

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE BIOLOGIA DE HELMINTOS
PARASITOS: CULTIVO *IN VITRO* DE *FASCIOLA HEPATICA*
Y *TAENIA HYDATIGENA*.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS POR EL LI-
CENCIADO D. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE
ÁLBORNOZ.

DIRECTOR: PROF. DR. D. DIEGO GUEVARA POZO.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA
TESIS HAN SIDO PRESENTADOS EN EL
THIRD INTERNATIONAL CONGRESS OF PARA
RASITOLOGY, MUNICH, 1974, Y EN EL PRI
MER CONGRESO NACIONAL DE PARASITOLOGÍA
GRANADA, 1976.

A MI ABUELO.

A MIS PADRES.

Mi mas profundo agradecimiento:

Al Profesor GUEVARA POZO, por su atenta y abnegada dirección, comprensión y apoyo de todo ti-po, tanto en los momentos difíciles como en los satisfactorios, durante la realización de esta TESIS.

Al Profesor J.D. SMYTH, (Imperial College) así como a su equipo, por su desinteresada enseñanza en esta especialidad.

Al Dr. J.L. CUADROS, (Hospital Clínico San Cecilio, Universidad. Granada) al facilitarme, a lo largo de esta TESIS, la recogida de material biológico humano.

Al Departamento de FISILOGIA ANIMAL, por el suministro de fluidos biológicos, así como datos sobre la fisiología intestinal de los cánidos.

A la Sra. AMELIA ZARZA, por su asistencia técnica. Sin ella no hubiera podido realizar esta TESIS.

Y a todo el PERSONAL Y COMPAÑEROS del Instituto "López-Neyra" y del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada. De todos ellos he aprendido algo a lo largo de estos cuatros años de realización de la TESIS.

También hemos de mencionar nuestra gratitud por la Beca del Plan de Formación Docente e Investigadora concedida por el C.S.I.C. durante los años 1973-1974-1975. Igualmente

agradecemos al Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada la aportación económica que nos ha facilitado en productos, material fungible, medios de cultivo, etc, todos ellos de elevado coste.

	pag.
1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	11
2.1.- <i>Fasciola hepática</i>	
2.1.1.- Sobre el ciclo experimental de <i>F. hepática</i>	13
2.1.2.- Sobre técnicas de eclosión experimental de la metacercaria de <i>F. hepática</i>	15
2.1.3.- Sobre mantenimiento y cultivo <i>in vitro</i> de <i>F. hepática</i>	20
2.2.- <i>Taenia hydatígena</i>	25
2.2.1.- Sobre factores que afectan la desenvaginación <i>in vitro</i> de <i>Cisticercus tenuicollis</i>	26
2.2.2.- Sobre cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taenia hydatígena</i>	31
3.- MATERIAL Y METODOS	35
3.1.- <i>Fasciola hepática</i>	36
3.1.1.- Procedencia de la cepa de <i>Limnaea (Galba) truncatula</i>	37
3.1.2.- Siembra del alga <i>Oscillatoria</i> sp. en "pradera"	37
3.1.3.- Mantenimiento de la cepa de <i>Limnaea</i> en las praderas.	39
3.1.4.- Procedencia y aislamiento de huevos de <i>F. hepática</i>	39
3.1.5.- Incubación de huevos de <i>F. hepática</i> ..	40
3.1.6.- Activación del miracidio y eclosión de los huevos de <i>F. hepática</i>	41.
3.1.7.- Recuento del número de miracidios libres	42
3.1.8.- Infestación de <i>Limnaea truncatula</i> con miracidios	43
3.1.9.- Emisión de cercarias y recogida de las metacercarias	44
3.1.10.-Preparación previa de las metacercarias ..	45
3.1.11.-Esterilización de las metacercarias ..	46
3.1.12.-Desenquistamiento	48
a.) Técnica de Digestión	49
b.) Técnica de desenquistamiento según Dixon	50
c.) Técnica de Dixon modificada	52

	pag.
3.1.13.-Medios de cultivo	54
a.) Totalmente indefinidos u oliguíficos	54
b.) Parcialmente definidos o merídicos	58
3.1.14.-Incubación - Cambios de medio de cultivo y observación de crecimiento	64
3.2.- <i>Taenia hydatigena</i>	66
3.2.1.- Sobre factores que afectan la desenvaginación <i>in vitro</i> de <i>Cisticercus tenuicollis</i>	67
3.2.1.1.- Procedencia de los cisticercos	67
3.2.1.2.- Desinfección de los cisticercos	68
3.2.1.3.- Disección de los cisticercos	68
3.2.1.4.- Tratamiento para desenvaginación	69
3.2.1.5.- Digestión péptica	69
3.2.1.6.- Solución desenvaginante ...	70
3.2.1.7.- Temperatura de almacenaje ..	71
3.2.1.8.- Tiempo de almacenamiento a 4°C	73
3.2.1.9.- Tensión de O ₂ disuelto en la solución desenvaginante	73
3.2.1.10.-Pruebas de desenvaginación con diferentes soluciones con digestión péptica previa	74
3.2.1.11.-Pruebas de desenvaginación con diferentes soluciones sin digestión péptica previa	76
3.2.1.12.-Número de cisticercos empleados en cada experiencia ...	76
3.2.2.- Sobre cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taenia hydatigena</i>	78
3.2.2.1.- Procedencia	79
3.2.2.2.- Desinfección	79
3.2.2.3.- Disección	80
3.2.2.4.- Tratamiento	84
a.) Digestión péptica	84
b.) Lavado	85
c.) Desenvaginación	85
3.2.2.5.- Separación de las "masas" de cisticercos	87
3.2.2.6.- Tipos de frascos	90
3.2.2.7.- Preparación y composición de cada una de las fases sólidas	91

3.2.2.8.- Preparación de las fases sólidas antes de la siembra	97
3.2.2.9.- Extractos y fluidos empleados como suplemento de los medios de cultivo	97
3.2.2.10.-Medios de cultivo	98
4.- RESULTADOS	104
4.1.-Experiencias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Fasciola hepática</i>	105
4.2.-Condiciones para la desenvaginación de <i>Cisticercus tenuicollis (in vitro)</i>	133
4.2.1.- Efecto de la temperatura de almacenaje	133
4.2.2.- Efecto del tiempo de almacenaje ..	136
4.2.3.- Efecto del pH en la desenvaginación ..	136
4.2.4.- Efecto del oxígeno disuelto en la solución desenvaginante	137
4.2.5.- Efecto de los diferentes enzimas presentes en la solución desenvaginante	140
4.2.6.- Resultados sin tratamiento previo con pepsina	144
4.3.-Experiencias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taenia hydatígena</i>	149
5.- DISCUSION	192
5.1.-Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Fasciola hepática</i>	193
5.2.-Condiciones para la desenvaginación de <i>Cisticercus tenuicollis in vitro</i>	219
5.2.1.- Efecto de la temperatura de almacenaje previo	220
5.2.2.- Efecto del tiempo de almacenamiento	224
5.2.3.- Efecto del pH en la desenvaginación	226
5.2.4.- Efecto del oxígeno disuelto en la solución desenvaginante	229
5.2.5.- Efecto de los diferentes enzimas presentes en la solución desenvaginante	231
5.2.6.- Influencia de la desenvaginación de un tratamiento péptico previo	237
5.3.-Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taenia hydatígena</i>	241

	pag.
6.- CONCLUSIONES	283
6.1.- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Fasciola hepática</i>	284
6.2.- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taenia hydatígena</i>	285
7.- BIBLIOGRAFIA	289
8.- APENDICE	306
8.1.-Composición de las diferentes soluciones y medios de cultivo comerciales, empleados ..	307
8.2.-Aparatos utilizados	317

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA REDACCION DE LA TESIS.

SE: Suero Equino.

SBF: Suero Bovino Fetal.

EPH: Extracto de Placenta Humana.

EH: Extracto de Hígado.

EEB: Extracto Embrión Bovino.

EEP: Extracto Embrión de Pollo.

PB: Plasma Bovino.

JD - GL: Jugo Duodenal - Grasa Láctea.

MTH: Medio *Taenia hydatígena*.

MFH: Medio *Fasciola hepática*.

ACCION Y JUSTIFICACION.

1.- INTRODUCCION.

1.- INTRODUCCION.Y JUSTIFICACION.

Aunque nos cueste admitirlo, tenemos que reconocer el atraso que arrastra la Parasitología comparado con el espectacular avance sufrido, en los últimos años, por las ramas científicas, más en vanguardia, de las Ciencias Biológicas. Si este avance ha podido ser tan amplio, hemos de pensar que, por una parte, ha sido gracias al desarrollo tecnológico aplicado a estas ciencias, y, por otra parte, gracias a la facilidad de mantenimiento, en el laboratorio, de grandes cantidades de material biológico. No tenemos más que ver algunos ejemplos de los mismos: *Drosophilla*, *Neurospora*, *Saccharomyces*, *Escherichia coli*, *Fagoλ*, etc., y veremos como detrás de los estudios hechos en cada uno de estos seres, se han construido modelos biológicos de alta complejidad.

La Parasitología reúne una serie de circunstancias en contra de su rápido desarrollo: dificultad experimental de los ciclos biológicos de la mayoría de los parásitos (de muchos de ellos aún no se conocen); dificultad de su obtención en condiciones vitales óptimas de los mismos, debido, entre otros motivos, a sus localizaciones, a menudo vitales para el hospedador; dificultad de obtención de cantidades suficientes para una experimentación prolongada; carestía en la reproducción, en el laboratorio, de las infestaciones naturales, y, sobre todo, a la gran dificultad de su cultivo, que no permite conocer profundamente sus características vitales.

Todo ésto ha hecho que las Ciencias Biológicas, en vanguarde

dia, se "olviden" frecuentemente de unos seres con unas potencialidades biológicas enormes, como son los parásitos; seres extremadamente adaptados, no sólo morfológica sino bioquímica e inmunológicamente, capaces de "engañar" sistemas biológicos tan perfeccionados como el inmunitario de los mamíferos.

En 1950, READ (83) decía: *Parece claro que el cultivo de helmintos parásitos fuera del hospedador representa uno de los problemas más difíciles y desafiantes con que los parasitólogos se enfrentan hoy día.*

A pesar de los 27 años que han pasado desde estas palabras, pocos han sido los parásitos que han logrado cultivarse. Aún hoy día, los investigadores, dedicados a este tema, tropiezan, diariamente, con enormes dificultades: Dificultad en la reproducción *in vitro* de los habitat de los parásitos, dado que la mayoría de las veces poco o confusamente se conoce la bioquímica, biofísica e incluso fisiología de órganos complicados en que los parásitos viven (hígado, cerebro, páncreas, etc). Por otra parte, el investigador tropieza con "estirpes" de la misma especie de parásito pero con requerimientos fisiológicos totalmente diferentes. Así, J.D. SMYTH (1974) (119), (1974) (120), (1974) (121), (1974) (122), (1974) (123), encuentra diferencias en el momento de cultivar *E. granulossus* según procedan los quistes, de caballos o de ovejas, llegando a la conclusión, posteriormente comprobada, de que existen, al menos, dos cepas del anterior parásito, epidemiológicamente hablando.

Por otra parte, tenemos que cada parásito, aún viviendo dentro de un mismo órgano, ha llegado a adaptarse al mismo siguiendo

rutas evolutivas diferentes, por tanto, perdiendo algunos sistemas de síntesis enzimáticas. Por otra parte, no podemos tampoco olvidar el sistema existente entre hospedador y parásito, íntimamente relacionados entre sí. Bastante conocidos son, por ejemplo, los fenómenos de interrelación hormonal en parásitos como: *Opalina* (J.D. SMYTH (1960) (133)), *Echinococcus patagonicus* (SZIDAT (1959) (133)), etc., en que el parásito llega a depender de los ciclos sexuales hormonales de su hospedador, para él, asimismo, entrar en reproducción.

Un ejemplo poco conocido, pero sumamente interesante, en que la relación hormonal no ha sido, en su fino proceso, demostrada, pero que muestra cuán íntimamente ligados están el comportamiento del parásito y el comportamiento etológico de su hospedador, lo tenemos en un *Polistomatidae*, parásito de las vías urinarias de un sapo africano. Pues bien, este parásito, sólo empieza a poner huevos en el momento en que su hospedador entra en el agua, fenómeno que realiza una vez al año por ser de costumbres terrestres (EUZET, 1974 (31)).

Todo esto hace difícil el cultivo *in vitro* de los parásitos, donde los medios de cultivo deben aproximarse, al máximo, al medio ecológico en el que se desarrollaría *in vivo* y a otras posibles causas aún desconocidas.

J. G. BAER (1971) (1) dice así: *El cultivo, en un medio artificial, de los organismos es difícil, y requiere condiciones muy cercanas a las del medio especializado en las cuales pululan normalmente.*

Por otra parte, aún dentro de las dificultades del cultivo *in vitro*, tenemos las dificultades propias de los cultivos celulares o de órganos; validez de los sueros (no todos los sueros, aún del mismo donante, son válidos); necesidad de cultivos prolongados, con lo que las posibilidades de contaminación, aún con las mayores precauciones, entran dentro de lo posible; medios sépticos de su habitat natural (helminths intestinales) que obligan a tratamientos previos con antisépticos o/y antibióticos, cuyos efectos sobre los parásitos no siempre son conocidos; medios muy complejos con dificultades de preparación, esterilización, estabilización, etc.; necesidad, a veces, de empleo de productos metabólicos o extractos tisulares de composición parcialmente conocida, y no todos de la misma efectividad.

TERMINOLOGÍA.

Numerosos nombres han sido empleados para designar las diferentes técnicas empleadas: Axénico del griego (α = ausencia; $\Sigma\epsilon\acute{\nu}\omicron\varsigma$ = extranjero) ausencia de cualquier otro organismo o ser vivo.

Monoxénico = cuando, además del organismo en cultivo, existe uno conocido.

Polixénico = cuando hay presente más de una especie además de la que se cultiva.

Agnobiótico = cuando existiendo especies acompañantes, éstas son desconocidas.

Medios: Holídicos, Merídicos y Oliguídicos (DOUGHERTY, 1959, (28)), cuando los medios son totalmente definidos, parcialmente definidos y poco definidos o indefinidos respectivamente, según su composición química.

CRITERIOS DE DESARROLLO.

Antes de nada, debemos considerar cuales son los criterios de viabilidad o desarrollo, para así diferenciar lo que es simplemente mantenimiento o supervivencia y cultivo.

El término *supervivencia* no es fácil definirlo con completa precisión. Para nosotros sería el conseguir mantener el metabolismo celular del parásito, sólomente para que sus células vivan, sin crecimiento ni diferenciación, y sin, por supuesto, la continua producción de esperma y óvulos en el caso de vermes adultos.

El término *cultivo* llevaría implícito el mantenimiento metabólico a nivel normal, con crecimiento y diferenciación, y, en el caso ideal, la producción continua de espermatozoides, óvulos y huevos ya fecundados y con capacidad infestante.

De acuerdo con GUEVARA POZO (1971) (42), existen, al menos, cinco niveles de aproximación para el cultivo ideal:

A) Mantenimiento en supervivencia de una de las fases del parásito por tiempo más o menos prolongado, sin multiplicación ni crecimiento celular.

B) Mantenimiento de una fase del parásito, consiguiendo la multiplicación celular a partir de las inicialmente presentes.

C) Transformación de una fase o estadio del parásito en la fase o estadio subsiguiente en su ciclo vital.

D) Transformación de la primera etapa del ciclo biológico (huevo, larva) hasta la última (adulto).

E) Cultivo prolongado, completando todas y cada una de las fases del ciclo indefinidamente *in vitro*.

El primer nivel de aproximación sería el mantenimiento o supervivencia, muy empleado en estudios bioquímicos, farmacológicos, etc., partiendo, generalmente, de adultos obtenidos tras el sacrificio de sus hospedadores.

Los otros cuatro niveles de aproximación sería cultivos más o menos "afortunados".

En nuestro caso siempre hemos pretendido conseguir los niveles de aproximación C y D, consiguiéndose, como más tarde veremos en los dos parásitos empleados, el nivel de aproximación D.

FINALIDADES DEL CULTIVO.

Como ya decíamos anteriormente, el cultivo *in vitro* de helmintos parásitos no puede ni debe ser, en sí mismo, un fin o meta a alcanzar. Es, mas bien, la consecución de técnicas lo más perfeccionadas posibles para ser, en su día, instrumento de trabajo al objeto de estudiar Fisiología, Bioquímica, Genética, Inmunología y Biología Molecular de los parásitos.

Una muestra bien clara de la importancia del cultivo *in vitro* de los parásitos la tenemos en el interés que ha despertado, en los inmunólogos, los recientes trabajos de W. TRAGER y J.B. LEUSEN (1976) (141), cultivando, de una manera contínua, *P. falciparum*, en vias de obtener unas cepas avirulentas con las que poder conseguir gran cantidad de inmunógeno. No hay que olvidar que, sólo en el continente africano, se cifran en 96 millones los casos de malaria con, aproximadamente, un millón de muertos anuales, O.M.S. (1975) (72).

Otro aspecto sumamente interesante, biológicamente hablando, lo tenemos en el estudio de las defensas del parásito contra el sistema inmunitario del hospedador, siendo evidente el papel que, en dichos estudios, puede jugar el cultivo *in vitro*.

En cuanto a la biología pura de los parásitos y sus cambios morfogénicos, tenemos ejemplos en los que, ya, el cultivo *in vitro* ha jugado un importante papel. BERNTZEN (1965) (7) cultivando *Trichinella spiralis*, descubre que la larva enquistada es una cuarta larva, y no una tercera como se pensaba.

SOMMERVILLE (1964-1966) (125) (126) observa que, aumentando la concentración de CO₂, se induce en *Haemonchus contortus* la muda (ecdisis).

J.D. SMYTH, en sus múltiples trabajos con cultivos, bien con *Schistocephalus solidus* (1954) (105); *Echinococcus granulossus*; *Echinococcus multilocularis*; *Taenia serialis* (= *Multiceps serialis*); *Taenia crassiceps* y *Diplostomum*, (107) (109) (110) (111) (112) (113) (116) (122), da cuenta de los cambios morfológicos sufridos por las larvas en su desarrollo *in vitro*.

Ni que decir tiene la importancia que jugará el cultivo *in vitro* en estudios de Fisiología, Bioquímica, Biología Molecular, Farmacología, etc., del parasitismo. Todo esto es lo que indujo a iniciarnos en este campo, que consideramos sumamente interesante, y al que aportamos nuestro pequeño esfuerzo.

Concluimos esta introducción tomando las palabras del Prof. GUEVARA POZO (1971) (42): *Cada adquisición en este campo, por pequeño que sea en su número o calidad, tenemos que calificarla de un importante hallazgo.*

2.- ANTECEDENTES PASOTOLA HEPATICA.

ANTECEDENTES SOBRE LA FASCIOLOGIA EXPERIMENTAL EN EL
MEXICO

El presente trabajo se refiere a las principales
contribuciones de los autores mexicanos en el campo de la
fasciología experimental.

2.1.- ANTECEDENTES SOBRE FASCIOLOGIA HEPATICA.

2.1.1.- ANTECEDENTES SOBRE EL CICLO EXPERIMENTAL DE *FASCIOLA* HEPATICA.

Fasciola hepática es un parásito ampliamente distribuido por la superficie del globo, encontrándose, principalmente, en las regiones templadas.

Las primeras referencias acerca del ciclo biológico de *Fasciola hepática*, las expuso SCHAPER en 1889 (94), ya que las anteriores ideas consideraban al parásito como producto de degeneración del propio hígado, como se expone, por ejemplo, en el libro de SCHEEPS HUSBANDRY 1837, al decir, que es causada por la acción de ciertos gases o miasmas durante la descomposición de la materia vegetal, bajo la influencia de la humedad y el aire".

Sin embargo, en 1698, el anatomista holandés G. BIDLOO (8) escribe 64 páginas en una carta a LEEWENHOEK dándole cuenta de los numerosos huevos que encuentra en el parásito y le sugiere la posibilidad de infestación por el agua de bebida.

Van LEEWENHOEK, también en algunas de sus cartas a la Royal Society (1700 y 1704) (146), piensa que los gusanos entran junto con la comida, pero no pudo explicar cómo no los encuentra en muestras de suelo o agua en las zonas de pastoreo.

LINNEO expuso la idea de que se pudiera producir una metamorfosis en el hospedador.

Hacia el final del siglo XVIII, se descubre que algunos parásitos completan su ciclo en varios hospedadores.

STEENSTRUP 1842 (129), desarrolla la idea de la alternancia de generaciones.

Los miracidios, redias y cercarias son descritos, como formas independientes, por MEHLIS en 1831 (69), BOJANVS en 1818 (10) y MULLER en 1772 (70), respectivamente.

SIMONDS en 1852 (101) observó que los huevos de *Fasciola hepática* son inócuos para las ovejas.

WEINLAND (1875) (152), confirmó la presencia de redias en los caracoles, especula sobre la posibilidad de que la cercaria pudiera enquistarse en la hierba.

LEUCKART (1881) (1882) (62) (63) y THOMAS (1882 y 1883) (136) (137) (138) (139) (140), respectivamente, en una serie de trabajos completan el ciclo experimental viendo como hospedador intermediario *Limnea (Galba) truncatula*. El trabajo de estos dos pioneros de la Parasitología fue confirmado, más tarde, en 1892 - 1893, por LUTZ (66), el cual demuestra que la metacercaria es la fase infestante para el hospedador vertebrado.

La relación o simple referencia de los trabajos posteriores encaminados a conseguir el mantenimiento del ciclo biológico de *Fasciola hepática*, sería excesivamente extensa, saliéndose de los límites de espacio de esta TESIS.



Nosotros hemos seguido, para el mantenimiento e infestación de *Limnea (Galba) truncatula*, el método que más adelante se describe según técnica seguida por M. JIMENEZ y GUEVARA-POZO (comunicación personal) (56), procedimiento que se sigue en el Instituto "López-Neyra" desde el año 1965.

2.1.2.- SOBRE TÉCNICAS DE ECLOSIÓN EXPERIMENTAL DE LA METACERCARIAS DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Los primeros trabajos acerca del desenquistamiento de metacercarias de *Fasciola hepática* tuvieron lugar en 1914, en que SINISTERSIN (104) observó que se produce en animales experimentalmente infestados, entre las dos y tres horas tras la infestación.

En 1938, SCHUNMACHIER (95) observa que, en cobayos experimentalmente infestados, aparecen las metacercarias intactas en el estómago, liberándose éstas en el intestino a las 2 horas y 30 minutos de la infestación.

DAWES, en 1961 (22), las encuentra activas en el intestino de ratones infestados, presentando la ventosa bucal pegada a la pared del quiste por la parte inferior.

DAWES, en 1963 (23), observa que la ventosa ventral es utilizada por la adolescaria para romper, de una forma mecánica, la parte inferior del quiste. Asimismo, DAWES y cols. encuentra que, tras colocar las metacercarias enquistadas en la

cavidad peritoneal de animales de experimentación, hay una liberación de la adolescaria, llegando a la conclusión de que no es necesaria la presencia de enzimas digestivos, HUGHES (1959) (50), (1963) (51); DAWES (1961) 22); DAWES y HUGHES (1964) (24).

En 1961, DAWES (22), encuentra que las metacercarias de *Fasciola hepática* no necesitan una determinada bilis específica y ve que, por infestación oral, puede infestar y obtener fasciolas en dos pollos.

La primera experiencia *in vitro* con un medio, primero definido y después parcialmente conocido (meridico), fue hecha WRIGHT(1927)(159). Trata las metacercarias de *Fasciola hepática* con líquido gástrico artificial y, posteriormente, con jugo duodenal, obteniendo adolescarias, llegando a la conclusión de que el desenquistamiento tiene lugar en el duodeno y no en el estómago.

SUSUKI, en 1931 (131), demuestra que el desenquistamiento tiene lugar cuando se tratan las metacercarias con pepsina acidificada y en solución al 0,2% de bicarbonato, conteniendo un 1% de pancreatina y un 5% a 7% de bilis de buey. Hace un control de la viabilidad inoculando, las desenquistadas, intraperitonealmente a conejos, cabras y cobayos jóvenes.

VOGEL (1934) (147), ve que, después de un tratamiento con jugo duodenal fresco de perro a 37°C, el desenquistamiento tiene lugar en un 25% a la hora y cuarto y en un 65% a las dos horas y cuarto. Inocula las desenquistadas intraperitonealmente a ratas y obtiene individuos adultos a los 41 días.

HUGHES, en 1959 (50), demuestra que el desenquistamiento se produce con fluido intestinal de conejo, bilis diluida o solución de tripsina. Después de 17 horas obtiene unos porcentajes de 84%, 4% y 14% respectivamente.

Buscando un medio rápido para ver la viabilidad de las metacercarias de *Fasciola hepática*, WIKERHAUSER, en 1960 (155), trata los quistes con una solución de pepsina acidificada al 0,5%, durante dos o tres horas; agrega, posteriormente, un 1% de bicarbonato sódico y 0,4% de tripsina. Los resultados los muestra en su trabajo sin detalle, pero indica que el 80% se desenquistan después de la adición de la tripsina, a las 2 ó 3 horas, pero algunos se desenquistan a los 15 minutos. Si la bilis se excluye, añade, el porcentaje es más bajo.

DAWES y HUGHES (1964) (24), muestran que en un medio similar al de WIKERHAUSER (1960) (155), a las tres horas y media se desenquistan el 50%; a las cuatro horas y media el 55% y a las cinco horas el 60%.

En 1964, DIXON, E.K. (26), concluye que las metacercarias se desenquistan tras exposición a altas concentraciones de CO₂, agentes reductores, temperatura de 39°C y bilis, el proceso de desenquistamiento ocurre no por un simple proceso externo de los enzimas, sino por un proceso activo dentro del quiste. Él admite que existen dos fases: una primera de activación y otra de desenquistamiento.

DIXON, en 1966 (27), hace un trabajo muy completo acerca del desenquistamiento y obtiene que la activación es favorecida

por las altas concentraciones de CO₂, los agentes reductores y temperatura de 39°C.

La acción del agente reductor estimula las otras dos. La acción del CO₂ sólo es necesaria durante cinco minutos, pero para la acción del reductor es necesario unos treinta minutos. El orden de estos procesos no altera el resultado.

Posteriormente, con la agregación de bilis, pasan de los movimiento rotatorios de la activiación a la fase de pequeñas y casi imperceptibles contracciones. Pasados veinte minutos desde que se agrega la bilis, empiezan a escapar por el espacio abierto en la parte inferior del quiste.

El medio que utiliza DIXON es: 60% CO₂; 0,02M de ditionato sódico y 10% de bilis de oveja, con los siguientes resultados:

- 5' - 20', rotan activamente.
- 20' - 50', chocan contra las paredes del quiste imperceptiblemente.
- 50' - 90', emergen.

Obteniendo un 90% de desenquistamiento.

En 1969, M.M.H. SEWELL y G.M. PURVIS (100), emplean una técnica en la que, primeramente, introducen las metacercarias en solución A (con 1/20 N de ClH a 39°C), añadiéndole, inmediatamente, igual volumen de solución B (conteniendo 1% de CO₃HNa, 0,8% de ClNa y 20% de bilis de vaca a 39°C). Obtienen estos

autores entre el 70 y 80% de desenquistamiento. Cuando el medio carece de bilis, se obtienen resultados variables, llegando a un máximo de un 40%. Comprueban la validéz de diferentes bilis, de vaca, cabra, cerdo, perro, obteniendo similares resultados.

Cuando emplean soluciones de 1,2% de taurocolato crudo o purificado o taurocolato sintético, obtienen entre el 60-70% de desenquistamiento.

Con glicocolato observan desenquistamiento, pero la mayoría de ellas se desintegran a las dos horas.

El glicodesoxicolato no estimula la desenquistación, y las libres se desintegran a las dos horas.

Agentes como el Twen 80, colato y taurina no estimulan el desenquistamiento.

En 1973, OSUNA; GUEVARA - POZO (73) (74), emplean, para el posterior cultivo, el procedimiento de Dixon, en el que hacen una modificación al objeto de obtener sólo adolesecarias, libres de metacercarias enquistadas y restos de las mismas.

R.E.B. HANNA; S.S. BAALAMY y W. JURA, en 1975 (43), emplean una modificación del medio de M.M. SEWELL y PURVIS (1969), para *Fasciola gigantica*. Emplean las dos soluciones A y B, añadiéndole 2 mg./ml. de L. Cisteina hidrociorhídrica. En algunos casos omiten la presencia de Cisteina, obteniendo, en este caso, un 30%. Cuando cambian el 20% de bilis por un 10% de suero bovino obtienen un 3%; y con el medio total en presencia de

L-Cisteina y bilis un 90,8%.

R.E.B. HANNA, JURA, W. (1976) (44) hablan de la influencia del CO₂ en el desenquistamiento para *F. gigantea*, favoreciendo las sales biliares la penetración del mismo al interior del quiste.

2.1.3.- SOBRE MANTENIMIENTO Y CULTIVO *IN VITRO* DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Parece que el primer investigador que, de una manera sistemática, se interesó acerca del cultivo *in vitro* de *Fasciola hepática* fue STEPHENSON (1947) (130). Utilizaba fasciolas procedentes del sacrificio de cabras; éstas eran transportadas al laboratorio en bilis fría, manteniéndolas así tras la obtención y hasta la puesta en cultivo durante unas 6 horas.

El medio que empleaba era solución Ringer a pH 9,2, añadiéndole 8,5 m M de Borax. El tiempo de supervivencia, en estas condiciones, fue de 12 horas.

Probaba este investigador con diferentes soluciones de azúcares encontrando efectos beneficiosos por este orden: Fructosa, Glucosa, Galactosa, Maltosa o Lactosa. Sin embargo, con los azúcares, debido a no ser las técnicas estériles, bajaba el pH de los medios.

En un estudio de los diferentes valores de pH, encuentra que "el óptimo" es de 8,6, en el que viven unas 40 horas.

DAWES (1954) (21), introduce ya técnicas asépticas y, en solución de Hedon-Fleig, consigue una supervivencia de 17 días.

CLEGG (16), en 1957), introduce las fasciolas en tubos de celulosa, consiguiendo una supervivencia de 17 días, y observa una espermatogénesis anormal sólo a las pocas horas del mantenimiento.

ROHRBACHER (1957) (85), usando un complemento de aminoácidos individualizados, mezclas de ellos, o productos como plasma de pollo, suero ~~de~~ caballo, extracto de embrión bovino, no consigue prolongar la vida de las fasciolas por más de 72 horas. Sin embargo, empleando colesterol, logra una mayor supervivencia de unos 10 días. La adición de extracto de hígado mantiene el color natural de los gusanos y la normalidad durante 14 días, y llegan a un máximo de motilidad de 21 días. Añadiéndole al extracto de hígado un extracto de hígado comercial, logra una apariencia normal de 21 días y una supervivencia de 30. Confirma, asimismo, que las fasciolas tienen mayor preferencia por los medios aeróbicos que por los anaeróbicos (como ya señalaba STEPHENSON). Y, asimismo, confirma ligando la ventosa bucal de los parásitos, que los azúcares glucosa, fructosa y el glicerol pasan a través de la cutícula, experiencia realizada anteriormente por STEPHENSON.

Su criterio de viabilidad, como el de los anteriores

autores, es el color y la motilidad.

NYMARK (1961) (71) confirma que las fasciolas viven mejor en solución Hedon-Fleig que en el medio de STEPHESON.

J. BENEX (1966) (4) logra una supervivencia de 40 a 50 días en medio con solución de HANK más un 30% de glucosa, 20% de suero fetal y el 0,05% de eritrocitos de carnero.

Los criterios de viabilidad seguidos, hasta este momento, por la mayoría de los autores, como indicábamos anteriormente, son la movilidad, el color y la apariencia de las fasciolas.

CLEGG en 1957 (16) y GUEVARA-POZO en 1964 (41), observan que los gusanos colocados en cultivo, rápidamente vaciaban su contenido de huevos en el útero, mostrando anormalidades fisiológicas a las 3 horas.

En 1969, L.H. RACTLIFFE; D. GUEVARA-POZO y R. LOPEZ-ROMAN (80), proponen, como criterio de viabilidad, la ovoposición. Describen un complicado aparato y prueban diferentes medios al objeto de intentar mantener una ovoposición constante. El mejor medio empleado fue solución Earle, 10% de sangre de ternera desfibrinada, 45% de suero de ternera, 1% de bilis y 0,5% de un concentrado de hígado y antibióticos, logrando una ovoposición durante 5 días y una supervivencia de 50 días.

En todas las investigaciones antes citadas, los autores partían de fasciolas adultas.

Los primeros investigadores que siguieron en sus investigaciones el auténtico criterio de cultivo *in vitro*, o sea, partiendo de la fase infestante, la metacercaria, fueron WIKERHAUSER y SLAVKO CVETNIC en 1967 (156). Ambos cultivaron las adolescarias en medios monoxénicos y axénicos.

EN CULTIVOS ASENICOS:

Hedon-Fleig	una supervivencia máxima de 2 dias.
Hedon-Fleig mas 0,1% de Agar	2 dias.
Suero de caballo	3 dias.

MEDIO A: Suero de caballo más 0,5% de Lactoalbúmina hidrolizada en solución de Hank

3 dias.

MEDIO B: 15% de suero de ternera inactivado más 0,5% de Lactoalbúmina hidrolizada

10 dias.

EN CULTIVOS MONOXENICOS:

Medio B, más células testiculares de ternero .	10 dias.
Medio A, más células de riñón bovino	14 dias.
Células de hígado bovino más medio B	10 dias.
Riñón embrionario de cerdo mas medio B	3 dias.
Células de riñon de mono más medio C (2% de suero de ternera en solución Earle)	11 dias.

Posteriormente, WIKERHAUSER, S. CVETNIC y Z. BRUDNHAK, en 1968 (157), consiguen unas supervivencias de 29 dias en el

siguiente medio monoxénico: células testicularres de becerro más 15% de suero de ternera inactivado más 0,5 de Lactoalbúmina hidrolizada; 22 días en células de riñón de cerdo más medio compuesto de 10% de suero inactivado de ternera; 0,5% de Lactoalbúmina hidrolizada y 0,1% de extracto de levadura en solución de Hank y 15 días de células anmióticas humanas más 2,5 de suero de ternera inactivado, 0,5 Lactoalbúmina hidrolizada en solución de Hank.

En 1973-1974, A. OSUNA y GUEVARA-POZO (73) (74), dan cuenta que en medio conteniendo exclusivamente suero equino inactivado y glóbulos rojos de carnero, consiguen un crecimiento de hasta 700 μ , y una cierta evolución genital con una duración de 54 días.

CAROLINE DAVIES (1975) (20) señala que el medio que mejor resultado les ha dado, NCTC 135 más el 40% de suero de pollo con glóbulos rojos de carnero, consiguiendo un crecimiento de hasta 1,2 mm. Se desarrollan de este modo las ramas intestinales, pero sin desarrollo de los rudimentos genitales. No especifica la duración del cultivo.

... SOBRE FASIONES DE AFILIACION...
DE AIRBORNE TISSUE...

2.2.- TAENIA HYDATIGENA.

2.2.1.- SOBRE FACTORES QUE AFECTAN LA DESENVAGINACIÓN *IN VITRO* DE *CISTICERCUS TENUICOLLIS*.

KUCHENMEISTER establece, en 1852 (60), la relación entre cisticerco-tenia.

Diez años después, BAILLET publicó sus experiencias con *Taenia hydatigena* (Pallas 1766) (2), demostrando su ciclo biológico y migración de los cisticercos desde el hígado a la cavidad abdominal.

LEUCKART (1884-1900) (65), conforme con BRONN (1884-1900) y RAILLIET (1891) () averiguan el tiempo necesario para la formación del cisticerco tras la infección en el hospedador intermediario, de esta misma especie.

Asimismo, LEUCKART (1884-1900) (65) observa que en el cisticerco aparecen ventosas y rostello al mes de la infección. BRONN (1884-1900) (11), G.K. SWEATMAN y P.J.G. PLUMMER (1957) (132), estudian el ciclo biológico y la patología del mismo cestode en animales domésticos, encontrando que para la aparición de ventosas y rostello, el tiempo oscila entre 34 y 53 días. Asimismo, basándose como criterio de viabilidad en las contracciones de la vesícula, estudian los efectos de la temperatura en cisticercos libres de membranas, almacenados en solución salina, encontrando que, a -21°C , sobreviven de 45 a 60 minutos, de 4°C y 7°C de 4 a 10 días, de 29°C a 31°C de 5 a 8 días y de 34°C a 36°C de 4 a 7 días.

D.W. FEATHERSTON (1969) (33), estudian *in vivo* la evolución del cestode en el hospedador definitivo, así como los períodos de emigración a lo largo del intestino delgado, mostrando en su trabajo, una foto de un cisticerco evaginado *in vitro*, comparándolo con cestodes mantenidos 3 días en el intestino del perro tras la ingestión de cisticercos; éstos últimos muestran la pérdida de la masa posterior al escolex.

D.W. FEATHERSTON (1969) (34), estudia, igualmente, el efecto de almacenaje de los cisticercos sobre la infestabilidad en perros.

D.W. FEATHERSTON (1971) (35), hace un trabajo sobre los efectos de la evaginación *in vitro* en diferentes soluciones enzimáticas, y compara con el establecimiento en el hospedador definitivo: el perro. Como soluciones enzimáticas emplea 10 diferentes. Desde solución de Hank simple a Pancreatina (100 mg.), Tripsina (100 mg.) y 5 ml. de bilis canina, disueltas todas en 100 ml. de solución de Hank. La temperatura empleada es de 38°C y el pH usado varía de 6,8 a 7,5.

A. OSUNA y GUEVARA-POZO (1974) (75), dan cuenta de la desevaginación de los cisticercos *in vitro* para su posterior cultivo, cuya descripción se da más adelante.

En cuanto a desenvaginación *in vitro* de cisticercos procedentes de otros cestodes de la familia *Taenidae*, la primera desenvaginación *in vitro* fue realizada, en 1913, por SCOTT. (96). P. BUTNING (1927) (12) hace un estudio de la desenvaginación de *T. solium*.

En 1933 (67), MALKANI estudia un método rápido para la desenvaginación de escolex de cisticercos de *T. pisiformis*.

En 1934, De WAELE (149) estudia los factores que afectan a la desenvaginación de *Cisticercus pisiformis*, indicando los efectos positivos de las sustancias con radicales cólicos como estimulantes de la desenvaginación.

En 1941 (29), EDGAR, S.A. indica que no es necesaria para la desenvaginación la presencia de la vesícula del cisticerco de *T. pisiformis*. Sin embargo WARDLE y MACLEOD (1952) (150) sugieren que la vesícula juega un importante papel en la desenvaginación.

ROTHMAN (1959) (86), ve en *Taenia taeniformis* (= *Hydatigera taeniformis*) que puede llegarse a la desenvaginación al eliminarse la membrana periquística, sin actuación de la bilis o de agentes tensoactivos.

En 1960 (36), FUENTES y col. sugieren que la desenvaginación de cisticercos de *T. solium*, es por causa de agentes tensoactivos en general, sin tener en cuenta la naturaleza química de los mismos. Asimismo, indican que la vesícula del cisticerco no juega ningún papel en la desenvaginación.

CAMPBELL W.C. y T. RICHARDSON (1960) (13), con *T. pisiformis*, encuentran que la evaginación es por causa de agentes tenso-activos.

En 1963 (14) CAMPBELL W.C. observan que un 0,005% de un tensoactivo comercial Nacconol (N.R.S.F.) es suficiente para la desenvaginación: que es necesaria para *T. pisiformis* una fuerza tensoactiva de 54 dinas/cm², no interviniendo la naturaleza del agente tensoactivo, y que en este cestode no interviene la vesícula para la desenvaginación.

De RICKE P.H. y GREMBERGEN G. Von (1965) (88), indican que al almacenamiento de los protoescolex de *E. granulossus* por debajo de 2°C pierden la capacidad de evaginación.

En 1966 (89), De RICKE P.H. y Von GREMBERGEN G., afirman la necesidad, para la desenvaginación de *E. granulossus*, de Pancreatina y de Tripsina.

J.D. SMYTH y col. (1967) (113) encuentran que la desenvaginación de *E. granulossus* es acelerada por la bilis, y que para lograr un mayor porcentaje de desenvaginación, es necesaria la presencia de Tripsina, Pancreatina y bilis, tras una digestión péptica; mostrando, asimismo, la necesidad de un medio aerobio para la misma.

J.D. SMYTH (1969) (114), en su libro sobre "Fisiología de cestodes", indica los peligros de emplear sales biliares comerciales en la desenvaginación. Pone, por ejemplo, que el ácido desoxicólico lisa rápidamente las cutículas de *E. granulossus*.

O.O.BARRIGA (1971) (3), estudia la supervivencia de protoescolex de *E. granulossus* almacenados en solución salina y líquido hidatídico a diferentes temperaturas.

Tal disparidad de criterios sostenidos por los diferentes autores que se han ocupado de este tema, nos indujo a realizar nuestras experiencias sobre desenvaginación de *T. hydátigena* que más adelante se exponen.

SOBRE-CULTIVO IN VITRO de TAENIA HYDATIGENA

ANTICUARIOS 504-8 0111-10 1110

2.2.2.- SOBRE CULTIVO IN VITRO DE TAENIA HYDATIGENA.

BYLOR, P. D. B., FAIR, G. B. y SOGG, M. (1961) *Journal of Parasitology* 51: 1-10

Estudio de cultivo in vitro de *Hydatigera dimorpha* y *Hydatigera contorta* en medios de cultivo sintéticos.

2.2.2.- ANTECEDENTES SOBRE CULTIVO *IN VITRO* DE *T. HYDATIGENA*.

En la amplia bibliografía consultada no hallamos ninguna referencia sobre el cultivo *in vitro* de *Tenia hydatigena*, partiendo de cisticercos. Tan sólo OSUNA y GUEVARA-POZO (1974) (75) hacen una comunicación al III Congreso Internacional de Parasitología, Munich, 1974 y A. OSUNA y GUEVARA-POZO (1976) (76).

Trabajando, asimismo, en cultivo *in vitro* con esta especie, pero con enfoque diferente, pues parte de oncosferas activadas, HEATH D.D. y SMYTH J.D. (1970) (45) intentan desarrollar cisticercos en medios libres de células, alcanzando cierto grado de desarrollo.

A pesar de la falta de bibliografía sobre el tema, existen publicaciones de algunos autores que, trabajando con otros cestodes, nos han servido de base bibliográfica para iniciar el presente estudio.

BERNTZEN (1960-1961) (5) (6) utilizando complicados aparatos y sistemas de cultivo, afirma que, a partir de cisticercoides de *Hymenolepis diminuta*, consigue, en 15 días, anillos grávidos.

TAYLOR A.E.R., BALL, G.H. y VOGEL M. (1960) (134) describen un método de cultivo de *Hymenolepis diminuta* y *Hymenolepis nana*, a partir de cisticercoides.

TAYLOR A.E.R. (1961) (135) cultiva *Hymenolepis diminuta* y *Hymenolepis nana* a partir de cisticercoides, aumentando el tamaño de los vermes al doble del tamaño inicial.

