Buchanan, K.D. (1990). Mammalian regulatory peptide immunoreactivity in the trematode parasite *Haplometra cylindracea* and the lung of its frog host, *Rana temporaria*. Comparative chromatographic characterisation using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C: 345-351.

111.- McKay, D.M., Fairweather, I., Johnston, C.F., Shaw, C. & Halton, D.W. (1991). Immunocytochemical and radioimmunochemical demonstration of serotonin- and neuropeptide- immunoreactivities in the adult rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta* (Cestoda, Cyclophyllidae). *Parasitology* 103: 275-289.

112.- Reuter, M., Lehtonen, M. & Wikgren, M. (1988). Immunocytochemical evidence of neuroactive substances in flatworms of different taxa- a comparison. *Acta Zool. (Stockh.)* 69: 29-37.

113.- Wikgren, M., Reuter, M. & Gustafsson, M. (1986). Neuropeptides in free-living and parasitic flatworms (Platyhelminthes). An immunocytochemical study. *Hydrobiologia* 132: 93-99.

114.- Schellig, H.D.F.H., Bergamin-Sassen, M.J.M., Hordijk, P.L. & De Jong-Brink, M. (1991). *Trichobilharzia ocellata*. Influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and cercarial induction of the

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

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

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

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

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

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

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



## AGRADECIMIENTOS:

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

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

MARIO CESAR SALINAS CARMONA, GUADALUPE ARREDONDO DE ARREDOLA, MARIO MORALES VALLARTA, CARLOS MEDINA, HARRY BOER, HENK SCHALLIG, MARJA RAMKEMA, LIES MEULEMAN, WIM SCHOUTEN, RENE AMEN, WIL VAN DER KNAAP, NORA FRIAS, JAN VAN MINNEN, CAROOL POPULIER, WIM VAN DEN BOVENKAMP, JOSE SAUL MARTINEZ, TINEKE BROERS-VENDRIG, GUADALUPE MARTINEZ, MARION BERGAMIN-SASSEN, VICTOR HUGO, JERRY SLOSTRA, ROSA PATRICIA PENILLA, J.

JOOSSSE, BEATRIZ GONZALEZ, LINDA MULLER, CARRY, LUPITA, CORA, CHIQUIS, WALTER, MECHE, ADN, RICARDO, IRENE MEESTER, ETC. ETC. ETC. ETC. ETC.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