SCHILLER (1965) (92) consigue cultivar y llega a obtener oncosferas infestantes de *Hymenolepis diminuta*, partiendo de cisticercoides, con diferentes métodos al descrito por BERNTZEN.

De RYCKE, P.H. y BERNTZEN A.K. (1967) (90) mantienen y hacen crecer *Hymenolepis microstoma in vitro*.

SINHA-HOPKINS (1967) (102) cultivan *Hymenolepis nana* desde cisticercoides a adultos con huevos maduros, empleando extracto de levadura, suero y extracto de hígado, en 12 días. Como fase gaseosa empleó N₂ 95% y CO₂ 5%, concluyendo que el O₂ es necesario en el cultivo por la gran cantidad de mitocondrias que existen en el adulto.

TURTON J.A. (1968) (142) cultiva *Hymenolepis diminuta*, partiendo de cisticercoides hasta adultos fértiles.

EVANS W.S. (1970) (32) cultiva *Hymenolepis microstoma*, desde cisticercoides hasta adultos fértiles. Cuando emplea altas concentraciones de O₂ se inhibe fuertemente el desarrollo.

PLATZER E.G. y ROBERT L.S. (1970) (79), ven la necesidad de una absorción, de origen externo de vitamina B₆ por parte de *Hymenolepis diminuta*.

J.S. SEIDEL (1971) (99), encuentra que la Hembra es un

requerimiento necesario para la segmentación *in vitro* de *Hymenolepis microstoma*.

TURTON J.A. (1974) (a,b) (143) (144) observa el efecto de los antibióticos sobre *Hymenolepis diminuta*, algunos de los cuales inhiben el crecimiento, o lo retrasan.

Estos son los trabajos que hemos encontrado más sobresalientes respecto a cultivo de especies de *Hymenolepis*.

Respecto a otros *Ciclophylloidea*.

WEBSTER, G.A. y CAMERON T.W.M. (1953) (15) tras probar 46 diferentes medios, consiguen que *Equinococcus multilocularis* llegue a segmentarse, a partir de protoexcolex.

ROBINSON, D.L.H.; SILVERMAN, P.H. y PEARCEAR (1963) (84) cultivan *Taenia crassiceps*, sin alcanzar resultados ostensibles.

J.D. SMYTH y col. (1962-1966-1966b-1967-1967-1969a-1969b-1969c-1971-1974a-1974b-1974c-1974d-1974d-1974e-1975) (107 a 124), describen la metodología y los problemas que existen para el cultivo *in vitro* de *E. granulossus* (origen: quistes de oveja) y *E. granulossus* (origen: quistes de caballos).

SMYTH J.D. (1969) (116), consigue cultivar *Taenia serialis* (= *Multiceps serialis*) con un medio similar al empleado para *E. granulossus*.

SMYTH J.D. (1973) (118) (comunicación personal) cultiva *Taenia crassiceps*, cepa *Toi*, en el mismo medio que para *E. granulossus*.

HEATH, D.D. (1974) (46) (comunicación personal) intenta cultivar, sin mucho éxito, *Taenia solium*, a partir de cisticercos.

ESCH, G.W.; SMYTH J.D. (1976) (30), cultivan *Taenia crassiceps*, en igual medio al comunicado personalmente por J.D. SMYTH (1973) (118) indicando la necesidad de la fracción globulínica del suero bovino fetal en orden a la morfogénesis *in vitro* del cestode.

SINHA, D.P. (1976) (103) da cuenta que no todos los extractos de levadura son válidos para el cultivo *in vitro* de cestodes. Indicando que cuando son esterilizados en autoclave pierden su efectividad, pensando por tanto en la necesidad para los cestodes de algún factor desnaturizable por el calor.

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1.- FASCIOLA HEPATICA.

3.1.1.- PROCEDENCIA Y MANTENIMIENTO DE *LIMNAEA (GALBA) TRUNCATULA**

Utilizamos en nuestras experiencias la cepa de *Limnaea Galba truncatula* para la obtención de metacercarias de *Fasciola hepática*.

Esta cepa, con la que trabajamos, procede del Instituto de Enfermedades Tropicales de Lisboa y se mantiene en nuestro laboratorio desde 1965, en unos terrarios (praderas) alimentándose del alga *Oscillatoria sp.*

3.1.2.- SIEMBRA DE ALGA *OSCILATORIA SP.* "EN PRADERAS".

Tierra procedente de un criadero natural de *Limnaea* de Santa Fe (Granada), era traída al laboratorio en cántaras de plástico, de unos 15 litros. Esta tierra, colocada en bandejas de vidrio o metálicas recubiertas de porcelana, se extendía formando una capa de unos 5 cm. de espesor, y se secaba y es-

* Hemos aceptado la nomenclatura de L. GERMAIN MOLLUSQUES terrestres et fluviatiles. Faune de la France. 1969 (37).

terilizaba en un horno Pasteur a 140°C, durante 12 horas.

Pasado este tiempo, la tierra se trituraba en un mortero y se hacía pasar por un tamíz de 0,6 cm. de malla.

Agua procedente del mismo criadero era filtrada y, posteriormente, esterilizada en autoclave a 2 At., durante media hora.

Una vez realizadas las fases anteriores, la tierra era amasada, en un mortero grande, con solución de Heller, hasta adquirir una consistencia pastosa. La tierra, así preparada, se extendía en cajas Petri (20 cm.) en un espesor aproximado de 1 cm.. De un cultivo patrón, se cortaba un trozo de unos tres centímetros cuadrados del cultivo de alga, que se colocaba cuidadosamente sobre el barro con la ayuda de un portaobjetos y un pincel.

Una vez sembradas, las praderas se mantenían bajo luz ultravioleta a unos 75 cm. de distancia de dos lámparas convergentes (Phillips MLU300W, 220-240 V 57265F-28, Ultraviolet, Made in Holland). Estas siembras se regaban periódicamente, para evitar que se secaran, con agua del criadero natural, previamente esterilizada.

Cuando el alga *Oscillatoria sp.* cubría totalmente la superficie de las cajas Petri, éstas, humedecidas ligeramente con agua, se mantenían, hasta su uso, en nevera a 4°C. El tiempo requerido para su total crecimiento era una semana aproximadamente, a 23°C, en habitación termoregulada.

3.1.3.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE LIMNAEA EN LAS PRADERAS.

Se colocaban entre 15 y 50 *Limnaeas* por caja Petri, cambiándolas normalmente cuando adultas, cada tres días y lavándolas diariamente con agua de Santa Fé, con ayuda de un pincel, al objeto de retirar los restos de alga y mucus que llevan adheridos sobre la concha. Asimismo, con la ayuda de una pipeta, se retiraban los restos fecales de los moluscos.

Si existían masas de huevos, eran aisladas con pinzas blandas de Entomología, y colocadas en vasos de precipitado pequeños con agua del criadero natural, a 23°C, temperatura existente en la habitación termoregulada, los huevos eclosionaban en 14 días, pasándose los pequeños moluscos a las "praderas".

3.1.4.- PROCEDENCIA Y AISLAMIENTO DE HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Diariamente recibíamos en el laboratorio las vesículas biliares de los bóvidos sacrificados en el Matadero Municipal de Granada. Inmediatamente eran abiertas y vaciado su contenido en copas cónicas de un litro de capacidad. Transcurrida una hora, tomábamos una gota del sedimento con una pipeta Pasteur que, colocada en un pocillo de histología, de los llamados alemanes, era observada a la lupa binocular (40x), para determinar la presencia de huevos de *Fasciola hepática*. Las copas que

contenían huevos, se decantaban hasta la mitad, volviendo a llenarse con agua del grifo, repitiéndose la operación cada media hora hasta que el líquido estuviera totalmente transparente. Después de ello, el contenido de las copas se filtraba a través de una malla de 0,6 mm. para eliminar las masas de moco, muy frecuentes en las bilis de animales parasitados. Estas mucosidades se lavaban con agua del grifo a una cierta presión encima de una copa cónica para separar los huevos que permanecen adheridos a las mismas. Los huevos de *Fasciola hepática*, por su mayor densidad, caen al fondo de las copas y pueden recogerse, en casi su totalidad, en el depósito a la media hora.

Tras esta última operación, mediante sifonado con una goma, se vaciaba el sobrenadante, con cuidado, volviendo a llenar la copa con agua destilada estéril a un tercio de su capacidad. Media hora después, con una pipeta de 10 cc. insuflábamos aire para remover el sedimento y los huevos adheridos a las paredes, pasándose a continuación el contenido de las copas a frascos de penicilina o pequeños matraces, pintados de color negro y esterilizados. En ellos se conservaban los huevos, así obtenidos, a 4°C.

3.1.5.- INCUBACIÓN DE HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Cuando la planificación de las experiencias así lo acon

sejaba, los frascos conteniendo los huevos de *F. hepática*, se sacaban de la nevera y se cubrían con papel de aluminio agujereado (según la técnica empleada por GOMES, VALVERDE y col., 1973) (38), pasándose a una caja mantenida en una cámara termoregulada a 23°C y en completa oscuridad. En estas condiciones, cambiando diariamente el agua de los frascos para evitar agrupaciones y proporcionar al agua una cierta aireación (ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960)) se mantenían los huevos durante 12 días.

Pasado este tiempo, se observan los huevos al microscopio (100x) para ver la evolución y motilidad del miracidio. A pesar de mantener los huevos, a embrionados, una viabilidad de unos 100 días, según indican GOMEZ y col. (1973) (38), utilizábamos en nuestras experiencias, para mayor seguridad, solamente los huevos con un período de incubación no superior a 15 días.

3.1.6.- ACTIVACIÓN DEL MIRACIDIO Y ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Los frascos conteniendo los huevos de *F. hepática*, se agitaban y vaciaban sobre un cristalizador situado a unos 40 cm. de distancia de una lámpara de 60 W. Transcurrida media hora, se observaba a la lupa binocular (40x) para comprobar el número de huevos eclosionados. Si éste aun era bajo, se observaba al microscopio invertido para ver si, en los huevos

embrionados, el miracidio realizaba los movimientos que preceden a la eclosión, dejándolos bajo la luz durante una hora.

3.1.7.- RECUENTO DEL NÚMERO DE MIRACIDIOS LIBRES.

Cuando, una vez observado el cristalizador bajo la luz binocular, se observaba que, prácticamente, todos los huevos habían eclosionado, el contenido del cristalizador se vertía en una probeta de 100 cc., completando con agua destilada hasta una cantidad fija siempre superior a los 50 cc.

El contenido de la probeta se agitaba mediante un agitador manual, construido a tal fin, y que consiste en una varilla metálica provista, en uno de sus extremos, de un disco agujereado. Se tomaban tres muestras, una en la parte superior, otra en la media y otra en la inferior, de 0,5 cc. Estas muestras conteniendo los huevos y miracidios, se llevaban a seis vidrios de reloj, en los que, previamente, se habían colocado una gota de formalina al 10%. Los miracidios instantáneamente morían, contándose, bajo la lupa binocular, y calculándose la media, refiriéndose este dato al volumen total del líquido.

3.1.8.- INFESTACIÓN DE LIMNAEA TRUNCATULA CON MIRACIDIOS DE FASCIOLA HEPATICA.

Una vez conocido el número de miracidios libres, calculábamos el volumen que contenía 5 miracidios. Se agitaba la probeta con el agitador manual, y se tomaba el referido volumen, siendo llevado a frascos de 13 cc., en los que, previamente, se había colocado una *Limnaea*, previamente lavada, al objeto de retirar los restos de mucosidad y algas que normalmente llevan adheridas a su concha, y que, según nuestras observaciones, dificulta la infestación por inmovilización de los miracidios en estos restos de moco del molusco. El volumen en que van los miracidios, se vertía sobre el molusco, completándose el volumen hasta 7 cc., con solución "agua de fuente" estéril cuya composición se describe en el apéndice de soluciones. El conjunto de los frascos con las *Limnaea* se exponía a la luz natural de una ventana a temperatura inferior a la que normalmente se encuentra, siendo mantenidos así, por espacio de 5 ó 6 horas, tiempo suficiente para la penetración de todos los miracidios.

Transcurridas estas horas, las *limnaeas* se sacaban con la ayuda de unas pinzas de latón blandas de Entomología, transfiriéndose a una nueva pradera, en la que, en la tapa superior, se anotaba el día de la infestación y la fecha prevista para la emisión de cercarias.

3.1.9.- EMISIÓN DE CERCARIAS Y RECOGIDA DE LAS METACERCARIAS.

Cuando habian pasado seis semanas desde el día de la infestación por los primitivos miracidios que penetraron en el molusco, habian evolucionado hasta la fase de cercaria que iba a abandonar el caracol tras un estímulo de descenso de temperatura y presencia de agua saliendo por su orificio respiratorio. Este era el momento de recoger estas cercarias, que pasarían a metacercarias, fase infestante para el hospedador vertebrado y de la que partiamos para el cultivo.

Los caracoles, después de lavados, se introducían en frascos de 13 cc., llenándose, hasta la mitad, con solución "agua de fuente" estéril. Los moluscos, en estos frascos, se colocaban en un cristalizador al objeto de taparlos, para evitar su fuga, con una lámina de vidrio.

Cerca de una ventana, y a temperatura inferior a la normal, se mantenían por espacio de 24 horas.

Casi inmediatamente de introducirse los moluscos en solución "agua de fuente", se observaba la emisión de cercarias, agrupándose éstas cerca de la superficie del agua.

A las 24 horas de ser emitidas, las cercarias habían perdido la cola por movimientos violentos, fenómeno observable bajo la lupa binocular, y habian formado las tres capas con que se protegían, formándose las metacercarias enquistadas que se fijaban en la superficie del vidrio y a nivel del agua. A este tiempo, los caracoles se pasaban, de nuevo, a las "praderas" y,

los frascos, con las metacercarias adheridas, se almacenaban, llenos de agua destilada, en nevera a 4°C hasta el momento de su uso.

3.1.10.- PREPARACIÓN PREVIA DE LAS METACERCARIAS.

Los frascos conteniendo las metacercarias eran sacados de la nevera donde se mantenían a 4°C, contándose el número de ellas adheridas al vidrio a fin de seleccionar aquellas que se ajustaran, en cuanto a número, a la planificación de la experiencia.

Una vez seleccionadas, era vaciada el agua destilada que los llenaba y se procedía a separar las metacercarias enquistadas de las paredes del frasco con la ayuda de una espátula, lavando el frasco, dejando resbalar por las paredes agua destilada a fin de arrastrar al fondo las que ya habían sido despegadas. Las que aún permanecían adheridas eran de nuevo despegadas con la espátula.

El agua destilada, con las metacercarias en suspensión, era vaciada sobre un filtro Sartorius de 8 μ (SMII30I-8-47) instalado en un soporte de filtración Sartorius (SM I6307), donde se realizaba una filtración por presión negativa con la ayuda de una bomba Milipore (XX 60 220 50). Las metacercarias enquistadas quedaban en la superficie de filtro. El frasco contenedor

de 13 cc., era repetidas veces lavado a fin de arrastrar las metacercarias que aun quedasen, siendo posteriormente sumergido en agua en ebullición a fin de evitar la posible contaminación accidental al personal del laboratorio.

El filtro sobre el que estaban las metacercarias, era sacado del soporte de filtración y colocado en una caja Petri que se llevaba bajo la lupa binocular, donde se agrupaban.

3.1.11.- ESTERILIZACIÓN DE LAS METACERCARIAS.

A pesar de haberse empleado durante todo el proceso, material y soluciones estériles, era lógico pensar que los caracoles de donde provenían fuesen fuente de contaminación, ya que no eran cultivados axénicamente. Por tanto era necesario emplear un procedimiento de esterilización.

Las metacercarias enquistadas agrupadas, eran introducidas con el filtro en un frasco de plástico estéril marca Steriline, en el que había una solución de lejía comercial de hipoclorito sódico al 3,3%, (previamente filtrada con presión positiva, en filtro Sartorius, 0,45 μ - 25 mm ϕ , en soporte de filtración Sartorius SM I65I7). Con la ayuda de unas pinzas y espátula estériles eran separadas las metacercarias enquistadas del filtro de 8 μ , tapándose el frasco con un tapón a rosca y

centrifugando a 800 revoluciones por minuto, durante 10 minutos.

Transcurrido el tiempo de centrifugación, el sobrenadante era desechado por pipeteo con pipeta Pasteur estéril y rellenado de nuevo el frasco con solución de lejía comercial al 3,3% (según técnica modificada de GUEVARA-POZO, (1953) (40)). Manteniéndose las metacercarias enquistadas en esta solución por espacio de 1/2 hora en agitador circular a la temperatura del laboratorio con una velocidad de 18 revoluciones por minuto, al objeto de realizar un mejor lavado.

Tras este tiempo, el frasco era sacado del agitador y mantenido en reposo por espacio de unos quince minutos, tiempo en que la totalidad de las metacercarias habían sedimentado, siendo decantado el sobrenadante con una pipeta estéril.

Las metacercarias enquistadas eran lavadas tres veces en agua destilada estéril al objeto de retirar el exceso de hipoclorito, arrojando el agua de lavado con cierta fuerza para provocar una agitación con la ayuda de una jeringa estéril, dejando sedimentar las metacercarias enquistadas 15 minutos en reposo, retirando por pipeteo el agua y repitiendo este proceso tres veces. Eliminado el exceso de hipoclorito se procedía a lavar las metacercarias enquistadas con solución BBS lavadora, en la que previamente habíamos disuelto tetraciclina, 0,005733 g./ml. y micostatin, 1000 U.I./ml. La solución con antibióticos era asimismo esterilizada por filtración con presión negativa, a través de filtro Sartorius 0,45 μ (SMIII06-0,45), montado en soporte de filtración Sartorius (SM I6307).

Mediante pipeta Pasteur estéril, se procedía a agregar la anterior solución al frasco donde estaban las metacercarias enquistadas, manteniéndose esta primera solución en contacto con ellas durante 15 minutos, procediéndose al vaciado y nuevo lavado con solución BBS lavadora más tetraciclina y micostatin en las concentraciones antes señaladas. Aquí eran mantenidas durante 2 horas a la temperatura del laboratorio y agitación de 18 revoluciones por minuto.

Tras este lavado, se dejaba sedimentar, y nuevamente era decantado con pipeta Pasteur estéril y lavado durante 20 minutos cada vez (tres veces), con solución BBS lavadora estéril, al objeto de arrastrar los antibióticos tetraciclina y micostatin. Procediéndose posteriormente al desenquistamiento experimental *in vitro*.

3.1.12.- DESENQUISTAMIENTO.

En nuestras experiencias hemos probado las dos técnicas fundamentales para la liberación de las adoleoscarias. Como ya indicábamos anteriormente, las más interesantes son por orden cronológico, la digestión de Wikerhauser (1960) (155) y la de Dixon, (1964) (26).

La primera técnica la modificamos según nuestra experiencia

cia, empleando las mismas concentraciones enzimáticas y tiempos que en la digestión de protoescolices de *Echinococcus granulosus* utiliza J.D.SMYTH (comunicación personal (118)).

a.) Técnica de Digestión.

Las metacercarias enquistadas, una vez lavadas en las soluciones desinfectantes, eran centrifugadas, al objeto de agruparlas, a 500 revoluciones por minuto durante 10 minutos. La última solución era retirada mediante pipeteo en el interior de la cámara estéril de flujo laminar. A continuación se le agregaba una solución de pepsina (1:10.000 merck), al 0,5% a pH 1,7 ajustado con ClH 0,1N, previamente calentada a 38°C y esterilizada por filtración; en esta solución y con agitación constante de 90 impulsos por minuto en agitador Koterman, colocado en el interior de una estufa de cultivo Hermi termoregulada a 38°C, eran mantenidas durante 20 minutos.

Transcurrido este tiempo eran sacadas de la estufa y retirada la solución enzimática. Después de dejarlas sedimentar brevemente y, reemplazada aquella por solución de Hank estéril calentada a 38°C, esta solución se mantenía con las metacercarias enquistadas durante 10 minutos al objeto de arrastrar el exceso de pepsina y ácido. Esta operación se repetía tres veces.

Tras el último lavado en solución de Hank, se le añadía una solución enzimática compuesta de: pancreatina (BDH) 0,3%, taurocolato sódico (BDH) 0,01% y tripsina (BDH 0,5 Anso/

gr.) 0,15%, disueltas en solución BBS lavadora ajustada a un pH de 7,2 y previamente calentada a 38°C.

Asimismo, se empleó otro tipo de solución en la que el taurocolato sódico se sustituía por un 0,05% de bilis de vaca. En estas soluciones se mantenía por espacio de 18 a 20 horas.

Transcurrido este tiempo y tras observación al microscopio invertido al objeto de ver el número de adoleoscarias libres, eran transferidas mediante una pipeta Pasteur estéril a una caja Petri también estéril, colocada en la cámara de flujo laminar, donde se había situado una lupa binocular, Nikon (45183) a la que se le habían lavado las superficies con alcohol de 70°.

El producto resultante de la digestión era observado a 40x, transfiriéndose las metacercarias libres, con una pipeta Pasteur, a los frascos Carrel (Pobel 13-3x1 cm.) para un posterior cultivo.

b.) Técnica de desenquistamiento según Dixon.

Aunque los resultados obtenidos por la técnica anterior eran buenos, (un 80% de metacercarias libres, como más tarde veremos), la técnica que casi desde el principio hemos empleado por su rapidéz, facilidad de manejo y efectividad, ha sido la técnica de Dixon, adaptada por nosotros.

Las metacercarias enquistadas, tras el último lavado en

soluciones desinfectantes, eran centrifugadas en los mismos frascos "Steriline" con tapón a rosca a 500 revoluciones por minuto, durante 10 minutos, ya agrupadas se transferían éstas, mediante pipeta Pasteur, con la menor cantidad de líquido posible, a un frasco Sorvivel 25, en el que previamente se habían colocado de 4 a 6 capas de gasa entrecruzada a modo de embudo (todo ello esterilizado en autoclave), y en el que antes de colocar las metacercarias se había colocado solución activadora (25,2 gr. de CO_3HNa y 0,468 de cisteína en 100 cc. de agua bidestilada), gaseada activamente con mezcla de CO_2 al 10% y N_2 90% y calentado a 39°C .

Una vez colocadas las metacercarias en el fondo del embudo formado con las gasas, era de nuevo gaseado con la misma mezcla, y cerrado el frasco, incubándose durante 35 minutos a 39°C en baño de maría, marca selecta, con agitación forzada.

Después del anterior proceso, las metacercarias enquistadas eran de nuevo gaseadas durante 5 minutos en la cámara de flujo laminar con mezcla de CO_2 10%, N_2 90%, se dejaba sedimentar unos minutos, y, mediante pipeta Pasteur, se sustituía la solución activadora por solución desenquistante, compuesta ésta última de solución de Hank y bilis de vaca al 10%. Se gaseaba de nuevo con CO_2 10% y N_2 90% y se incubaba durante 18 ó 20 horas en baño de maría a 39°C , tiempo en que las metacercarias salidas del quiste penetraban a través de las capas de gasa, por sus activos movimientos, cayendo al fondo del frasco, de donde eran recogidas para su posterior cultivo.

c.)

Otra modificación de la técnica de Dixon consistió en un tubo de ensayo estéril de 15 cc. que tenía una abertura cónica en la parte inferior. La boca del tubo era cerrada con tapón de goma reversible, y en la parte inferior se le acoplaba, mediante tubo de silicona, un tubito de ensayo de 0,5 cc. de capacidad, preparado al efecto.

En el interior del tubo de 15 cc. se introducía el embudo de gasas, antes descrito, donde se colocaban las metacercarias enquistadas y donde se realizaba el tratamiento descrito anteriormente.

En la parte superior del tubito se colocaba una pequeña capa de suero equino y heparina sódica (BDH) (Mucous 20.000 unidades/mg.), (5:1) coagulado a 80°C, 1/2 hora y batido con espátula estéril dándole así una consistencia mucosa, llenándose el resto con solución de carboximetil celulosa al 4% en solución BSS (según técnica modificada de GONZALEZ CASTRO y col. (139)), mezcla (1:1) con suero equino (3:1), extracto de embrión bovino (Difco). En el fondo del tubo se colocaban glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever. A las 24 horas la mayoría de las metacercarias desenquistadas (libres) se recogían en el fondo junto con los glóbulos rojos, tomándose con pipeta y pasándose a los diferentes medios.

METACERCARIA DE F. HEPATICA



DESENQUISTAMIENTO Y SEPARACION DE
METACERCARIAS. METODO DE DIXON MODIFICADO

3.1.13.- MEDIOS DE CULTIVO.

Los componentes de los medios de cultivo que hemos empleado los podemos dividir en dos grandes grupos: oliguidicos y me
ridicos.

a.) TOTALMENTE INDEFINIDOS (OLIGUIDICOS)

1. Suero equino (SE) procedente de la casa Llorente. El suero era adquirido en frascos de 100 ml., siendo inmediatamente inactivado a 56°C, 30 minutos en baño de María, marca Se
Selecta.

Una vez inactivado, era filtrado a través del filtro Sartorius 0,45 μ mediante presión positiva, almacenándose en ampollas de vidrio estériles cerradas al fuego. En cada ampolla se almacenaban 5 ml. que se mantenían en nevera a -25°C, para luego descongelar sólo la cantidad necesaria y evitar así la congelación y descongelación repetidas con la pérdida de actividad y desnaturalización posibles de los componentes del suero.

2. Suero bovino fetal (SBF) (Gibco) en frasco de 20 ml. liofilizado era mantenido en nevera a 4°C hasta su rehidratación. Para ello, tras lavar previamente con alcohol de 70° el tapón de goma del frasco, eran inyectados 20 ml. de agua bidestilada estéril en cada frasco; completada la rehidratación se inactivaba a 56°C durante 30 minutos en baño de María marca Se
lecta. Se filtraba con presión positiva a través del filtro

Sartorius de 0,45 μ y almacenaba en ampollas como anteriormente detallamos.

3. Extracto de placenta humana.

Placentas procedentes de partos normales, eran recogidas en el Hospital Clínico San Cecilio, Universidad de Granada. Se seleccionaban exclusivamente las procedentes de partos en que nacían varones. Asimismo, antes de ser llevadas al laboratorio, en el mismo paritorio, eran desechadas aquellas que pudieran estar contaminadas de Meconio, excepto en determinados casos que luego se indican en Resultados, teniéndose también en cuenta el historial clínico de la madre y las incidencias del parto.

Transportadas rápidamente en bolsas de plástico, se procedía inmediatamente a pesarlas y trocearlas al objeto de preparar un extracto de las mismas a un 50% P/V según técnica de Weinstein y Jones (1956) (153), para extracto de embrión de pollo.

Los trozos de placenta son triturados en frío en homogeneizador CEKA, a unas 2.000 revoluciones por minuto durante un minuto, con solución de Hank estéril mantenida a 4°C. Una vez triturados eran transferidos a un matraz Elermeyer estéril de un litro de capacidad y tapón rosca, bajo el cual se había colocado un cristallizador con hielo picado a fin de que el homogeneizado no se calentase mientras duraba todo el proceso.

Una vez homogenizada la totalidad de la placenta, ésta era almacenada a 4°C en nevera durante toda la noche, siendo a la mañana siguiente centrifugada a 1.000 g. durante 20 minutos

Sartorius de 0,45 μ y almacenaba en ampollas como anteriormente detallamos.

3. Extracto de placenta humana.

Placentas procedentes de partos normales, eran recogidas en el Hospital Clínico San Cecilio, Universidad de Granada. Se seleccionaban exclusivamente las procedentes de partos en que nacían varones. Asimismo, antes de ser llevadas al laboratorio, en el mismo paritorio, eran desechadas aquellas que pudieran estar contaminadas de Meconio, excepto en determinados casos que luego se indican en Resultados, teniéndose también en cuenta el historial clínico de la madre y las incidencias del parto.

Transportadas rápidamente en bolsas de plástico, se procedía inmediatamente a pesarlas y trocearlas al objeto de preparar un extracto de las mismas a un 50% P/V según técnica de Weinstein y Jones (1956) (153), para extracto de embrión de pollo.

Los trozos de placenta son triturados en frío en homogeneizador CEKA, a unas 2.000 revoluciones por minuto durante un minuto, con solución de Hank estéril mantenida a 4°C. Una vez triturados eran transferidos a un matraz Elermeyer estéril de un litro de capacidad y tapón rosca, bajo el cual se había colocado un cristallizador con hielo picado a fin de que el homogeneizado no se calentase mientras duraba todo el proceso.

Una vez homogenizada la totalidad de la placenta, ésta era almacenada a 4°C en nevera durante toda la noche, siendo a la mañana siguiente centrifugada a 1.000 g. durante 20 minutos

a 0°C en centrífuga refrigerada Jouan Paris K63 F. Recogido el sobrenadante, era inmediatamente filtrado a través de dos capas de papel de filtro y ultrafiltrado en torre de filtración empezando por un prefiltro preparatorio: $8\mu-3\mu-1,2\mu-0,45\mu-0,22\mu$, filtros Sartorius separados entre sí por separadores de nylon al objeto de facilitar la filtración. Una vez ultrafiltrado, se procedía a la preparación definitiva del medio en el interior de la cámara de flujo laminar.

4. Medio con extracto de placenta humana.

Suero Bovino Fetal (SBF) estéril... 100 cc.
Extracto de Placenta (EPH) 50 cc.

El conjunto era agitado durante unos minutos en un agitador magnético G-INVESTER, en el interior de un matrás estéril con tapón a rosca (Sorvivel 3) de 250 cc. con agitación magnética. Tras unos minutos de agitación se dejaba en la nevera a 4°C hasta que la espuma producida por la agitación había desaparecido.

El producto obtenido se introducía en ampollas de vidrio mediante una jeringa, siendo luego cerradas a fuego (todo ello en condiciones estériles), y almacenadas a -25°C hasta su uso.

El resto del extracto placentario (EPH) era almacenado a -25°C en frascos de 150 cc. de capacidad, estériles, cerrados con tapón de caucho y cápsulas de aluminio para tapones de goma perforables, y almacenados hasta su uso.

En una ocasión se preparó el antes citado medio, pero con la placenta contaminada por meconio. Las consecuencias de ello se expondrán más adelante.

5. Extracto de hígado.

El extracto de hígado (EH -50) se obtenía a partir de hígados de ratón o de feto de cabra, de igual forma a la anteriormente descrita para las placentas humanas. Se almacenaba, asimismo, tras la filtración en ampollas de vidrio cerrado a fuego y congelaba a -25°C hasta su uso.

6. Extracto de Embrión Bovino.

El extracto de Embrión Bovino (EEB 100) procedía de la casa Difco en frascos liofilizados. Para su rehidratación y preparación se siguieron los consejos dados por la casa comercial.

7. Plasma de Bovino.

El Plasma de Bovino (PB), fué adquirido liofilizado de la casa Difco siguiéndose asimismo, las indicaciones dadas por la casa para su rehidratación y preparación.

b.) PARCIALMENTE DEFINIDOS (MERIDICOS)

MPH 1

Fase líquida.

TC 858 (Difco)	100 ml.
Plasma bovino (Difco)	40 ml.
Suero Equino (Llorente)	25 ml.

Aminoácidos mínimos

Medio Eagle	1 ml.
-------------------	-------

Vitaminas mínimas.

Medio Eagle	1 ml.
Extracto levadura (Difco) 5%	1 ml.

En ocasiones se suplementa con sangre humana procedente de donadores del laboratorio.

Fases sólidas.

Agar no nutritivo/Plasma bovino ...	5%
Agar Panmede (Paynes & Birne)	2%
Agar hígado de buey	2%.

HFH 2

Fase líquida.

EEB Difco	10 ml.
Suero humano	40 ml.
Glóbulos rojos humanos	10 ml.

NCTC 135 (Gibco)	100	
Extracto Levadura 5% (Difco)	2	40 ml.
Glucosa 30%	1	

Fase sólida.

Agar - Sangre	5%.
---------------------	-----

MFH 3

Fase líquida

TC 858 (Difco)	100 ml.
Extracto de hígado Fetal 50 de ca- bra en solución de Hank ;	5 ml.
Suero Equino (Llorente)	10 ml.
Vitaminas y aminoácidos esenciales	1 ml.
Medio Eagle	1 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.
Glutamina 200 mM	0,1 ml.

Fase sólida.

Agar - Sangre

MFH 4

TC 199 (Gibco)	100 ml.
Suero Equino (Llorente)	10 ml.
Glucosa 30%	1 ml.
Bilis de vaca	1 ml.

Vitaminas esenciales:

Medio Eagle	0,1 ml.
Medio más glóbulos rojos humanos ..	5%.

MFH 5

TC 199 (Gibco)	60 ml.
Extracto de hígado de ratón en Sol. Hank	10 ml.
Suero Equino (Llorente)	30 ml.
Glucosa 30%	1 ml.
Bilis de vaca	1 ml.

MFH 6

NCTC 135 (Gibco)	50 ml.
Suero Bovino Fetal SBF (Gibco)	40 ml.
Glucosa 30%	1 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco)	1 ml.
Extracto hígado ratón en Sol. Hank	10 ml.
Bilis de vaca	1 ml.

MFH 7

NCTC 135 (Gibco)	1000 ml.
Vitamina B ₁	0,002 gr.
Vitamina B ₂	0,0027 gr.

Acido Nicotínico	0,160 gr.
Vitamina B ₆	0,009 gr.
Biotina	0,001 gr.
Acido Ascórbico	0,260 gr.
Pantotenato Ca	0,006 gr.
Colesterol	0,260 gr.
Acido Retinoico	0,006 gr.
L. Tocoferol	0,001 gr.
Albúmina bovina	0,05 gr.
Glucosa	1,9 gr.
Glucógeno	1,6 gr.
SE (Llorente)	150 ml.
Extracto placenta humana 50%	150 ml.
Bilis bovina	10 ml.
Etanol	2 ml. (como agente solubilizante).

El medio NCTC 135 fue modificado de acuerdo con los valores medios de vitaminas existentes en hígado según las Tablas Geygi. Las vitaminas hidrosolubles fueron disueltas en 200 cc. del agua empleada en disolver el medio liofilizado.

Las vitaminas liposolubles y el colesterol se disolvieron en alcohol y el colesterol y L. tocoferol se suspendieron con las bilis y 10 cc. de medio mediante equipo de ultrasonidos (MSE-30155) con baño de hielo picado.

Este medio fue suplementado con glóbulos rojos de carne-ro lavados en solución Alsever (Llorente).

MFH 8

NCTC 135 (Gibco) modificado según hemos expuesto anteriormente como solubilizante de L. Tocoferol y Acetato de Retinol 0,2 ml. de Etanol 100 ml.

Glucógeno (BDH) 1 gr.

Suero Equino 25 ml.

EPH 5 ml.

Asimismo fue suplementado con glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alserver (Llorente) 0,05 ml./ml.

MFH 9

Medio MFH 8 + Glucosa 1 por mil.

MFH 10

NCTC 135 (Gibco) modificado, según hemos expuesto anteriormente ... 100 ml.

Glucógeno (BDH) 1,6 gr.

SE (Llorente) 30 ml.

EEB (100) (Difco) 5 ml.

Suplemento con glóbulos rojos (Llorente) 0,05 ml./ml.

MFH 11

NCT (modificado)	100 ml.
Glucógeno (BDH)	1 gr.
SE (Llorente)	30 ml.
EEB x 100 (Difco)	5 ml.
Glóbulos rojos de carnero	0,05 ml./ml.

MFH 12

NCTC 135 (Gibco) modificado	100 ml.
SBF (Gibco)	20 ml.
Eph 50	10 ml.
Glucógeno (BDH)	1 ml.
Glóbulos rojos	0,05 ml./ml.

MFH 13

NCTC 135	100 ml.	} 4 partes.
SBF	30 ml.	
Glucosa 30%	1 ml.	
SBF	20 ml.	} 6 partes.
Eph	10 ml.	
Glóbulos rojos de carnero (Llorente)	0,05 ml./ml.	

3.1.14.- INCUBACIÓN, CAMBIOS DE MEDIO DE CULTIVO Y OBSERVACIÓN DE CRECIMIENTO.

En los frascos Carrel, una vez sembradas las fasciolas en el medio de cultivo, era anotado con lápiz graso el número del protocolo de la experiencia y metacercarias de fasciola colocadas, éstas eran de 20 a 40 por cada frasco (estos datos eran anotados, asimismo, en impresos al efecto). Siendo, seguidamente, gaseados con la ayuda de pipeta Pasteur estéril, con la mezcla antes citada de CO₂ 10%, O₂ 5% y N₂ 85% (SEO. S.A.) y cerrados los frascos con un tapón a rosca e incubados en estufa Hermi termoregulada a 38°C sin agitación.

Los frascos eran observados cada 24 horas en microscopio invertido NIKON y medidos con micrómetro ocular, previamente calibrado, siempre que la transparencia o movilidad lo permitiesen. Para lo cual se tomaban, mientras los ejemplares estaban en reposo, tres medidas: la longitud total y la que existía entre ventosa bucal y ventosa ventral y ventosa ventral-poro excretor, al objeto de calcular el índice de relación existente entre la longitud ventosa ventral-poro excretor y ventosa bucal-ventosa ventral.

El número de fasciolas medidas en cada caso fue de 10 ejemplares tomados al azar calculándose y anotándose en el protocolo la media de dichos ejemplares.

El cambio de medio se realizaba cada tres días, para

lo cual eran tomados los frascos y con sumo cuidado, a fin de no agitar los glóbulos rojos que quedaban sedimentados en la base, eran colocados en el interior de la cámara de flujo laminar, donde asimismo, se colocaba una lupa binocular NIKON. Con la ayuda de ésta y una jeringa de plástico estéril Sterline de 10 cc. se tomaba el medio, guardándose para una posterior observación por si algún ejemplar, debido a las turbulencias, había sido arrastrado.

Los ejemplares que, por error, eran arrastrados de los medios de cultivo, eran fijados en formol al 10% y teñidos con Carmín Borácico para su estudio microscópico, anotándose, asimismo, en el protocolo(en alguna ocasión se empleo la orceina acética), el número, tamaño y desarrollo.

Reemplazándose acto seguido con la ayuda de una pipeta Pasteur la misma cantidad de medio previamente calentado a 38°C.

Los glóbulos rojos eran sacados de la nevera a 4°C donde se almacenaban, y, una vez lavado con alcohol de 70°C el tapón de goma del frasco, era sacada la cantidad necesaria, tras agitación, con jeringa de plástico estéril Sterline de 1 cc., añadiéndose seguidamente al frasco Carrel, gaseándose de nuevo con la mezcla antes citada, cerrándose el frasco e incubándose de nuevo.

FACTORES QUE AFECTAN LA PRESERVACION DE TISTICERCUS TENUICOLIS

3.2.- TAENIA HYDATIGENA.

3.2.1.- FACTORES QUE AFECTAN LA DESENVAGINACIÓN *IN VITRO* DE *CISTICERCUS TENUICOLLIS*.

3.2.1.1.- PROCEDENCIA.

Los cisticercos eran recogidos en el Matadero Municipal de Granada, procedentes de la cavidad abdominal de ovinos y caprinos, sacrificados para el consumo cárnico. Recogidos conjuntamente y/o separadamente, según las experiencias, en bolsas de plástico. Anotándose datos de interés, tales como localidad de procedencia, zonas de pastoreo, presencia de perros en la zona, edad, sexo, etc. de los hospedadores. Datos que, en su día, serán recogidos para posteriores investigaciones epidemiológicas.

Los cisticercos, una vez almacenados en sus bolsas de plástico, eran transportados al laboratorio, a la temperatura ambiente, transcurriendo, desde su obtención hasta la llegada al mismo, de media a una hora como máximo.

El material, una vez en el laboratorio, era sacado inmediatamente y almacenado en cristalizadores mantenidos a 4°C.

3.2.1.1.- DESINFECCIÓN DE LOS CISTICERCOS.

Los cisticercos, una vez almacenados en nevera a 4°C., se mantenían por el espacio de dos horas, tras lo cual eran sacados de los cristalizadores y tomados, con unas pinzas, uno a uno. Eran sumergidos y agitados, repetidas veces, en una solución (1:5000) de Armil (solución concentrada 10 gr. de cloruro de benzaolconio/100 cc. vehículo acuoso), en solución salina estéril (8,3 0/00) durante 45 segundos, tras lo cual eran depositados en un cristalizador estéril.

Una vez lavados todos los cisticercos con la solución anterior, eran, de nuevo, lavados en alcohol de 70° por el mismo procedimiento durante dos minutos, siendo transferidos a un nuevo cristalizador estéril.

Todas estas operaciones, junto con la disección, se realizaban en el interior de la cámara estéril de flujo laminar.

3.2.1.3. DISECCIÓN DE LOS CISTICERCOS.

Una vez los cisticercos lavados en las dos soluciones, eran tomados y suspendidos, con unas pinzas estériles, por la membrana periquística. Con la ayuda de unas tijeras estériles,

era cortada la membrana periquística, y con unas pinzas curvas, introducidas por la abertura, era tomada la vesícula del cisticerco y sacada a través de ella, cortándose inmediatamente al objeto de hacer salir el líquido que contenía, siendo separado el cisticerco e introducido en solución de Hank estéril (calentada a 38°C) al objeto de lavarlo de los posibles restos de líquido que arrastrase.

3.2.1.4.- TRATAMIENTO PARA DESENVAGINACIÓN.

Los cisticercos eran sometidos a la acción de diferentes soluciones, según la experiencia de que se tratase, indicándose en cada una de ellas.

3.2.1.5.- DIGESTIÓN PÉPSICA.

Los cisticercos, una vez lavados en solución de Hank estéril, eran pasados, mediante pipeta Pasteur estéril, a un frasco Esterline con solución de Pepsina Merck (1:10.000) al 0,5% en solución de Hank y ClH a un pH de 1,7 (también calen-

tada previamente a 38°C). Una vez los cisticercos en esta solución, el frasco era cerrado con un tapón a rosca e incubado con agitación (agitador Kottérman), durante una hora y 10 minutos a 38°C y 90 impulsos/minuto.

Cada 30 minutos los frascos eran sacados y agitados bruscamente con la mano.

3.2.1.6.- SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

Transcurridos los 30 minutos la solución aparecía turbia y los cisticercos libres de cualquier resto de membranas, siendo nuevamente pasados, mediante pipeta estéril, a solución de Hank (previamente calentada a 38°C), donde se mantenían algunos minutos. Esta operación se repetía tres veces al objeto de eliminar los posibles restos de ácido y pepsina.

Después eran pasados a 15 cc. de la solución desenvaginante almacenada en frasco Sterline y compuesta de:

Bilis vesicular de perro inactivada a 56°C durante 30 minutos	0,05 ml.
Tripsina BDH (0,5 Anson/gr.)	0,15 gr.
Pancreatina BDH	0,3 gr.

en 100 cc. de solución BSS lavadora, ajustada a los diferentes

valores de pH con ClH 0,1 N y con NaOH 0,1 N y esterilizado mediante filtración a través de filtro 0,45 μ Sartorius (11 116-25) en soporte de filtración (16517) mediante presión positiva.

Los diferentes valores de pH estudiados han sido:

pH 3 pH 5 pH 6 pH 7,2

Se emplearon también otras disoluciones desenvaginantés que en cada caso particular se expondrán.

3.2.1.7.- TEMPERATURA DE ALMACENAJE.

Los cisticercos, una vez llegados al laboratorio, eran almacenados, durante dos horas, a diferentes temperaturas.

- 25°C. En arcon congelador K.AC. 250 Kelvinator. Transcurridas las dos horas, se dejaba descongelar lentamente a temperatura del laboratorio. En otra experiencia se descongelaron instantáneamente sumergiéndolos en solución salina 8,3 por mil calentada a 38°C.
- 10°C. Se colocaban en congelador de nevera Corbero FD 400 previamente calibrada a esta temperatura \pm 2°C. Asimismo se descongelaron lenta y rápidamente por idénticos procedimientos a los anteriormente descritos.

- 0°C. Se introducían dentro de un vaso de precipitado entre hielo en fusión.
- 4°C. En nevera Corberó FD 400 A. \pm 1°C
- 22°C. En habitación termorregulada \pm 3°C.
- 40°C. Se colocaban en un matríz con tapón a rosca Pobel con solución salina calentada a esta temperatura e introduciendo en baño de María Selecta a esta temperatura. Se realizaba así al objeto de evitar la desecación.
- 53°C. Se empleó el mismo sistema descrito anteriormente.

Una vez almacenados los cisticercos a las temperaturas dichas, en cada caso, se procedió a la digestión descrita para la experiencia anterior, ajustando la solución desenvaginante a pH 7,2.

En todos los casos, junto con los cisticercos, se introdujo un Termómetro "Din" de máxima y mínima, para controlar los límites extremos de la temperatura a la que los cisticercos estaban sometidos.

3.2.1.8.- TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A 4°C.

Los cisticercos fueron almacenados a 4°C en nevera, durante los tiempos siguientes: 2 horas, 1 día, 7 días, y un límite máximo de 15 días.

3.2.1.9.- TENSION DE O₂ DISUELTO EN LA SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

6'1 PPM.- Los cisticercos, tras la digestión péptica y lavados en solución Hank, fueron colocados en solución desenvaginate a pH 7,2, calentada a 38°C, en la que se hizo burbujear aire estéril mediante una pipeta Pasteur estéril. El aire procedía de una bomba Siroco, haciéndole burbujear en agua tridestilada estéril y de aquí ya se pasaba a través del algodón graso que cerraba la pipeta Pasteur.

Se hizo burbujear aire por espacio de 20 minutos, tomándose una muestra de la solución (17 ml.), midiéndose en un oxímetro YSI (modelo 57) dando un valor de 6,1 partes por millón (P.P.M.).

3 PPM.- Se preparó para ello un frasco de boca ancha y cierre hermético en cuyo interior se había colocado un frasco pequeño abierto de 13 ml. En este último, se colocaba la

solución desenvaginante pH 7,2 y en el frasco exterior 25ml de Solución de Pirogalato sódico. La solución desenvaginante se colocó junto a la de Pirogalato sódico por espacio de una hora antes de colocar los cisticercos para la desenvaginación. Una experiencia en blanco anterior nos mostró en el Oxímetro una concentración de O_2 de 3 PPM. A pesar de este dato, en el momento de introducir los cisticercos tomamos una muestra del líquido dándonos una tensión de O_2 de 2,9-3 PPM.

0,2 PPM.- Dejamos la solución desenvaginante junto a la de Pirogalato durante 24 horas a $38^\circ C$ y agitación constante de 90 impulsos por minuto en un agitador Kotterman. La tensión de O_2 , al cabo de este tiempo era de 0,2PPM.

3.2.1.10.- PRUEBAS DE DESENVAGINACIÓN CON DIFERENTES SOLUCIONES TRAS EL TRATAMIENTO PÉPSICO PREVIO.

Tras el tratamiento pépsico y posteriores lavados en solución de Hank, los cisticercos se pasaron a diferentes soluciones:

Solución A)

Solución de Hank.

Solución B)

Pancreatina (BDH)	0,3 gr.
Solución Hank.	100 ml.

Solución C)

Tripsina (BDH 0,5 Anson/gr.)	0,15 gr.
Solución BSS(Lavadora)	100 ml.

Solución D)

Bilis canina inactivada	0,05 ml.
Solución Hank	100 ml.

Solución E)

Tripsina (BDH 0,5 Anson/gr.)	0,15 gr.
Pancreatina (BDH)	0,3 gr.
Solución BSS(Lavadora)	100 ml.

Solución F)

Pancreatina (BDH)	0,3 gr.
Bilis canina inactivada	0,05 ml.
Solución BSS (Lavadora)	100 ml.

Solución G)

Tripsina (BDH, 0,5 Anson/gr.) ...	0,15 gr.
Bilis canina inactivada	0,05 ml.
Solución BSS (Lavadora)	100 ml.

Solución H)

Tripsina (BDH, 0,5 Anson/gr.) ...	0,15 gr.
Pancreatina (BDH)	0,3 gr.
Bilis canina inactivada	0,05 ml.
Solución BSS(Lavadora)	100 ml.

3.2.1.11.- PRUEBAS DE DESENVAGINACIÓN CON DIFERENTES SOLUCIONES SIN TRATAMIENTO PÉPSICO PREVIO.

Los cisticercos una vez lavados tras la disección, fueron introducidos en diferentes soluciones, ajustadas todas a pH 7,2.

Las soluciones empleadas, fueron las mismas de la experiencia anterior.

3.2.1.12.- NÚMERO DE CISTICERCOS EMPLEADOS EN CADA EXPERIENCIA.

Para cada experiencia de las aquí planteadas se partió de un número mínimo de doce cisticercos.

Se tomó este número por ser el máximo que normalmente enviaban al laboratorio y evitar así su almacenamiento de unos días para otros, con diferentes tiempos de almacenamiento.

Asimismo, se colocaron de tres a cuatro cisticercos por frasco durante el tratamiento con la solución desenvaginante.

Cada experiencia se repitió tres veces.

Todas las soluciones empleadas fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Sartorius de $0,45\mu$.

3.2.2.- SOBRE CULTIVO IN VITRO DE TAENIA HYDATIGENA.

3.2.2.1.- PROCEDENCIA.

Los cisticercos eran recogidos en el Matadero Municipal de Granada, procedente de la cavidad peritoneal de caprinos y ovinos sacrificados para el consumo cárnico.

Recogidos conjunta y separadamente, según las experiencias, en bolsas de plástico, anotándose el sexo y especie de que procedían.

Los cisticercos eran transportados al laboratorio, a la temperatura ambiente, transcurriendo, desde su obtención hasta la llegada al mismo, de media a una hora como máximo.

El material parasitario, una vez en el laboratorio, era sacado de las bolsas de plástico y almacenado en cristalizadores a 4°C, durante un tiempo variable, siendo de dos horas el mínimo de almacenaje.

3.2.2.2.- DESINFECCIÓN.

Los cisticercos, una vez almacenados en nevera, se procedía a su desinfección, para lo cual eran tomados con pinzas estériles y sumergidos, uno a uno, en una solución de Armil 1:5000 (solución concentrada = 10 gr. de cloruro de Benzalco-nio/100 cc. excipiente acuoso) diluida en solución salina 8,3%.

durante 45 segundos.

Una vez lavados en la anterior solución, los cisticercos, siempre dentro de la cámara estéril del flujo laminar, eran colocados en cristizador estéril, tras lo cual se procedía al segundo lavado en alcohol de 70°, para lo cual eran sumergido en el mismo durante dos minutos, tomados con pinzas estériles y colocados en nuevo cristizador estéril.

3.2.2.3.- DISECCIÓN.

Los cisticercos, una vez lavados en las dos soluciones, eran tomados y suspendidos, con pinzas estériles, por la membrana periquística, procediéndose, mediante tijeras estériles, a cortarla por la parte superior, e introduciendo por la abertura creada unas pinzas curvas estériles se sacaba la vesícula del cisticerco. Esta era suspendida y cortada de nuevo, con tijeras estériles, al objeto de vaciarla del líquido que contiene. Separando, posteriormente, las membranas del cisticerco propiamente dicho. Colocándose éste en un frasco Sterline de 30 cc. con solución de Hank estéril a pH 7,2 y, previamente, calentada a 38,9°C, al objeto de lavarlo de los posibles restos de líquido del cisticerco que pudiera arrastrar.

Foto n°1.- Lavado de los cisticercos.

Foto n°2.- Corte de la membrana periquística del cisticerco.

Foto n°3. Extracción del cisticerco, contenido en
la membrana periquística.

Foto n°4. Cisticerco con vesícula aislada.

EXAMEN TOPOGRÁFICO

Foto n°5. Cisticerco con su vesícula vaciada de líquido, color

Foto n°6. Separación de las membranas de la vesícula del cis
ticerco.

3.2.2.4.- TRATAMIENTO.

a.) Digestión péptica.

Hemos probado, en nuestras experiencias, diferentes concentraciones de pepsina Merck (1:10.000), 0,1%; 1%; y 0,5%, disuelta en solución de Hank y ajustada a pH 1,5 - 1,7 - 1,9, con tiempos de tratamiento que variaban de 30 minutos a una hora 10 minutos.

Tras el lavado en solución de Hank, los cisticercos eran transferidos, mediante pipeta Pasteur estéril, a la solución de Pepsina, previamente calentada a 38,9°C, en el interior de un frasco Steriline y colocado éste, el tiempo que durase la programación de la experiencia, en el interior de una estufa Hermi, con un agitador horizontal Kottermann, a 90 impulsos por minuto y termorregulada a 38,9°C.

Cada 30 minutos era agitado el frasco activamente con la mano, al objeto de disolver los restos de membrana ya digeridos.

En algunas experiencias se ha realizado la digestión péptica tras el tratamiento del cisticerco y sus membranas en batidora comercial Turmix, durante 20 segundos. Realizándose ésta en la propia solución péptica.

b.) Lavado.

Transcurrido el tiempo de la digestión, los cisticercos eran tomados con pipeta y transferidos a solución de Hank estéril, a pH 7,2, calentada a 38,9°C, donde se les mantenía por espacio de algún tiempo al objeto de arrastrar el exceso de pepsina y ácido. Esta operación se repetía tres veces.

c.) Desenvaginación.

Aunque anteriormente se han descrito con cierta extensión las experiencias llevadas a cabo para la desenvaginación *in vitro* de cisticercos de *T. hydatígena*, aquellas experiencias estaban encaminadas a determinar, dentro de lo posible, las circunstancias y condiciones extrínsecas que facilitarán el proceso de desenvaginación.

En el presente apartado, describimos las técnicas de desenvaginación que hemos seguido para obtener cisticercos viables para su cultivo *in vitro*. Algunas de las soluciones aquí empleadas fueron ya expuestas antes; pero, otras, han sido exclusivamente empleadas para el posterior cultivo *in vitro*.

Una vez lavados los cisticercos, éstos eran transferidos a la solución desenvaginante. Hemos probado diferentes soluciones:

1.)

Solución de Tripsina (BDH) (0,5 Anson/gr.) 0,15% P/V

Pancreatina (BDH)	0,3% P/V
Taurocolato sódico (BDH)	0,01% P/V

Disuelto todo en solución BSS lavadora, ajustada a pH 7,2 y ultrafiltrada.

b.)

Solución BSS Lavadora.

Tripsina

Pancreatina.

Disueltas en concentraciones similares a la anterior solución, únicamente que, en lugar de Taurocolato sódico, se empleó bilis canina, previamente inactivada a 56°C 30 minutos 0,05% V/V. Todo ello, esterilizado, por filtración a través de filtro Sartorius 0,45 μ y ajustado a pH 7,2.

c.)

Solución desenvaginante compuesta de:

Tripsina (BDH) (0,5 Anson/gr.). 0,15% P/V

Pancreatina (BDH)

Taurocolato sódico (BDH)

Disueltos en solución BSS Lavadora, esterilizado por filtración y ajustado a pH 7,2 - 30 ml. más 10 ml. de medio de cultivo NCTC 135 (Gibco) modificado, como más tarde describimos, también ajustado a pH 7,2 y esterilizado por filtración.

d.)

Jugo duodenal de perro, suministrado por el Departam-

mento de Fisiología Animal, inactivado a 56°C durante 30 minutos y ultrafiltrado a través de filtro Sartorius 0,45 μ . El pH del mismo fue de 4,65.

Estas soluciones eran almacenadas, ya estériles, en frascos Steriline (30 ml.) y calentadas, antes de colocar en ellas a los cisticercos, a 38,9°C.

Una vez los cisticercos en la solución desenvaginante, eran mantenidos en ella por espacio de 18 a 20 horas, en estufa Hermi, termorregulada a 38,9°C, con agitación constante (60 impulsos/minuto) mediante un agitador horizontal Kottermann.

Al cabo de este tiempo, los cisticercos, ya desenvaginados, eran transferidos, mediante pipeteo estéril, a un nuevo frasco que más tarde detallaremos.

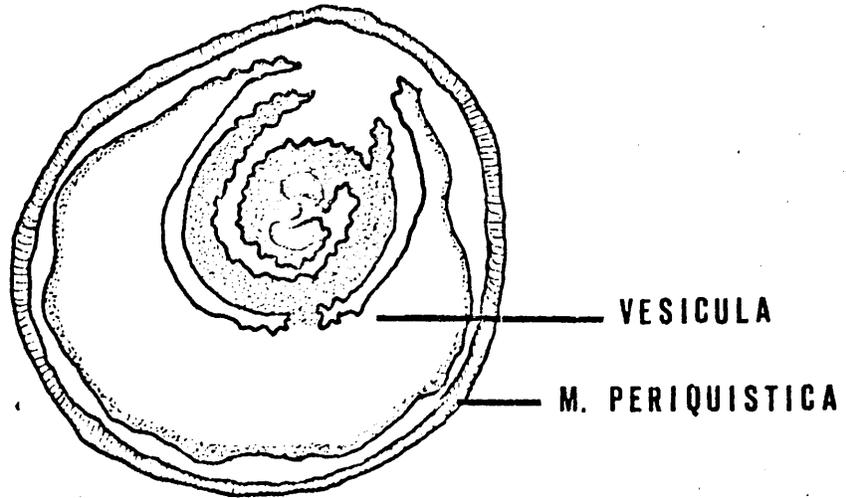
3.2.2.5.- SEPARACIÓN DE LAS "MASAS" DE LOS CISTICERCOS.

En las repetidas experiencias que hemos realizado, en un principio colocábamos los cestodes desenvaginados directamente en los frascos que servían de cultivo, observando una migración de los escolex en la fase sólida que permitía la rotura y eliminación de la parte posterior del cuello del cisticercos ("masa").

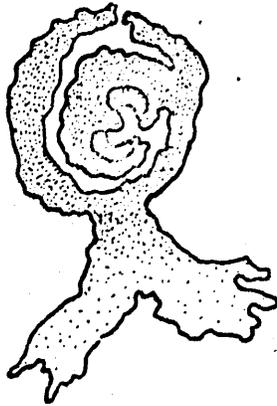
CYSTICERCUS TENUICOLLIS

ESQUEMAS

TRANSVERSALES

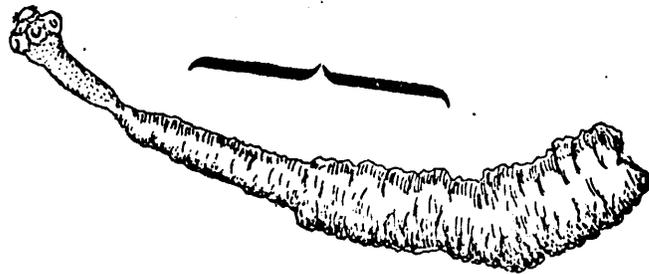


C. ENQUISTADO



C. DEENQUISTADO

CISTICERCO DE T. HYDATIGENA



"MASA" DEL CISTICERCO



CISTICERCO DE T. HYDATIGENA DESENVAGINADO

"MASA" SEPARADA DEL ESCOLEX

Esto nos indujo a pensar en la posibilidad de emplear este dispositivo como fase previa al cultivo.

Hemos probado a este fin diferentes fases sólidas:

Huevo total; clara de huevo; suero equino; suero bovino; agar suero; suero equino EEB (1:1), todos ellos, menos los que llevan agar, coagulados por el calor.

Como fase líquido hemos empleado: medios de cultivo que más tarde describiremos; soluciones desenvaginantes, que antes hemos citado; y mezcla 1:1 de solución desenvaginante b.) más medio de cultivo.

Como fase gaseosa hemos empleado: mezcla de gases (SEO) CO₂ 10%; N₂ 84,8%; O₂ 5,20%; y CO₂ 10,20% y N₂ 89,80%.

Cuando los escolex estaban libres del resto de la "masa" del cisticerco, eran tomados los escolex, generalmente en la fase sólida, con pipetas Pasteur estéril y transferidos a los medios de cultivo.

3.2.2.6.- TIPO DE FRASCOS.

Los frascos empleados para los medios de rotura y cultivo

han sido de vidrio: Sorvivel n° 30-25 y 18, y de plástico; Falcon de 25 cm² de superficie. En dos casos se empleó equipo de filtración Milipore XXII-0,47 00 modificado al efecto, como más tarde describiremos.

A estos frascos se les añadía 5 ml. de la fase a solidificar que se coagulaba por el calor seco.

3.2.2.7.- PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS FASES SÓLIDAS.

a.) Clara de huevo: Huevos de gallina procedentes de establecimientos comerciales, eran pincelados tres veces, dentro de la cámara estéril, con tintura de Iodo, esperando de pincelación a pincelación que la tintura se secase sobre la superficie. Cuando la última pincelación estaba seca, se procedía a la rotura de la cáscara a través de la cámara de aire, con tijeras de punta fina, estériles. Una vez cascada, era retirada, con pinzas estériles, la porción de cáscara que bordea la cámara de aire; procediéndose a abrir, con pinzas estériles, la membrana, e introducir, por ella, una pipeta Pasteur estéril, con la que se tomaba la clara, transfiriéndose ésta a un Elermeyer estéril con tapón a rosca y bolas de vidrio estériles, con las que se batía. Una vez batida, se tomaban 5 ml. que se introducían en los frascos para su coagulación a 80°C, en horno Pasteur

marca Tarma K. Este procedimiento es seguido por D.W. KANANGARA y J.D. SMYTH (1974) (58).

b.) Clara de huevo más extracto de embrión de pollo: Este último producto fue adquirido en la casa (Difco), siguiéndose para su preparación los consejos dados por la casa. Se mezcló con la clara en la proporción 1:1, fué coagulado a 80°C durante 90 minutos.

c.) Clara de huevo más sangre: Sangre de perro, procedente de la casa Gibco, fue mezclada en proporción 1:1 con la clara de huevo, coagulándose a 80°C durante 90 minutos.

d.) Clara de huevo más suero equino: El suero equino procedía de la casa Llorente. Se procedió igual que en el apartado anterior.

e.) Clara de huevo más EEP más Testosterona: Para la preparación de la testosterona se siguió el método de M.M. A. RAYNAND y C. PIGAN (1973) (82), consistente en disolver 100 mg. de testosterona (Sigma) en 2 ml. de etanol; 0,1 ml. de esta solución se disolvió en 5 ml. de la mezcla clara de huevo- EEP, mientras coagulaba y su estado era aún pastoso, precipitando la testosterona en microcristales, terminándose la coagulación como en el resto de las anteriores fases sólidas.

f.) Huevo total: El procedimiento fue el mismo que en Clara de huevo, salvo que en el momento en que la cámara de aire estaba abierta, se introducía una pipeta de 10 cc. de punta ancha, con la que se mezclaba todo el contenido del huevo, pasándose a Elermeyer con bolas de vidrio, para homogenizar y posteriormente coagular en los frascos de cultivo.

g.) Suero equino: Fue adquirido en Llorente, en frascos de 100cc. antes de su colocación en los frascos para la coagulación, fue filtrado a través de 0,45 μ en filtros y soportes de filtración Sartorius mediante presión positiva.

Fue coagulado a 75 - 80°C en horno Pasteur (Tarma K), tardándose para ello de 60 - 90 minutos.

h.) Suero equino más extracto de embrión bovino: El suero equino procedía de la casa Llorente. Era inactivado a 56°C durante 30 minutos y esterilizado por filtración.

El extracto de embrión bovino era adquirido en la casa Difco, y se siguió el procedimiento que recomienda la casa para su preparación.

El extracto de embrión y el suero equino fueron mezclados en la proporción 1:1 y, distribuidos en los frascos y coagulados a 75 - 80°C, durante 60 a 90 minutos.

i.) Suero bovino: El suero bovino empleado en algunas de nuestras experiencias fue adquirido en la casa Oxoid, liofilizado, rehidratándose según recomienda la casa y, posteriormente, ultrafiltrado. Fue coagulado en los frascos a 75 - 80°C, durante 60 - 90 minutos, previamente distribuidos en ellos los 5 ml. del suero.

En otras ocasiones hemos empleado suero bovino procedente del Matadero Municipal de Granada. Este era ultrafiltrado comprobándose, sobre nuestros propios cultivos de células, Hela, su efectividad. Siendo posteriormente distribuido y coagulado según indicábamos anteriormente.

J.) Suero bovino más lisado de hematíes: Sangre de conejo obtenida asépticamente por canulación de la vena marginal de la oreja, fue recogida en un frasco Vacutanner BD Francia tipo Q, con EDTA di Sodico y centrifugada a 1.500 r.p.m., durante 10 minutos. Deshechado el plasma, se recogieron los glóbulos rojos tras lavado con solución Alsever y centrifugado de los mismos a 1.500 r.p.m., 10 minutos en solución de Hank; procediéndose a la congelación del botón formado a -20°C, durante 24 horas, tras lo cual eran sacados del congelador y dejados a temperatura ambiente, con lo que se favorecía la lisis de los mismos.

Una vez lisados, eran diluidos 1:2 V/V en suero bovino y filtrados a través de filtro Sartorius 0,45 μ , tras lo que era distribuido y coagulado a 70 - 80°C de 60 - 90 minutos.

k.) Suero de rata: Procedente de la casa Gibco, fue distribuido en los frascos y coagulado a 70 - 80°C, durante unos 70 minutos.

l.) Agar más suero: Se fundió agar duro y, cuando estaba a unos 45°C, se les añadía 1 ml. de suero equino inactivado y estéril por cada 10 ml. de agar. Se agitaba fuertemente y se distribuía en frascos a razón de 5 ml. en cada uno, dejándose verticales hasta solidificar.

En alguna ocasión se preparó a la concentración 1:1.

m.) Agar más sangre: Se fundía agar duro y cuando estaba a unos 45°C, se les añadía 1 ml. de sangre de cordero estéril por cada 10 ml. de agar, se agitaba fuertemente y se distribuía en frascos a razón de 5 ml. en cada uno, dejándose solidificar verticalmente.

n.) Se preparó una base sólida coagulada compuesta de:

Suero equino	5 ml.
Sangre de perro	0,1 ml.
Solución de desvaginante a.) ..	1 ml.

Todo ello coagulado por calor seco a 80°C, 60 - 90 minutos.

o.) Fase sólida sobre prefiltro y filtro Sartorius S M 13400 y

S M 11106-0,45, respectivamente.

Sobre equipo de filtración Milipore XXII-04700 se montaron, una vez estériles, los filtros antes citados, colocándose sobre el prefiltro.

Extracto de embrión de pollo (Gibco) 1 ml., como medio rehidratante se ha colocado 0,1 ml. de Secratina (Calbiochem) grado A diluida en solución de Hank.

Pancreocimina (Calbiochem 10 UI/ml.), diluida en solución de Hank, 0,1 ml.

Prolina (Sigma) (0,1 g./ml.), diluida en solución de Hank, 0,1 ml.

Conjunto de aminoácidos-vitaminas, 0,1 ml.; compuesto de aminoácidos esenciales del medio Earle 1ml. y vitaminas esenciales Medio Earle (Difco), 1 ml.

Plasma de pollo (Gibco), 1 ml., en el que, como rehidratante, se colocó:

0,1 ml. de lisado de glóbulos rojos, tal como se describe anteriormente, en solución de Hank.

0,1 ml. de Emulsión "JD-GRL" y

0,1 ml. de Histamina (Lefa) al 10%.

El conjunto del EEP y plasma de pollo sobre el filtro, se embebía en el filtro incubándose tres horas a 38°C al objeto de formar, en el interior de las fibras de celulosa, el coágulo.

Una vez incubado, se recubría de una capa compuesta de suero bovino coagulado, que contenía 10.000 UI/ml. de Heparina

(BDH) coagulado a 70°C, durante 45 minutos, y agitado, con espátula, activamente hasta adquirir consistencia mucosa.

3.2.2.8.- PREPARACIÓN DE LAS FASES SÓLIDAS ANTES DE LA SIEMBRA.

Una vez coágulas las fases sólidas, siempre dentro de la cámara de flujo laminar, era agujereada la superficie con una pipeta capilar al objeto de permitir o facilitar la sujeción y penetración de los escolex.

3.2.2.9.- EXTRACTOS Y FLUIDOS EMPLEADOS COMO SUPLEMENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

a.) Extracto hepático.

Se siguió, para su preparación, la técnica descrita en el apartado de Material y Métodos para *Fasciola hepática*.

b.) Extracto de placenta humana 50

Se siguió, para su preparación, la técnica descrita en Material y Métodos para *Fasciola hepática*.

c.) Jugo duodenal con emulsión de grasa láctea (JD-GL).

Las siglas corresponden a una mezcla de jugo duodenal de perro-grasa láctea emulsionada.

5 ml. de jugo duodenal canino fueron diluidos en 25 ml. de solución de Hank, en la que iban disueltos 12,5 mg./l. de Twen 80; añadiéndose al conjunto 0,1 gr. de grasa láctea fundida; el conjunto se sometió a sonificación, bajo equipo de ultrasonidos MSE, durante 5 minutos. Bajo el conjunto se colocó hielo picado al objeto de evitar sobrecalentamientos.

Los extractos empleados eran almacenados, una vez diluidos, en frascos estériles a -20°C .

Todos los fluidos biológicos empleados fueron inactivados a 56°C , 30 minutos, y almacenados, como los sueros, según se describe en el Material y Métodos para *Fasciola hepática*.

3.2.2.10- MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios empleados fueron, en todo momento, medios parcialmente definidos o merídicos. Se siguieron siempre como patrón los medios empleados por J.D. SMYTH, para el cultivo de *E. granulossus* (1974) (119) por ser *T. hydatígena* y *E. granulossus* parásitos que tienen el mismo medio ecológico en su fase

adulta.

Los medios de cultivo se cambiaban cada tres días.

3.2.2.10.- MEDIOS DE CULTIVO (MTH).

MTH - 1.

TC 199	100 ml.
Glucosa 10%	2 ml.
Extracto Levadura 2% (difco) ...	5 ml.
Suero Equino (Llorente)	10 ml.
SBF (Gibco)	1 ml.

MTH - 2

TC 199	60 ml.
Extracto hepático	10 ml.
Suero Equino (Llorente)	30 ml.
Bilis canina	1 ml.
Medio modificado de Evans (1970) (32).	

MTH - 3

NCTC 135	100 ml.
----------------	---------

SBF	20 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) ...	12,5 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Penicilina	100 UI/ml.
Streptomicina	100 mg/ml.

MTH - 4

NCTC 135	100 ml.
SBF	25 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) ...	12,5%
ClK 2%	5 ml.
Glucosa 30%	22 ml.

MTH - 5

NCTC 135	100 ml.
SBF	10 ml.
Líquido de cisticerco procedente de quistes de oveja	10 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) ...	12,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.

El líquido del cisticerco fue inactivado a 56°C, durante 30 minutos.

MTH - 6

NCTC 135	100 ml.
SBF	10 ml.
Extracto de Placenta Humana 50	10 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) .	12,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.

MTH - 7

MTH - 4	57 ml.
Solución desenvaginante a.) ..	43 ml.

MTH - 8

TC 858 (Difco)	100 ml.
SBF (Gibco)	25 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) .	12,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.

En este medio el Extracto de Levadura, el Cloruro potásico y la Glucosa se disolvieron en solución BSS de Hank, y no como en los anteriores medios en agua tridestilada.

MTH - 9

CMRL 1066 (Difco)	100 ml.
SBF (Gibco)	25 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) ..	12,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.
Jugo Duodenal de perro	25 ml.

El Jugo Duodenal fue inactivado a 56°C, 30 minutos y ultrafiltrado a través de filtro Sartorius 0,45µ.

MTH - 10

NCTC 135 (Gibco)	100 ml.
SBF (Gibco)	25 ml.
Extracto Levadura 5% (Difco) ..	12,5 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.
JD más GL/Hank	12,5 ml.

MTH - 11

CMRL 1066 (Gibco)	100 ml.
SBF (Gibco)	25 ml.
Extracto Levadura (Oxoid) 5% ..	12,5 ml.
ClK 2%	0,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.

En los restantes medios que se describen el Extracto de Levadura, en todo momento, fue de la casa Oxoid.

MTH - 12

Igual al MTH - 4, con la única variante de emplear extracto de Levadura "Oxoid".

MTH - 13

TC 199 (Gibco)	100 ml.
SBF	25 ml.
Extracto Levadura 5% (Oxoid) .	12,5 ml.
Glucosa 30%	2,2 ml.
ClK 2%	0,5 ml.

4.- RESULTADOS

4.1.- EXPERIENCIAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Hemos decidido incluir también experiencias con poco o ningún éxito, al objeto de mostrar el camino de tanteos progresivos, a que este tipo de investigación obliga; aunque en las publicaciones, otros autores, habitualmente sólo consigⁿan las experiencias con mejores resultados. Creemos que ello puede ayudar a otros investigadores dispensándolos de hacer experiencias supérfluas.

Primera Experiencia.

Las metacercarias libres fueron obtenidas siguiendo el procedimiento de digestión de las metacercarias enquistadas.

Se realizaron tres réplicas a veinte ejemplares en cada una de ellas, con un tamaño medio de 175 μ

El medio de cultivo fue NCTC 135 (Gibco), sin ningún tipo de suplemento, ajustado a pH 7,2 y gaseado con mezcla gaseosa: CO₂ 10%, N₂ 85% y O₂ 5%.

Se obtuvo una supervivencia máxima de 4 días, al cabo de los cuales los individuos aparecían flotando e inactivos.

Segunda Experiencia.

Las metacercarias libres se obtuvieron asimismo por

digestión. Igualmente, como en el resto de las experiencias, se realizaron tres réplicas, en este caso de 25 ejemplares cada una.

El medio de cultivo fue TC 199 (Gibco) gaseado con la mezcla: CO₂ 10%, N₂ 85% y O₂ 5%.

El tamaño medio inicial fue de 170 μ , con una supervivencia máxima de tres días.

Tercera Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue NCTC 135 con un 30% de SBF inactivado (Gibco), gaseado con mezcla CO₂ 10%, N₂ 85% y O₂ 5%. El tamaño medio inicial fue de 170 μ y la supervivencia de 8 días.

Cuarta Experiencia.

Las metacercarias libres, obtenidas por digestión, tenían un tamaño medio de 175 μ .

El medio de cultivo empleado fue TC 199 (Gibco) más un 30% de SBF inactivado (Gibco) gaseado con mezcla CO₂ 10%, N₂ 85% y O₂ 5%.

Se logró una supervivencia de 7 días.

Quinta Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 1, gaseado con la mezcla anteriormente señalada de CO₂, N₂ y O₂. El tamaño inicial de los vermes, obtenidos por digestión, fue de 170 μ . Se colocaron 20 individuos por réplica. Se emplearon diferentes bases sólidas, con los resultados que se indican.

a-Agar-Plasma al 5%: supervivencia de 4 días.

b-Agar-Panmede al 2%: supervivencia de 5 días.

c-Agar-Hígado de buey al 2% mas un 5% de sangre humana: la supervivencia fue de 8 días. Al segunda día, aparece fase sólida en el intestino de las adolecarias.

Sexta Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 1. Fase sólida de Agar-Sangre al 20%. Las metacercarias libres con 175 μ de media fueron obtenidas por digestión. Se logró una supervivencia de 8 días, encontrándose a partir del tercer día fase sólida en el interior del intestino. Las adolecarias alcanzaron al fin de la experiencia un tamaño medio de 220 μ .

Séptima Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 2. Fase sólida Agar-Sangre humana 5%. Las metacercarias libres, con una medida en las tres réplicas de 180 μ , fueron obtenidas por el procedimiento modificado de Dixon, antes mencionado.

Sobrevivieron durante 13 días, llegando a un tamaño medio de 210μ . A partir del décimo día el medio aparecía turbio contaminado por bacterias. En este medio se emplearon glóbulos rojos humanos lavados en solución Alsever. La contaminación procedía de estos glóbulos rojos.

Octava Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 2. La fase sólida fue la empleada en la Experiencia Séptima. Las metacercarias libres de 180μ de media, se obtuvieron por el procedimiento modificado de Dixon.

Al tercer día apareció una contaminación, detectada en la sangre, por las levaduras, comprobada en medio Sabouraud. Se agregaron 100 UI/ml. de Micsotatin. Al cuarto día murieron, encontrándose con desflecamiento de la cutícula y deformadas.

Novena Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 3. Fase sólida Agar-Sangre al 20%. Las metacercarias libres de 175μ iniciales (30 por frasco en cada réplica), se obtuvieron por el procedimiento modificado de Dixon.

Al cuarto día aparecieron precipitaciones mucosas en los tres frascos, por lo que rápidamente cambiamos el medio.

Al séptimo día sacrificamos los cultivos, apareciendo las adolescarias bien formadas, con un tamaño medio de 250μ y la mayoría dentro de la fase sólida.

Décima Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 3. Fase sólida Agar-Sangre al 20%. Las metacercarias libres, obtenidas por el procedimiento modificado de Dixon, tenían un tamaño medio de 175μ . Los medios se renovaron cada dos días, lográndose una supervivencia de 8 días con un tamaño medio de 250μ .

Undécima Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 3 y suero equino en igual proporción. Fase sólida de Agar-Sangre al 20%. Las metacercarias libres de 160μ se obtuvieron por el procedimiento modificado de Dixon. Los medios se cambiaban en las tres réplicas cada dos días lográndose un mantenimiento de 10 días y un tamaño medio de 260μ .

Duodécima Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 4, con glóbulos rojos humanos lavados en solución Alsever.

Se partió de 70 metacercarias liberadas, distribuidas

en tres frascos, obtenidas por procedimiento de Dixon modificado y de un tamaño medio de 170μ . El medio, como era costumbre, se cambiaba cada 3 días.

Se obtuvo una supervivencia de 13 días con un tamaño medio de 260μ .

El día 12°, se observó contaminación bacteriana confirmada por siembra en agar nutritivo, comprobándose posteriormente que provenía de los glóbulos rojos. Se lavó con Penicilina G.Sódica-100.000 U.I./litro y Sulfato de Estreptomina 100 mg./litro a pesar de lo cual las adolesecarias murieron.

Décimo tercera Experiencia.

Medio de cultivo MFH - 5. Se realizaron dos series de experiencias con tres frascos cada uno y un total de 75 metacercarias libres con un tamaño medio de 175μ .

En el primer lote agregamos 0,05 cc. por frasco Carrel de glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever, procedente de la casa Llorente.

En el segundo lote no se agregó nada.

En el primer lote la supervivencia fué de 4 días. Al segundo día comenzaron a observarse precipitaciones floculosas en el fondo del frasco.

En el segundo lote sobrevivieron tan sólo un día, apareciendo el mismo tipo de precipitaciones.

Décimo cuarta Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue:

Suero equino (Llorente) inactivado.

Glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever (Llorente) (0,05 ml./ml.).

Las metacercarias libres con un tamaño medio de 170μ , se obtuvieron por la técnica de Dixon modificada. Se logró una supervivencia de 103 días.

Al cuarto día el tamaño medio era de 230μ , con un valor mínimo de 200μ , y máximo de 258μ . A partir de este día siguieron midiéndose las adoleoscarias con regularidad, y en el siguiente cuadro representamos los valores obtenidos durante el tiempo que duraron los cultivos.

Cuadro número 1.

Longitud de las adolecarias de *Fasciola hepática* en cultivo *in vitro*.

Experiencia n° 14).

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>L. media</u> (micras)	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima</u>
4	230	258	200
14	365	440	320
20	392'5	470	360
27	407	500	360
29	416'25	550	360
32	442'5	610	370
35	457	620	380
40	474	630	400
42	480	650	460
54	540	700	490
69	590	720	530
74	612	750	550
85	630	790	550
94	645	800	560
100	662	810	570
103	662	810	570

El día 100, se observó una cierta turbidez, encontrándose el día 103 una lisis total de los glóbulos rojos y abundantes micelios, comprobándose que la contaminación procedía de los glóbulos rojos.

La evolución de las adolecarias a lo largo del tiempo que duraron los cultivos queda patente en su aumento de tamaño y es corroborada por los siguientes datos:

A partir del día 3° se observó la presencia de abundantísimos glóbulos rojos en las ramas intestinales.

El día 12, engrosamientos en las paredes de las cruas intestinales. Hacia el día 15 aparecen ya ramificaciones intestinales.

El día 34 se encontraron en un ejemplar sacado al azar y teñido con Orceína Acética dos masas bien patentes que interpretamos como testiculares. Situadas posteriormente a la ventosa ventral, y otra masa celular situada por la parte anterior a esta ventosa que correspondería probablemente a los primordios de la bolsa del cirro.

A partir de los 54 días de cultivo, se observaron indicios de terceras ramas intestinales y agregados celulares en los bordes del animal.

En las fasciolas teñidas al término del cultivo, el 103° día, muchas de las cuales estaban degeneradas a causa de la contaminación, no se observó mayor evolución de la observada

el día 54.

Décimo quinta Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue el mismo que en la experiencia anterior, utilizando tres frascos Carrel. Se logró una supervivencia de 96 días, partiendo de metacercarias libres, obtenidas como de costumbre por la técnica de Dixon modificada, de un tamaño medio de 180μ . Las adolesecarias se midieron regularmente durante el curso de la experiencia detallándose en el siguiente cuadro los valores obtenidos en diferentes fechas.

Cuadro número 2.

Longitud (micras) de las adolesecarias de *Fasciola hepática* en cultivo *in vitro*.

(Experiencia n°15).

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>L. media</u>	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima.</u>
7	277	300	250
13	280	320	250
20	343	400	320
24	390	410	350
26	392	420	360
31	407	450	380
34	427	500	391
45	463	550	410

.....//.....

Continuación del Cuadro n°2.

<u>Edad de cultivo</u> (días)	<u>L. media</u>	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima</u>
54	481	600	453
60	489	650	453
74	520	700	500
96	570	790	550

El día 96, lo mismo que en el cultivo anterior, aparecieron contaminaciones por hongos. Los glóbulos rojos empleados procedían del mismo frasco. La evolución de las adoleescarias siguió los pasos señalados en la anterior experiencia.

Décimo sexta Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue asimismo suero equino inactivado más glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever. El tamaño medio inicial fue de 170μ , lográndose una supervivencia de 79 días. Las adoleescarias presentaron durante el curso de los cultivos los tamaños que se indican en el siguiente cuadro.

Cuadro número 3

Longitud (micras) de las adolesecarias de *Fasciola hepática* en cultivo *in vitro*.

(Experiencia n° 16).

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>L. media</u>	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima</u>
8	205	230	190
15	260	290	230
19	299	330	210
21	305	330	290
26	320	350	300
29	329	360	300
34	355	400	320
40	384	460	350
54	410	500	390
65	420	520	400
79	450	580	400

El día 79 aparecieron contaminaciones por hongos, ya que, aunque los sueros empleados procedían de frascos diferentes en las tres experiencias (14, 15 y 16), no ocurría igual con los glóbulos rojos de carnero que tenían el mismo origen.

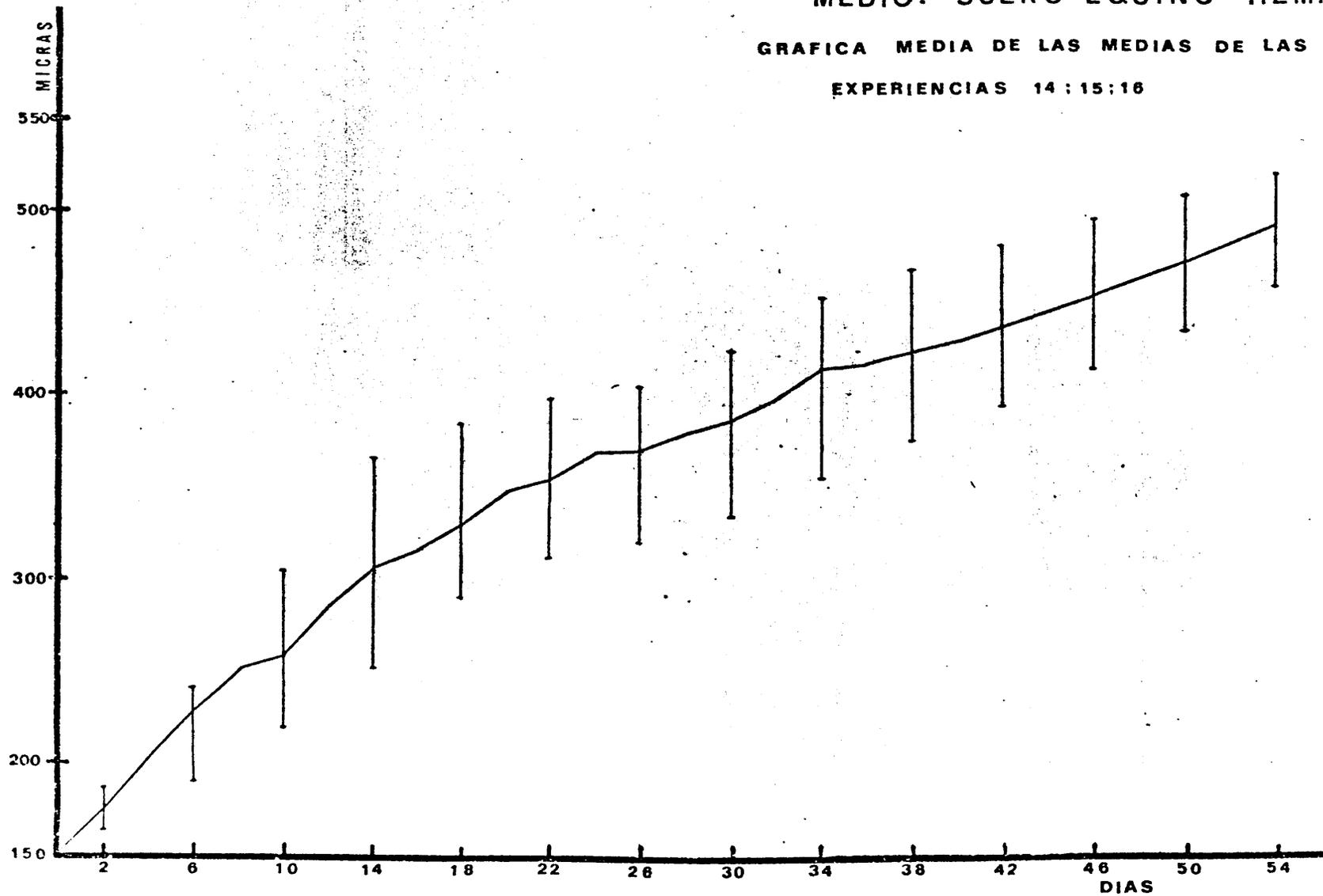
Las adolesecarias en esta experiencia mostraron una evolución paralela a la de las experiencias anteriores.

DESARROLLO DE FASCIOLA "IN VITRO"

MEDIO: SUERO EQUINO-HEMATIES

GRAFICA MEDIA DE LAS MEDIAS DE LAS

EXPERIENCIAS 14 : 15 : 16



Décimo séptima y décimo octava Experiencias.

El medio de cultivo empleado fue sangre total de perro no inactivada. Se utilizaron tres frasco con tres réplicas cada uno.

Las metacercarias libres habian muerto a las 24 horas.

Décimo novena Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue sangre heparinizada de conejo mantenida en la nevera a 4°C durante 21 días.

Las metacercarias libres crecieron y sobrevivieron durante 8 días. A los 6 días el tamaño medio era de 275 μ , y de 315 μ a los 8 días.

El séptimo día la sangre vieja almacenada en la nevera que se empleaba para el cultivo fue sustituida por sangre reciente al cambiar el medio, muriendo las adoleoscarias al día siguiente.

Vígesima Experiencia.

Empleamos 9 frascos, con tres diferentes medios: MFH - 7; MFH - 8; MFH - 9. Utilizamos también glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever. En cada frasco se sembraron 20 metacercarias libres obtenidas por la técnica de Dixon modificada, con un tamaño medio de 170 μ .

En esta experiencia se intentó simular *in vitro* la emigración que sufren las adolecarias en su ciclo biológico. Durante los tres primeros días se mantuvieron en suero equino inactivado más glóbulos rojos; en este tiempo crecieron hasta 175μ de media. Tras ello se les cambió el medio primitivo en su totalidad sustituyéndolo en los distintos tubos por los anteriores citados. Los resultados tras ello fueron los siguientes:

MFH - 7. El primer día de cultivo los glóbulos rojos aparecen lisados y las adolecarias muertas flotando en el medio.

MFH - 8. Sobreviven 18 días alcanzando las siguientes longitudes medias,

día 6° - $276'6\mu$

día 8° - 320μ

día 10° - 325μ

día 15° - 333μ

día 18° - 340μ

El día 17 presentan poca vitalidad por lo que se añade medio MFH - 9, muriendo al día siguiente.

MFH - 9. Murieron al primer día de estar en este medio.

Vígesimo primera Experiencia.

Se prueban en ella los medios MFH - 8 y MFH - 10.

Las metacercarias libres de 170μ de tamaño medio, obtenidas por el método de Dixon modificado, se mantienen 3 días en suero equino más glóbulos rojos, pasándose posteriormente a los frascos de cultivo conteniendo MFH - 8 más glóbulos rojos y MFH - 10 más glóbulos rojos, obteniéndose los siguientes resultados:

MFH - 8. Viven 12 días, contaminándose el oncono por levaduras presentes en los glóbulos rojos. Presentan los valores de tamaño que se indican:

día	4°	-202 μ
día	5°	-213 μ
día	12°	-330 μ

MFH - 10. Además de los glóbulos rojos, este medio fue adicionado con suero equino (MFH - 10, 2 ml. -suero equino - 4 ml.).

Las adoleoscarias sobrevivieron 14 días, contaminándose el medio en esta fecha por contaminación presente en los hematies. Los tamaños fueron:

día	4°	-204 μ
día	6°	-225 μ
día	13°	-550 μ , con un máximo de 630 y mínimo de 530 μ .

El día décimo tercero aparecían inicios de ramas intestinales y separación de masas testiculares.

En los dos medios utilizados en esta experiencia, desde el sexto día, era patente una gran lisis de glóbulos rojos, lo que obliga a cambiar el medio cada dos días añadiendo medio fresco.

Vigesimo segunda Experiencia.

El medio de cultivo empleado fue el siguiente:

Extracto de placenta humana en solución de Hank al 50% P/V	50 ml.
SBF inactivado (Gibco)	100 ml.
Glóbulos rojos de carnero (Llorente en solución Al-sever)	0,05 ml./10ml. de medio.

Se emplean 66 metacercarias libres, obtenidas por el procedimiento de Dixon modificado, de 175μ de longitud media.

Durante dos días se mantienen en SBF más glóbulos rojos. Transcurrido este tiempo, se transfieren a tres frascos Carrel (13-Pobel), como se indicaba en apartados anteriores, conteniendo el medio de cultivo.

Se consiguieron 83 de supervivencia, muriendo tras un corte de fluido eléctrico.

El siguiente cuadro muestra el crecimiento de las adolescarias durante el tiempo que duraron los cultivos:

Cuadro número 4.

Longitud (micras) de las adoleoscarias de *Fasciola hepática* en cultivo *in vitro*.

(Experiencia n° 22).

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>L. media</u>	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima</u>
3	260	310	190
5	320	390	250
6	328	400	270
11	479	590	390
13	537'5	530	470
15	633'3	820	570
18	858	1.000	750
21	1.060	1.280	870
26	1.270	1.400	900
27	1.315	1.800	900
29	1.350	1.900	950
33	1.375	1,920	1.000
40	1.700	2.150	1.300

A partir del día 40, debido a las dimensiones alcanzadas por los vermes y su movilidad, se hizo prácticamente imposible determinar su tamaño, ya que en el microscopio invertido a 100x se salían por completo del campo.

Sobrevivieron, como ya hemos indicado, hasta el día 83, en el que permanecieron más de 12 horas a temperatura ambiente por falta de fluido eléctrico. Por otros procedimientos no fue posible lograr la temperatura adecuada.

Las jóvenes fasciolas, se sacaron del medio de cultivo y tiñeron con Carmín borácido, arrojando una media de 2.600μ con un tamaño máximo de 3.600μ y mínimo de 1.500μ .

La evolución durante el tiempo que duró el cultivo fue la siguiente:

- 2° día. Mostraban el intestino repleto de glóbulos rojos.
- 6° día. Aparición de ramas intestinales primarias.
- 11° día. Apreciables engrosamientos repletos de glóbulos rojos, a modo de muñones, en las ramas intestinales primarias.
- 20° día. Ramas intestinales terceras.
- 30° día. Ramas intestinales perfectamente formadas.
- 40° día. Ramas intestinales perfectamente formadas, por los bordes, acúmulos de células; se aprecia en individuos vivos una masa que pudiera ser la bolsa del cirro.
- 83° día. Estadío 5-6 de Dawes para el desarrollo de *Fasciola hepática in vivo* en el ratón (1963) (23).

El estudio de la relación de medidas de longitud: ventosa ventral-poro excretor/ventosa bucal-ventosa ventral, dió los siguientes resultados:

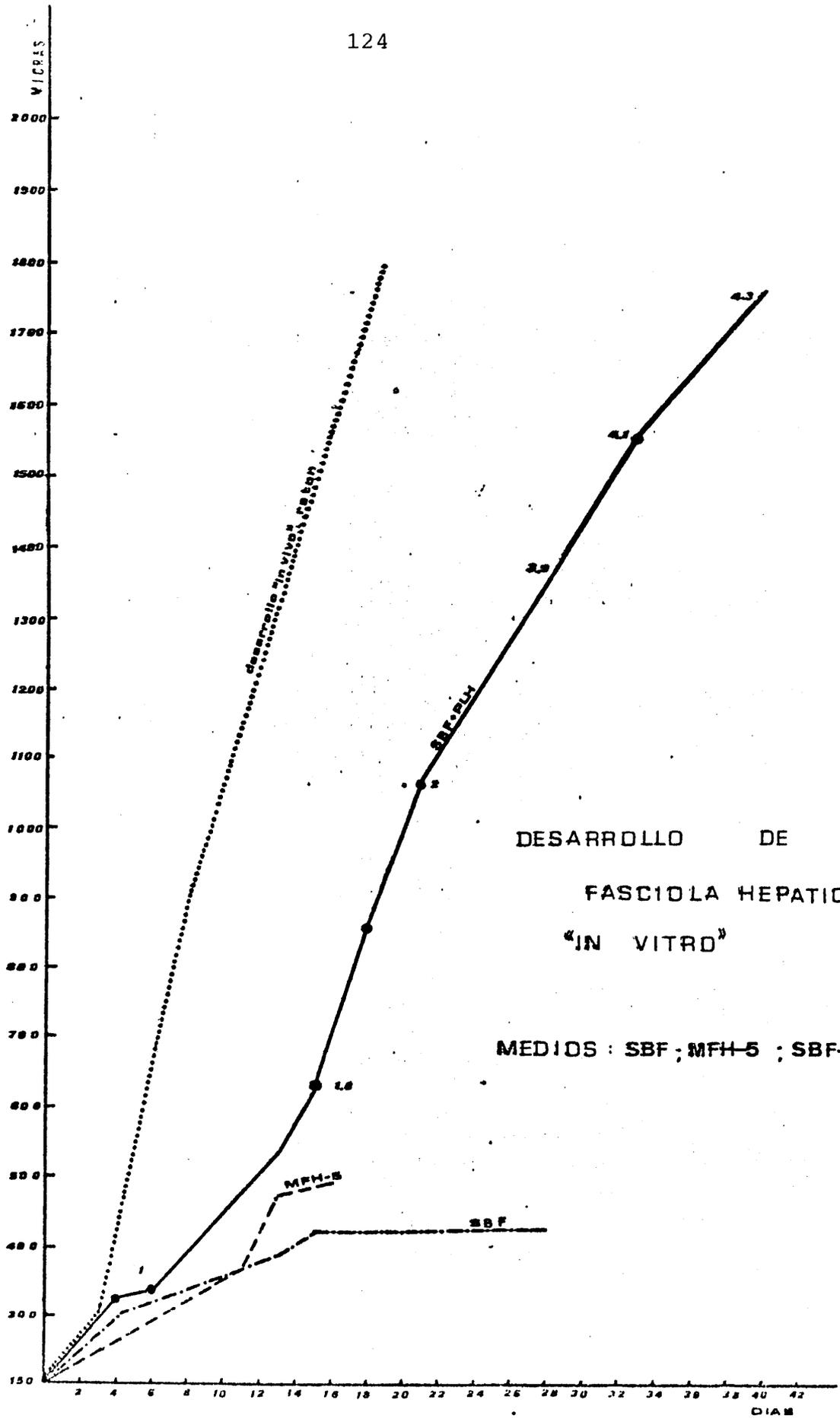


Foto n°7. Adolescaria cultivada *in vitro*, 83 dias.
Experiencia n° 22. Fotomicrografia parcial.



A los 2 días	1
A los 15 días	1'8
A los 21 días	2
A los 33 días	3'9
A los 37 días	4'1
A los 40 días	4'3

Al finalizar la experiencia, es decir, a los 83 días de iniciado el cultivo, se encontró una relación de 4'4 y 4'6 en las de máximo tamaño.

Vígesimo tercera Experiencia.

El medio de cultivo fue SBF inactivado de la casa Gibco, y glóbulos rojos de carnero de la casa Llorente.

Partimos de 96 metacercarias libres, obtenidas por la técnica de Dixon modificada, con un tamaño medio de 175 μ .

A los tres días de iniciado el cultivo, el intestino de las fasciolas jóvenes aparece lleno de glóbulos rojos. Los individuos se midieron durante el curso de la experiencia, obteniendo los valores representados a continuación:

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>Longitud media.</u> (micras)
3	260
5	321
9	375
13	388
15	422
26	433
34	458'7
41	476
46	491'2
54	515
62	537'5
70	560

El día 70 aparecieron muertas, y, el medio, altamente contaminado dándose por finalizada la experiencia. La contaminación se detecto en los glóbulos rojos.

Vígesimo cuarta Experiencia.

El medio de cultivo en esta experiencia fue el siguiente:

Suero equino inactivado 10 ml.

Extracto embrión bovino 10 ml.
 Glóbulos rojos de carnero 0,05 ml./10 ml. de medio.

Las metacercarias libres de 180 μ de longitud media, fueron obtenidas por el método de Dixon modificado, utilizándose 35 vermes por frasco. Se logró una sobrevivencia de 14 días, y la evolución en cuanto al tamaño fue la siguiente:

<u>Edad del cultivo</u> (días)	<u>L. media</u>	<u>L. máxima</u>	<u>L. mínima</u>
3	275	--	--
7	280	350	250
12	296'2	375	270
14	298	380	275

El día 14 murieron por contaminación detectada en el EEB, ya que éste era agregado independientemente al cambiar el medio.

Vigesimo quinta Experiencia.

En esta experiencia se utilizan los medios semidefinidos MFH - 2 y MFH - 12, con y sin adición de insulina a los mismos. La insulina posee acción contradictoria para *Fasciola hepatica* (PANTELOURIS (1964) (77), ISSEROFF y READ (1968) (52)).

Se prepararon 12 frascos Carrel con 25 metacercarias libres cada uno, de 175μ de longitud media obtenidas por el procedimiento modificado de Dixon y distribuidas de la siguiente forma:

3 frascos MFH - 11.

3 frascos MFH - 11 más 0,4 UI/ml. de insulina (Leo) -
- MFH - 2 (I).

3 frascos MFH - 12.

3 frascos MFH - 12 más 0,4 UI/mo. de insulina (Leo) -
- MFH - 12 (I)

Las metacercarias libres se mantuvieron por espacio de 3 días en suero equino con glóbulos rojos para los medios MFH - 2 y MFH - 2 (I) y en suero bovino fetal (SBF) más glóbulos rojos para los medios MFH - 12 y MFH - 12 (I).

Los resultados obtenidos en estos 4 medios fueron los siguientes:

MFH - 11. Sobrevivieron 10 días. El medio a partir del 4º día presentaba lisis de glóbulos rojos. Al décimo día sesacrificó el cultivo.

Al 5º día presentaban un tamaño medio de 250μ .

Al 7º día, -334μ - Al 10º día, -340μ .

MFH - 11 (I). Las adolescarias vivieron durante 10 días, sacrificándose el medio en esta fecha. La evolución en el tamaño fué

la siguiente:

5° día-x = 252 μ .
7° día-x = 317 μ .
10° día-x = 330 μ .

MFH - 12. Sobrevivieron durante 22 días. A partir del 9° día se observaron abultamientos en las ramas intestinales, como un inicio de ramas intestinales secundarias.

Los tamaños medios durante el tiempo que duraron los cultivos fueron:

5° día -320 μ .
9° día -365 μ .
12° día -370 μ .
14° día -375 μ .
16° día -473 μ .
20° día -476 μ .
22° día -480 μ .

MFH - 12 (I). Sobrevivieron durante 22 días. A partir del noveno día aparecieron ramas intestinales. Los tamaños medios durante el tiempo que duraron los cultivos fueron los siguientes:

5° día -316 μ .
9° día -320 μ .
12° día -346 μ .
14° día -360 μ .

16°día -385 μ .

20°día -436 μ .

22°día -445 μ .

Vigesimo sexta Experiencia.

El medio de cultivo fué el MFH - 13.

Empleamos 60 metacercarias libres obtenidas por el procedimiento de Dixon modificado con un tamaño medio de 175 μ . Los tres primeros días se mantuvieron en SBF más glóbulos rojos. Sobrevivieron 38 días. Al tercer día, antes de pasarlas al medio MFH - 13, dieron un tamaño medio de 253 μ .

Al 38 día se las ve contaminadas por abundante micelios de hongos, sacrificándose los cultivos, dando un tamaño medio de 720 μ , con máximo de 820 μ y mínimo de 650 μ . La contaminación provenía de los glóbulos rojos empleados.

Vigésimo séptima, vigésimo octava y vigésimo novena Experiencias.

En estas experiencias se emplearon extractos placentarios contaminados por meconio.

Se emplearon metacercarias libres de 175 μ de longitud media, obtenidas por los procedimientos habituales.

Se mantuvieron, durante 3 días, en SBF más glóbulos

rojos, dando un tamaño de 250μ de longitud media. Fueron pesadas a medio de cultivo compuesto de:

Eph 50 ml.
SBF 100 ml.

Al día siguiente aparecieron muertas.

En la experiencia 28, se empleó medio MFH - 13 con placentas contaminadas por meconio.

Al día siguiente de la siembra murieron, apareciendo flotando sobre el medio.

En la experiencia 29, se emplearon metacercarias libres obtenidas por el mismo procedimiento de las experiencias anterior y con igual tamaño medio de 175μ .

El medio fue MFH - 14 con placenta contaminada por meconio.

Al día siguiente de la siembra en este medio, tras estar en suero bovino fetal, murieron, apareciendo flotando en el medio.

4.2.- RESULTADOS SOBRE LAS CONDICIONES DE LA DESENVAGINACIÓN DEL *CISTICERCUS TENUICOLLIS* IN VITRO.

4.2.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAJE.

En esta experiencia se ha estudiado la influencia de la temperatura en el almacenaje previo de los cisticercos, viéndose la viabilidad de los mismos, calculándose ésta por el número de cisticercos que, tras la digestión péptica y en la solución desenvaginate H ajustada a pH 7,2, llegan a desenvaginarse, efecto que no consideramos pasivo, por el contrario, activo, debido a los movimientos violentos que preceden a la desenvaginación.

-25°C. Descongelación lenta.

No se desenvagina ninguno a las 25 horas. Aparecen al cabo de este tiempo completamente digeridos en la solución desenvaginate.

-10°C. Descongelación lenta.

No se desenvagina ninguno a las 24 horas.

Algunos quedan digeridos.

-25°C. Descongelación rápida.

A la media hora y a la primera hora el 8,3%

A las 2 horas el 83,3%

A la tercera hora el 100%.

A partir de este tiempo, el estado de los cisticercos permaneció estacionario hasta las 24 horas.

-10°C. Descongelación rápida.

En la primera media hora se desenvaginaron el 16,6%. A la primera hora el 58,3%. A la segunda hora el 83,3%. A la tercera hora el 100%, permaneciendo estacionario este valor hasta las 24 horas.

0°C.

A la primera media horas, el 25%

A la hora, el 25%

A las 2 horas, el 25%.

A las 3 horas, el 25%.

A las 16 horas, el 75%.

A las 18 horas, el 75%.

A las 20 horas, el 100%.

A las 24 horas, el 100%.

4°C.

A la media hora se desenvaginó el 100%.

22°C.

A la media hora se desenvaginó el 83,3%.

A la primera hora se desenvaginó el 100%.

40°C.

A la primera media hora se desenvagina el 58,3%.

A la hora primera, el 58,3%.

A la segunda hora permanece el mismo valor.

A la tercera hora sigue permaneciendo estacionario el mismo valor.

A las 16 horas aumenta el número de desenvaginadas a un 75%, permaneciendo estacionario este porcentaje hasta las 24 horas.

53°C.

A las 24 horas no se desenvagina ninguno, apareciendo todas digeridas.

4.2.2.- EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.

En esta experiencia se estudia la pérdida de viabilidad que sufren los cisticercos, medida en el porcentaje de desenvaginaciones, en relación con el tiempo de almacenamiento a 4°C. Se utilizó la solución desenvaginante H, con pH inicial de 7,2, a 38,9°C, con agitación de 90 impulsos por minuto.

2 horas a 4°C ± 1°C.

A la media hora aparecen desenvaginadas el 100% de los cisticercos.

1 día a 4°C ± 1°C.

A la primera media hora aparecen desenvaginados el 75%

A la hora, el 83,3%.

A las 2 horas, el 91,66%.

A las 2 horas y media, el 100%.

4 días a 4°C ± 1°C.

A la media hora se desenvaginan el 58,33%.

A las 2 horas, 66,66%.

A las 16 horas aparecen desenvaginadas el 100%, permaneciendo invariable hasta las 24 horas.

7 días a 4°C.

A la media hora, 0%.

A la primera hora, 0%.

A las 2 horas, 0%.

A las 3 horas, 66,66%, permaneciendo invariable este porcentaje a las 24 horas.

15 días a 4°C

A las 24 horas no hay desenvaginación, mostrándose todas digeridas.

4.2.3.- EFECTO DEL PH EN LA DESENVAGINACIÓN.

Se ha estudiado en esta experiencia la influencia de diferentes valores de pH en la desenvaginación del cisticerco de *T. hydatígena*.

Utilizamos para ello un mínimo de doce cisticercos, para cada valor de pH, distribuidos en frascos Steriline de tres en tres.

pH inicial 3.

Este valor de pH fue estudiado por ser el existente a la salida del esfínter pilórico (según G.B. JERZY GLASS (197)) (55)).

Los cisticercos a las 18 horas aparecen desenvaginados un 16,6% llegando y permaneciendo estacionario a las 20 horas con un 25%.

Hay que hacer notar que el pH del medio subió al final de la experiencia a 4,25; quizás debido a la neutralización causada por los corpúsculos calcáreos libres tras la digestión y/o a la eliminación de CO_2 de la fase líquida durante la incubación a 39°C en agitación. Esta variación del pH fue notada a las 17 horas permaneciendo invariable hasta las 24 horas.

pH inicial 5.

pH considerado como el existente en el fluido intestinal en la primera parte del duodeno (JERZY GLASS) (197) (55).

En la primera media hora los cisticercos se desenvaginaron en un 25%, manteniéndose este porcentaje hasta la segunda hora, en que asciende a un 41,66%. A las 16 horas asciende a un 91,66%, y a las 24 horas fue siempre del 100%.

Estas soluciones viraron su pH a 6 a las 16 horas, también posiblemente debido a la neutralización por los corpúsculos calcáreos.

pH inicial 6

pH considerado como el existente en el duodeno a las 6 horas de la ingesta, con comida normal no grasa, en el jugo duodenal de perros con fístula duodenal (SANCHEZ CAMPOS) (comunicación personal).

En la primera hora de desenvaginación es del 66,6% aumentando a un 83,33% a las dos horas llegándose al 100% a las 16 horas.

A las 16 horas las soluciones viraron su pH a 6,8 posiblemente por los corpúsculos calcáreos del cestode.

pH inicial 7,2.

En este pH la desenvaginación es prácticamente instantánea para algunos cisticercos, completándose el 100% a la media hora.

El pH a las 17 horas permaneció invariable.

4.2.4.- INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

Se utilizó solución desenvaginante, H, con pH inicial de 7,2 a 38°C, en agitación de 90 impulsos por minuto y un tiempo de almacenaje previo de 2 horas a 4°C.

6,10 PPM

A la media hora nos dió el 100% de individuos desenvaga-

ginados, permaneciendo invariable a lo largo de las 24 horas.

3,00 PPM.

A la media hora encontramos un 91,66% de desenvaginación, llegando al 100% a las 4 horas.

0,20 PPM.

A la media hora no encontramos desenvaginación. Igual ocurre a la primera hora.

A segunda hora un 16,66%.

A la tercera un 33,33%, manteniéndose constante este resultado hasta las 24 horas.

4.2.5.- EFECTO DE LAS DIFERENTES ENZIMAS PRESENTES EN LA SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

Las experiencias se llevaron a cabo después de la previa acción de la pepsina. Almacenamiento previo de 2 horas a 4°C; a 38,9°C, en agitación de 90 impulsos por minuto.

Solución A (de Hank).

Obteniéndose a la media hora 0% de desenvaginación

1	"	16,6%	"
2	"	25%	"
3	"	25%	"
16	"	50%	"
18	"	66,6%	"
20	"	66,6%	"
24	"	75%	"

(En realidad, en ningún caso hubo desenvaginación total. Los tantos por ciento que se señalan corresponden a desenvaginaciones parciales, pues tanto los escolex como el cuello y la masa posterior aparecen unidos todavía).

Solución B (Pancreatina en solución Hank).

A la media hora 0% de desenvaginación.

1	"	8,33%	"
2	"	25%	"
3	"	50%	"
16	"	66,6%	"
18	"	75%	"
20-24	"	75%	"

Solución C (Tripsina en solución BSS lavadora).

A la media hora no se obtiene desenvaginación.

1	"	"	"	"	"
2	"	"	"	"	"
3	"	se obtiene el 25%.			
16	"	"	"	"	58,33%.
18	"	"	"	"	58,33%.
20	"	"	"	"	58,33%.
24	"	"	"	"	75%.

Solución D (Bilis de perro en solución de Hank).

A la media hora no se obtiene desenvaginación.

1	"	"	"	"	"
2	"	"	"	"	"
3	"	obtiene el 25%.			
16	"	"	"	"	41,66%.
18	"	"	"	"	41,66%.
20	"	"	"	"	75%.
24	"	"	"	"	75%.

Solución E (Tripsina + Pancreatina en BSS lavadora).

A la media hora se obtiene el 83,33%.

1	"	"	"	"	83,33%.
2	"	"	"	"	83,33%.
3	"	"	"	"	83,33%.
16	"	"	"	"	100%.
18	"	"	"	"	100%.
20	"	"	"	"	100%.
24	"	"	"	"	100%.

Solución F (Pancreatina + Bilis de perro en solución de Hank).

A la media hora se obtiene el 25%.

1	"	"	"	"	58,33%.
2	"	"	"	"	58,33%.
3	"	"	"	"	58,33%.
16	"	"	"	"	100%.
18	"	"	"	"	100%.
20	"	"	"	"	100%.
24	"	"	"	"	100%.

Solución G (Tripsina + Bilis de perro en solución BSS lavadora).

A la media hora no se obtiene desenvaginación.

1	"	"	"	"	"
2	"	"	"	"	"
3	"	se obtiene el 16,6%.			
16	"	"	"	"	83,33%.
18	"	"	"	"	83,33%.
20	"	"	"	"	100%.
24	"	"	"	"	100%.

Solución H. Desenvaginante completa. (Tripsina + Pancreatina + Bilis en sol. BSS lavadora).

A la media hora se obtiene el 100% de desenvaginación.

4.2.6.- RESULTADOS SIN TRATAMIENTO PREVIO CON PEPSINA.

Para comprobar la influencia del tratamiento previo con pepsina realizamos experiencias con las mismas soluciones desenvaginantes anteriores, pero sin dicho tratamiento pépsico-clorhídrico.

Solución A.- No aparece desenvaginación a las 24 horas.

Solución B.- No aparece desenvaginación a las 24 horas.

Solución C.- No aparece desenvaginación a las 24 horas.

Solución D.- No aparece desenvaginación a las 24 horas.

Solución E.- A la media hora, 0

1	"	0
2	"	0
3	"	8,3%.
16	"	58,3%.
18	"	66,6%.
20	"	66,6%.
24	"	66,6%.

Solución F.- A la media hora, 0

1	"	0
2	"	0
3	"	41,66%.

Continuación Solución F.

A las 16 horas,		66,6%.
18 "		66,6%.
20 "		66,6%.
24 "		66,6%.

Solución G.- A la media hora, 0

1 "		0
2 "		0
3 "		44,4%.
16 "		58,33"
18 "		63,88%.
20 "		66,66%.
24 "		66,66%.

Solución H.- A la media hora, 0

1 "		0
2 "		0
2,5 "		16,6%.
3 "		41,66%.
16 "		66,66%.
18 "		66,66%.
20 "		66,66%.
24 "		66,66%.

Foto n°8. Gráfica del efecto de la temperatura de almacenaje en la desenvaginación *in vitro* de *Cisticercus tenuicollis*.

Foto n° 9. Gráfica del efecto del tiempo de almacenaje en la desenvaginación *in vitro* de *Cisticercus tenuicollis*.

Foto n°10. Gráfica del efecto del pH en la desenvaginación
in vitro de *Cisticercus tenuicollis*.

Foto n°11. Gráfica del efecto del O₂ disuelto en la solución
desenvaginante sobre la desenvaginación *in vitro*
de *Cisticercus tenuicollis*.

RESULTADOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS ENZIMAS

Foto n°12. Gráfica del efecto de las diferentes enzimas presentes en la solución desenvaginante sobre la desenvaginación *in vitro* de *Cisticercus tenuicollis*.

Foto n°13. Gráfica del efecto en la desenvaginación *in vitro* de *Cisticercus tenuicollis*, sin previo tratamiento péptico.

4.3.- RESULTADOS SOBRE EL CULTIVO IN VITRO DE T. HYDATIGENA.

Experiencia n° 1

El origen de los cisticercos fue la cavidad peritoneal de caprinos.

Pretratamiento consistente en:

- a.) Lavado con alcohol de 70° 2 minutos.
- b.) Lavado en solución de Hank.
- c.) Digestión 1% pepsina (pepsina 1:10.000 Merck) pH = 2; 1 hora.
- d.) Lavados en solución de Hank.
- e.) Solución desenvaginante (tripsina 0,1; pancreatina 0,3; taurocolato sódico 0,01% en solución BSS lavadora).

Medio de cultivo: MTH, 1 a pH 7,4 inicial.

Fase sólida: Agar más suero (1:1)

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Esta experiencia se repitió cuatro veces con un total de 20 ejemplares. Se emplearon frascos Sorvivel 18.

Sobrevivieron 37 días, solamente un ejemplar desprendió la masa del cisticerco, no mostrando signos de evolución. Se observaron zonas oscuras en la fase sólida, por los sitios donde permanecían o habían permanecido los escolex.

Experiencia n° 2

El origen de los cisticercos fue idéntico a la experiencia anterior.

Pretratamiento, también el mismo.

Medio de cultivo: MTH - 2; pH 7,2 inicial.

Fase sólida: suero equino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Se emplearon 25 ejemplares, repitiéndose cinco veces la experiencia. Se emplearon frascos Sorvivel 18.

La masa del cisticercos se desprendió en un 30% de los casos, a las 48 horas de cultivo. En aquellos ejemplares en los que se desprendió la masa, la región del escolex mostró, a los once días, la aparición de canales excretores. El tamaño máximo logrado fue de 4 mm. a los 19 días.

Experiencia n° 3

El origen de los cisticercos fue la cavidad peritoneal de ovinos. Se emplearon cisticercos almacenados en nevera 5 días, a 4°C, al objeto de emplear para el cultivo aquellos que lograron evaginar por considerarlos con mayor grado de viabilidad.

a.) El pretratamiento empleado fue: lavado en alcohol

de 70° durante 2 minutos.

b.) Disección.

c.) Digestión péptica (Pepsina 1:10.000 Merck) 1% a pH 1,9 durante 1 hora.

d.) Lavados.

e.) Desenvaginación: Tripsina 0,1%; Pancreatina 0,3%; Taurocolato 0,01% en solución lavadora, a pH 7,2 inicial.

f.) Medio de cultivo: MTH - 3, a pH 6,8 inicial.

g.) Fase sólida: suero equino coagulado 80°C - 50 minutos.

h.) Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90% (SEO).

A las 18 horas en solución desenvaginante y base sólida, los cisticercos pierden la masa posterior del cisticerco en un 32%. Se emplearon 25 cisticercos en cinco experiencias. En cada frasco, Sorvivel 18, se pusieron 2 cestodes y en uno de ellos sólo uno.

A las 48 horas, aparecen vesículas en la región del escolex. Estas vesículas se mantuvieron hasta el día 12° en que aparecieron muertos los escolex con infinidad de ellas en el interior y en la cutícula.

Experiencia n° 4

Los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ovinos.

El pretratamiento y el medio de cultivo fueron idénti-

cos a los de la anterior experiencia.

En este caso, una vez alargado el cuello del cisticerco, fue cortado a nivel de 2 mm. del escolex, a las 48 horas de puestos en solución desenvaginante; colocándose, inmediatamente, en medio de cultivo.

A los 4 días aparecen muy activas. Tras 6 días de cultivo muestran unas zonas, como flecos, que salen de la región del corte. A los 11 días aparecen muertas y con abundantísimos flecos; no muestran evolución.

Experiencia nº5

Cisticercos procedentes de la cavidad peritoneal de cabras fueron tratados de igual manera que en la experiencia anterior.

Como fase líquida de medio de cultivo se empleó el MTH - 3, a pH 6,8 inicial.

Como fase sólida se empleó:

Suero equino (Llorente)	5/ml.
Sangre de perro (Gibco)	0,1/ml.
Solución desenvaginante (Tripsina-Pancreatina-Taurocolato sódico en BSS lavadora).	

Todo ello coagulado a 80°C durante 90 minutos.

Como fase gaseosa se empleó: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A las 18 horas aparece el 40% que han perdido la masa posterior al cuello.

A las 36 horas aparecen todas muertas.

Experiencia n° 6

Los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ovinos, siendo almacenados en nevera a 4°C, durante 3 días.

Se realizaron cinco experiencias, con un total de 30 ejemplares.

El pretratamiento consistió en lavado en alcohol de 70° durante 2 minutos, tras ello la disección y el lavado en Hank a un pH de 7,2.

Digestión péptica (Pepsina 0,1% 1:10.000 Merck), a pH 1,4, durante 45 minutos.

Lavado en solución de Hank a pH 7,2.

Solución desenvaginante: Tripsina 0,1% P/V. Pancreatina 0,3% P/V. Taurocolato sódico 0,01% P/V, en solución BSS lavadora a pH 7,2 durante 18 horas.

El medio de cultivo fue: MTH - 4, como fase líquida.

Como fase sólida se empleó: suero equino (Llorente) coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Un 12% perdieron la masa del cisticerco.

Sobrevivieron 40 días, en ningún caso mostraron evolución.

Experiencia n° 7

Los cisticercos, procedentes de la cavidad abdominal de cabras, fueron mantenidos un día a 4°C antes de su preparación.

Tras el lavado en alcohol de 70° (2 minutos), fueron disectados lavándose posteriormente en solución de Hank a pH 7,2.

La digestión péptica se realizó con solución de Pepsina 0,1% P/V (1:10.000 Merck), pH 1,4, una hora 35 minutos, lavado en Hank, pasándose a la solución desenvaginante A, donde se mantuvieron por espación de 18 horas.

Medio de cultivo: MTH - 4, pH 7,1.

Fase sólida: Huevo total coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A los dos días en medio líquido y fase sólida, aparecen sin la masa del cisticerco el 70%; se retiraron las masas, dejando, únicamente, los excolex en el medio.

Al 6º día aparecen muertas por contaminación.

Se emplearon en esta experiencia un total de 10 cisticercos.

Experiencia nº 8

Repetimos exactamente la experiencia con 20 cisticercos del mismo origen, procediéndose para su pretratamiento exactamente a la experiencia anterior.

El medio de cultivo y la fase sólida fueron idénticas a la experiencia anterior.

A los 3 días aparece el 80% libres de la masa del cisticerco.

Tras 8 días de cultivo crecen visiblemente, con tamaños que oscilan entre 4 - 6 mm.

A los 13 días, aparecen algunas con bandeado acusado.

A los 14 días, empiezan la mayoría a mostrar signos de degeneración con el escolex "hinchado".

A los 24 días, siguen vivas, con escolex anormales y bandeado acusado.

A los 30 días, empiezan a aparecer burbujas en la cutícula.

A los 47 días, degeneran y mueren.

Experiencia n° 9

Los cisticercos procedían de la cavidad peritoneal de caprinos. Fueron almacenados durante 2 días a 4°C.

El pretratamiento fue idéntico al de la experiencia anterior, solámente se cambió el tiempo de la digestión pépsica, que fue 1 hora.

El medio de cultivo fue el MTH - 4.

Fase sólida: huevo total coagulado (90°C - 90 minutos)

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A los dos días de colocados los 18 cisticercos en el medio de cultivo, separaron de su masa un 50%. El resto, y las masas ya eliminadas, fueron desechadas.

Los escolex, en ningún momento, se introdujeron en la base sólida. A los 34 días no mostraban evolución, por lo que el cultivo se desechó.

Experiencia n° 10

Se repitió la experiencia anterior exactamente, salvo en la fase sólida que fue preparada con huevo total coagulado a 80°C, durante unos 60 minutos.

Los 12 cisticercos, a las 48 horas de colocados, se liberan de la masa del cisticerco el 41,66%, colocándose las masas libres de los escolex, junto con los no separados, en otros frascos en idénticas condiciones.

A los 10 días de cultivo aparecía, en la zona del cuello de una de las masas de los cisticercos, sin escolex, una zona aplanada, quizá foliácea.

A los 20 días aparece bandeo en la zona foliácea de la masa antedicha.

Día 20 de cultivo. Aparece bandeo en el cuello de dos de los escolex aislados.

Días 30, aparecen burbujas en las cutículas.

Día 40 de cultivo, las burbujas ocupan, prácticamente la totalidad de los escolex aislados.

A los 43 días, aparecen muertos los escolex aislados. Las masas de cisticercos con zona filiciácea, las sacrificamos para teñirlas. No se aprecia más evolución que bandeo.

Experiencia n° 11

Los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de caprinos.

Fueron lavados y disectados según procedimientos habituales.

La disección péptica se realizó con pepsina (1:10.000 Merck), al 1% a pH 2, durante media hora.

Tras la digestión péptica se lavaron y colocaron en solución desvaginante A, como en las anteriores experiencias.

Se han comparado paralelamente los medios líquidos MTH - 4, y MTH - 5.

Como fase sólida se empleó huevo total, coagulado.
Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Se emplearon 20 cisticercos distribuidos en frascos Sorvivel 18.

A) Medio MTH - 4

A los 4 días sueltan la masa del cisticerco.

A los 12 días se les aprecia crecimiento.

A los 14 días aparece, en dos de ellas, bandeó.

A los 17 días se les aprecia burbujas y escolex anormales, muy hinchados.

A los 19 días se sacrifican por poseer abundantísimas burbujas cuticulares.

B) Medio MTH - 5.

A los 3-4 días sueltan la masa del cisticerco.

A los 12 días se aprecia en ellas bandeo.

A los 24 días se les aprecia crecimiento abundante unos 4-6 mm.

A los 30 días las sacrificamos y teñimos, no mostrados más evolución que el bandeo, aunque, quizá, éste muy intenso.

Experiencia n° 12

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad peritoneal de cabras, manteniéndose en nevera a 4°C un día antes de su preparación.

Tras la desinfección, disección y lavados habituales, los cisticercos fueron tratados con solución de pepsina (1:10.000 Merck) al 1% a pH 1,9, durante 30 minutos. A continuación, fueron lavados como en las anteriores experiencias y transferidos a solución desvaginante A, donde se mantuvieron por espacio de 18 horas.

Medios de cultivo: MTH - 4 y MTH - 5.

Bases sólidas se emplearon: suero equino coagulado 80°C, 70 minutos. Huevo total coagulado 80°C, 80 minutos.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Se emplearon un total de 30 cisticercos.

MTH - 4 más huevo coagulado.

Al 3º día, todas aparecen sueltas de la masa del cisticerco.

Al 7º día no se aprecia evolución.

Al 10º día muertas.

MTH - 5 más huevo coagulado.

Al 4º día aparecen todos libres de la masa del cisticerco.

Al 10º día aparece, en el cuello de la masa, libre del escolex, una zona aplanada foliácea.

Al 19º día en los escolex libres se aprecia crecimiento, unos 5 mm.

Al 35º día se sacrifica el cultivo, miden unos 6 mm., no se aprecia evolución.

MTH - 4 más suero coagulado.

Al 5º día se aprecian los escolex libres de la masa.

Al 12º día se aprecia crecimiento, miden unos 6 mm.

Al 30º día se sacrifican los cultivos, no se aprecia más que un ligero bandeo.

MTH - 5 más suero coagulado.

Al 5º día se observan los escolex libres de la masa del cisticerco.

Al 12º día miden unos 6 mm., hay ligerísimos inicios de bandeado.

Al 30º día, se sacrifican los cultivos para tinción; aparece la misma evolución del día 12º.

Experiencia nº 13

Veinte cisticercos procedentes de la cavidad peritoneal de ovinos, fueron mantenidos durante un día a 4°C en nevera.

Fueron tratados en todo el proceso como en la experiencia anterior.

El medio de cultivo empleado fue MTH - 5.

Como fases sólidas se utilizaron:

5 ml. clara de huevo coagulada (80°C - 60 minutos).

5 ml. clara de huevo - 0,1 ml. de sangre de perro, coagulado todo ello a 80°C - 60 minutos.

3 ml. clara de huevo - 2ml. suero equino coagulado

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Clara de huevo mas suero (como fase sólida)

A los 3 dias se desprenden los escolex de la masa del cisticerco. Se eliminan las masas, dejándose en el frasco únicamente los escolex.

A los 32 dias no se aprecia evolución, sacrificándose al cultivo. Miden unos 6 mm.

Clara de huevo (como fase sólida)

A los 3 dias se desprenden los escolex de sus respectivas masas.

A los 17 dias miden algunas de ellas cerca de los 7 mm.

A los 19 dias se visualizan, cerca del escolex, los canales excretorios.

A los 20 dias se aprecia ligero bandeo. Los canales excretorios se aprecian mejor y más largos.

A los 32 dias sacrificamos el cultivo. No se aprecia mayor evolución de la observada el día 20.

Clara de huevo mas sangre (como fase sólida)

Al 4º día se separan las masas de los escolex.

Al 17º día se aprecian, cerca del escolex, los canales excretorios laterales.

Al 27º día se sacrifican para tinción; aparece bandeo. Miden, como máximo, 15 mm. Algunas se hallan fraccionados en dos y tres trozos con los escolex degenerados.

Experiencia n° 14

Cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de cabras fueron mantenidos durante un día en nevera a 4°C, procediéndose para su lavado, disección, etc., como es habitual.

La digestión péptica se realizó en solución de pepsina (1:10.000 Merck) al 1%, pH 1,5, durante 45 minutos.

Tras la digestión péptica, se lavaron y sumergieron en solución desenvaginante A.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 5, ajustado a pH 7,1.

Como fase sólida se empleó clara de huevo - E.E. Pollo

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

El número de cisticercos empleados fue de 20.

Al 2º día se separa el 85% de las masas de los escolex. Los escolex se pasan a nuevo frasco.

Al 8º día se observa crecimiento, midiendo la mayoría entre 4 y 5 mm.

Al 10º día se aprecian los canales excretorios.

Al 11º día aparece bandeado.

Al 25º día se sacrifican, apareciendo grandemente deformados. No se aprecia en la tinción más que bandeado y miden 16 mm.

Experiencia n° 15

Cisticercos procedentes de la cavidad peritoneal de cabra fueron tratados de igual manera a la experiencia anterior.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 6.

Como fase sólida se empleó clara de huevo mas E.E.P.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Se emplearon 13 cisticercos. El segundo día de la siembra se separa la masa del escolex en el 84,6%, eliminándose las masas libres de los escolex y aquellos otros que no habian llegado a separarse.

El día 25° se sacrificaron los cultivos para tinción, encontrándose ejemplares de 12 mm. muy deformados y con pseudosegmentación.

Experiencia n° 16

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de ovinos, empleándose un total de 20 cisticercos, que se mantuvieron en nevera a 4°C por espacio de 24 horas.

Para el lavado, disección, etc, se procedió de forma habitual, empleándose para la digestión péptica, Pepsina

(1:10.000 Merck) al 1% a pH 1,7, durante 60 minutos. Lavándose en Hank para arrastrar el ácido y pepsina. A continuación, se sumergieron los cisticercos en solución desenvaginante A, en donde permanecieron 18 horas.

De los 20 cisticercos se desenvaginaron, a las 18 horas, 13 (65%), y de éstos, 8 aparecieron con abundantes burbujas en la cutícula.

Los medios empleados fueron: MTH - 5 y MTH - 6, ajustado a pH 7,2.

Como fase sólida se empleó: clara de huevo E.E.P. - Testosterona.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Medio MTH - 5

Al 3º día se separaron las masas de los cisticercos en los 6 cisticercos de este lote.

Al 7º día se les aprecia crecimiento, miden entre 4 - 5 mm.

Al 10º día se aprecia, en dos de ellas, bandeo.

Al 16º día sacrificamos el cultivo por tener indicios de contaminación, se aprecia considerable crecimiento, con máximo de 17 mm. En dos de ellas se aprecia bandeado.

Medio MTH - 6

Al 3º día aparecen separadas las masas del cisticerco

en los 7 ejemplares de este lote.

Al 6º día miden unos 6 mm.

Al 8º día se aprecia aplanada la región del cuello y canales excretores. Los corpúsculos calcáreos se pierden en parte. En la región terminal se aprecia una formación a modo de muñón.

Al 12º día miden entre 9 y 12 mm.; aparece el bandeo.

Al 13º día miden entre 10 y 14 mm. Se aprecia un crecimiento anárquico.

Al 16º día se sacrifican los cultivos por mostrar indicios de contaminación. Se aprecia comienzos de segmentación anárquica.

Experiencia nº 17

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de cabras, manteniéndose durante 24 horas a 4°C.

El número empleado en total fue de 20 cisticercos.

El pretratamiento consistió en desinfección en alcohol de 70°, durante 2 minutos.

Disección: una vez sacada la vesícula del cisticerco de 10 cisticercos de la pared periquística, se procedió a vaciarla e introducirla en una batidora marca "Turmix", en la que, en su interior, existían 50 ml. de pepsina (1:10.000) 0,5%, pH 1,8 a 38°C, donde se batieron por espacio de 5 segun-

dos, manteniéndose el conjunto por espacio de una hora 10 minutos en agitación y a 38,9°C.

Con los otros restantes se siguió la técnica habitual con una digestión péptica, sin trituración, pero con la misma concentración, pH y tiempo antes expresado.

Después del lavado en solución de Hank, se introdujeron los dos lotes por separado en solución desenvaginante C, donde se mantuvieron 18 horas. Una vez desenvaginados, se transfirieron a frascos Sorvivel 22, donde, previamente, se había coagulado suero bovino. Como fase líquida se empleó la solución desenvaginante C.

A las 24 horas aparecen separadas las masas de los escolex en el 70% de los ejemplares.

A las 48 horas se completa el 100%.

La experiencia quedó interrumpida aquí, al comprobarse contaminación en siembra de Agar-Sangre.

Experiencia n° 18

Los cisticercos empleados en esta experiencia procedían de la cavidad abdominal de ovinos, almacenándose durante 24 horas a 4°C.

El pretratamiento fue idéntico a la experiencia anterior. El número de cisticercos empleado fue de 10.

El medio de cultivo empleado fue: MTH - 4. El pH del medio fue 7,3.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Fase sólida: suero bovino coagulado.

Al 3º día, se separan de las masas.

Al 7º día aparece bandeado.

Al 8º día miden entre 4 y 6 mm.

Al 12º día, bandeado intenso, inicios de segmentación.

Al 15º día, sacrificamos el cultivo. Se observa que no pasan del anterior estadio.

Experiencia nº 19

Los cisticercos empleados fueron 20, procedentes de la cavidad abdominal de ovinos.

El pretratamiento fue idéntico a la anterior experiencia.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 4, ajustado a pH variable: 5,8 - 6 - 6,7 - 7,3; cambiando el medio cada tres días y asimismo el pH. El objeto fue imitar, hasta cierto punto, las variaciones del pH que, según FEATHERSTON (1969) (33) sufren los escolex en su traslado a lo largo del tracto intestinal del perro *in vivo*.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Al 3º día se cambian los escolex a nuevos frascos. Todos están libres de sus respectivas "masas".

Al 6º día aparecen 5 de ellas muy rígidas.

Al 10º día se encuentran los escolex muy hinchados y vesiculosos.

Al 12º día mueren. No se aprecia mayor evolución.

Experiencia nº 20

Los 10 cisticercos empleados en esta experiencia procedían de la cavidad peritoneal de ovinos. Fueron mantenidos durante dos horas a 4°C.

El pretratamiento y digestión péptica fue idéntico a la experiencia anterior.

Como solución desengainante se empleó jugo duodenal canino, previamente centrifugado a 2000 g. durante 10 minutos y ultrafiltrado. Cuatro partes de este ultrafiltrado mezcladas con una parte de medio MTH - 8 y a pH igual a 6,2.

A las 20 horas estaban todas desengainadas, pero no habían completado la fase de alargamiento del cuello.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 8, con con-

centraciones variables de jugo duodenal, 4:1; 4:2; 4:3; 4:4, cambiándosele, sucesivamente y en este orden, cada tres días.

Fase sólida: se empleó, en frascos Sorvivel 20, una base casi horizontal de suero bovino coagulado a 80°C durante 60 minutos, sobre el cual se colocó papel de celofán estéril y perforado con diminutos orificios, según técnica de HSU y KELOGG (1960) (48), para explantes de piel.

La fase gaseosa fue: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

La observación se hizo difícil. A partir del 21º día se dejó de cambiar el medio. Se observó al día 56 un bandeó acusado. El día 66º se sacrificó, viéndose sólomente inicio de segmentación, y una longitud de 10 - 11 mm.

Experiencia nº 21

Los 17 cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de ovinos. Se mantuvieron 2 horas a 4°C antes de su preparación.

El pretratamiento consistió en lavado, disección etc., en la forma habitual. La digestión péptica se realizó con pepsina 0,5% (1:10.000 Merck), pH 1,9, una hora y 10 minutos. Tras la digestión péptica fueron lavados en Hank y tratados con solución desenvaginante C, donde se mantuvieron durante 18 horas.

Para la fase de separación de las "masas" se procedió

con solución desenvaginante C y suero bovino coagulado, obteniéndose a los 3 días 94,11% de separación de las "masas".

Como medio de cultivo se empleó MTH - 7 a pH igual a 7,2.

Fase sólida: suero bovino coagulado más Hematies lisados.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 4º día aparecen burbujas en las cutículas, mostrándose vesiculariformes. No se prosigue el cultivo.

Experiencia n° 22

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de ovinos, siendo mantenidos, los 10 ejemplares utilizados, durante 3 horas a 4°C.

El sistema de lavado y disección fue el habitual. Siguiéndose para la digestión péptica el tratamiento, durante una hora y 10 minutos, con pepsina 0,5% (1:10.000 Merck), a pH de 1,9. Tras la digestión fueron lavados con Hank a pH de 7,2, con objeto de arrastrar el exceso de ácido, tras lo cual fueron transferidos a la solución desenvaginante B.

Una vez desenvaginados, fueron transferidos a frascos Sorvivel con suero bovino coagulado, y, como fase líquida, so-

lución desenvaginante B - (3 partes) más medio de cultivo (1 parte).

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 9.

Fase sólida: suero bovino más lisado de Hematíes, coagulado a 80°C, durante 60 minutos.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 3º día del tratamiento enzimático, se pasaron los escolex libres al medio de cultivo.

Al 7º día aparece bandeado.

Al 11º día sacrificamos el cultivo, no apreciándose mayor evolución de la aparecida al 7º día.

Experiencia n° 23

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de ovinos. Fueron mantenidos, durante dos horas, a 4°C. Como pretratamiento se siguió el mismo de la experiencia anterior.

Una vez separados, espontáneamente, de sus respectivas "masas", los escolex fueron pasados al equipo de filtración Milipore XXII-04700, acondicionado al efecto, tal como se describe en Material y Métodos.

En él se colocó medio MTH - 9. Durante el cultivo se

hacía burbujear constantemente CO₂ 10%; N₂ 90%, mientras que, por la parte inferior del aparato, se hacía pasar una corriente continua de CO₂ 10%; N₂ 85% y O₂ 5%.

Al tercer día de colocarlas se observó una fuerte contaminación. Se abrió, comprobándose que aparecían muertas.

Experiencia n° 24

Se repitió la experiencia anterior, colocándole al medio Penicilina 100 UI/ml., Estreptomycin 100 mg./ml. y 100 mg./ml. de Micostatin.

A pesar de los antibióticos, aparecieron altamente contaminadas y muertas al 4° día.

Experiencia n° 25

Se partió de 10 cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de ovinos, mantenidos dos horas a 4°C. Se procedió a lavar los cisticercos con una solución de Armil 1:5.000, durante 90 segundos, como lavado previo al de alcohol de 70°.

Para su disección, digestión, desenvaginación y rotura, se siguió el procedimiento descrito en las anteriores experiencias.

El medio de cultivo empleado fué el MTH - 10, con

pH variable, variándolo de la forma siguiente: para el primer día pH = 3,5; el tercer día pH = 4; el 5° día pH = 5; el 8° día pH = 6; el 10° día pH = 6,8.

Como fase sólida se empleó Agar más sangre.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%. El frasco empleado fue Falcon de 25 cm².

Al 3° día del tratamiento enzimático se pasan al medio de cultivo.

Al 4° día se aprecian activas y, quizás, con un cierto crecimiento.

Al 5° día se les aprecia rígidas.

Al 7° día aparecen vesiculosos los escolex, muy poco activos.

Al 10° día sacrificamos para tinción ya que no se apreciaba actividad.

Experiencia n° 26

Los 13 cisticercos empleados en esta experiencia procedían de la cavidad abdominal de caprinos y ovinos indistintamente. Fueron mantenidos, antes de su preparación, dos horas a 4°C.

Los lavados y pretratamiento, en general, fue idéntico al de las anteriores experiencias.

Los cisticercos, una vez desenvaginados, fueron pasados a frascos Sorvivel 20, donde, previamente, habian sido coagulados 5 ml. de suero bovino a 80°C, durante 60 minutos. Como fase líquida se empleó medio MTH - 11 mas solución desenvaginante B (1:1). A las 36 - 48 horas, el 100% habian separado los escolex de la "masa", transfiriéndose, sólo los escolex, a frascos Falcon de 25cm² con el siguiente medio:

Medio de cultivo: MTH - 11 (con extracto de levadura "Oxoid") a pH = 7,1.

Fase sólida: suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85% y O₂ 5%.

A los 6 días de iniciado el tratamiento enzimático, se aprecia ondulación de canales excretorios.

Al 7º día miden 10 mm. de media, oscilando entre 8 - 12 mm.. Asimismo se aprecia bandeado interno.

Al 9º día se inicia la segmentación (Estrobilación).

Al 11º día se aprecia la formación de agregados celulares en el interior de los anillos.

Al 13º día comienza la formación del velum de los anillos.

Al 15º día se fisura espontáneamente el frasco del cultivo.

Al 16º día mueren por contaminación. Miden unos 25 mm. de media, con máximo de 36 y mínimo de 14 mm.

Experiencia n° 27

Los cisticercos empleados procedían de caprinos y ovinos indistintamente. Fueron empleados 12 cisticercos. El pretratamiento fue, en todo momento, idéntico al anterior.

El medio de cultivo empleado fue: MTH - 11 (con extracto de levadura "Difco") a pH = 7,1.

Los frascos, fase sólida, fase gaseosa, etc, fueron idénticos a los de la experiencia anterior.

A los 6 días, se aprecia un crecimiento con respecto a los tamaños iniciales (unos 4 mm.).

Al 7º día se observa, a lo largo del cuello, condensaciones celulares transversales (bandeo).

Al 10º día se aprecia bandeo intenso.

Al 15º día se sacrifican los cultivos. No se aprecia más evolución que bandeo intenso. El tamaño era de 10 mm. de media.

Experiencia n° 28

Cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de caprinos fueron empleados para esta experiencia. El número total utilizado fue de 11, mantenidos, durante dos horas, a 4°C.

El pretratamiento fue idéntico a las experiencias anteriores.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 11 (con extracto de levadura "Oxoid"), a pH = 7,1.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado en un frasco Falcon 25 cm².

Como fase gaseosa se empleó CO₂ 10%; N₂ 85% y O₂ 5%.

Al 3º día después del tratamiento se siembran los 11 escolex, libres ya de las "masas, en tres frascos Falcon.

Al 4º día se aprecian visibles los canales excretores.

Al 7º día aparece "bandeado".

Al 8º día comienzo de segmentación.

Al 9º día los canales excretores parecen unidos en la región posterior.

Al 10º día miden unos 12 mm. de media, con tamaños que oscilan entre 15 mm. y 8 mm.

Al 16º día parece formarse la vesícula excretora terminal.

Al 19º día miden de longitud media unos 20 mm., con tamaños que oscilan entre 13 y 25 mm. Se aprecian formaciones celulares en el interior de los anillos, correspondientes a formación de los inicios genitales femenino y masculino.

Al 20º día se observa, claramente, el abultamiento precursor del poro genital que se aprecia aún cerrado.

Al 22º día miden unos 25 mm., con tamaños que oscilan entre 29 y 20 mm.

Al 23º día sacrificamos el cultivo para tinción.

Experiencia nº 29

Se ha partido de cisticercos procedentes de ovinos y caprinos. Los 8 cisticercos, antes de su preparación, fueron mantenidos, durante 2 horas, a 4°C.

El pretratamiento fue idéntico al de la experiencia anterior.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 11 con extracto de levadura "Oxoid", por olvido se omitió inactivar el suero fetal.

Como fase sólida: suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Tras la rotura se pasaron los escolex aislados a frascos de cultivo Falcon 25.

Se apreció, desde el primer momento, una tendencia a agregarse unos escolex con otros por la región terminal, justo por la región "no cicatrizada" por donde se efectuó la rotura.

A los 12 días no se aprecia evolución, aunque sí se les aprecia un cierto crecimiento. Miden entre 4 y 6 mm.

A los 14 días se suspende el cultivo por no haber evolución.

Experiencia n° 30

En esta experiencia se comprueba el efecto de la ausencia de base sólida en diferentes medios, sobre el desarrollo de *T. hydatígena*.

Se emplearon 12 cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de caprinos y ovinos.

El pretratamiento, antes de su puesta en cultivo, consistió en el habitual para las experiencias números 26 a 29.

Los medios probados fueron: MTH - 11; MTH - 12; MTH - 13.

Como fase gaseosa se empleó mezcla de CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Medio MTH - 11

Al 3° día son sembrados en el medio.

Al 4° día muestran actividad normal.

Al 5° día aparecen menos activas que el día anterior.

Al 6° día aparecen con escolex vesiculosos.

Al 7° día aparecen inmóviles y muertas, no se aprecia evolución.

Medio MTH - 12

Al 3° día, siembra.

Al 4º día, los escolex se muestran vesiculosos.

Al 5º día, aparecen rígidas y muertas dos de ellas.

Al 6º día, aparecen muertas el resto.

Medio MTH - 13

3º día, se siembran en los frascos de cultivo.

A las 84 horas aparecen con los escolex vesiculosos.

Al 4º día aparecen rígidas y muertas.

Experiencia nº 31

Se compran los medios MTH - 11; MTH - 12; y MTH - 13 con base sólida de suero bovino coagulado. Para ello se emplearon 12 cisticercos pretratados, antes de su siembra, como en las anteriores experiencias.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Medio MTH - 13

3º día, siembra.

5º día, comienzan a crecer, miden unos 5 mm. de media.

8º día, se muestran algo rígidas, aunque activas. Se visualizan los canales excretores ondulados.

10º día, bandeado.

12º día, segmentación.

15º día, sacrificamos el cultivo para tinción.

Medio MTH - 12

3º día, siembra.

6º día, miden 5 mm.

7º día, se aprecian los canales excretores ondulantes.

9º día, bandeado avanzado.

11º día, segmentación iniciada.

13º día, formación del estróbilo y velum.

15º día, sacrificamos el cultivo para tinción, no habiendo mayor evolución.

Medio MTH - 11

3º día de la digestión, siembra.

4º y 7º día, visualización de canales.

6º y 8º día, ondulación de canales, 4 a 5 mm.

8º y 10º día, bandeado. Miden 10 - 12 mm.

10º y 13º día, segmentación. Miden 16 mm. de media.

21º y 23º día, primordios genciales formados, velum, poro genital cerrado; 25 - 35 mm. de longitud.

32º día sacrificamos para tinción, no habiendo mayor evolución de la observada el día 23.

Experiencia nº 32

Se comprueba en esta experiencia la eficacia de otros sueros coagulados: suero rata, suero de caballo.

Se emplearon 10 cisticercos de la cavidad abdominal

de caprinos y ovinos, procediéndose para su preparación de la misma forma que en las anteriores experiencias.

Se siembran a los 3 días, empleándose como medio el MTH - 11.

Como fase gaseosa se empleó, CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Medio MTH - 11 mas suero de rata (Gibco) coagulado.

4-5 días, canales excretorios visualizados.

5-7 días, canales excretorios ondulantes.

10-12 días, bandeado.

12-14 días, segmentación iniciada.

22 días, se sacrifican, mostrando idéntica evolución a la fase anterior.

Medio MTH - 11 más suero de caballo (Llorente) coagulado.

5-6 días, canales excretorios.

7-8 días, ondulación de canales.

10-13 días, bandeado.

12-16 días, segmentación iniciada.

22 días, se sacrifican, mostrando idéntica evolución que en anterior período.

Experiencia n° 33

Se emplea como base sólida Agar-Suero. Como medio de cultivo MTH - 11. Fase gaseosa CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%. Se parte de 12 cisticercos, procediéndose para su almacenamiento, disección, digestión y forma de eliminación de la masa cisticercal, de igual forma que en las precedentes experiencias.

A los 3 días se pasan a los frascos de cultivo.

7° día, se visualizan los canales excretores con ligera ondulación.

10° día, canales excretores visibles y ondulantes.

13° día, se observa inicio de bandeado.

23° día, se sacrifica el cultivo; no se aprecia más evolución que bandeado.

Experiencia n° 34

Se parte de 10 cisticercos procedentes de caprinos y ovinos. Para su preparación se procedió con igual metodología que en las anteriores experiencias.

El medio empleado fue el MTH - 11.

Fase sólida: Suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 3° día se siembran en los frascos.

Al 2° - 4° día de la desenvaginación se visualizan los canales, miden 4 mm, de longitud media.

ESTADIO:

2

3

4

5

6

7

ROTURA

CANALES

ONDULACION

BANDEADO

SEGMENTACION

INICIO

EXCRETORES

CANALES

GENITAL

Dias

1-3

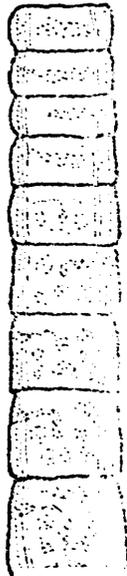
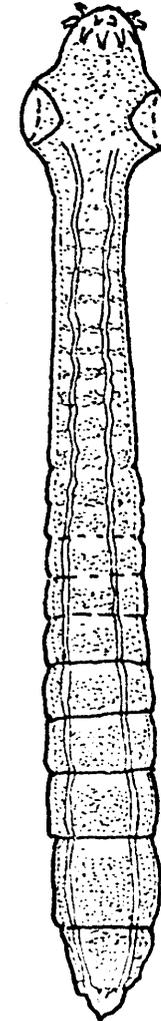
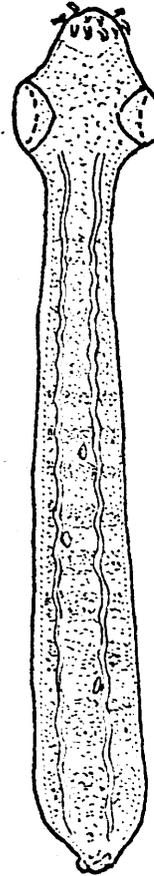
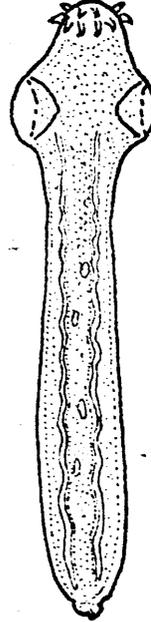
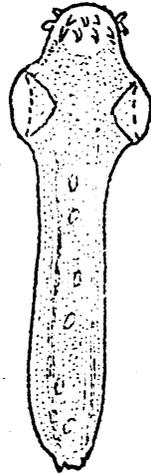
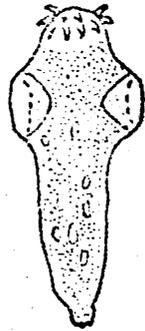
2-4

3-5

5-7

7-10

12-20



DESARROLLO

"in vitro" de *T. hydatigena*

EXPERIENCIAS

PROPIAS

Al 3°- 5° día, ondulación de canales; 4-5 mm. de longitud.

5°- 7° día, bandeado; 10-12 mm. de longitud.

Al 7°- 10° día, segmentación; 15-16 mm. de longitud.

Al 12°- 15° día, formación del velum.

Al 18°- 20° día, se observan condensaciones celulares en el interior de los anillos. Presencia de poro genital cerrado; 25-35 mm. de longitud.

Al 35° día, 35 - 40 mm. de longitud.

Al 40° día, se sacrifican para tinción y estudio microscópico posterior.



GRAFICA COMPARATIVA DEL
 DESARROLLO "IN VIVO" E "IN VITRO"
 DE T. HYDATIGENA

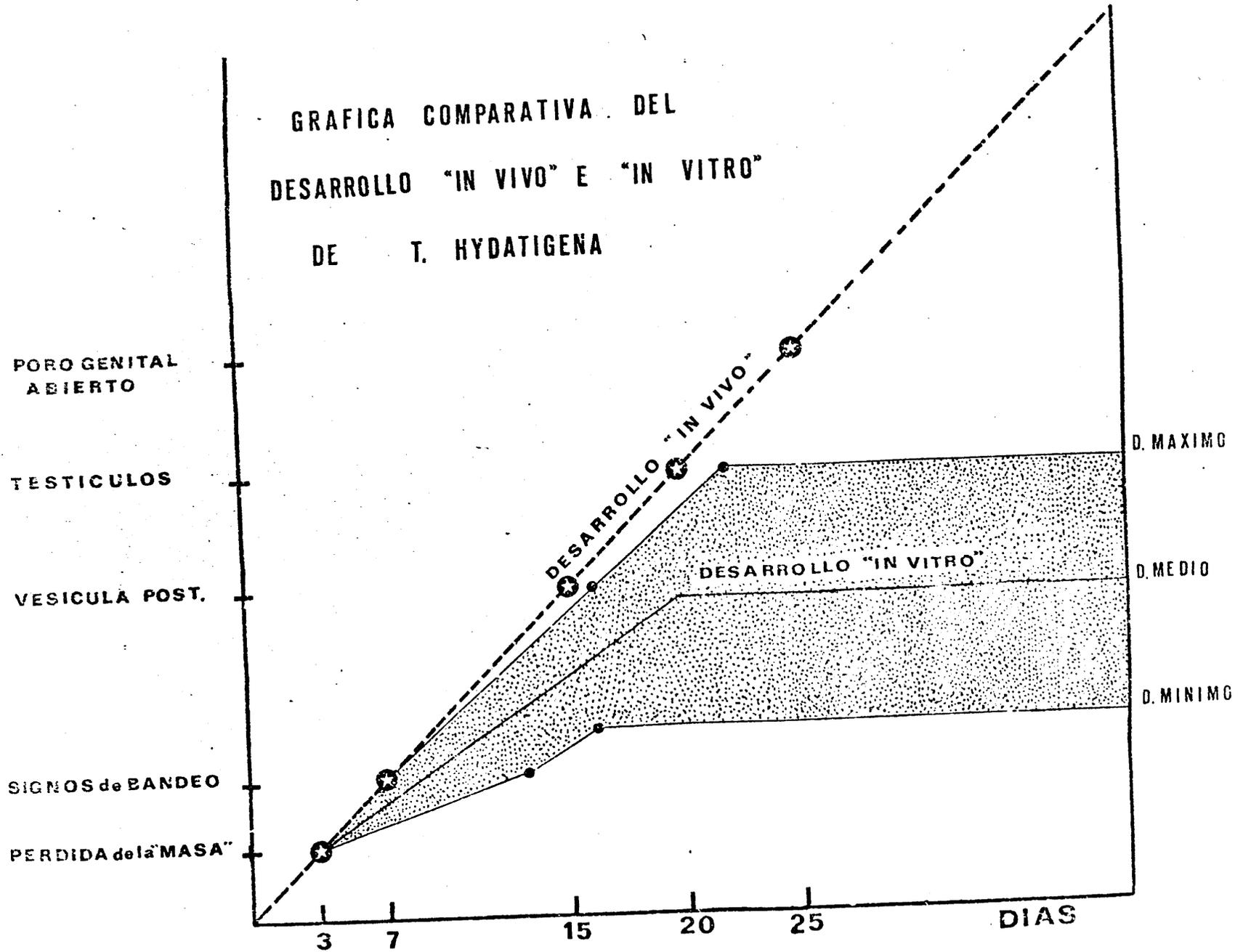


Foto n°14. Escolex desenvaginado;↑, zona por donde se realizará la separación espontánea de la masa posterior.

Foto n°15. Masa posterior; el escolex ya se ha separado espontáneamente.

Foto n°16. Se observa el estrechamiento existente en el cuello del cisticerco, antes de realizarse la separación del escolex de la masa posterior.

Foto n° 17. Se aprecia la zona de "rotura", en un escolex ya libre de la masa posterior. Puede observarse una zona donde la cutícula se adelgaza hasta desaparecer (100x).

Foto n° 18. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Visualización canales excretores. Aparecen
ligeramente ondulante.

Foto n° 19. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Bandeado.

Foto n° 20. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Segmentación.

Foto n° 21. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Segmentación, formación estróbilos.
Visión global.

Foto n°22. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Formación del velum (100x)

Foto n°23. Cultivo *Taenia hydatigena*.
Velum formado y poro genital.

5.- D I S C U S S I O N

5.1.- DISCUSIÓN DE *FASCIOLA HEPTACIA*.

Experiencia n° 1

Las metacercarias libres se obtuvieron siguiendo el procedimiento del tratamiento enzimático de las metacercarias enquistadas.

El medio empleado fue NCTC 135, sin aditamento alguno a pH 7,2, y como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Se obtuvo una supervivencia máxima de 4 días.

El medio de cultivo absorbido, muy rico en aminoácidos, vitaminas, etc., no fue suficiente para mantener el metabolismo de las fasciolas jóvenes. A pesar de ésto, en el medio doblaron el tiempo de supervivencia al logrado por WIKERHAUSER y col. (1967) (156) en solución salina Hedon-Fleig, lo que prueba la mayor riqueza del medio y la insuficiente absorción de estos trematodes, para continuar su desarrollo.

Experiencia n° 2

Las metacercarias libres se obtuvieron por idéntico procedimiento al descrito anteriormente.

El medio de cultivo fue TC 199.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Lograron sobrevivir 3 días.

El medio empleado en esta ocasión fue menos completo que en la anterior experiencia. Si tenemos en cuenta los resultados de WIKERHAUSER y col. (1957) (156) con el medio de cultivo A, y los obtenidos por nosotros con TC 199, veremos una gran similitud, por otra parte, haremos constar que un medio y otro son empleados habitualmente para el cultivo de células Hela, por lo que suponemos tengan ambos una semejanza en cuanto a nutrientes se refiere, pero insuficiente para la evolución de *Fasciola hepática*.

Experiencia n° 3

Las metacercarias libres fueron obtenidas tras el tratamiento enzimático de las metacercarias enquistadas.

Como medio de cultivo se empleó: NCTC 135 más 30% de suero fetal, gaseado todo con mezcla CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%. Lograron sobrevivir 8 días. En este caso, el suplemento del 30% de SBF contribuyó a la mayor prolongación del tiempo de cultivo, no siendo suficiente aún, a pesar de este suplemento nutritivo, para mantener un prolongado cultivo. Al poseer *Fasciola hepática*, aún en sus fases juveniles, un aparato digestivo aunque no totalmente desarrollado, nos indicaría que la absorción de nutrientes la hace, prioritariamente, por ingestión, como posteriormente veremos, y, tal vez de modo particular para ciertos nutrientes por absorción cuticular.

Experiencia n° 4

Las metacercarias libres empleadas fueron obtenidas por idéntico procedimiento a las anteriores experiencias.

El medio de cultivo empleado fue TC 199 más un 30% de SBF inactivado.

Como fase gaseosa se empleó: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Lograron sobrevivir 7 días.

En esta experiencia vemos que, como en la experiencia n°2, el TC 199, al ser menos rico, los nutrientes absorbidos no son suficientes como para permitir un prolongado aporte nutritivo para el desarrollo de las adolesecarias.

Experiencia n° 5

Las metacercarias libres fueron obtenidas tras tratamiento enzimático.

Como medio de cultivo se empleó MFH - 1, como fase líquida

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Fases sólidas se emplearon:

Agar-Plasma (A-P)

Agar Panmede al 2% (A-Pm)

Agar Hígado de buey al 2% más un 5% de sangre humana
(A-H-San).

La supervivencia máxima fue de 8 días para las tres fases sólidas, aunque a partir del segundo día observamos una ingestión y permanencia de las fases sólidas en el intestino de las adolecarias, en las cuales se introducían, con lo cual observamos la necesidad de una fase sólida que pudiera ser ingerida por los vermes.

Experiencia n° 6

Las adolecarias fueron obtenidas de igual manera a la anterior experiencia.

Como medio de cultivo se empleó MFH - 1, como fase líquida.

Como fase sólida: Agar-Sangre al 20%.

La fase gaseosa fue idéntica a la anterior experiencia.

Se logró una supervivencia de 8 días, logrando un incremento de tamaño de 45μ sobre el tamaño inicial.

Experiencia n° 7

Las adolesecarias se obtuvieron tras el procedimiento de Dixon modificado (a).

El medio de cultivo se componía de:

MFH - 2 como fase líquida.

Como fase sólida: Agar-Sangre humana al 5%.

Los parásitos sobrevivieron 13 días, llegando a un tamaño de 210 μ . (se partió de una longitud media de 180 μ).

A partir del 10° día se observó una fuerte contaminación bacteriana, por lo que se desechó.

El objeto de cultivar *F. hepática* en medio con fase sólida Agar-Sangre, está basado en los trabajos de JENINGS y col. (1954) (1955) (53) (54), los cuales, mediante isótopos, trabajando *in vivo*, llegaron a la conclusión de que *Fasciola hepática* en su fase hepática (no biliar) ingieren grandes cantidades de glóbulos rojos.

Experiencia n° 8

En esta experiencia se repitió exactamente la experiencia anterior.

Al 3er. día apareció una fuerte contaminación, observándose la misma en la sangre humana. Siendo comprobada en medio Saboureaud.

Experiencia n° 9

En esta experiencia se empleó el medio MFH - 3, medio con mayor cantidad de aditivos y, por tanto, teóricamente más eficaz.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

La fase sólida, asimismo, fue enriquecida: Agar-Sangre al 20%.

Las metacercarias libres tenían un tamaño inicial medio de 175 μ .

Al 4° día aparecieron precipitaciones mucosas sobre la fase sólida. El medio fue cambiado rápidamente, pensándose en contaminación de algún tipo.

Al 7° día las precipitaciones flocculentas volvieron a aparecer, sacrificándose el cultivo. La mayor parte de las adolescarías aparecieron en la fase sólida, con el intestino repleto de la misma y con una longitud media de 250 μ .

Si bien en esta experiencia se consiguió señalado crecimiento de los parásitos, debemos entender que, por alguna

razón no determinada, quizá el extracto hepático, se originaron precipitaciones que consideramos, provisionalmente, como no deseables.

Experiencia n° 10

El medio de cultivo fue idéntico a la anterior experiencia. El medio se renovó cada dos días, al objeto de evitar, en lo posible, las precipitaciones provenientes del medio.

Se sacrificó el cultivo el día 8°, ya que las precipitaciones acumuladas, que no habían podido arrastrarse con los cambios de medio, eran muy intensas.

El tamaño medio fue de 250μ , se incrementó, pues, el tamaño en 75μ en los ocho días de cultivo.

Experiencia n° 11

El medio de cultivo fue MFH - 3 - suero equino inactivo (1:1) como fase líquida.

Como fase gaseosa y sólida se utilizaron las mismas que en la experiencia anterior.

Se sacrificaron el 10° día, también a causa de las precipitaciones, aunque éstas fueron menos acusadas en los cuatro primeros días, por lo que se pensó en una inestabilidad de al-

gún componente del medio de cultivo.

Se logró una longitud media de 260μ en los diez días de cultivo, con un incremento de 90μ .

Experiencia n° 12

El medio de cultivo fue el MTH - 4, como fase líquida

Fase gaseosa: CO_2 10%; N_2 85%; O_2 5%.

Como fase sólida se preparó un sustrato, en la base del frasco, de glóbulos rojos humanos sedimentados. Se logró una supervivencia de 13 días, con un tamaño medio de 260μ .

A partir del 3° día se observó la presencia de glóbulos rojos ingeridos, apareciendo el intestino de los vermes negro en algunas regiones, quizá por derivados de la hemoglobina.

Al 12° día se observó contaminación bacteriana presente en los glóbulos rojos. A pesar de los lavados con antibióticos, al día siguiente murieron.

Experiencia n° 13

Al observarse el menor crecimiento en el medio ante-

rior, de nuevo se intentó suplementar el medio con un extracto de hígado de ratón, para lo cual se preparó el medio MFH - 5.

Se realizaron dos series de experiencias. En la primera de ellas se le agregó el 0,05% de glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alserver.

En la segunda serie no se le agregó nada. Observándose:

Primera serie: la supervivencia fue de 4 días, observándose, a partir del primero, gran cantidad de precipitaciones. El intestino aparecía lleno, a partir del segundo día, de glóbulos rojos.

En la segunda serie: sobrevivieron, tan sólo, un día. Al día siguiente de la siembra, se les observó muertas y con gran cantidad de precipitaciones.

Las precipitaciones las entendemos como una inestabilidad de las proteínas hepáticas en solución a pH 7,2, pH del medio de cultivo. Al precipitar debe cambiar algún factor físico-químico del medio con lo que los vermes mueren.

A pesar del poco tiempo de mantenimiento en esta experiencia es destacable el efecto, al parecer, beneficioso de la ingesta de glóbulos rojos en la supervivencia con independencia de otros factores limitantes. Creemos sugerente resaltar que los hematies succionados por la ventosa bucal deben arrastrar medio de cultivo, siendo, también, posiblemente asimilado por estos helmintos.

Experiencia n° 14

Las metacercarias libres fueron obtenidas por el tratamiento de Dixon modificado (a) de las metacercarias.

Como medio de cultivo se empleó suero equino inactivado, con un suplemento de glóbulos rojos de carnero lavados en solución Alsever. Tanto el suero como los glóbulos rojos, eran adquiridos en la casa Llorente.

Como fase gaseosa se empleó CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%. Se logró una supervivencia de 103 días.

Las metacercarias libres inicialmente median 170 μ de media, llegando, al final de la experiencia, a una longitud media de 662 μ con un máximo de 810 μ .

Hasta la fecha, la mayor supervivencia la habían logrado WIKERHAUSER y col. en 1968 (157), en 29 días, sin mencionar en sus trabajos el tamaño alcanzado al final de la experiencia.

El medio de cultivo empleado en la experiencia de WIKERHAUSER y col. fue un medio monoxénico, compuesto de: células testiculares de becerro en un medio líquido de Lactoalbúmina hidrolizada 0,5% y un 15% de suero de ternera, disuelto todo en solución de Hank. El medio de cultivo, como antes decíamos, era monoxénico, interviniendo células vivas de mamífero.

A. OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ y GUEVARA-POZO (1973) (73) (1974) (74), consiguieron una supervivencia de 54 días y un tamaño máximo de 700μ en el mismo medio empleado por nosotros en la experiencia que nos ocupa.

Por otra parte, en ningún caso se logró con este medio una evolución superior al tercer estadio evolutivo descrito por B. DAWES (1961) (22) (1963) (23) Lámina p.117, en que aparecen las ramas intestinales segundas e inicio de la formación de las terceras ramas. La evolución genital no pasó de dos masas diferenciadas en la parte posterior del animal, que interpretamos como testículos. En los bordes del verme, a partir del día 54, aparecieron condensaciones celulares que podría interpretarse como inicio de los vitelógenos. Las fasciolas obtenidas, tras el cultivo, son semejantes a las obtenidas en el caso de un parasitismo errático de fasciola, que se alojan en las vías linfáticas del animal, DAWES (1963) (23)

Esto nos demuestra que, si bien el medio empleado permite supervivencia y cierto desarrollo del parásito, no es el óptimo, como sucede *in vivo* cuando *F. hepática* yerra su localización específica.

Experiencia n° 15

Se repitió exactamente la experiencia n°14, sobreviviendo las adolescarias 96 días, llegando a medir 570μ de media, con tamaño máximo de 790 y mínimo de 550μ . La longitud inicial fue de 170μ .

Como en las dos anteriores experiencias, las fasciolas jóvenes crecieron, aunque tampoco al ritmo que en las primeras etapas de su vida lo hacen *in vivo*. El medio es, al parecer, suficiente para permitirles un metabolismo que las dejara vivir y sufrir una evolución especialmente de crecimiento, pero sin adquirir el ritmo evolutivo normal del parásito.

Experiencias nos. 17 y 18.

En sangre normal (no inactivada) mueren en 24 horas. Pensamos que podría ser debido a un fenómeno inmunológico; a las 24 horas aparecieron flotando sobre el medio.

Experiencia n° 19

El cultivo empleado fue sangre de conejo, obtenida por punción en la vena marginal de la oreja, mantenida a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 21 días. La sangre no fue inactivada.

Las metacercarias libres fueron obtenidas tras el tratamiento de las metacercarias enquistadas con el procedimiento de Dixon modificado (a), midiendo en el momento de la siembra 170μ de longitud.

Sobrevivieron 8 días, midiendo el 6° día y 8° día, 275μ de media y 315μ de media respectivamente.

El 7° día fue cambiada la sangre por otra recién extraí

da del donante, muriendo al día siguiente. Este fenómeno podemos interpretarlo como causado por un fenómeno inmunológico: Después de largo almacenamiento en nevera, posiblemente algún factor, quizá el complemento, se altere, cosa que no ocurre en el segundo caso actuando *in vitro* y matando a las fasciolas en cultivo.

Experiencia n° 20

Se emplearon adolecscarias de 170μ , obtenidas por el procedimiento de Dixon modificado (b).

Como medio de cultivo se emplearon el MFH - 7; MFH - 8; MFH - 9, empleando glóbulos rojos de carnero (Llorente).

Durante los tres primeros días se mantuvieron en suero equino-globúlos rojos, simulando, así, la migración a través de la cavidad general.

Al tercer día fue cambiado el primitivo medio, sustituyéndose por el MFH - 7; MFH - 8; MFH - 9; a todos los frascos se les agregó un 0,05%/ml. de glóbulos rojos de carnero (Llorente).

En el medio MFH - 7 aparecen los glóbulos rojos lisados y las adolecscarias muertas y flotando en los medios.

En el medio MFH - 8, sobrevivieron 18 días, alcanzando

una longitud de 340μ de media. Al 17º día se substituyó este medio por el MFH - 9, muriendo al siguiente día.

En el medio MFH - 9 murieron al día siguiente de la siembra.

La modificación al medio NCTC 135 estuvo en todo caso de acuerdo con las concentraciones vitamínicas mostradas por las tablas Geygi. Los medios MFH - 8 y MFH - 9 tuvieron en común con el MFH - 7 sólo la modificación vitamínica del medio comercial.

La muerte en los medios MFH - 7 y MFH - 9, quizá se deba a fenómenos osmóticos, por haber suplementado los medios originales con glucosa, vitaminas y otros nutrientes.

Experiencia nº 21

En esta experiencia se probaron los medios MFH - 8 y MFH - 10.

Las metacercarias fueron obtenidas por el procedimiento modificado de Dixon (b), midiendo inicialmente 170μ de media.

Fueron mantenidas, durante tres días, en suero equino mas glóbulos rojos, tras lo cual se pasaron a los medios.

En el medio MFH - 8, viven durante 12 días, contami-

nándose el oncenno día por levaduras presentes en los glóbulos rojos. El día de la siembra midieron 202μ de media. El decimosegundo día midieron 330μ de media.

En el medio MFH - 10 sobrevivieron 14 días, muriendo por contaminación presente, como en el medio anterior, en los glóbulos rojos. En el momento de la siembra midieron 204μ de media.

El decimocuarto día midieron 550μ de media, con un máximo de 630μ y un mínimo de 530μ .

El día decimotercero aparecieron inicios de las ramas intestinales secundarias y separación de las ramas intestinales.

En este último medio mostraron más rápido desarrollo de los logrados hasta entonces, aunque, en todo momento, en el medio apareció una abundante lisis de glóbulos rojos, fenómeno al que no le encontramos más explicación que la posiblemente debida a una inestabilidad ocasionada por los componentes del medio sobre las membranas de los eritrocitos.

Experiencia n° 22

Dada la relativa frecuencia de infecciones prenatales por *Fasciola hepática* en el ganado, y en algunos casos en el hombre (von K. ENIGK-D. DUWEL (1959) (148)), y la necesidad que tienen para ello los parásitos de atravesar la placenta

y alimentarse algún tiempo de ella, nos sugirieron la posibilidad de emplear extractos de este organo como suplemento de los medios de cultivo.

Por otra parte, es conocido el gran acúmulo de sustancias, tanto nutritivas como hormonales, que en la placenta se acumulan o sintetizan (HORMAN-LEMTIS (1967) (47)). Sin ánimo de profundizar en el tema, citamos algunas que han sido comprobadas y aisladas, y otras de las que simplemente parece haberse detectado una actividad en los extractos placentarios humanos:

DECLERCK, P. (1958) (25) demuestra, en cultivos celulares de placenta, unas altas concentraciones de estrógenos.

HUFFMAN, THAYER y DIOSY (1940) (49) aislan, de placentas humans, *Estradiol*, hormona que también aparece en el folículo de Graaf y en la época de maduración del óvulo.

Estrona. EASTERFELD y col (1938) (154) la aisla de placentas humanas.

Estriol. Esteroides que es transformado por el feto en sulfato de 3 estriol, que retorna a la placenta donde se acumula (Van de WIELE y JAILER (1959) (145)).

SCHMIDT-ELMENDORFF (1961) (93) en placentas libres de sangre encontraron $100,7 \pm 16,03\gamma$ de Estradiol, $180 \pm 16,0\gamma$ de Estriol y $40,8 \pm 15,1\gamma$ de Estrona por Kg. de placenta. Asimismo, hablan de que el extracto conservado a 14°C , durante 3 a 25 horas, aumentan los estrógenos.

KAUFMANN (1955) (59) ve que la placenta produce Progesterona. El lugar de su formación sería el revestimiento plasmoidal de las vellosidades. Se comprueba la producción hasta el final de la gestación, produciendo: 1,56 a 2,66 γ por gramo de placenta.

También, existen productos metabólicos de la misma, como la 20 α de hidprogesterona y 20 β de hidprogesterona.

STARK y VOSS (1957) (128) ven que 30 gr. de placenta sin tejido conjuntivo poseen una unidad en el test de la cresta del gallo. Parece, pues, que estos andrógenos procedan de la síntesis de estrógenos o bien del propio feto.

STAMMLER (1954) (127) encontró cortisona, cortisol y otros, con valores de 90 γ de cortisona, 45 γ de 11 de hidrocortisona 4 γ de hidroxycortisona y 3 γ de aldosterona.

SAWASAKI y col. (1954) (91) demuestran que 100 gr. de placenta equivalen a 26 gr. de corteza suprarrenal.

JOHNSON y HAINES (1952) (57), tras inyección de extractos placentarios a ratas, producen en éstas acúmulos de glucógeno en hígado equivalentes a los que se producirían con 0,45 mg. de hidrocortisona.

Además de estas sustancias, aparecen en la placenta una serie de sustancias proteicas con actividad estimuladora del crecimiento celular. Así se han aislado de líquido amniótico, del suero fetal, del hígado fetal, de placenta y de tejidos

hepáticos y gastrointestinales, de adultos con tumores, una α globulina (α fetoproteína) cuya misión, al parecer, estimula la división celular.

Como hormonas de naturaleza proteica y origen placentario se han aislado fundamentalmente dos: la gonadotropina coriónica (H C G), aunque su producción disminuye progresivamente hasta el momento del parto (K.J. CATT) (1973) (15), y la Somatotropina coriónica humana (H C S), ésta tiene una analogía estructural con la hormona del crecimiento hipofisaria humana (H G H). Aunque no posee la misma actividad biológica, tiene reacción cruzada con la (H G H). En el momento del parto hay unas tasas de varios mg/ml de sangre. Parece tener una actividad biológica haciendo que el feto consuma glucosa, aunque no se descarta la posibilidad de que actúe como la H G H para el feto (K.J. CATT) (1973) (15).

Aparte de estas dos hormonas, se ha descrito para los extractos placentarios actividad (T S H), (S T H), Histamina, Cloruro de Colina, etc. entre otras (HORMANN-LEMTIS) (1967) (47).

Todo esto nos indujo a emplear los extractos placentarios como parte de medios de cultivo.

El empleo de placentas humanas fue debido a su facilidad de obtención.

Se partió de metacercarias libres obtenidas por el procedimiento de Dixon modificado (b), con una longitud inicial de 175μ de media.

Durante dos días se mantuvieron en SBF más glóbulos rojos. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a tres frascos con el medio de cultivo. Se consiguió una supervivencia de 83 días, muriendo por corte de fluido eléctrico.

Al 3° día miden 260μ de media.

Al 15° día miden $633,3\mu$ de media.

Al 21° día miden 1060μ de media.

Al 26° día miden 1270μ de media.

Al 27° día miden 1315μ de media.

Al 33° día miden 1375μ de media.

Al 40° día miden 1700μ de media, con máximo de 2150μ y mínimo de 1300μ .

A partir de este día fue imposible medirlas bajo el microscopio invertido, ya que a $100x$, se salían del campo y con los continuos movimientos, la operación se hacía difícil, pudiendo conducirnos a error.

Al 83° día, tras teñirlas, poseen un tamaño de 2600μ de media, con máximo de 3600μ y mínimo de 1500μ .

La evolución mostrada fue, en las primeras fases del cultivo, casi paralela al desarrollo *in vitro* en infestaciones experimentales en ratón (B. DAWES (1963) (23)), estabilizándose, posteriormente, su evolución como muestra la Gráfica pag. 124.

Al 11° día aparecen los inicios de las ramas intestinales secundarias.

Al 20° día aparecen formadas las ramas intestinales secundarias.

Al 30° día se aprecian completamente formadas las ramas intestinales, secundarias y terciarias.

Al 40° día se aprecia lo que pudiera ser inicio de la bolsa del cirro.

Al 83° día se logra el estadio 5 - 6 de Dawes del desarrollo *in vitro* en ratón.

Los estudios de la relación de medidas

$$\frac{\text{Distancia ventosa ventral} / \text{Poros excretor}}{\text{Distancia ventosa bucal} / \text{ventosa ventral}} = R$$

dieron los siguientes resultados:

Al 2° día	R = 1
Al 15° día	R = 1,8
Al 21° día	R = 2
Al 33° día	R = 3,9
Al 37° día	R = 4,1
Al 43° día	R = 4,3
Al 83° día	R = 4,4 - 4,6 en las de máximo tamaño.

Lo que nos muestra una evolución parecida a la mostrada *in vivo*, siendo considerado este parámetro como indicativo de la auténtica evolución de crecimiento y desarrollo de las fasciolas jóvenes.

Debemos hacer constar que los resultados de esta experiencia constituyen la máxima evolución lograda hasta el momento *in vitro*.

C. DAVIES (1945) (20) da cuenta de un crecimiento de 1,2 mm. tamaño doblado en nuestras experiencias, y aparición de ramas intestinales, aunque no aparece en el cultivo de DAVIES evolución genital, mientras que en nuestros cultivos, aunque no se logra la madurez sexual, si aparece un ovario primitivo, glándulas de Mehlis y bolsa del cirro, aunque no todavía funcionales.

Por tanto, parece deducirse que alguno o algunos de los componentes presentes en la placenta humana, inducen en *Fasciola hepática in vitro* una evolución desde metacercaria liberada a fasciola preadulto (estadio 5-6 de B. Dawes (1963) (23)).

Experiencia n° 23

El medio empleado fue SBF inactivado.

Las metacercarias se desenquistaron por el procedimiento de Dixon modificado (b), presentando una longitud media de 175 μ .

Sobrevivieron 70 días, lográndose una longitud media de 560 μ .

A los 40 días de cultivo mostraron mayor tamaño de las cultivadas en suero equino (SE) en la experiencia n°14. Luego, a partir de este día, fueron creciendo más lentamente, siendo el tamaño final menor que el conseguido en la experiencia n° 14. Esto, en principio, resulta un poco extraño, ¿cómo explicar que en suero fetal, donde existe estimuladores del crecimiento y reproducción celular, las adolesecarias llegan a crecer, al final de la experiencia, menos que las cultivadas en suero equino normal?. Como ya hemos visto en las primeras etapas, crecen más rápidamente las cultivadas en SBF, quizá éste, aporte en las primeras etapas de desarrollo estimuladores del crecimiento, no siendo así cuando se ha alcanzado un cierto nivel, mientras el (SE) tal vez sea más estable en cuanto a suministro de nutrientes se refiere.

Tampoco debemos olvidar las enormes variaciones que poseen los sueros, incluso del mismo donante, en cuanto a validez en los cultivos se refiere CLEGG (1974) (17).

Experiencia n° 24

Las metacercarias libres fueron obtenidas por el procedimiento de desenquistamiento habitual, midiendo, en el momento de la siembra, 180 μ de media.

Sobrevivieron 14 días, muriendo a causa de contaminación que pudimos detectar provenía del EEB empleado.

Se logró un tamaño de 298 μ de longitud media, con máximo de 380 μ y mínimo de 275.

A pesar de que la contaminación suspendió el cultivo a los 14 días, el crecimiento de las adolesecarias fue menor que el de las experiencias 14 y 23 en el mismo tiempo, lo que, quizá, se deba a la misma razón expuesta en la experiencia 23, no todos los sueros tienen la misma riqueza, ni son igualmente válidos para el cultivo.

Experiencia n° 25

En esta experiencia se compararon los medios MFH - 11 y MFH - 12, con MFH - 11 más insulina y MFH - 12 más insulina.

Las metacercarias fueron desenquistadas por el procedimiento habitual.

Medio MFH - 11

Sobrevivieron 10 días, el medio presentó lisis de los glóbulos rojos a partir del día 6°.

Al 5° día la longitud media fue de 250 μ .

Al 7° día la longitud media fue de 334,1 μ .

Al 10° día la longitud media fue de 340 μ .

Las adolesecarias murieron por contaminación bacteriana.

Medio MFH - 11 mas insulina.

Vivieron durante 10 días

Al 5° día la longitud media fue de 252 μ .

Al 7° día la longitud media fue de 317 μ .

Al 10° día la longitud media fue de 330 μ .

Murieron por contaminación, que procedió de los glóbulos rojos de carnero adquiridos de un proveedor.

Medio MFH - 12.

Sobrevivieron durante 22 días.

Al 5° día la longitud media fue de 320 μ .

Al 9° día la longitud media fue de 365 μ .

Al 14° día la longitud media fue de 375 μ .

Al 20° día la longitud media fue de 476 μ .

Al 22° día la longitud media fue de 480 μ .

Se sacrificó el cultivo.

Medio MFH - 12 mas insulina.

Al 5° día la longitud media fue de 316 μ .

Al 9° día la longitud media fue de 320 μ .

Al 14° día la longitud media fue de 360 μ .

Al 20° día la longitud media fue de 436 μ .

Al 22° día la longitud media fue de 445 μ .

Puede comprobarse que la insulina, al menos en estos medios, no parece influir sobre el crecimiento o evolución de las adolecarias de *F. hepática*, cultivadas *in vitro*.

Experiencia n° 26

El medio de cultivo fue el MFH - 13.

El método de desenquistamiento fue el habitual pro-

cedimiento de Dixon modificación (b).

En el momento de la misma siembra midieron 175μ de media.

Sobrevivieron 38 días.

Antes de pasarlas al medio de cultivo, después de tres días en SBF más glóbulos rojos, dieron un tamaño de 253μ de media.

Al día 38° dieron un tamaño medio de 720μ , con máximo de 820μ y mínimo de 650μ .

La evolución mostrada fue la siguiente:

Al 2° día, intestino repleto de glóbulos rojos.

Al 8° día, aparición de abultamientos en las ramas intestinales primarias.

Al 20° día, ramas intestinales secundarias perfectamente formadas.

Al 38° día, iniciación de la formación de terceras ramas.

Desarrollo equivalente a 4° estadio de B. DAWES (1963) (23).

Murieron por contaminación de los glóbulos rojos del lote empleado en el último cambio de medio.

Experiencias nos. 27, 28 y 29

En estas experiencias se emplearon extractos placentarios con cierta cantidad de meconio. Se emplearon metacercarias desenquistadas de 175 μ de longitud media, obtenidas por los procedimientos habituales. Se mantuvieron, durante tres días, en SBF mas glóbulos rojos, dando un tamaño de 250 μ de media. Fueron pasadas a medio de cultivo compuesto de EPH al 50% en solución de Hank, 50 ml.; SBF, 100 ml, las de la experiencia n° 27 y al día siguiente aparecieron muertas.

En la experiencia n° 28, se empleó medio MFH - 13 con placenta contaminada por meconio.

Al día siguiente de la siembra murieron, apareciendo flotando sobre el medio.

En la experiencia n° 29, se emplearon metacercarias libres obtenidas por el mismo procedimiento de las experiencias anteriores y con igual longitud media, 175 μ .

El medio fue MFH - 14 con placenta contaminada por meconio.

Al día siguiente de la siembra en este medio, tras estar en suero bovino fetal, murieron, apareciendo flotando en el medio.

La explicación de esta muerte súbita en estos medios,

la encontramos, quizás, en el alto contenido en β glucoronidasa que poseen estas placentas (J.L.CUADROS, NAVARRETE y C. CHUNG (1976)) (19) (J.L.CUADROS (1976) (comunicación personal)) (18) o de otros compuestos catabólicos, no determinados, presentes en el meconio.

Quizá aquel enzima, actuando sobre la cutícula, altere ésta y llegue a causar la muerte rápida de estos helmintos.

5.2.- DISCUSIÓN SOBRE DESENVAGINACIÓN DE *CYSTICERCUS TENUICOLLIS*.

Sobre la desenvaginación de *C. tenuicollis*: Los resultados obtenidos indican que *T. hydatigena* posee los mismos requerimientos que otras Taenias para la desenvaginación de su cisticerco (*C. tenuicollis*).

Para su estudio hemos tomado unos intervalos de valores de tiempo mayores que los que emplea D.W. FEATHERSTON (1971) (35), ya que consideramos como desenvaginación completa cuando el cuello de la fase larvaria está totalmente distendido. Por otra parte, la observación durante 24 horas del fenómeno controlaría las posibles reinvaginaciones a períodos más largos que los empleados por otros autores, fenómeno observado tanto por J.D. SMYTH (1967) (112) como por FEATHERSTON D.W. (1971) (35).

5.2.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO PREVIO.

Se han estudiado 6 diferentes temperaturas:

-25°C; -10°C; 0°C; 4°C; 22°C; 40°C; y 53°C. El tiempo de almacenamiento fue, para todas las temperaturas ensayadas, de dos horas.

Las dos temperaturas inferiores a 0°C (-25°C y -10°C), producen, tras una descongelación lenta, la muerte de los cisticercos hemos demostrado, porque por el tratamiento de los mismos con las soluciones enzimáticas, ninguno de ellos llegó a desenvaginarse; digeriéndose, completamente, tras 24 horas en la solución desenvaginante.

La muerte de los cisticercos, en estas condiciones, puede ser explicada por la cristalización de agua en el interior de las células. Con la descongelación lenta se producen fenómenos de recristalización que originarían la lisis celular (MAZUR y col. (1969) (68), citado por J. EGOZCUE (1971)).

Cuando después de mantenidos a bajas temperaturas (-25°C y -10°C) fueron sumergidos en solución salina a 38°C, al objeto de descongelarlos lo más rápidamente posible, se encontró:

Almacenados a -25°C .

A la media hora y 1 hora el 8,3%.

A la segunda hora el 83,3%.

A la tercera hora el 100%.

Almacenados a -10°C .

A la media hora el 16,6%.

A la primera hora el 58,3%

A la segunda hora el 83,3%.

A la tercera hora el 100%.

Ningún cisticerco resultó digerido.

Puede entenderse esta diferencia de comportamiento debida a la distinta velocidad de descongelación admitiendo que las células de los cisticercos, intactos pueden estar protegidas, quizá, por los lípidos del líquido que los rodea, o bien, por las mucoproteínas que contiene la cutícula.

La descongelación rápida impide, en todo momento, el fenómeno de recristalización.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos, para el mismo cestode, por SWEATMAN y PLUMMER (1957) (132).

Almacenados a 0°C .

El mantenimiento de los cisticercos a 0°C durante

2 horas y un posterior tratamiento , nos muestran que no sufren daño, efecto que podemos ver al llegar a completarse la desenvaginación en el 100% de los casos a las 20 horas, aunque sí prolonga el tiempo de desenvaginación, puesto que:

A la media hora , primera, segunda y tercera hora, el 25%.

A las 16 horas, el 75%.

A las 20 horas, el 100%.

Esta lenta respuesta a la solución enzimática puede explicarse, en cierta manera, admitiendo que la desenvaginación no es un proceso únicamente pasivo por la acción de los enzimas del medio, ni tampoco puede interpretarse como debido a la acción de estos enzimas unida a los movimientos activos del cisticerco, sino que, quizás, junto a los movimientos activos y a la acción de los enzimas del medio, se pongan en funcionamiento las hidrolasas ácidas de los lisosomas del cisticerco (BOGISH, 1967) (9), ayudando, así, a la lisis de los tejidos que rodean el escolex. Es posible que este fenómeno quede interrumpido temporalmente por su permanencia previa a 0°C, retrasándose, así, la desenvaginación.

¿Por qué no pasa éstos tras la congelación a -10°C y -25°C y descongelación rápida?. Porque en los probables fenómenos de recristalización puedan dañarse algunos lisosomas cuyos enzimas actúen tan pronto se eleve la temperatura.

Almacenados a 4°C.

El tiempo que tardaron en desenvaginarse el 100% de los cisticercos fue de media hora, como máximo.

Esta temperatura de almacenamiento fue empleada para las experiencias de cultivo.

Almacenados a 22°C.

A la media hora la desenvaginación fue del 83,3%.

A la primera hora la desenvaginación fue del 100%.

Dado que la diferencia entre 83,3% y el 100% es relativamente baja, quizá, esta temperatura no influya decisivamente durante el tiempo de almacenaje en los propios cisticercos.

Almacenados a 40°C.

Se obtuvo a la primera hora el 58,3%.

A la segunda y tercera hora permaneció invariable el mismo valor.

A las 16 horas se obtuvo el 75%, permaneciendo invariable hasta las 24 horas.

Este retraso y pérdida de desenvaginación podría interpretarse como debidos a un consumo de los nutrientes alma-

cenados, por el más alto metabolismo del cisticerco, durante el almacenamiento sin recuperación posterior de los mismos, y, por supuesto, sin eliminación de los catabolitos. Estos fenómenos llegarían a ser fatales para un 25% de los cisticercos.

Almacenados a 53°C.

No se desenvaginan, ésto indica que ocasiona esta temperatura la muerte celular de las fases larvarias.

5.2.2.- INFLUENCIA, EN LA DESENVAGINACIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAJE EN *CISTICERCUS TENUICOLLIS*.

Durante todos los tiempos de almacenaje, la temperatura fue de 4°C, a diferencia de D.W. FEATHERSTON (1969) (34), que emplea temperaturas del laboratorio, 15°C \pm 3.

Dos horas a 4°C, para nosotros, es el tiempo óptimo e ideal de almacenamiento, pues, en estas condiciones, se desenvaginan, a la media hora de tratamiento, el 100%.

Cuando los cisticercos permanecen almacenados un día, ya la desenvaginación es más lenta, mostrando:

A la media hora solo, el 75%.
A la primera hora, el 83,3%.
A las dos horas, el 91,66%.
A las dos horas y media, el 100%.

Cuando permanecen 4 días, la desenvaginación es:

A las dos horas, el 66,6%.
A las dieciseis horas, el 100%.

Este valor, en el caso de una infestación *in vivo*, quedaría eliminado, ya que en este tiempo la ingesta habría ya pasado por el intestino delgado.

Tras siete días de almacenaje, se desenvaginan un 66,6% a las tres horas, permaneciendo este valor invariable hasta las 24 horas.

Tras quince días de almacenaje, no aparece desenvaginación; todas, tras el tratamiento desenvaginante, quedan digeridas completamente.

Estos valores nos pueden sugerir una pérdida de viabilidad, y, en algunos casos, muerte, quizás por consumo de reservas durante el tiempo de almacenamiento, que, aunque disminuido a causa de la baja temperatura, son suficientes para que, tras siete días de almacenamiento, causen la muerte de un 44,4% de los individuos.

Nuestros resultados, aunque a diferente temperatura,

coinciden con los mostrados por DW. FEATHERSTON (1969) (34).

Este autor llega a la conclusión de que 3 días de almacenamiento es el límite máximo que pueden aguantar con viabilidad para poder infestar cánidos y obtener un 100% de seguridad en la infestación.

5.2.3.- EFECTO DEL PH EN LA DESENVAGINACIÓN.

El valor de pH óptimo *in vitro*, consideramos que es el de pH = 7,2, en el que se obtiene el 100% de desenvaginación a la media hora de tratamiento con la solución desenvaginante, permaneciendo este valor hasta las 24 horas de iniciado el tratamiento. Este pH, según comunicación personal de la Dra. SANCHEZ CAMPOS, aparece en el jugo duodenal de perros mantenidos en ayunas, así como en las paredes mucosas del intestino. J.D. SMYTH (1974) (121) emplea este mismo pH para la desenvaginación de *E. granulossus*.

pH = 6.

Este valor de pH aparece, aproximadamente, a las 6 horas de la ingesta, con una comida normal no grasa, en el jugo duodenal de perros con fístula duodenal, (SANCHEZ CAMPOS (comu-

municación personal).

A la primera hora la desenvaginación es de un 66,6% aumentando a un 83,3% a las dos horas, y completándose al 100% a las dieciseis horas. El valor de un 83,3% de desenvaginación se acerca extraordinariamente al valor del 80% de cestodes de esta en perros, a los tres días de la infestación experimental (FEATHERSTON (1969) (33)).

Dado que a las 16 horas ha transcurrido ya el tiempo normal de permanencia de la ingesta en el intestino delgado del perro, el valor del 100% de desenvaginación obtenido *in vitro* a las 16 horas no puede relacionarse con lo que ocurriría *in vivo* en similares circunstancias, dado que la fijación de las tenias desenvaginadas tiene tan sólo lugar sobre la mucosa del intestino delgado y no en el grueso (D.W. FEATHERSTON (1969) (33)).

pH = 5.

Este valor de pH aparece en jugo duodenal tras la ingesta. A este pH, en la primera media hora se desenvaginaron el 25%, manteniéndose este porcentaje hasta la segunda hora en que asciende a un 41,66%.

A las 16 horas asciende a un 91,66%.

A las 24 horas fue siempre de un 100%.

La subida *in vitro* del pH a 6, a las 16 horas, la interpretamos, quizá, como consecuencia de la neutralización por los corpúsculos calcáreos.

Como en el anterior pH, los valores de las 16 horas hasta las 24 horas, no podemos relacionarlos con el fenómeno *in vivo*.

pH = 3.

Consideramos este pH como el existente a la salida del esfínter pilórico (JERZY GLASS) (1970) (55).

A las 16 horas, aparece un 16,6%, llegando a las 20 horas a un 25%.

Este valor permaneció inmutable hasta las 24 horas. El pH, en este caso, también, ascendió a 4,25 a las 16 horas.

Por tanto, consideramos que, dado que el mayor número de desenvaginación *in vitro* ocurre a la 1/2 hora a pH 7,2, éste debe ser el óptimo, al objeto de obtener el mayor número de ejemplares desenvaginados para experimentación y cultivo *in vivo*, tal valor de desenvaginaciones debe ocurrir tras el contacto del cisticerco con la mucosa intestinal, o bien, cuando el pH del fluido intestinal sube a causa de la secreción pancreática y biliar, ya que la desenvaginación a pH = 7,2, prácticamente, es instantánea.

5.2.4.- EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

La solución desenvaginante empleada en las experiencias sobre efecto de diferentes soluciones en la desenvaginación, fue la solución desenvaginante completa, H, ajustada a pH = 7,2.

Los niveles probados de O₂ disuelto son: 6,1 ppm, 3 ppm y 0,2 ppm.

6,1 ppm

A la media hora dió el 100% de desenvaginación.

3 ppm.

A la media hora desenvaginaron el 97,22%, llegando al 100% a las 4 horas.

0,2 ppm.

A la media hora y primera hora no aparece desenvaginación.

A la segunda hora aparece el 16,66%, subiendo a la tercera hora a un 33,3%, que permanece invariable hasta las 24 horas.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para *E. granulossus* por J.D. SMYTH y col. (1967) (113).

Vemos que, a la concentración de 6,1 partes por millón

de O_2 disuelto en el medio, se obtiene, a la media hora, el 100% de desenvaginaciones. Hay que recordar que este mismo porcentaje se obtuvo en la experiencia "efecto del pH en la desenvaginación, pH 7,2". La explicación es que, en las condiciones de esta experiencia, el tanto por millón máximo de O_2 disuelto, era precisamente de 6,1.

Cuando el tanto de O_2 por millón se bajó a 3, el porcentaje de desenvaginación alcanza, también, el 100%, pero con un retraso de tres horas y media.

Al descender hasta 0,2 el tanto por millón de O_2 disuelto, sólo se alcanza, como máximo, el 33,3% de desenvaginaciones, aún después de 24 horas de experiencia.

Nos parece indudable que la presencia de O_2 disuelto en el medio es importante, y cuando ésta se reduce drásticamente, las desenvaginaciones son menos numerosas y mucho más tardías.

Los valores empleados 6,1 ppm, 3 ppm y 0,2 ppm, fueron los de O_2 disuelto en la solución desenvagianante completa (H).

0,2 ppm, fue el mínimo valor obtenido tras el tratamiento con Pirogalato sódico.

3 ppm, fue el valor intermedio entre los valores extremos.

5.2.5.- EFECTO DE LOS DIFERENTES ENZIMAS PRESENTES EN LA SOLUCIÓN DESENVAGINANTE.

Solución A (Hank)

Tras la digestión péptica previa, en que los restos de membrana de la vesícula fueron digeridos, los cisticercos fueron lavados en solución de Hank, a pH = 7,2, tres veces, al objeto de eliminar los restos de ácido y de pepsina. Tras estos lavados, los cisticercos fueron pasados a solución de Hank ajustada a pH = 7,2.

A la 1/2 hora no se desenvagina ninguno.

A la 1 hora se desenvaginaron el 16,6%.

A las 2 y 3 horas, el 25%.

A las 16 horas, el 50%.

A las 18 horas, el 66,6%.

A las 20 horas, el 66,6%.

A las 24 horas, el 75%.

Algunas de ellas mostraron una desenvaginación parcial.

Tras la digestión péptica previa, vemos que los cisticercos pueden llegar a desenvaginarse en una solución isotónica equilibrada, libre de enzimas, como es la solución de Hank.

Este fenómeno podemos interpretarlo como si la pepsina

actuara sobre las células del cuello que rodean el escolex, y, tras los activos movimientos de la masa del cisticerco, que preceden a la desenvaginación, puede llegar a completarse ésta sin la acción posterior de otros enzimas.

La presencia de desenvaginaciones parciales nos muestra la conveniencia de la acción de los otros enzimas para la desenvaginación (D.W. FEATHERSTON (1971) (35)).

Solución B (Pancreatina).

Asimismo, tras la digestión péptica y los posteriores lavados, los cisticercos fueron tratados con solución Hank, en la que fue disuelta la Pancreatina. En esta solución los cisticercos desenvaginaron:

- A la 1/2 hora, el 0%.
- A la 1 hora, 31 8,33%.
- A las 3 horas, el 25%.
- A las 3 horas, el 50%.
- A las 16 horas, el 66,6%.
- A las 18 horas, el 75%.
- A las 24 horas, el 75%.

Los cisticercos, en esta solución, se desenvaginan en una mayor proporción, que en la solución anterior, a las 3 y 16 horas. Esto muestra una acción efectiva, aunque lenta, de los enzimas que constituyen el conjunto de la Pancreatina. Asimismo, nos muestra la necesidad de los otros componentes

para una desenvaginación totalmente eficaz.

Nuestros resultados no están completamente de acuerdo con los obtenidos por D.W. FEATHERSTON (1971) (35). Este autor, con un tratamiento que consiste en la no disección de los cisticercos, tratamiento péptico con pepsina 1:60.000 (0,025 gr. - 30 minutos) y Pancreatina 0,03 g. disuelta en solución de Hank, consigue, en 90 minutos, una desenvaginación del 70%. Quizás, este pretratamiento péptico más intenso, condicione una más rápida desenvaginación.

Nosotros, en todo momento, hemos evitado los tratamientos enzimáticos intensos para, por una parte, poder estudiar mejor el efecto del factor que nos proponemos estudiar, y, por otra, no alterar los cestodes para su posterior cultivo *in vitro*.

Solución C (Tripsina)

En esta solución, tras el tratamiento péptico y los lavados, se desenvaginaron:

A la 1/2, 1 y 2 horas, el 0%.

A las 3 horas, el 25%.

A las 16, 18 y 20 horas, el 58,33%.

A las 24 horas, el 75%.

Nos muestra que la Tripsina sola no es suficiente para

la desenvaginación total. Nos encontramos, asimismo, cisticercos con desenvaginaciones parciales.

La mayor proporción de desenvaginaciones en las primeras horas, ocurrida con la solución B, parece indicar que, en la desenvaginación, también actúan los diferentes enzimas (lipasas, amilasas y proteasas) que componen la Pancreatina.

Aunque esta desenvaginación en solución C, como en los casos anteriores (en soluciones A y B) sea debida, en mayor proporción, a los activos movimientos musculares del cisticerco.

Solución D (Bilis Canina)

En las dos primeras horas se obtiene el 0%.

A las 3 horas, el 25%.

A las 16 y 18 horas, el 41,66%.

A las 20 y 24 horas, el 75%.

En realidad, quizás la bilis solamente actúa como estimulante de los movimientos (BOGITSH (1967) (9)), por tanto, de la desenvaginación, pero necesitando, en todo momento, de la presencia de los enzimas.

La bilis sola, según esta experiencia, no parece tener ninguna acción decisiva en el fenómeno de la desenvaginación.

Solución E (Tripsina-Pancreatina)

A la 1/2 hora, se obtuvo el 83,33%.

A la 1 hora, el 83,33%.

A las 2 horas, el 83,33%.

A las 16 horas, el 100%.

A las 20 horas, el 100%.

A las 24 horas, el 100%.

Nos puede sugerir esta experiencia lo que antes apuntábamos como la necesidad de un refuerzo enzimático - Tripsina - Pancreatina; que actuaría digiriendo parte de los tejidos del cuello que envuelven el escolex.

Solución F (Pancreatina - Bilis de Perro)

A la 1/2 hora se obtiene el 25%.

A la 1 hora, el 58,33%.

A las 2 horas, el 58,33%.

A las 3 horas, el 58,33%.

A las 16 horas, el 100%.

A las 18 horas, el 100%.

A las 20 horas, el 100%.

A las 24 horas, el 100%.

El conjunto de los enzimas que constituyen la Pancreatina, junto con la bilis, estimulan la desenvaginación en mayor grado que los componentes aislados, lo que, en esta expe-

riencia, determina el que con más rapidéz se alcance el 100% de desenvaginaciones.

Solución G (Tripsina - Bilis Canina)

A la 1/2 hora no se obtiene desenvaginación

A la 1 hora no se obtiene desenvaginación

A las 2 horas no se obtiene desenvaginación.

A las 3 horas se obtiene el 16,6%.

A las 16 horas, el 83,33%.

A las 18 horas, el 83,33%.

A las 20 horas, el 100%.

A las 24 horas, el 100%.

El proceso es más lento que en las soluciones anteriores, ésto parece indicar la conveniencia de otros enzimas, no proteolíticos, implicados en la desenvaginación.

Asimismo, vemos que la bilis es sólo un estimulante del proceso.

Solución H (Desenvaginante completa).

Se obtiene, a la 1/2 hora, el 100% de individuos desenvaginados.

Con todo lo anterior creemos haber probado la necesidad de todos los componentes que constituyen la solución H,

actuando de una manera conjunta, para la máxima eficacia en la desenvaginación *in vitro* del *Cisticercus tenuicollis*.

5.2.6.- INFLUENCIA EN LA DESENVAGINACIÓN DE UN TRATAMIENTO PEPSICO PREVIO.

Los cisticercos, una vez extraídos de la membrana periquística y lavados en solución de Hank, se colocaron en las diferentes soluciones, probadas anteriormente para estudiar la desenvaginación, sin la acción previa de la pepsina.

Solución A (de Hank)

No se obtiene desenvaginación a las 24 horas de tratamiento. Ello nos indica la necesidad de un tratamiento péptico, previo, para lograr la desenvaginación, al menos en el grado en que se obtuvo en la experiencia "Efecto de los diferentes enzimas presentes en la solución desenvaginante. Sol. A".

Solución B (Tripsina en solución de Hank).

No se obtiene desenvaginación a las 24 horas.

Esto indica la necesidad de una digestión proteolítica intensa, previa, quizá a nivel de los enlaces de los aminoácidos ácidos, siendo pues, insuficiente la realizada, solo a nivel de los enlaces Lis-Arg. sobre los que actúa únicamente la Tripsina (LEHNINGER (1972) (61)).

Nuestros resultados no concuerdan con los de D.W. FEATHERSTON (1971) (35), que obtiene un 10% de desenvaginación a los 10 minutos, aunque, posteriormente, los cisticercos se reinvaginan.

Solución C (Pancreatina en solución de Hank).

No se encuentra desenvaginación a las 24 horas. Nuestros resultados no concuerdan con los de D.W. FEATHERSTON (1971) (35), empleando las mismas concentraciones por él señaladas.

Solución D (Bilis Canina en solución de Hank).

No se encuentra desenvaginación a las 24 horas. A pesar de que D.W. FEATHERSTON (1971) (35) emplea una concentración de bilis 20 veces mayor no obteniendo, tampoco, desenvaginación en 90 minutos.

Solución E (Tripsina + Bilis Canina en solución Hank)

- A la 1/2, 1 y 2 horas no se encuentra desenvaginación
- A las 3 horas se obtiene el 8,36% de desenvaginación.
- A las 16 horas, el 58,3%.
- A las 24 horas, el 66,66%.
- A las 28 horas, el 66,66%.

La acción de la Tripsina digiriendo los prótidos, y la bilis estimulan la desenvaginación, aunque no con total efi
cacia.

Solución F (Pancreatina + Bilis Canina)

- A la 1/2, 1 y 2 horas, el 0%.
- A las 3 horas, el 41,66%.
- A las 16 horas, el 66,66%.
- A las 24 horas, el 66,66%.

La acción de los diferentes enzimas de la Pancreatina y de la bilis desencadenan la desenvaginación en algunos cisti
cercos, aunque no llega a completarse el 100%.

Solución C (Tripsina + Pancreatina en solución Hank).

La conjunción del complejo enzimático Pancreatina - Tripsina, desencadena un fenómeno ligeramente más rápido, pero tampoco llega a completarse el 100%.

Solución H (Solución Desenvaginante completa).

En esta solución (que, tras una digestión péptica previa, se origina en 1/2 hora el 100% de desenvaginación), ocurre que a las 2 horas y 30 minutos desenvagan el 16,66%.

A las 3 horas, el 41,66%.

A las 16 horas, el 66,66%.

A las 18 horas, el 66,66%.

A las 20 horas, el 66,66%.

A las 24 horas, el 66,66%.

De nuevo vemos la necesidad de una digestión péptica previa para obtener resultados de total eficacia.

Si bien, tanto en las soluciones de Tripsina - Pancreatina y Solución H completa, los restos de membrana del cisticercos aparecen completamente digeridos, estas soluciones no actúan lo suficientemente como para estimular la desenvaginación de una manera rápida como ocurre tras la digestión péptica.

D.W. FEATHERSTON (1971) (35), empleando 0,1% de Tripsina, 0,1% de Pancreatina y 5% de Bilis, no encuentra diferencias entre los no tratados con pepsina y los tratados, quizás, se deba a la mayor concentración de bilis y sus efectos tenso-activos.

Los resultados que aparecen variables de unos tratamientos a otros, con la misma técnica, quizá se deban a la variabilidad de unos cisticercos a otros, pues, a pesar de tratar

de homogenizar los lotes, es indiscutible que exista la variabilidad individual.

Por otra parte, vemos que la vesícula del cisticerco no juega el papel que EDGAR S.A. (1941) (29) y WARDLE y MACLEVEL (1952) (150) indican para la desenvaginación. La vesícula, como indicábamos anteriormente en Material y Métodos, fue en todos los casos previamente eliminada en la disección.

5.3.- CULTIVO *IN VITRO* DE *TAENIA HYDATIGENA*

El origen de los cisticercos cultivados *in vitro* no evidencia, como posteriormente veremos, diferencias entre los de procedencia ovina o caprina, hospedadores usuales y de fácil obtención en nuestra geografía. A diferencia de lo encontrado por J.D. SMYTH (1973-1974) (118), (1974) (120), (1974) (121) (122) y (1974) (123) en que, para *E. granulossus*, demuestra diferencia epidemiológica para los quistes procedentes de caballo y los procedentes de oveja.

Nosotros, repetimos, no encontramos diferencias en el momento de cultivar la *T. hydatigena*, bien sea de cisticercos obtenidos en caprinos o en ovinos.

Por lo demás, como apuntábamos en la discusión para condiciones de la desenvaginación del *Cisticercus tenuicollis* de

T. hydatigena, es un parásito con unos requerimientos biológicos muy parecidos, por su evolución, a otros cestodes que poseen el mismo hospedador definitivo (*E. granulossus*, *T. serialis*, *T. crassiceps*, J.D. SMYTH y col.) (

Experiencia n° 1

El medio empleado fue el MTH - 1, pH = 7,4.

Fase sólida: Agar - Suero.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Los cestodes empleados, una vez desevaginados, se colocaron en los frascos. Sólomente un ejemplar, de los veinte utilizados, desprendió la masa del cisticerco.

Esto puede interpretarse, quizá, como falta de consistencia de la fase sólida, no ofreciendo resistencia y por tanto apoyo mecánico después de la penetración en la misma del escolex.

La presencia en el medio de zonas opacas junto a los escolex, nos sugiere un posible fenómeno de digestión externa por parte de los escolex, fenómeno observado por otros autores para otros cestodes (J.D. SMYTH, MILLER & HOWKINS (1967) (113)).

Experiencia n° 2

Medio de cultivo: MTH - 2, pH = 7,2

Suero Equino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Los cisticercos fueron tratados, igual que en la experiencia anterior, con solución de pepsina 1%, a pH = 2, tras lo cual, se lavaron y se pasaron a la solución desenvaginante con Taurocolato sódico en lugar de Bilis.

La masa del cisticerco se desprendió en un 30% de los casos a las 48 horas. Este fenómeno, como veremos en posteriores experiencias, debe estar sujeto a varios factores:

- a.) Una digestión péptica intensa.
- b.) Una prolongada acción de los enzimas "intestinales".
- c.) Una suficiente consistencia en la fase sólida para permitir un apoyo suficiente tras la penetración del escolex; de esta manera, quizá, activen los movimientos, tanto del cuello como de la región posterior del cisticerco, y facilitar, así, la "rotura".

J.D. SMYTH (1969) (116) sugiere que la "rotura" podría estar influenciada tras el tratamiento enzimático en *T. serialis*.

lis.

Nosotros consideramos que este proceso *in vivo* debe verse grandemente facilitado por los movimientos tanto de la mucosa como por los peristálticos generales del intestino.

En esta experiencia obtuvimos, sólo en las regiones de los escolix libres, indicios de evolución a los once días, apareciendo visibles los canales excretores. El tamaño, a los 19 días de cultivo, fue de 4 mm.

Experiencia n° 3

El origen de los cisticercos, en este caso, fue de ovinos, a diferencia de las anteriores experiencias, en que fue caprino.

El pretratamiento fue idéntico a la experiencia anterior.

El medio de cultivo fue:

Fase líquida: MTH - 3; pH = 6,8.

Fase sólida: Suero Equino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Los cisticercos perdieron la masa posterior en un 32%.

A las 48 horas de puestos en el medio de cultivo aparecen vesículas en las cutículas de los cestodes. Se mantuvieron hasta 12 días en que aparecieron completamente llenos de ellas y muertos.

La aparición de estas vesículas puede deberse, en primer lugar, al excesivo tiempo de almacenamiento (5 días a 4°C) y quizá, a las 23 horas que se mantuvieron con el Taurocolato sódico de la solución desenvaginante.

Los cisticercos fueron mantenidos 5 días a 4°C, al objeto de ver si había alguna influencia en el desprendimiento de la masa posterior del mismo.

Experiencia n° 4

Los cisticercos de esta experiencia tuvieron el mismo origen, pretratamiento y tratamiento que en la experiencia anterior. Los escolax, en lugar de esperar a desprenderse, fueron cortados al segundo día, mostrando crecimiento, no ordenados, a partir de las zonas de corte. A los once días mueren.

Experiencia n° 5

Los cisticercos empleados provenían de la cavidad abdominal de caprinos. El pretratamiento y fase líquida fue idéntica a las anteriores experiencias.

Como fase sólida se empleó suero Equino, 5 ml. y Sangre canina, 0,1 ml.

Solución desenvaginante con Taurocolato sódico, 1 ml.

Todo ello coagulado a 80°C durante 90 minutos.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A las 18 horas aparece un 40% de escolex libres de la masa posterior del cisticerco.

A las 36 horas aparecen muertas y con abundantes vesículas.

Este fenómeno, como apuntábamos anteriormente, puede deberse al íntimo y prolongado contacto de los cestodes con el Taurocolato sódico; quizá el Taurocolato que empleamos, como posteriormente veremos en otras experiencias, contenga contaminantes de Desoxycolato sódico (característica de las bilis de los herbívoros). Esta sal, por otra parte, tiene propiedades líticas para el tegumento de *E. granulossus* según J.D.SMYTH (1962) (107); J.D. SMYTH y HASLWOOD (1963) (108). Posiblemente *T. hydatígena* tenga un comportamiento similar al cestode utilizado por SMYTH y col.

Experiencia n° 6

Los cisticercos procedían de la cavidad abdominal de ovinos.

La digestión péptica se realizó con pepsina al 0,1% con pH = 1,4, durante 45 minutos.

El resto del pretratamiento fue idéntico a casos anteriores.

El medio de cultivo consistió:

Fase líquida: MTH - 4.

Fase sólida: Suero Equino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Se desprendieron de sus masas el 13,33% de los cisticercos. Sobrevivieron 40 días, no mostrando evolución.

Se empleó una digestión péptica muy suave, al objeto de ver su efecto en la pérdida de la masa posterior.

Como se puede apreciar en el resultado obtenido, efectivamente juega un importante papel, quizás digiriendo, aún cuando el cisticerco está sin desenvaginar, zonas del cuello menos protegidas por los mucopolisacáridos de la cutícula. Evidentemente se puede apreciar una zona antes de la "rotura" más estrecha en el cuello (Microfoto n° 16). como asimismo, una zona desguarnecida de la cutícula, tras la separación de la masa del cisticerco (Microfoto n° 17). Esto nos indicaría, quizá, una zona de "rotura" preestablecida ya en el cisticerco.

Experiencia n° 7

Los cisticercos procedían de la cavidad abdominal de caprinos. El pretratamiento idéntico a las experiencias anteriores, salvo en la digestión péptica que fue al 0,1% con pH de 1,4. Se realizó esta digestión durante una hora y 35 minutos.

El medio de cultivo fue el MTH - 4 a pH = 7,1.

Fase sólida: Huevo total coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A los dos días en el medio de cultivo aparecen un 70% de los escolex sin la masa del cisticerco.

A los 6 días de cultivo aparecen muertas por contaminación.

En esta experiencia se observa, nuevamente, el fenómeno de la "rotura" en un porcentaje más elevado. La concentración de pepsina y el pH son los mismos de la experiencia anterior, pero no el tiempo de tratamiento, anteriormente 45 minutos, y aquí una hora 30 minutos, lo que nos indica que, a igual concentración pero más tiempo de tratamiento, el efecto, en cuanto a pérdida de la masa del cisticerco, es inferior.

En esta experiencia se empleó como fase sólida el huevo total coagulado, esta fase es más consistente, lo que, en cierta manera, dificulta la penetración de los escolex pero fa

cilita un punto de apoyo para separación de la masa. Se empleó esta fase sólida al objeto de cambiar la base protéica, como, asimismo, suministrar los lípidos que componen la yema del huevo.

Experiencia n° 8

La procedencia y tratamiento de los cisticercos fueron idénticas a la experiencia anterior.

El medio de cultivo fue el mismo empleado anteriormente.

El que aparezca el 80% de escolex libres lo interpretamos como en la experiencia anterior.

A los 8 días de cultivo crecen hasta 4-6 mm. de los 2 mm. aproximadamente que poseen los escolex inicialmente.

A los 13 días de cultivo aparecen con bandeado patente.

A los 14 días muestran los escolex (ventosa y rostelo), acusados signos de degeneración ("hinchamiento") que interpretamos, quizás, como una degeneración del mismo por causa de una base sólida muy compacta y, por tanto, muy impenetrable, tanto para la penetración de los escolex, como para la digestión externa y asimilación de productos de la misma por parte del cestode.

A los 24 días mantienen los mismos signos de evolución y degeneración.

A los 30 días empiezan a aparecer mayores signos de degeneración, algunas aparecen muertas, llegando algunas vivas hasta el día 45-46.

Al 47° día todas aparecen muertas.

No mostraron mayor evolución de bandeado intenso.

Experiencia n° 9

Como consecuencia de los signos de degeneración mostrados por los cestodes, se probó una digestión péptica menos intensa, con la cual, los cisticercos, de similar origen a la anterior experiencia, fueron tratados con pepsina al 0,1%, durante una hora.

La fase líquida del medio de cultivo fue el MTH - 4
Como fase sólida: huevo total coagulado a 90°C, durante 90 minutos.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

A los dos días se desprenden de sus masas el 50% de los escolex, permaneciendo este valor hasta el tercer día en que se colocaron sólo los escolex, en los frascos de cultivo. Este valor de un 50% de desprendimientos está en consonancia de lo que antes apuntábamos: a igual consistencia de

fase sólida, desprenden más escolex los que han sido tratados con una digestión péptica más intensa.

Los escolex, en los frascos de cultivo, no llegaron, en ningún momento a introducirse en las fases sólidas.

A los 34 días de cultivo, no mostraron signos de evolución, se deshechó el cultivo.

Experiencia n° 10

Como consecuencia de la no penetración de los escolex, se repitió, exactamente, la experiencia anterior, preparando una fase sólida mas "blanda" con huevo total coagulado a 80°C unos 60 minutos.

Se liberan de la masa del cisticerco el 41,66% de los escolex, colocándose los no liberados junto con las masas libres en frascos similares a los de cultivo de los escolex.

A los 10 días de cultivo se aprecia, en una de las masas aisladas del escolex en la región del cuello, una zona foliácea aplanada.

A los 20 días, en la zona anterior, se observa "bandeado", observándose, así mismo, en algunos escolex.

Día 30, aparecen burbujas en las cutículas.

Día 40, las burbujas ocupan la totalidad de los escolex aislados.

Día 43, aparecen muertas. Los escolex aislados. Los cisticercos no poseen más evolución de la anteriormente señalada.

El fenómeno observado de "bando" en la zona foliácea del resto de cuello en la masa libre, indicaría una cierta potencialidad de diferenciación por parte de algunas células que componen la referida zona.

La presencia de las deformaciones cuticulares, a la vista de los resultados definitivos obtenidos en esta Tesis, quizás, nos induzca a pensar en una inadecuada fase sólida.

Experiencia n° 11

Los cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de caprinos, tras los habituales pretratamientos, fueron tratados con solución de pepsina 1% y pH 2, durante media hora, tras lo cual se siguieron las manipulaciones habituales.

Los medios probados fueron:

MTH - 4 y MTH - 5, como fases líquidas.

Huevo total coagulado, como fase sólida.

CO₂ 10%; N₂ 90%, como fase gaseosa.

A los 3-4 días se aprecia en los dos lotes la pérdida de la masa del cisticerco.

A los 12 días se les aprecia crecimiento en el medio MTH - 4, mientras que en el MTH - 5 se les aprecia un ligero "bandeado" en el mismo día.

A los 14 días en el medio MTH - 4 aparece ligero "bandeado".

A los 17 días se les aprecia, en el MTH - 4, burbujas en las cutículas y escolex anormales muy hinchados.

A los 19 días las sacrificamos por poseer abundantísimas burbujas.

A los 24 días en MTH - 5 miden unos 4 a 6 mm. con "bandeado".

A los 30 días las sacrificamos y se tiñeron, mostrando un bandeado intenso.

J.D.SMYTH (1962) (107), (1966) (109), (1969) (115), (1973) (118) (comunicación personal), (1974) (119) emplea en algunos casos un 20% de líquido hydatídico para el cultivo *in vitro* de *E. granulossus*, sin emplear, en estos casos, suero bovino fetal. Nosotros hemos preferido emplearlo al 10% con otro 10% de suero bovino fetal en el MTH - 5.

Es curioso notar la mayor rapidéz de aparición de bandeado en el segundo medio (MTH - 5), así como la ausencia de burbujas, cuando, además, las fases sólidas empleadas y el suero eran del mismo origen. Quizá, lo que en la anterior experiencia apuntábamos -la inadecuada fase sólida- quede, en cierta forma, compensada con algún nutriente presente en el líquido del cisticerco.

Experiencia n° 12

Los cisticercos procedían de la cavidad peritoneal de caprinos. Fueron tratados exactamente igual que en la experiencia anterior, salvo en el tratamiento pépsico que el pH empleado fue de 1,9 en lugar de 2.

Como medios líquidos se emplearon los medios MTH - 4 y MTH - 5.

Como fase sólida se empleó huevo total coagulado (HTC) y suero equino coagulado (SEC). Distribuidas a razón de (S.E.c) - MTH - 4; (H.T.C.) - MTH - 4 y (SEC) - MTH - 5; (HTc) - MTH - 5.

MTH - (Huevo total coagulado).

No se aprecia evolución en 10 días, el cultivo se deshechó por no mostrar actividad los gusanos.

Al tercer día todos los escolex se separaron de sus masas respectivas.

MTH - 5 - (Huevo total coagulado).

Al cuarto día se desprenden los escolex de las masas del cisticerco.

Al 10° día aparece una zona aplanada en los cuellos de las masas libres de los escolex.

Al 19° día se aprecia crecimiento en los escolex libres, unos 5 milímetros.

Al 35° día se sacrifican, miden unos 6 mm. No se aprecia evolución.

MTH - 4 -(suero coagulado).

Al 5° día aparecen los escolex libres.

Al 12° día se aprecia crecimiento, unos 6 mm.

Al 30° día se les aprecia "bandeado".

MTH - 5 -(suero coagulado).

Al 5° día los escolex aparecen libres.

Al 12° día se observa "bandeado", de idéntica manera al observado el 12° día.

En el caso de MTH - 5 - huevo coagulado, vuelve a aparecer, en la única masa que quedó, idéntico fenómeno al descrito anteriormente.

En esta experiencia interpretamos que la fase sólida, huevo coagulado, es una fase insuficiente, bien por su pobreza o por la consistencia del coágulo.

Experiencia n° 13

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad abdominal de ovinos. Fueron pretratados de una manera exacta a la experiencia anterior.

El medio empleado fue:

MTH - 5 como fase líquida.

Como fases sólidas se emplearon:

Clara de Huevo - Suero Equino)CH - SE)

Clara de Huevo (CHc)

Clara de huevo - Sangre (CHc-Sangre)

Fase gaseosa: como en la experiencia anterior, CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

CH - Suero.

A los 3 días desprenden la masa del cisticerco los 6 escolex.

Los escolex libres en los medios de cultivo, a los 32 días no se les aprecia evolución. Llegan a medir unos 6 mm. al cabo de este tiempo.

CH

A los 3 días se desprenden de las masas los 7 escolex.

A los 17 días miden cerca de 6 mm.

A los 19 días se visualizan los canales excretorios.

A los 20 días se aprecia ligero "bandeado".

A los 32 días no se aprecia más evolución.

CH - Sangre.

Al 4º día se separan los escolex de las masas, los 7 escolex puestos en cultivo.

17º día se aprecian los canales excretorios.

27º día sacrificamos el cultivo. Se aprecian partidas en varios trozos, con "bandeado". Miden, en total, unos 15 mm.

La posible explicación de por qué sucede que en la fase CH - suero no exista evolución, la podemos tener en la calidad del suero. Bien conocido es, por los investigadores dedicados al cultivo de tejidos, este dato. Sueros obtenidos del mismo individuo, en diferentes momentos, son de resultados totalmente diferentes, en el cultivo *in vitro* de *Schistosoma*,

J.CLEGG (1974) (17). Asimismo, J.D. SMYTH (1974) (122) da cuenta de la variabilidad de los sueros, en el cultivo *in vitro* de *E. granulossus*, llegando algunos a producir efectos líticos sobre los parásitos. Dando, asimismo, cuenta de la imposibilidad que entraña el probar antes de la experiencia con los *Echinococcus*, como rutinariamente se efectúa para los cultivos celulares, debido a la variabilidad intrínseca de unos vermes con otros de la misma especie.

La aparición de escolex degenerados, y las roturas encontradas, podríamos explicarlo como un proceso degenerativo de los cestodes introducidos en la fase sólida al ser esta fase mas compacta y menos blanda y untuosa que los sueros coagulados.

Experiencia n° 14

Los cisticercos fueron tratados de la manera habitual, lavados, digestión péptica 1%, pH = 1,7, 45 minutos y solución desenvaginante A, con Taurocolato sódico. Como medio de cultivo se empleó el MTH - 5 ajustado a pH 1,7.

Como fase sólida se empleó clara de huevo - EEP

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Al 2° día se separa el 85% de los escolex de sus respectivas masas.

Al 8° día se observa crecimiento. Miden unos 4 ó 5 mm.

Al 10° día se aprecian los canales excretores.

Al 11° día se aprecia "bandeado".

Al 25° día se sacrifica el cultivo, con ejemplares de unos 16 mm., pero grandemente deformados y con fenómenos teratológicos y no se aprecia más evolución que el "bandeado".

El anárquico crecimiento mostrado solamente es explicable por el íntimo contacto con la fase sólida por parte de los escolex, poseyendo ésta, en el EEP, algún factor estimulante del crecimiento pero no así de la diferenciación.

Experiencia n° 15

Los cisticercos, de la cavidad abdominal de cabras, fueron tratados de igual forma a la experiencia anterior.

El medio de cultivo estaba compuesto de:

Fase líquida: MTH - 6.

Fase sólida: Clara de huevo - EEP, todo ello coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

El segundo día de la puesta en cultivo se separaron de la masa del cisticerco el 84,6%.

Los escolex aislados fueron sembrados, encontrándose el día 25 una pseudosegmentación en la región terminal y una longitud de 12 mm. de media, pero altamente deformados.

El 84,6% de eliminación de las masas posteriores, lo

interpretamos como resultado de una digestión péptica intensa, tal y como anteriormente lo interpretábamos.

Tanto la pseudosegmentación como los efectos teratológicos inducidos en los cestodes, lo interpretamos como producidos por un estimulador del crecimiento contenido en el EEP en la fase sólida y su íntimo contacto por parte de los escolex.

Experiencia n° 16

Los cisticercos, de la cavidad abdominal de ovinos, fueron tratados con pepsina al 1%, durante 60 minutos y a pH= 1,7. Posteriormente se les continuó el tratamiento como en las experiencias anteriores.

Los medios empleados fueron:

Como fase líquida, los medios MTH - 5 y MTH - 6, a pH = 7,2.

Fase sólida: Clara de huevo EEP - Testosterona.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Medio MTH - 5

Al 3° día se separan las masas de los escolex en los cisticercos de este lote.

Al 7° día se aprecia crecimiento.

Al 16° día miden unos 17 mm., en algunas se aprecia "bandeado".

Medio MTH - 6

Al 3° día se separan las masas del cisticerco.

Al 6° día miden unos 6 mm.

Al 8° día se aprecian aplanadas, más traslúcidas de lo habitual. Se hacen visibles los canales excretorios. En la parte terminal se aprecia un muñón.

Al 12° día miden entre 9 y 12 mm. Aparece "bandeado".

Al 13° día miden entre 10 y 14 mm. se aprecia crecimiento anárquico en la región del cuello.

Al 16° día, inicios de una segmentación anárquica.

El medio MTH- 6 con el extracto de placenta, unido a la base sólida, en la que la clara de huevo coagulada, como soporte sólido protéico. El EPP como suplemento nutritivo por una parte unido a los estimuladores del crecimiento (mitosis), (ampliamente empleado para el cultivo de tejidos) y la testosterona, al objeto de ver si jugaba algún papel en la diferenciación interna de los estróbilos, ya que SZIDAT, habla de la influencia en la fertilidad de los *Echinococcus in vitro*.(133).

Por otra parte, colocamos en el medio extracto de placenta humana.

Todo ésto hace que los vermes tengan un crecimiento anómalo, con grandes deformaciones, e inicio anárquico de segmentación.

Además, la gran proporción de escolex libres de sus respectivas masas, una vez más, nos induce a pensar en la influencia de una digestión péptica intensa.

Experiencia n° 17

Los cisticercos, de la cavidad abdominal de caprinos, fueron, una vez libres de la membrana periquística, colocados y triturados en batidora, con sol. del pépsina 0,5%, a pH 1,8 y 38°C, durante 5 segundos (Técnica modificada de J.D. SMYTH y Z. DAVIES (1973 com. personal y 1975) (118) (124)), manteniéndoseles, por espacio de 1 hora, 10 minutos, en estufa Hermi a 38°C con agitador Kotterman a 90 impulsos por minuto. Tras esta digestión, fueron tomados los cisticercos y lavados en sol. de Hank; tras lo cual fueron pasados a sol. desenvaginante C, de donde fueron pasados a sol. C y suero bovino coagulados, al objeto de eliminar allí las masas de los cisticercos.

A las 24 horas se separan el 70%, llegándose al 100% a las 48 horas.

Esto nos muestra la necesidad de la acción de enzimas externas en la rotura y eliminación de la masa del cisticerco. Los cisticercos, de una parte, sufren la acción de la pepsina, y de otra, durante 66 horas, la acción de la solución enzimática desenvaginante.

En la zona del cuello, que nos parece desguarnecida por la cutícula, posiblemente actúen estos enzimas favoreciendo la eliminación de la masa del cisticerco.

Experiencia n° 18

Los cisticercos provenían de la cavidad abdominal de

ovinos. Fueron tratados de igual manera que en la experiencia anterior.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 4, ajustado a un pH de 7,3.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Al 3° día se separan las masas de los escolex en un 100%.

Al 7° día aparecen "bandeado".

Al 8° día miden de 4 a 6 mm.

12° día, "bandeado intenso".

15° día, sacrificamos. No se aprecia una mayor evolución.

Con este tratamiento conseguimos al fin, un pretratamiento óptimo, que seguiremos empleando en el resto de las experiencias. Sin embargo, en cuanto al cultivo, aunque, también estábamos en esta experiencia cerca de lograr el medio óptimo, como más tarde veremos, la falta de evolución nos despistó, preparando una serie de experiencias con variaciones de pH en el medio, que más adelante se detallan.

Experiencia n° 19.

Los cisticercos empleados, que provenían de ovinos, fueron tratados de idéntica manera que la anterior experiencia

sin trituración. Los escolex aislados fueron colocados en frascos de cultivo con medio MTH - 4, como fase líquida, ajustado a pH que variaban entre 5,8 - 6 - 6,7 - 7,3. El medio era cambiado cada tres días, y, con él, su pH, empezándose con el pH 5,8.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 90%.

Con esta experiencia se pretendía imitar el ritmo de emigración de los vermes a través del intestino delgado del cánido (D.W. FEATHERSTON (1969) (33)).

El 3° día se pasan los escolex a los medios, todos se han liberado de sus masas. pH = 5,8.

Al 6° día aparecen, 5 de ellas, muy rígidas.

Al 10° día aparecen los escolex hinchados.

Al 12° día mueren. No se aprecia evolución.

Se pensó, que, quizás tanto las soluciones desvaginantes como el medio de cultivo, necesitaban algún factor natural presente en el jugo duodenal (como por ejemplo el factor intrínseco para la vitamina B 12), cambiándose nuevamente las soluciones desvaginantes y el medio de cultivo, para las posteriores experiencias.

Experiencia n° 20

Los cisticercos empleados provenían de la cavidad

abdominal de ovinos. La digestión péptica fue idéntica a la experiencia anterior.

Como solución desenvaginante se empleó jugo duodenal canino suministrado por el Departamento de Fisiología Animal. Diluyendo 4 partes con una de medio de cultivo MTH - 8 con pH final de 6,2, los cisticercos desenvaginan, pero no completan la fase de alargamiento. Quizá debido a pobreza en algún factor, por parte del jugo duodenal.

El medio de cultivo empleado fue el MTH - 8, con concentraciones variables de jugo duodenal canino: 1:4; 2:4; 3:4; 4:4.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado, hematíes de carnero, coagulado casi horizontal, con papel celofán agujereado al objeto de ejercer sobre los cestodes una presión constante (técnica empleada en la fijación de Explantes de piel HSU y KELOGG (1969) (48)).

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 66° día se sacrifican los cultivos, encontrándose inicios de segmentación en la mayoría de los cestodes, midiendo unos 10-11 mm.

Experiencia n° 21.

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad

abdominal de ovinos.

El pretratamiento consistió en: disección, tratamiento péptico con pepsina 0,5%, pH = 1,9, durante una hora, 10 minutos.

Lavados en solución de Hãnk.

Solución desenvaginante C.

Para la separación de las masas se empleó un frasco con suero bovino coagulado y solución C como base líquida, obteniéndose el 94,11% de separaciones al tercer día.

Fase líquida: Medio de cultivo: MTH - 7; pH = 7,2.

Fase sólida: Suero bovino coagulado - Lisado de hemáties.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 4° día (1° día de su puesta en cultivo) aparecen burbujas en las cutículas, monstrándose los escolex vesiculosos. Quizá ésto sea a causa del Taurocolato sódico en contacto constante con los vermes. J.D. SMYTH (1962) (107), SMYTH J.D. & HALSBWOOD (1963) (108), J.D. SMYTH & DAVIES (1974) (122), hablan que algunos "Taurocolatos sódicos" tienen efectos líticos sobre la cutícula de *E. granulossus*, quizá ocurra igual para el cestode objeto de nuestro estudio.

Experiencia n° 22

Los cisticercos empleados provenían de la cavidad abdominal de ovinos.

El sistema de pretratamiento fue idéntico a la experiencia anterior, sustituyéndose la solución desenvaginante C por la B.

Una vez desenvaginados se pasaron a frascos con Suero bovino coagulado como fase sólida y solución desenvaginante B (3 partes) medio de cultivo una parte, para eliminar las masas de los cisticercos. Una vez eliminadas, se pasaron los escolex al medio.

Fase líquida: MTH - 9.

Fase sólida: Suero bovino - Lisado de hematíes.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 7° día aparece "bandeado".

Al 11° día sacrificamos el cultivo. No se aprecia mayor evolución.

A pesar de que a los 7 días aparezca "bandeado", igual que ocurre en el perro, D.W. FEATHERSTON (1969) (33), hay, sin embargo, algún factor o carencia que le impide continuar la evolución.

Por ello, pensamos que, quizá, las hormonas y componentes de la mucosa intestinal, consistencia, niveles de O₂,

etc., jueguen algún papel en el desarrollo de *T. hydatígena*, se preparó la siguiente experiencia que a continuación se detalla.

Experiencia n° 23

Los cisticercos provenían de la cavidad abdominal de ovinos. El pretratamiento seguido fue idéntico a la experiencia anterior.

Una vez libres de las masas del cisticerco, se pasaron al equipo de filtración XXII-04700, acondicionado para el caso. Con la base sólida sobre el prefiltro, tal como se describe en Material y Métodos.

Como fase líquida se colocó MTH - 9.

Fase gaseosa: se emplearon CO₂ 10%; N₂ 90%, que se hacía burbujear en el medio y CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%, que se hacía mantener constante en la parte inferior del sistema de filtración.

Al 3° día de puestas en el sistema de cultivo aparecen muertas por contaminación. El sistema era excesivamente complejo, y en alguna fase de su preparación o siembra debió contaminarse.

Experiencia n° 24

Se repitió, exactamente, la experiencia anterior, evitando en todo momento, la posible contaminación.

Al medio se le agregaron antibióticos:

Penicilina G Sódica, 100 UI/ml.

Estreptomina Sulfato, 100 mg./ml.

Micostatin: 100 mg./ml.

A pesar de todos los cuidados, al 4° día aparecen muertas por contaminación.

Experiencia n° 25

En esta experiencia se hicieron dos innovaciones, en primer lugar, los cisticercos eran, antes de ser lavados en alcohol, lavados en solución de Armil 1:5000, durante 90 segundos, y, en segundo lugar, se emplearon frascos Falcon 25 cm² de superficie.

El resto del procedimiento se siguió como es habitual, empleándose el medio MTH - 10, con pH que variaba entre 3,5 y 6,8, cambiándose cada tres días.

Como fase sólida se empleó Agar-Sangre.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 4° día se las aprecia activas.

Al 5° día se las aprecia vivas pero muy rígidas.

Al 7° día, los escolex hinchados, muy poco activas.

Al 10° día sacrificamos el cultivo por no mostrar ninguna actividad.

En esta experiencia se intentó ver si lo que necesitaba *T. hydatigena*, para su desarrollo, era Hemoglobina, o, al menos Hemina. W.S. EVANS (1970) (32) y J.S. SEIDEL (1971) (99), llegan a la conclusión de que un requerimiento imprescindible para el cultivo de *H. microstoma* es la Hemoglobina y la Hemina respectivamente.

Nosotros llegamos a la conclusión, después de los resultados obtenidos en experiencias que se detallarán posteriormente, de que *T. hydatigena* se comporta con esta fase sólida como cuando se la coloca en medios que carecen de ella, Quizá esta fase sea pobre en proteínas, impidiendo, así, su desarrollo.

Experiencia n° 26

Cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de ovinos y caprinos, indistintamente, fueron empleados en esta experiencia.

Se procedió de la manera habitual en las últimas experiencias para su disección y tratamiento enzimáticos. Para la eliminación de las masas se emplearon frascos Sorvivel con suero bovino coagulado y solución desenvaginante B (1:1) medio de cultivo como fase líquida. A los 3 días, el 100% de los escolex

habían perdido las masas.

Medio de cultivo:

Fase líquida: MTH - 11.

Fase sólida: Suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

A los 6 días de iniciar el tratamiento encontramos ondulación de los canales excretorios.

Al 7° día, miden unos 10 mm. de media, oscilando entre 8 y 12 mm. Se aprecia "bandeado".

Al 9° día, segmentación, los estróbilos aparecen nítidos.

Al 11° día se aprecian agregados celulares en el interior de los anillos.

Al 13° día, inicios de la formación de los velum.

Al 16° día mueren a causa de contaminación, por haber se fisurado el frasco de cultivo.

Si tenemos en cuenta los trabajos de D.W. FEATHERSTON (1969) (33) en que explica el desarrollo *in vivo* de *T. hydatigena*, al 7° día dice que hay "inicios de segmentación", posiblemente se refiera a lo que *in vitro* llamamos bandeado.

Siendo así, resulta que, en este medio de cultivo sigue la misma pauta de desarrollo que *in vivo* en estos primeros estadios.

Experiencia n° 27

Intentamos, en esta experiencia, con los datos de las anteriores, repitiendo todo exactamente igual, ver si tiene algún efecto, en el desarrollo, el origen del extracto de levadura empleado. En este caso se volvió, de nuevo, al procedente de la casa "Difco".

Encontrándose:

A los 6 días se aprecia crecimiento, unos 4 mm.

Al 7° día, "bandeado".

Al 10° día, continua el bandeado.

Al 15° día sacrificamos el cultivo, no mostrando más evolución de la anteriormente expuesta. Miden 10 mm.

A nuestro entender, el origen del extracto de levadura juega un importante papel en el desarrollo *in vitro*. Quizás, la preparación, la cepa o las cantidades totales del grupo de vitaminas B difieran de uno a otro, dándonos, pues, estos diversos resultados. SINHA, D.P. (1976) (103) da cuenta de un fenómeno similar para el cultivo *in vitro* de *Hymenolepis nana*, no todos los extractos de levadura, procedentes de diferentes casas comerciales, son útiles. Por otra parte, cuando un extracto válido es esterilizado en autoclave, pierde su efectividad, lo que indicaría una labilidad al calor por parte de algún supuesto factor.

Experiencia n° 28

Los cisticercos empleados procedían de la cavidad peritoneal de caprinos, siguiéndose para su preparación la metodología expuesta en la experiencia n° 26.

El medio de cultivo fue el MTH - 11, a pH = 7,1.

Como fase sólida se empleó suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO 10%; n 85%; O 5%.

Al 3° día, se siembran los escolex libres de sus masas.

Al 4° día, se aprecian visibles los canales excretores.

Al 7° día, aparece "bandeado".

Al 8° día, inicios de segmentación.

Al 9° día, los canales excretores parecen entrecruzarse en el proglotis distal.

Al 10° día, miden unos 12 mm. de media, con longitudes que oscilan de 15 a 8 mm.

Al 16° día, aparece la vesícula excretora en el anillo final.

Al 19° día, longitud media de 20 mm., con longitudes de 13 a 25 mm.

Al 20° día, se aprecia la protuberancia del poro genital cerrado.

Al 22° día miden unos 25 mm. de media.

Al 23° día, sacrificamos el cultivo para tinción y estudio microscópico.

En esta experiencia los vermes siguen evolución casi

idéntica al desarrollo *in vivo* D.W.FEATHERSTON (1969) (33).
Compartiendo los datos de este autor *in vivo* con los obtenidos
in vitro tenemos el siguiente cuadro:

C U A D R O N U M . 5

Dias	<i>In vivo</i>	<i>In vitro.</i>
7°	Signos de estrobilación	Aparece "bandeado".
8°		Segmentación.
9°		Canales excretores entrecruzándose en el último anillo.
15°	Vesícula excretora en el último anillo.	
16°		Vesícula excretora en el último anillo.
19°		Se observan condensaciones celulares en el interior de los anillos, posiblemente inicio testicular.
20°	Aparecen los testículos y primeras espermatogonias.	
22°		
25°	Utero abierto. Proglotis maduros.	

Como vemos, la evolución seguida es casi idéntica a la mostrada *in vitro* considerando por tanto que, aunque susceptible de mejorarse este medio, es un buen medio para el cultivo *in vitro* de este cestode.

Por otra parte, dado que este medio y el empleado por J.D. SMYTH para *E. granulossus* (1974) (122), *T. serialis* (1969) (116) y *T. crassiceps* (1973) (118) com. pers.) (1976 (30) tienen una gran semejanza, consideramos que *T. hydatígena* necesita análogos requerimientos que los anteriores cestodes para su desarrollo *in vitro*.

Esto es lógico, debido a que el medio ecológico en que tienen que completarse su desarrollo *in vivo* es similar en los cuatros cestodes.

Por otra parte, pensamos que *T. hydatígena* es un cesto de de elección para trabajos de Biología de desarrollo, ya que en 7 a 9 días llega a la segmentación, mientras que *T. serialis* y *E. granulossus* lo completan a los 11 y 14 días respectivamente, J.D. SMYTH y col. (1974, 1969) (124) (116).

Experiencia n° 29

Se partió de cisticercos procedentes de la cavidad abdominal de ovinos y caprinos. El tratamiento fue idéntico a la experiencia anterior, así como el sistema de cultivo, salvo en el SBF que, en este caso, no estaba inactivado.

Se apreció, desde el momento de la siembra, una tendencia a unirse por la región distal, desguarnecida de la cutícula, justo por el sitio donde se produce la rotura.

Este fenómeno ha sido también observado por J.D. SMYTH (1969) (114) (1974) para *E. granulossus* con algunos sueros, interpretándolos como un tipo de reacción inmunológica de precipitación o aglutinación.

Hay que hacer constar que el fenómeno de agregación ocurre sólo en la zona de "muñón" desguarnecida de la cutícula.

Nosotros interpretamos este fenómeno como un fenómeno inmunológico que actúa solo en la parte más vulnerable del cestode.

Experiencia nº 30

En esta experiencia intentamos ver la influencia de la falta de fase sólida (suero bovino coagulado) en el desarrollo *in vitro* de *T. hydatigena*. Para ello se procedió de la manera habitual en estas últimas experiencias.

Se probaron los medios MTH - 11; MTH - 12; MTH - 13.
Sin fase sólida.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Medio MTH - 11.

- Al 3° día, se siembran los escolex.
- Al 4° día muestran actividad normal.
- Al 5° día aparecen menos activas.
- Al 6° día aparecen vesiculosos los escolex.
- Al 7° día aparecen muertas.

Medio MTH - 12.

- Al 3° día se siembran los escolex.
- Al 4° día aparecen los escolex vesiculosos.
- Al 5° día aparecen rígidas y muertas dos de ellas.
- Al 6° día aparecen todas muertas.

Medio MTH - 13.

- Al 3° día se siembran los escolex.
- A las 84 horas de iniciada la digestión de los cisticercos aparecen los escolex vesiculosos.
- Al 4° día aparecen rígidas y muertas.

J.D. SMYTH y col. (1966) (111) (1967) (112) (1969) (116) cuando emplean medios monofásicos, observan que no se induce en los protoescolex diferenciación hacia el verme adulto, volviéndose éstos vesiculosos recordando los inicios de pequeños quistes.

Es de hacer constar que *E. granulossus* tiene la potencialidad de diferenciarse a partir de los protoescolex hacia vermes adultos, cuando llega al intestino del cánido, o hacia quistes cuando es inoculado o por accidente derramado en la cavidad general de un hospedador receptivo. Por tanto, consideramos

imprescindible para el cultivo de *T. hydatigena* la presencia de una fase sólida protéica, quizás, como sustrato de digestión externa y posterior absorción por el escolex de los productos digeridos, o quizás, como sugiere J.D. SMYTH (1967) (113) (1969) (116), estos productos absorbidos por el escolex estimulen un organizador de la estrobilación, diferenciándose el helminto.

Experiencia n° 31

Se comparan en esta experiencia los medios MTH - 11; MTH - 12 y MTH - 13, con fase sólida de suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Los cisticercos procedían de cabras y ovejas, manipulándose con ellos del modo habitual.

Al 3° día se siembran los escolex en los medios.

Medio MTH - 13

Al 5° día crecen hasta unos 5 mm.

Al 8° día se muestran rígidas, aunque activas. Se visualizan los canales excretores ondulados.

Al 10° día "bandeado".

Al 12° día segmentación.

Al 15° día sacrificamos para tinción.

Medio MTH - 12

Al 6° día miden unos 5mm.

Al 7° día se aprecia "ondulación" en los canales excretores.

Al 9° día "bandeado" acusado.

Al 11° día segmentación.

Al 13° día formación del estróbilo y velum.

Al 15° día sacrificamos para tinción.

Medio MTH - 11

Al 4° y 7° día, visualización de canales excretores.

Al 6° y 8° día, ondulación de canales excretores, con longitud de 4 a 5 mm.

Al 8° y 10° día, "bandeado", miden 10-12 mm.

Al 10° y 13° día, "segmentación", 16 mm. de longitud media.

Al 21° y 23° día, inicio de genital formado, velum, poro genital cerrado, 25-35 mm. de longitud.

Al 32° día, sacrificamos para tinción.

Como se muestra en esta experiencia, el medio MTH - 11 muestra una mayor predisposición a que los escolex de *T. hydatigena*, cultivados en él, se diferencien con mayor rapidéz que en los anteriores medios. Hay que tener, sin embargo, en cuenta la variabilidad de unos individuos a otros.

Experiencia n° 32

Se comparan, con el medio MTH - 11, las fases sólidas suero de caballo coagulado y suero de rata.

Los cisticercos provenían de caprinos y ovinos, tratándolos de la manera habitual en las últimas experiencias.

Suero de rata (Gibco)

Al 4° - 5° día, canales excretores visualizados.

Al 5° - 7° día, canales excretores ondulantes.

Al 10° - 12° día, "bandeado".

Al 12° - 14° día, segmentación.

Al 22° día, se sacrifican, mostrando la misma evolución del estadio anterior.

Suero de caballo (Llorente).

Al 5° - 6° día, visualizaciones de canales excretores.

Al 7° - 8° día, "ondulación".

Al 10° - 13° día, "bandeado".

Al 12° - 16° día, segmentación.

Al 22° día, se sacrifican. No muestran mayor evolución de la lograda anteriormente.

Como nos parece mostrar en esta experiencia, tanto el suero de caballo como el de rata son válidos para la diferenciación de *T. hydatigena in vitro*, aunque el desarrollo sea algo más lento.

Esto lo interpretamos como una variabilidad, más que

en los componentes bioquímicos, que indudablemente existen, en las propiedades fisicoquímicas de los sueros una vez coagulados. Quizá, el pH, el Eh o incluso la consistencia de los mismos juegue cierto papel en el desarrollo de *T. hydatigena in vitro*.

Experiencia n° 33

Se emplea en esta experiencia Agar-Sangre como fase sólida en el medio de cultivo.

Como fase líquida se empleó MTH - 11.

Como fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

A los tres días son pasados los escolex a los medios de cultivo.

Al 7° día se visualizan los canales excretores con ligera ondulación.

Al 10° día, canales excretores ondulantes.

Al 13° día, inicio de "bandeado".

Al 23° día, se sacrifica el cultivo. No se aprecia mayor evolución.

Esta experiencia nos parece confirmar lo que anteriormente apuntábamos, sobre la necesidad de una fase sólida con alta riqueza de proteínas.

Los resultados obtenidos nos recuerdan los obtenidos en las primeras experiencias.

Las necesidades de este cestode parecen ser distintas de las que *Hymenolepis microstoma* necesita para su cultivo *in vitro* (W.S. EVANS, (1970) (32)) J.S. SEIDEL (1971) (99).

Experiencia n° 34.

Se parte de 10 cisticercos procedentes de caprinos y ovinos. Para su preparación se siguió igual metodología que en anteriores experiencias.

El medio empleado fue el MTH - 11, como fase líquida.

Fase sólida: Suero bovino coagulado.

Fase gaseosa: CO₂ 10%; N₂ 85%; O₂ 5%.

Al 3° día se siembran los escolex.

Al 2° - 4° día de la desenvaginación se visualizan los canales excretores. Miden 4 mm.

Al 7° - 10° día, segmentación, 15-16 mm.

Al 12°- 15° día, formación del velum.

Al 18°- 20° día se observan condensaciones celulares en el interior de los anillos. Presencia del poro genital cerrado, 25-35 mm.

Al 35° día, 35-40 mm.

Al 40° día se sacrifican para tinción y estudio microscópico.

En esta experiencia, como en las anteriores que se ha logrado segmentación con el medio MTH - 11, se consigue una evolución paralela, en algunos momentos, idéntica al desarrollo

in vivo en el intestino de los cánidos.

La existencia de variaciones en cuanto al tamaño y tiempo de evolución, lo interpretamos como variabilidad individual de unos ejemplares a otros.

6.1.- SOBRE *FASCIOLA HEPATICA*

- 1°.- El método que en nuestras experiencias ha resultado óptimo para la liberación de metacercarias de *Fasciola hepática* es el método de Dixon modificado. Con nuestra modificación conseguimos purificar los parásitos de los restos de quistes de la metacercaria.
- 2°.- Hemos conseguido cultivar *in vitro* hasta el 5°- 6° estadio del desarrollo, que según Dawes se da *in vivo* en *Fasciola hepática*, a partir de metacercarias desenquistadas; considerándose este estadio como el máximo logrado *in vitro* hasta este momento según la bibliografía mundial consultada, empleando un medio de cultivo original.
- 3°.- Los medios de cultivo para *Fasciola hepática*, completamente líquidos, sin ningún tipo de partícula o célula, no han resultado suficientes para mantener un cultivo prolongado de las mismas, lo que sugiere que gran parte de los productos asimilables del medio son ingeridos en forma sólida y, posteriormente, digeridos.
- 4°.- Un medio de cultivo compuesto de suero equino y glóbulos es suficiente para mantener los primeros estadios de desarrollo de *Fasciola hepática*, a partir de metacercarias

desenquistadas, apareciendo los vermes con una evolución similar a la mostrada *in vivo* por los parasitismos erráticos de la misma, descritos por algunos autores.

- 5°.- En un medio compuesto de extracto de placenta humana y suero bovino fetal, el desarrollo de *F. hepática* es paralelo al mostrado *in vivo* en ratón, consiguiéndose el estadio 5° o 6° de desarrollo, equivalente a adolescencia con genital formado, aunque éste último no desarrollado totalmente.
- 6° .- Cuando como medio de cultivo se emplea placentas con meconio, los vermes mueren rápidamente, considerándose este fenómeno como probable influencia de la glucuronidasa y de otras sustancias presentes en el meconio.
- 7°.- Los medios MFH - 8 y MFH - 10 constituyen fases líquidas del medio capaces de mantener un crecimiento inicial óptimo para *F. hepática*.

6.2.-SOBRE TAENIA HYDATIGENA.

- 8°.- Hemos cultivado *Taenia hydatigena* por primera vez, des

la fase de cisticerco hasta el estadio de adulto no fértil, siguiéndose, a lo largo del cultivo, una evolución casi paralela a su desarrollo *in vivo*.

- 9°.- La desenvaginación *in vivo* de *Cisticercus tenuicollis* de *T. hydatigena* tiene lugar fundamentalmente en ambientes aeróbicos.
- 10°.- La acción previa de tratamiento péptico no es indispensable para la desenvaginación de los cisticercos, que pueden sufrir este proceso en cualquiera de las siguientes soluciones: Tripsina-Pancreatina, Tripsina-Bilis, Pancreatina-Bilis, Tripsina-Pancreatina-Bilis, pero sí parece indispensable para obtener el efecto máximo del 100%.
- 11°.- El tratamiento óptimo para la desenvaginación de *Cisticercus tenuicollis in vitro*, requiere: a) un tratamiento péptico previo; b) un subsiguiente tratamiento con solución compuesta de Tripsina, Pancreatina y Bilis. De esta forma se consigue alcanzar una desenvaginación del 100% a la 1/2 hora de tratamiento.
- 12°.- Los cisticercos de *T. hydatigena*, recogidos y transportados al laboratorio, requieren ser almacenados a 4°C durante dos horas, al objeto de, tras los tratamientos

enzimáticos, obtener una desenvaginación *in vitro* del 100% a los 30 minutos de tratamiento.

- 13°.- La desenvaginación *in vitro* de los cisticercos no queda afectada, y por tanto la viabilidad, tras la permanencia durante dos horas de los cisticercos a -25°C ; -10°C y descongelación rápida de los mismos. No siendo así cuando éstos son descongelados lentamente. Asimismo, quedan inviables cuando son mantenidos a 40°C o 53°C durante dos horas.
- 14°.- Los cisticercos de *T. hydatígena*, mantenidos a 4°C , pierden paulatinamente viabilidad hasta llegar a inviabilidad absoluta a los 15 días de almacenamiento.
- 15°.- La desenvaginación de cisticercos de *T. hydatígena* tiene lugar instantáneamente a pH neutro o próximo a la neutralidad, supuestas óptimas las demás características del medio.
- 16°.- Parece existir en el cuello del cisticerco de *T. hydatígena* una zona preestablecida, por donde el cestode realizará la liberación de la "masa embrionaria" del cisticerco. Para que esta separación sea realizada en un 100% es necesario: un pretratamiento péptico intenso, la presencia de las enzimas componentes de la solución desenvaginante y una fase sólida que ayude, como punto de apoyo

y resistencia, a los movimientos de penetración en la misma por parte del escolex.

17°.- No todos los extractos de levadura comerciales son óptimos para el desarrollo *in vitro* de *T. hydatígena*.

18°.- Para el cultivo *in vitro* de *T. hydatígena* es necesario un medio trifásico, en el que la fase gaseosa debe llevar O₂, la fase líquida MTH - 11, y una fase sólida de suero coagulado. En ausencia de ésta última, los cestodos no evolucionan. El suero óptimo para emplear como fase sólida es suero bovino coagulado. Otras fases sólidas se han comportado ineficaces para el desarrollo *in vitro* de *T. hydatígena*, al menos en las condiciones experimentales empleadas en esta investigación.

19°.- El Taurocolato sódico puro del comercio parece tener efectos líticos sobre la cutícula de *T. hydatígena* tras el contacto del verme con el mismo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...

- 1.- Baer, J.G. (1971).
EL PARASITISMO ANIMAL.
Edi. Guadarrama. 249.
- 2.- Baillet, M.C. (1862)
NOUVELLES EXPERIENCES SUR LE Cysticercus tenuicollis DES RUMINANTS ET SUR
LE Taenia QUI RESULTE DE SA TRANSFORMATION DANS L'INTESTIN DU CHIEN.
Bull. Soc. Imp. Méd. Chir. et Pharm., 63: 22-28 (citado por SWEATMAN
Y col.).
- 3.- Barriga, O.O. (1971).
SOBREVIDA DE ESCOLICES DE E. granulossus EN SOLUCION SALINA Y EN LIQUIDO
HYDATIDICO A DIFERENTES TEMPERATURAS.
Bol. Chil. Parasitol. XXVI (3-4): 80-83.
- 4.- Benex, J. (1966).
LES POSSIBILITES DE LA CULTURE ORGANOTYPIQUE EN MILIEU LIQUIDE DANS L'ETUDE
DES PROBLEMES PARASITAIRES. III. LE MANTEN EN SURVIE "in vitro" DE Fas-
ciola hepática ET DE Dicrocoelium lanceolatum.
Bulletin de la Soc. de Pathologie Exotique, 59: 99-105.
- 5.- Berntzen, A.K. (1960)
AN EFFECTIVE METHOD FOR THE "in vitro" CULTURE OF Hymenolepis diminuta.
J. Parasit., 46 (5 sect. 2, Suppl): 47.
- 6.- Berntzen, A.K. (1961)
THE "in vitro" CULTIVATION OF TAPEWORMS. I. GROWTH OF Hymenolepis diminuta
(CESTODA: Cyclophyllidae)
J. Parasit., 47: 351-355.
- 7.- Berntzen A.K. (1965).
COMPARATIVE GROWTH AND DEVELOPMENT OF Trichinella spiralis "in vitro" AND
"in vivo", WITH A REDESCRIPTION OF THE LIFE - CYCLE.
Expl. Parasit. 16: 74-106
- 8.- Bidloo, G. (1698).
BRIEF VA G. BIDLOO AAN ANTHONY LEEWENKOEK VVEGENS DE DIEREN, WELKEN MEN
ZOMIYDS IN DER SCHAAPEN EN ANDERE BEESTEN VIND.
H. van Kroonevelt, Delft 1968 (CITADO POR PANTELOURIS E.M. 1975.
- 9.- Bogitsh, B.J. (1967).
HYSTOCHEMICAL LOCALIZATION OF SOME ENZYMES IN CYSTICERCOIDS OF TWO SPE-
CIES OF Hymenolepis.
Exp. Parasit., 21: 373-379.

- 10.-*Bojanus, L.H. (1818)*
 KURZE NACHRICHT ÜBER DIE ZERKARIEN UND IBREN FUNDORT.
 Isis von Oken, Jahrg, 729-730 (citado por Pantelouris E.M., 1965).
- 11.-*Bronn, H.C. (1884-1900).*
 KLASSEN UN ORDUNNGEN DES TIER.
 Reichs I Abteilung, b. cestodes, 4 Wurmer. 1884-1900 (citado por
 Sweatman y col. 1957).
- 12.-*Butning, P. (1927)*
 ÜBER DEN MECHANISMUS DER VERWANDHUNG DES Cysticercus cellulosae IN DIE
Taenia solium UBER DIE WIEKUNG DER VERDANGSSAFTE AUF DIEREN.
 Prozess Z. Morphol (1927).
- 13.-*Campbell, W.C. y T. Richardson (1960)*
 STIMULATION OF Cysticercus EVAGINATION BY MEANS OF SURFACTANTS.
 J. Parasit., 46: 490.
- 14.-*Campbell, W.C. (1963)*
 THE EFFICACY OF SURFACE-ACTIVE AGENTS IN STIMULATING THE EVAGINATION OF
 CYSTICERCICI "in vitro".
 The J. of Parasit ., 49, 1: 81-84.
- 15.-*Catt, K.J. (1973)*
 ENDOCRINOLOGIA FUNDAMENTAL
 (Ed. Castellana. Edt. Toray S.A. Barcelona).
- 16.-*Clegg, J.A. (1957)*
 STUDIES ON THE MAINTENANCE "in vitro" OF Fasciola hepática.
 Tesis doctoral Universidad Londres (citado por Ractliffe L.H. y col.).
- 17.-*Clegg, J. (1974)*
 THE USE OF "in vitro" CULTURE IN THE STUDY OF PARASITE IMMUNITY.
 Procc. of third International Congress of Parasitology, 1: 444.
- 18.-*Cuadros, J.L. (1976)*
 Comunicación personal.
- 19.-*Cuadros, J.L.; Navarrente y Chung, C. (1976).*
 NIVELES DE B. GLUCURONIDASA EN PLACENTAS Y LIQUIDO ANMIOTICO.
 Rev. Esp. de Ginecología (en prensa).

- 20.-Davies, C. (1975)
THE DEVELOPMENT OF A TREMATODE IN CULTURE.
Proceeding II Reunión Parasitol. Europeos: 35.
- 21.-Dawes, B. (1954)
MAINTENANCE "in vitro" OF Fasciola hepática.
Nature London, 174: 664.
- 22.-Dawes, B. (1961)
ON THE EARLY STAGES OF Fasciola hepática PENETRATING INTO THE LIVER OF
AN EXPERIMENTAL HOST, THE MOUSE, A HISTOLOGICAL PICTURE.
J. Helminth: 41-52.
- 23.-Dawes, B. (1963)
THE MIGRATION OF JUVENILE FORMS OF Fasciola hepática L. THROUGH THE WALLS
OF THE INTESTINES IN THE MOUSE WITH SOME OBSERVATIONS ON FOOD AND FEEDING
Parasitol., 53: 109-122.
- 24.-Dawes, B; Hughes, D.L. (1964)
FASCIOLASIS: THE INVASIVE STAGES OF Fasciola hepática IN MAMMALIAN HOSTS.
Advances in Parasitol., II: 97-168. Ed. B. Dawes, London. Acad. Press.
- 25.-Declerck, P. (1958)
SECREATION D'OESTROGENENES PAR LE SYNCYTOTROPHOBLASTE HUMAIN EN CULTURE.
Snoeckle placenta humain (Masson et cie Paris 1958).
- 26.-Dixon, E.K. (1964)
EXCYSTMENT OF METACERCARIAE OF Fasciola hepática L. "in vitro".
Nature, London, 202: 1240-1241.
- 27.-Dixon, E.K. (1966).
THE PHYSIOLOGY OF EXCYSTMENT OF THE METACERCARIA OF Fasciola hepática L.
Parasitol., 56: 431-456.
- 28.-Dougherty, E.C. (1959).
INTRODUCTION TO AXENIC CULTURE OF INVERTEBRATE METAZOA.
Am. N.Y. Acad. Sci. 77: 27-54.
- 29.-Edgar, S.A. (1941)
USE OF BILE SALTS FOR THE EVAGINATION OF TAPEWORM CYSTS.
Trans. Am. Microscop. Soc., 60:121-128.
- 30.-Esch, G.W.; SMYTH, J.D. (1976).
STUDIES ON THE "in vitro" CULTURE OF T. crassiceps.
Int. J. for Parasitol.: 6: 143-149.

- 31.-Euzet (1974)
 CONFERENCIA PRONUNCIADA EN EL INSTITUTO "LOPEZ-NEYRA", DURANTE SU VISITA AL MISMO.
- 32.-Evans, W.S. (1970)
 THE "in vitro" CULTIVATION OF Hymenolepis microstoma FROM CISTICERCOID TO EGG-PRODUCING ADULT.
 Cand. J. Zool. 48: 1135.
- 33.-Featherston, D.W. (1969)
Taenia hydatigena. I. GROWTH AND DEVELOPMENT OF ADULT STAGE IN THE DOG.
 Exp. Parasitol, 25: 329-338.
- 34.-Featherston, D.W. (1969)
 STORAGE OF CYSTICERCI OF Taenia hydatigena AND ITS EFFECT ON THE RECOVERY OF WORMS FROM DOGS.
 Res. Vet.Sci. (1969), 10: 391.
- 35.-Featherston, D.W. (1971)
Taenia hydatigena. II. EVAGINATION OF CYSTICERCI AND ESTABLISHMENT IN DOGS.
 Exp. Parasitol. 29: 242-249.
- 36.-Fuentes, B.; Negrete, J. y R. Villalobos. (1960).
 ALGUNOS FACTORES FISICOS Y QUIMICOS QUE AFECTAN LA EVAGINACION DE Cysticercus cellulosae "in vitro".
 Rev. Inst. Salub. y Enferm. Trop. 20: 103-127.
- 37.-Germain, L. (1969)
 MOLLUSQUES TERRESTRES ET FLUVIATILES FAUNE DE LA FRANCE, 22: 479-506 (segunda parte). Libraire de la France Faculte des Sciences.
- 38.-Gomes, P.; Velarde, A.; Chiroboga, J.; Leon, D. (1973).
 A SIMPLE METHOD FOR MASS PRODUCTION OF Fasciola hepática MIRACIDIA.
 Jour. of Agriculture of the University of Puerto Rico, 57: 87-88.
- 39.-Gonzalez-Castro, J.; Rodríguez-Osorio, M.; Pérez-Garro, M.C.; Gómez-García, B. (1972)
 PURIFICACION DE LARVAS DE Trichinella spiralis.
 Rev. Iber. Parasitol. 32: 1-11.
- 40.-Guevara-Pozo, D. (1953)
 OBTENCION DE HUEVOS Y LARVAS DE ASCARIS EN FORMA ASEPTICA.
 Rev. Iber. Parasitol. 13: 333-338
- 41.-Guevara-Pozo, D. (1964)
 ESTUDIOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA "in vitro" DE HELMINTOS PARASITOS. I. CURVAS DE OVOPOSICION EN Fasciola hepática.
 Proceeding of the First International Congress of Parasitology (1966) I (A2) 67.

- 42.-Guevara-Pozo, D. (1971)
EL CULTIVO "in vitro" DE HELMINTOS PARASITOS: SUS PARTICULARIDADES,
PROBLEMAS Y FINES.
C. Farmaceutica 197-219.
- 43.-Hanna, R.E.B.; Baalaby, S.S.; Jura, W. (1975)
METHODS FOR "in vitro" STUDY OF THE INVASIVE PROCESSES OF Fasciola hepática
Research in Vet. Science, 19: 96-97.
- 44.-Hanna, R.E.B.; Jura, W. (1976)
AN "in vitro" STUDY OF THE RELATIVE IMPORTANCE OF BILE AND CARBON DIOXIDE
IN THE ACTIVATION OF Fasciola gigantica, METACERCARIAE.
Research in Vet. Sciece, 20:344-345.
- 45.-Heath, D.D. y Smyth, J.D. (1970).
"In vitro" CULTIVATION OF E. granulossus, T. hydatigena, T. ovis, T. pisi-
formis AND T. serialis FROM ONCOSPHERE TO CYSTIC LARVA.
Parasitol., 61 (3): 329-343.
- 46.-Heath, D.D. (1974)
Comunicación personal.
- 47.-Hormann-Lemtis (1967)
EN CLINICA OBSTETRICOGINECOLOGICA DE HOSTSCHWALM DODERLEIN, G (III)
(Ed. Castellana, Edt. Alhambra).
- 48.-Hsu, T.C. y Kellogg, D.S. (1960)
PRIMARY CULTIVATION AND CONTINUOUS PROPAGATION "in vitro" OF TISSUES
FROM SMALL BIOPSY SPECIMENS.
J. Ntl. Cancer Inst., 25:221.
- 49.-Huffman, M.N.; Thayer, S.A.; Doisy, E.A. (1940).
ISOLATION OF DIHYDROTHEELIN FROM HUMAN PLACENTA.
J. Biol. Chem. 133:567.
- 50.-Hughes, D.L. (1959)
CHEMOTERAPY OF EXPERIEMENTAL Fasciola hepática INFECTIONS.
Tesis Universidad de Ondres (citado por Dixon K.E. 1966).
- 51.-Hughes, D.L. (1963)
Citado por Dawes B. y Hughes D.L. (1964)
- 52.-Isseroff and Read (1968)
DOES INSULIN AFFECT CARBOHYDRATE METABOLISM IN Fasciola hepática?
Compl. Biochem. Physiol, 24:1069-1072.

- 53.-Jenings, F.W.; Lauder, I.M.; Mulligan, W.; Urquhart, G.M. (1954)
SOME APPLICATION OF RADIOACTIVE ISOTOPES IN VETERINARY RESEARCH.
The Veterinary Record, 66: 155-161.
- 54.-Jenings, F.W.; Mulligan, W.; Urquhart, G.M. (1955)
SOME ISOTOPIC STUDIES ON THE BLOOD LOSS ASSOCIATED WITH Fasciola hepática
INFECTION IN RABBITS.
Trans of the Royal Soc. of Tropical Medicine and Hygiene, 49:305-306.
- 55.-Jezzy Glaas, G.B. (1970).
PRINCIPES DE PHYSIOLOGIE GASTRO-INTESTINAL.
Hermann Paris Collection Methodes. 243 .
- 56.-Jiménez, M.; Guevara-Pozo, D. (1976)
CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGIA DE Fasciola hepática EN ALGUNAS
DE SUS FASES LARVIARIAS.
Tesis doctoral de la Fac. Farmacia. Univ. Granada.
- 57.-Johnson, R.H.; Haines, W.J. (1952)
EXTRACTION OF ADRENAL CORTEX ACTIVITY FROM PLACENTAL TISSUE.
Science 116:456.
- 58.-Kanangara, D.W.W.; J.D. Smyth (1974)
"In vitro" CULTIVATION OF Diplostomum spathaceum AND Diplostomum phoxini
METACERCARIAE.
Inst. J. for Parasitol. 4: 667-674.
- 59.-Kaufmann, C. (1955)
PROGESTERON, SEIN SCHICKSAL IN ORGANISMUS UND SEINE ANWENDUNG IN DAR THERAPIE.
Klin. Wschr, 33: 345.
- 60.-Kuchenmeister (1852)
(Citado por G.K. SWEATMAN & P.J.G. PLUMMER)
Can. J. Zool. (1957) 35: 93:109
- 61.-Lehninger (1972)
BIOQUIMICA.
Ed. Omega, 886.
- 62.-Leuckart, R. (1881)
ZUR ENTWICKLUNGSGESCHICHTE DES LEBEREGELS.
Zool. Anz., 99: 641-646 (citado por Pantelouris E.M. 1965)
- 63.-Leuckart, R. (1992)a.
ZUR ENTWIRKLUNGSGESCHICHTE DES LEBEREGELS (DIPLOSTOMUM HEPATICUM)
Arch. Naturgesch, 48: 80-118 (citado por Pantelouris E.M. 1965)

- 64.-Leuckart, R. (1882) b.
ZUR ENTWICKLUNGSGESCHICHTE DES LEBEREGELS.
Zweite Mittheilung Zool. Anz., 122: 524-528 (citado por Pantelouris, E.M., 1965)
- 65.-Leuckart (1884-1900)
Citado por SWATMAN, G.K. y col. (1957).
- 66.-Lutz (1892-1893)
Citado por Pantelouris E.M. (1965)
- 67.-Malkani, P.G. (1933)
RAPID METHOD FOR EVAGINATING THE SCOLICES IN PARASITIC CYSTS.
Ind. Vet. J. 9: 193
- 68.-Mazur, P; Farrant, J.; Leibo, S.P.; y Chu, E.H.Y. (1969)
SURVIVAL OF HAMSTER TISSUE CULTURE CELLS AFTER FREEZING AND THAWING.
Cryobiology, 6, 1, 1969. (citado por J. Egozcue (1971)).
Técnicas en Citogenética Expans 144.
- 69.-Mehlis, C.F.E. (1831)
NOVAE OBSERVATIONES DES ENTOZOIS.
Isis von Oken, Jahrg 1831: 68-99 y 166-199 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)
- 70.-Muller, O.F. (1773-1774)
VERMIUM TERRESTRIUM ET FLUVIATILIUM..... SUCCINCTA HISTORIA.
Harniae et Lipsiae vol 1 (1): Infusoria (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 71.-Nymark, M. (1961)
OM DISTOMATOSE. SYGIOMMEIS DIAGNOSTICERING SAUT "in vitro" FORSOY MED
Fasciola hepática.
Nordisk Veterinarmedicin 13: 629-639.
- 72.-OMS (1975)
LE PROGUES EN IMMUNOLOGIE DU PALUDISME.
Serie des rapports technique n° 579
- 73.-Osuna-Carrillo de Albornoz, A.; Guevara-Pozo, D. (1973)
CULTIVO "in vitro" DE Fasciola hepática. nota previa.
Rev. Iber. Parasitol. 33: 661
- 74.-Osuna-Carrillo de Albornoz, A.; Guevara-Pozo, D. (1974).
CULTIVO DE HELMINTOSPARASITOS. I: PRIMEROS RESULTADOS CON UN MEDIO BASICO PARA
EL CULTIVO "in vitro" DE Fasciola hepática. L.
Rev. Iber. Parasitol., 34: 137-140

- 75.-Osuna-Carrillo de Albornoz, A.;Guevara-Pozo, D.(1974)
CULTIVO "in vitro" DE Taenia hydatigena: EXPERIENCIAS PRELIMINARES.
Proc. Third International Congress of Parasitology, 1: 458 sec. B-6
- 76.-Osuna-Carrillo de Albornoz, A.;Guevara-Pozo, D. (1976)
EXPERIENCIAS DE DESENVAGINACION DEL CISTICERCO Y DE ORGANOGENESIS DEL ESTRO-
BILO DE T. hydatigena CULTIVADA "in vitro".
Proc. 1° Congreso Nacional Parasitología. Granada. 1976. 72.
- 77.-Pantelouris, E.M. (1964)
LOCALITATION OF GLUCOGEN IN Fasciola hepática L. AND AN EFFECT OF INSULIN.
J. Helminth, 38:283-286.
- 78.-Panteoluris, E.M. (1965)
THE COMMON LIVER FLUKE.
Pergamon Press, 259.
- 79.-Platzer, E.G.; Roberts, L.S. (1970).
DEVELOPMENTAL PHYSIOLOGY OF CESTODES. PART.VII. VITAMIN B₆ AND
Hymenolepis diminuta VITAMIN LEVELS IN THE CESTODE AND EFFECTS OF DEFICIENCY
ON PHOSPHORILASE AND TRANSAMINASE ACTIVITIES.
Comp. Biochem. Physiol., 35 (3):535-552.
- 80.-Ractliffe, L.H.;Guevara-Pozo,D.;López-Román,R. (1969)
"In vitro" MAINTENANCE OF Fasciola hepática: A FACTORIAL APPROACH BARED
ON EGG PRODUCTION.
Experimental Parasitol., 26:41-56.
- 81.-Railliet, A. (1891)
DEVELOPPMENT EXPERIMENTAL DU Cysticercu tenuicollis CHEZ LE CHEVRAU.
Bull. Sco. Zool. France 16:157-158 (citado por Sweatman y col. (1957)).
- 82.-Raynard, M.M.A.;Pican, C. (1973)
ACTION DE LA TESTOSTERONE SUR LES CONDUITS GENITAUX DES EMBRYONS DE REPTILES
Comptes Rendus Acad. Sci. Paris 276: serie D, 3195 13 junio.
- 83.-Read, C.P. (1950)
THE VERTEBRATE SMALL INTESTINE AS AN ENVIRONMENT FOR PARASITIC HELMINTHS.
Rice Inst. Paph, 37 (2): 94 (citado por Guevara-Pozo (1971)).
- 84.-Robinson, D.L.H.;Silverman, P.H.; Pearcear (1963)
THE CULTIVATION OF Taenia crassiceps "in vitro".
Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 57:238
- 85.-Rohrbacher, G.H. (1957)
OBSERVATION ON THE SURVIVAL "in vitro" OF BACTERIA-FREE ADULT COMMON LIVER
GLUKES, Fasciola hepática.
J. Parasit ., 43: 9-18.

- 86.-Rothmann, A.H (1959)
STUDIES ON THE EXCYSTIMEN OF TAPEWORMS.
Exp. Parasitol. 8: 336-364.
- 87.-Rowcliffe, S.A.; Ollerenshaw, C.B. (1960)
OBSERVATIONS ON THE BIONOMICS OF THE EGG OF Fasciola hepática.
Ann. Trop. Med. Parasit., 54: 172-181.
- 88.-Rycke, De P.H.; van Grembergen, G. (1965)
ETUDE SUR L'EVAGINATION DE SCOLEX D'Echinococcus granulossus.
Z. Parasitkde, 25: 518-525.
- 89.-Rycke, De P.H.; van Grembergen, G. (1966)
STUDY ON THE EVAGINATION OF Cysticercus pisiformis.
Z. Parasitkde, 17: 341-354.
- 90.-Rycke, De P.H.; Berntzen, A.K. (1967)
MAINTENANCE AND GROWTH OF Hymenolepis microstoma (Cestoda: Cyclophyllidae)
"in vitro".
J. Parasit., 53: 352-354.
- 91.-Sawasaki, C.; Kagayama, M.; Niinobr, S.; Sugawara, S. (1954)
ADRENAL CORTICAL HORMONE-LIKE SUBSTANCE EXTRACTED FROM THE PLACENTA
(P.C. SUBSTANCE).
Jap. Obstr. Gynaec. Soc. (Engl. Ed.) 1: 159.
- 92.-Schiller, E.L. (1965)
A SIMPLIFIED METHOD FOR THE CULTIVATION OF THE RAT TAPEWORM Hymenolepis diminuta.
J. Parasitol., 51: 516-518.
- 93.-Schmidt-Elmendorff, H. (1961)
DER GEHALT von OSTRON, 17B - OSTRADIOS UND OSTRIOLE IN DER MENSCHLICHEN
PLACENTA.
Acta Endocrinológica 38: 527.
- 94.-Schäper A. (1889)
DIE LEBEREGEL KRANKHEIT DER HAUSSAUGETHEIERE EINE ATIOLOGISCHE UND
PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE UNTERSUCHUNG. DTSCH.
Z.Thiermed, Vergl. Pathol., 16:1-95 (citado por Pantelouris E.M. (1965)).
- 95.-Schunmachier, W. (1938).
UNTERSUCHUNGEN UBER DEN WANDERUNGSWEG UND DIE ENTWICKLUNG VON Fasciola hepática L. IN ENDWIT.
Z. Parasitkde 10: 608-643.

- 96.-Scott, J.W. (1918)
EXPERIMENTS WITH TAPEWORMS.
Biol. Bull. 25: 304-312 (citado por Campbell, W.C. (1963)).
- 97.-Seidel, J.S. (1962)
"In vitro" CULTIVATION OF TAPEWORMS II. GROWTH AND MAINTENANCE OF
Hymenolepis nana (Cestoda: Cyclophyllidea).
J. Parasit. 48: 795-797.
- 98.-Seidel, J.S. (1966)
"In vitro" CULTIVATION OF PARASITES.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139: 176-189.
- 99.-Seidel, J.S. (1971)
HEMIN AS A REQUERIMENT IN THE DEVELOPMENT "in vitro" Hymenolepis microstoma
(Cestoda: Cyclophyllidae).
The J. of Parasit. 57 (3): 566-570.
- 100.-Sewell, M.M.H.; Purvis, G.M. (1969)
Fasciola hepática: THE STIMULATION OF EXCYSTATION.
Parasitol., 59: proccding 4.
- 101.-Simonds, J.B. (1880)
THE ROT IN SHEEP JOHN MURRAY LONDON 1880
(citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 102.-Sinha, D.P. and Hopkins, C.A. (1967)
"In vitro" CULTIVATION OF THE TAPEWORM Hymenolepis nana FROM LARVA TO ADULT.
Nature, Lond., 215: 1275-1276.
- 103.-Sinha, D.P. (1976)
YEAST EXTRACT IN MEDIA FOR "in vitro" CULTIVATION OF CESTODES.
Indian. J. of Exp. Biolog. 14: 46-50
- 104.-Sinitsin, D.F. (1914)
NEUE TATSACHEN ÜBER DIE BIOLOGIE DER Fasciola hepática L.
Zentbl. Bakt. Parasitkde, 74: 280-285 (citado por Dixon, K.E. (1966)).
- 105.-Smyth, J.D. (1954).
STUDIES IN TAPEWORM PHYSIOLOGY. VIII. FERTILIZATION OF Schistocephalus solidus
"in vitro".
Exp. Parasit. 3: 64-71.

- 106.-Smyth, J.D.; El Mofty, M.M. (1960)
 ENDOCRINE CONTROL OF SEXUAL REPRODUCTION IN Opalina ranarum PARASITIC IN
Rana temporaria.
 Nature, 186: 559.
- 107.-Smyth, J.D. (1962)
 STUDIES ON TAPEWORM PHYSIOLOGY. X. AXENIC CULTIVATION OF THE HYDATID
 ORGANISM, Echinococcus granulossus; ESTABLISHMENT OF A BASIC TECHNIQUE.
 Parasit ., 52: 441-457.
- 108.-Smyth, J.D.; Haslewood, G.A.D. (1963)
 THE BIOCHEMISTRY OF BILE AS A FACTOR IN DETERMINING HOST SPECIFICITY IN
 INTESTINAL PARASITES, WITH PARTICULAR REFERENCE TO E. granulossus.
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 234-260.
- 109.-Smyth, J.D. (1966)
 (Citado por Angel Taylor y Baker: THE CULTIVATION OF PARASITES "in vitro"
 (1968)
 Adlard and Son LTD 377.
- 110.-Smyth, J.D. (1966)
 AN "in vitro" TECHNIQUE FOR THE PRODUCTION OF EGGS OF E. granulossus BY
 MATURATION OF PARTLY DEVELOPED STROBILA.
 Parasitol., 56: 763-766.
- 111.-Smyth, J.D.; Howkins, A.B.; y Barton, M. (1966)
 FACTORS CONTROLLING THE DIFFERENTIATION OF THE HYDATID ORGANISM,
E. granulossus IN TO CYSTIC OR STROBILAR STAGE "in vitro".
 Nature, Lond., 211: 1374-1377.
- 112.-Smyth, J.D. (1967)
 STUDIES IN TAPEWORM PHYSIOLOGY XI. AXENIC CULTIVATION OF THE PROTOSCOLECES OF
E. granulossus TO THE STROBILATE STAGE.
 Parasitol., 57: 111-133.
- 113.-Smyth, J.D.; Miller, H.J. y Howkins, A.B. (1967)
 FURTHER ANALYSIS OF THE FACTORS CONTROLLING STROBILIZATION DIFFERENTIATION
 AND MADURATION OF E. granulossus "in vitro".
- 114.-Smyth, J.D. (1969)
 THE PHYSIOLOGY OF CESTODES
 S.H. Freeman Comp. 279.
- 115.-Smyth, J.D. (1969).
 THE BIOLOGY OF THE HYDATID ORGANISMS.
 Advances in Parasitology, 7: 317-347.

- 116.-Smyth, J.D. (1969)
PARASITES AS BIOLOGICAL MODELS.
Parasitol. 59: 73-91
- 117.-Smyth, J.D. (1971)
DEVELOPMENT OF MONOZOIC FORMS OF *Echinococcus granulossus* DURING "in vitro"
CULTURE.
Inter. J. Parasito. 1: 121-124.
- 118.-Smyth, J.D. (1973)
Comunicación personal.
- 119.-Smyth, J.D. (1974)
PROBELMS OF "in vitro" CULTIVATION.
Third International Congress of Parasitolgy, 1: 536 sec B-10
- 120.-Smyth, J.D. (1974)
OCURRENCE OF PHYSIOLOGICAL STRAINS OF *E. granulossus* DEMONSTRATED BY "in vitro"
CULTURE OF PROTOESCOLECES FROM SHEEP AND HORSE HYDATID CYSTES.
Inter. J. for Parasitol. 4: 443-445.
- 121.-Smyth, J.D. (1974)
Comunicación personal.
- 122.-Smyth, J.D.; Davies, Z. (1974)
"In vitro" CULTURE OF THE STROBILAR STAGE OF *E. granulossus* (SHEEP STRAIN):
A REVIEW OF BASIC PROBLEMS AND RESULTS.
Intern. J. Parasitol. 4: 631-644.
- 123.-Smyth, J.D.; Davies, Z. (1974)
SHEEP AND HORSE HYDATIDS AS NUTRITIONAL MUTANTS OF *E. granulossus*.
Parasitol., 69 (I)
- 124.-Smyth, J.D.; Davies, Z (1975)
"In vitro" SUPPRESSION OF SEGMENTATION IN *E. multilocularis* WITH MORPHOLOGICAL
TRANSFORMATION OF PROTOESCOLECES INTO MONOZOIC ADULTS.
Parasitol, 71: 125-135.
- 125.-Sommerville, R.I. (1964)
EFFECT OF CARBON DIOXIDE ON THE DEVELOPMENT OF THIRD STAGE LARVAE OF
Haemonchus contortus "in vitro".
Nature, Lond, 202: 316.
- 126.-Sommerville, R.I. (1966)
THE DEVELOPMENT OF *Haemonchus contortus* TO THE FORTH STAGE "in vitro".
J. Parasit., 52: 127-136.

- 127.-*Stammler, H.J.* (1954)
GRUNDLAGEN UND VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN UBER DEN HASUHALT DER NNR-
HORMONE IN DER SCHWANGERSCHAFT HABIL-SCHR. KIEL.
- 128.-*Stark, G.; Voss, H.H.* (1957)
DIE ANDROGENE IN DER MENSCHLINCHE PLACENTA.
Arztil. Forschg. 11: 310.
- 129.-*Steenstrup, J.J.S.* (1842)
ON THE ALTERATION OF GENERATIONS (TRADUCIDO POR G.BUSK)
Roy.Soc. Publ., 1845. (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 130.-*Stephenson, W.* (1947)
PHYSIOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON THE ADULT LIVER FLUKE
Fasciola hepática L. I. SURVIVAL "in vitro".
Parasitol., 38: 116-144
- 131.-*Susuki, S.* (1931)
RESEARCHES IN TO THE LIFE HISTORY OF Fasciola hepática AND ITS DISTRIBUTION
IN FORMOSA.
J.Med. Ass. Formosa, 30: 97-102 (citado por Dixon, K.E. (1966)).
- 132.-*Sweatman, G.K. y Plummer* (1957)
THE BIOLOGY AND PATHOLOGY OF THE TAPEWORM Taenia hydatigena IN DOMESTIC AND
WILD HOSTS.
Can. J. Zool. 35: 93-109.
- 133.-*Szidat, L.* (1959)
HORMONALE BEEINFLUSSUNG VON PARASITEN DURCH IHREN WIRST.
Z.f. Parasit., Kd., 19
- 134.-*Taylor, A.E.R.; Ball, G.H. y Voge, M.* (1960)
STUDIES ON THE AXENIC CULTURE OF THE RODENT TAPEWORMS Hymenolepis diminuta
AND H. nana.
J. Parasito., 46 (5 sec. 2, Suppl.) 11.
- 135.-*Taylor, A.E.R.* (1961)
AXENIC CULTURE OF THE RODENT TAPEWORMS Hymenolepis diminuta AND H. nana.
Exp. Parasit., 11: 176-187.
- 136.-*Thomas, A.P.* (1881).
REPORT OF EXPERIMENTS ON THE DEVELOPMENT OF THE LIVER FLUKE (Fasciola hepática)
J. Roy. Agri. Soc. England, 17: 1-29 (citado por Pnatelouris, Em. (1965)).

- 137.-Thomas, A.P. (1882a)
THE ROT IN SHEEP, ON THE LIFE HISTORY OF THE LIVER FLUKE.
Nature, 26: 606-608 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 138.-Thomas, A.P. (1882b)
SECOND REPORT OF EXPERIMENTS ON THE DEVELOPMENT OF THE LIVER FLUKE
(*Fasciola hepática*).
J. Roy. Agr. Soc. England, 18: 439-455 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 139.-Thomas, A.P. (1883a)
THE LIFE HISTORY OF THE LIVER FLUKE.
Quart J.Micr. Sci. 23: 99-133 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 140.-Thomas, A.P. (1883b)
THE NATURAL HISTORY OF THE LIVER FLUKE AND THE PREVENTION OF ROT.
J. Roy. Agric. Soc. 19: 276-305 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 141.-Trager, W.; Leusen, J.B. (1976)
Science, 193: 673.
- 142.-Turton, J.A. (1968)
Hymenolepis diminuta "in vitro" AND "in vivo".
Parasitol., 58 (4): 13.
- 143.-Turton, J.A. (1974a)
"In vitro" CULTIVATION OF *Hymenolepis diminuta*: EFFECT OF ANTIBIOTICS AND
THE GROWTH OF TREE-DAYS OLDS WORMS REMOVED FROM THE RAT.
Exp. Parasitol., 36: 62-69.
- 144.-Turton, J.A. (1974b)
THE "in vitro" CULTURE OF 3-DAY OLD *Hymenolepis diminuta* REMOVED FROM THE RAT.
Third International Congress of Parasitol., 1: 1974. Sec. B-6, 459.
- 145.-van de Wiele, R.L.; Jailer, J.W. (1959)
PLACENTAL STEROIDS.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 75:889.
- 146.-van Leewenhoek (1700-1704)
Cartas a la Royal Society (citado por Pantelouris, E.M. (1965))
- 147.-Vogel, H. (1934)
DER ENTWICKLUNGSZYKLUS VON OPISTORCHIS FELINEUS (RIU).
Zoologica Stuttg., 33: 1-103.

- 148.-von K. Enigk; D. Duwel (1959)
ZUR HAUFIGKEIT DER PRANATALEN INFESTION MIT Fasciola hepática BEIM RINDE.
Berl.Munch. Tierarztl Wschr, 72: 362-363.
- 149.-Waele, De A. (1934)
ETUDE DE LA FOUCITION BILIARE DANS LA PHENOMENE DE L'EVAGINATION CHEZ
LES CYSTICERQUES DES CESTODES.
Ann. Parasit., 12: 492-510.
- 150.-Wardle, R.A. y McLeod, J.A. (1952)
THE ZOOLOGY OF THE TAPEWORMS.
Univ. Minnesota Press Minneapolis 780 (citado por Campbell W.C.)
- 151.-Webster, G.A.; Cameron, T.W.M. (1963)
SOME PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE DEVELOPMENT OF Echinococcus "in vitro".
Can. J. Zool., 41: 185-195.
- 152.-Weinland, D.F. (1875)
DIE WEICHTERFAUNA DER SHAWABISCHEN ALP.
Stuttgart, 1875 (citado por Pantelouris, E.M. (1965)).
- 153.-Weinstein, P.P.; Jones, M.F. (1956)
THE "in vitro" CULTIVATION OF Hippostrongylus muris TO THE ADULT STAGE.
J. Parasitol., 42:215-236.
- 154.-Westerfeld, W.W.; Mc Corquodale, D.W.; Thayer, S.A.; Doisy, E.A. (1938)
ISOLATION OF THEELIN FROM HUMAN PLACENTA.
J.Biol. Chem. 126:195.
- 155.-Wikerhauser, T. (1960)
A RAPID METHOD FOR DETERMINING THE VIABILITY OF Fasciola hepatica METACERCARIAE
Am J. Vet. Res. 21: 895-897.
- 156.-Wikerhauser, T.; Cvetnic, S. (1967)
SURVIVAL OF YOUNG AND SEXUALLY MATURES ADULT Fasciola hepática IN VARIOUS CELL-
FREE MEDIA WITH AND WITHOUT MAMMALIAN CELL CULTURES.
Exp. Parasitol., 20:200-204
- 157.-Wikerhauser, T.; Cvetnic, S.; Brudujak, Z. (1968)
FURTHER STUDY OF THE SURVIVAL OF YOUNG Fasciola hepatica IN CELL CULTURES.
Wiadomosci Parazytologiczne, XIV: 703-705.
- 158.-Wikerhauser, T.; Cvetnic, S.; Brudujak, Z (1970)
Indian Vet. Research Innst. H.D. Srivastava commemoration vol: 279-281.

159.-Wright, W.R. (1927)

STUDIES ON LARVAL TREMATODES FROM NORTH WALES.

Part. I. OBSERVATION ON THE REDIA CERCARIA AND CYST OF Fasciola hepatica
Ann. Trop. Med. Parasit., 21: 47-56.

8.- APENDICE

SOLUCIÓN SALINA DE HARKI

(SOLUCIÓN 8.1)

8.1.- COMPOSICIÓN DE LAS DIFERENTES SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES, EMPLEADOS.

AGROFITO

AGROFITO

AGROFITO

SOLUCIÓN SALINA DE HANK.

(SOLUCIÓN BSS)

ClNa	8,00 gr.
ClK	0,40 gr.
Cl ₂ Ca	0,14 gr.
SO ₄ Mg. 7 H ₂ O	0,20 gr.
PO ₄ HNa ₂ .2 H ₂ O	0,06 gr.
PO ₄ HK ₂	0,06 gr.
GLUCOSA	1,00 gr.
CO ₃ HNa	0,35 gr.
NEOMICINA	0,1 gr.
ROJO FENOL	1,0 ml.
H ₂ O BIDEESTILADA	1.000ml.

SOLUCIÓN LAVADORA

(SOLUCIÓN BSS)

ClNa	8,00 gr.
ClK	0,40 gr.
PO ₄ HNa ₂ .2H ₂ O	0,06 gr.
PO ₄ H ₂ K	0,06 gr.
GLUCOSA	1,00 gr.
CO ₃ HNa	0,35 gr.
NEOMICINA	0,1 gr.
ROJO FENOL	1,0 ml.
H ₂ O BIDEESTILADA	1.000 ml.

SOLUCIÓN "ALSEVER"

GLUCOSA	18,66 gr.
CITRATO SODICO	8 gr.
ClNa	4,18 gr.
ACIDO CITRICO	0,55 gr.
H ₂ O BIDEESTILADA	1.000 ml.

.....	0,01 g.
.....	0,05 g.
.....	0,05 g.
.....	0,05 g.
.....	0,01 g.

SOLUCIÓN MINERAL "HELLER"

1) ClK	100 g./litro	7,5 cc.
2) NO ₃ Na	100 g./litro	6 cc.
3) SO ₄ Mg, 7H ₂ O	100 g./litro	2,5 cc.
4) PO ₄ H ₂ Na, H ₂ O	10 g./litro	12,5 cc.
5) Cl ₂ Ca, 2H ₂ O	10 g./litro	7,5 cc.
6) Cl ₂ Fe, 6H ₂ O	1 g./litro	1 cc.

SO ₄ Zn, 7H ₂ O	1 g.
BO ₃ H ₃	1 g.
SO ₄ Mn, 4H ₂ O	0,01 g.
7) SO ₄ Cu, 5H ₂ O	0,03 g.
Cl ₃ Al	0,03 g.
Cl ₂ Ni, 6H ₂ O	0,03 g.
I K	0,01 g.

H₂O c.s.p. 1 litro

Todo esto en H₂O c.s.p. 1 litro.

SOLUCIÓN "AGUA DE FUENTE"

SOLUCION a). ($\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 gr. en 1 litro H_2O

SOLUCION b). (Cl_2Ca anhidro)..... 11,0 gr. en 1 litro H_2O

SOLUCION c). ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)..... 10,0 gr. en 1 litro H_2O

SOLUCION d). Buffer Fosfato.- Disolver 34 gr. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ en 500 ml. de agua destilada. Añadir aproximadamente 175 ml. de NaOH 1N hasta tener un pH de 7,2. Añadir después 1,5 gr. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y diluir hasta un litro.

Combinar las soluciones a)..... 0,5 ml.

b)..... 2,5 ml.

c)..... 2,5 ml.

d)..... 1,5 ml.

Agua des-ionizada 1000 ml.

MEDIO- 199
(EN MILÍGRAMOS POR LITRO)

ClNa	8.000.0	Guanidina ClH	0.300
ClK	400.0	Xantina	0.300
SO ₄ Mg.7H ₂ O	200.0	Hiposantina	0.300
PO ₄ HNa ₂ .2H ₂ O	60.0	Uracilo	0.300
PO ₄ H ₂ K	60.0	Timina	0.300
Glucosa	1.000.0	α tocopherol	
Rojo Fenol	20.0	phosphato di-	
Cl ₂ Ca (anhidro)	140.0	soico	0.010
CO ₃ HNa	350.0	Tiamina ClH	0.010
L-Arginina ClH	70.000.0	Piridoxina ClH	0,025
L-Histidina ClH	20.000.0	Riboflavina	0.010
L-Lysina monohi-		Piridoxal ClH	0.025
drochloridrica	70.000.0	Niacina	0,025
DL-Triptofano	20.000.0	Niacinamida	0.025
DL-Fenilalanina	50.000.0	Pantotenato Ca	0.010
DL-Metionina	30.000.0	i-Inositol	0.050
DL-Serina	50.000.0	Acido Ascorbico	0.050
DL-Treonina	60.000.0	Acido Fólico	0.010
DL-Leucina	120.000.0	Acido Para-	
DL-Isoleucina	40.000.0	Aminobenzoico	0.050
DL-Valina	50.000.0	Nitrato Férrico	0.100
DL-Acido Glu-		d-Biotina	0.010
támico mono-		Menadiona	0.010
hidratado	150.000.0	Glutation	0.050
DL-Acido Aspar-		Vitamina A	0.100
tico	60.000.0	Calciferol	0.100
DL-α-Alanina	50.000.0	Colesterol	0.200
L-Prolina	40.000.0	Tween 80	20.000.0
L-Hidroxipro-		Adenosin trifos-	
lina	10.000.0	phato (sal só-	
Glicina	50.000.0	dica)	1.000.0
L-Glutamina	100.000.0	Acido Adenilico	0.200
Acetato sódico	50.000.0	Desoxyribosa	0.500
L-Cistina	20.000.0	Ribosa	0.500
L-Tyrosina	40.000.0	Cholina Cl	0.500
L-Cisteina ClH	0.100	CO ₃ HNa	0.350
Adenina sulfato	10.000.0		

MEDIO NCTC 135

(EN MILÍGRAMOS POR LITRO)

ClNa	6800,0000	L-Prolina	6,1000
ClK	400,0000	L-Serina	10,8000
Cl ₂ Ca (anhidro)	200,0000	L-Taurina	4,2000
SO ₄ Mg	100,0000	L-Treonina	18,9000
PO ₄ H ₂ Na-H ₂ O	140,0000	L-Triptofano	17,5000
D-Glucosa	1000,0000	L-Tirosina	16,4000
L-Alanina	31,5000	L-Valina	25,0000
Acido α-n-amino		Tiamina ClH	0,0250
butirico	5,5000	Riboflavina	0,0250
L-Arginina ClH	31,5000	Piridoxina ClH	0,0625
L-Asparigina		Piridoxal ClH	0,0625
ClH	9,2000	Niacina	0,0625
Acido L-Aspartico	9,9000	Niacinamida	0,0625
L-Cistina	10,5000	D-Pantotenato Ca	0,0250
D-Glucosamina		Biotina	0,0250
ClH	3,9000	Acido Fólico	0,0250
Acido L-Glutámico	8,3000	Cholina Cl	1,2500
L-Glutamina	135,7000	Vitamina B ₁₂	10,0000
Glicina	13,5000	i-Inositol	0,1250
L-Histidina		Acido Para-Ami	
ClH-H ₂ O	26,7000	nobenzóico	0,1250
α-Hidroxi-		Vitamina A	0,2500
-prolina	4,1000	Calciferol	0,2500
L-Isoleucina	18,0000	Menadiona	0,0250
L-Leucina	20,4000	Fosfato α-toco-	
L-Lisina ClH	38,4000	pherol-dinodico	0,0250
L-Metionina	4,4000	Glutation sódico	10,0000
L-Oritina		Acido Ascórbico	50,0000
ClH	9,4000	Difisfopiridin	
L-Fenilalanina	16,5000	nucleótido	7,0000
		Trifosfopiridin	
		nucleotido (mono	
		sódico	1,0000

.....//.....

Continuación del MEDIO NCTC 135.

Coezinma A	2,5000
Cocarboxilasa	1,0000
Flavin adenin dinucleótido	1,0000
Uridin trifos- fato sódico	1,0000
Deoxiadenosina	10,0000
Deoxiguanosina	10,0000
Timidina	10,0000
5-Metilcitosi- na	0,1000
Tween 80	12,5000
D-Glucorono- lactona	1,8000
Glucuronato sódico-H ₂ O	1,8000
Acetato sódico- - 3H ₂ O	50,0000
Etanol	40,0000
Rejo de Fenol	20,0000
CO ₃ HNa	2200,0000

C M R L - 1066

(EN MILÍGRAMOS POR LITRO).

ClNa	6799.0	Uridin trifos-	
ClK	400.0	fato	1.0
Cl ₂ Ca (anhi-		Etanol	16.0
dro)	200.0	Tween 80	5.0
SO ₄ Mg-7H ₂ O	200.0	L-Cistina	20.000
PO ₄ H ₂ Na-H ₂ O	140.0	Acido L-Glutá-	
Glucosa	1000.0	mico	75.000
Acetato sódico-		L-Glutamina	100.000
-3H ₂ O	83.0	Glicina	50.000
L-Alanina	25.0	L-Histidina ClH	
L-Arginina ClH	70.0	-H ₂ O	20.000
Acido L-Aspartico	30.0	Hidroxi-L-pro	
L-Cisteina ClH -		lina	10.000
- H ₂ O	260.0	L-Isoleucina	20.000
L-Prolina	40.0	L-Leucina	60.000
L-Serina	25.0	L-Lisina HCl	70.000
L-Treonina	30.0	L-Methionina	15.000
L-Triptofano	10.0	L-Fenilalanina	25.000
L-Tirosina	40.0	Colesterol	0.200
L-Valina	25.0	Glutation	10.000
Deoxiadenosina	10.0	Glucuronato	
Deoxicitidina	10.0	sódico	4.200
5-Metil-deoxici-		Acido-Para-Ami	
tidina	0.1	nobernoico	0.50
Timidina	10.0	Biotina	0.010
Deoxiguanosina	10.0	Pantotenato Ca	0.010
Cocarboxilasa	1.0	Cholina Cl	0.500
Coenzima A	2.5	Acido Fólico	0.010
Difosfopiridin		i-Inositol	0.050
nucleótido	7.0	Niacina	0.025
Flavin adenin di-		Niacinamida	0.025
nucleótido	1.0	Piridoxal ClH	0.025
Tifosfopiridin		Piridoxina ClH	0.025
nucleótido	1.0	Riboflavina	0.010
		Thiamina ClH	0.010
		Acido Ascórbico	50.000
		Rojo Fenol	20.000
		CO ₃ HNa	2200.000

T C 858

Difiere este medio del CMRL-1066, en la adición a és te último de vitaminas del grupo B; Tiamina; Riboflavina, Acido nicotínico; Nicotinamida y Pantotenato calcico; mientras - que el TC 858 posee coenzimas de alta pureza y vitaminas A,D, E y K, junto con Nitrato férrico que en el CMRL - 1066 han sido omitidas.

8.2.- APARATOS.

Cámara de flujo laminar Airflux
Autoclave: Super
Destilador de agua.
Centrífuga
Ebullidor
Baño María Precis-Term (selecta)
Lupa Binocular Nikon
Microscopio invertido Nikon
Balanza Monoplate Monopan Savter
Phmetro Radiometer 28
Oxígrafo Ysi 57
Agitador Magnético 6 - Investier.
Estufas Hermi.
Lavador de Pipetas
Agitador Koterman
Horno Pasteur K - Tarma
Balas de gases.
Homogenizador Ceka (UMS)
Centrífuga Jonan, Paris K 63 F.
Liofilizador Edwards mod. Efos.
Bomba Milipore XX6022050
Recipiente Presión XX6700051 Milipore
Soporte Filtración 142 mm Milipore.
Portafiltros Sartorius SM 16510