

TD-EP

H-7  
3  
32

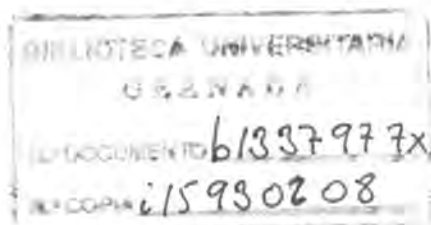
Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Parasitología



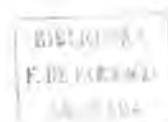
Estudios biológicos sobre *Anisakis simplex* s.s.  
e *Hysterothylacium aduncum aduncum*.


## TESIS DOCTORAL

Luis Iglesias López



Granada, Mayo de 1999.





*Agradecimientos*

Quiero expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que con su apoyo han hecho posible la realización de este trabajo:

En primer lugar, a la Dra. Adela Valero López y al Dr. Francisco Javier Adroher Auroux, quienes me han ayudado y orientado en todo momento, no sólo en el ámbito profesional, sino también en el humano, haciendo posible que el trabajo se hiciera mucho más llevadero.

A todo el profesorado y personal que componen el Departamento de Parasitología, por la buena disposición que he encontrado frente a cualquier problema o necesidad que me ha surgido.

Al Dr. Antonio Pretel, por su asesoramiento e inestimable ayuda en el campo de la genética.

A la Dra. Joaquina Martín Sánchez, por su implicación en el trabajo de electroforesis.

No quiero dejar pasar esta ocasión sin recordar a D. José González Castro, quien me brindó valiosos consejos y estuvo siempre dispuesto a ayudarme con su experiencia.

A toda mi familia, en especial a mis padres, por su continuo aliento y apoyo sin el cual no me hubiera sido posible realizar este trabajo.

A Oti, por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles, y compartir conmigo tantas horas de trabajo.



*Dedicatoria*

*A mis padres, Luis y Susana, y a mi hermano Iñigo*

*A Oti*



*Abreviaturas*

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

- ADH: alcohol deshidrogenasa.
- ADK: adenilato kinasa.
- Ae: actividad específica.
- AES: antígenos de excreción/secreción.
- c.s.p.: cantidad suficiente para.
- DS: desviación estándar.
- EC: *Enzyme Commission*. Nomenclatura asignada a cada enzima según el "Nomenclature Committee for the International Union of Biochemistry"
- ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.
- EM: enzima mállica.
- ES: error estándar.
- GLUDH: glutamato deshidrogenasa.
- GPi: glucosa fosfato isomerasa.
- Graf.: gráfico.
- G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
- LAP: leucín aminopeptidasa.
- L3: tercer estadio larvario.
- L4: cuarto estadio larvario.
- L5: preadulto o adulto.
- Max: máximo.
- MDH: mállico deshidrogenasa.
- Min: mínimo.
- MPi: manosa fosfato isomerasa.
- M3: tercera muda (paso de tercer a cuarto estadio larvario).
- M4: cuarta muda (paso de cuarto estadio larvario a preadulto).
- n: número de individuos.
- ns: diferencia no significativa, según el test de la "t" de Student.
- NAD: nicotín adenín dinucleótido, forma oxidada.
- NADH: nicotín adenín dinucleótido, forma reducida.
- NADP: nicotín adenín dinucleótido fosfato, forma oxidada.
- NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato, forma reducida.
- NHT: número de huevos totales.
- O: número de ovoposiciones.
- OAA: oxalacetato.
- PC: piruvato carboxilasa.
- PEP: fosfoenol piruvato.
- PEPC: fosfoenol piruvato carboxilasa.
- PGD: 6 fosfogluconato deshidrogenasa.
- PGM: fosfoglucomutasa.
- PEPCK: fosfoenol piruvato carboxikinasa.
- PEPCT: fosfoenol piruvato carboxitransfosforilasa.
- PK: piruvato kinasa.
- RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA markers*.
- RAST: *Radio Allergy Sorbet Test*.
- Sav±ES: supervivencia media±error estándar.
- Sav±ES, L5: supervivencia media±error estándar de la L5.
- S50: día en el que viven la mitad de los individuos de la experiencia.
- SBFI: suero bovino fetal inactivado por calor.
- SOD: superóxido dismutasa.
- TC: tampón tris-citrato.
- TCE: tampón tris-citrato-EDTA.
- TM: tampón tris-maleato.
- U: unidades de enzima.
- UI: unidades internacionales.





## Índice

## ÍNDICE

1.-JUSTIFICACIÓN	1
2.-INTRODUCCIÓN.	2
2.1.- <i>Anisakis simplex</i> .	2
2.1.1.-Encuadramiento taxonómico.	4
2.1.2.-Estudio de los parásitos.	4
2.1.2.1.-Morfología del tercer estadio larvario (L3).	4
2.1.2.2.-Morfología del cuarto estadio larvario (L4).	5
2.1.2.3.-Morfología de adultos.	5
2.1.2.4.-Huevos.	5
2.1.2.5.-Ciclo de vida.	13
2.1.3.-Epidemiología.	15
2.1.4.-Patología de la anisakidosis.	19
2.1.5.-Sintomatología de la anisakidosis.	20
2.1.5.1.-Forma no invasiva o luminal.	20
2.1.5.2.-Forma invasiva.	21
2.1.5.2.1.-Gástrica.	21
2.1.5.2.2.-Intestinal.	22
2.1.5.2.3.-Intraperitoneal.	22
2.1.5.3.-Reacciones asociadas.	23
2.1.6.-Diagnóstico.	23
2.1.6.1.-Diagnóstico clínico.	23
2.1.6.2.-Diagnóstico inmunológico.	25
2.1.6.3.-Diagnóstico de hipersensibilidad a anisákidos.	26
2.1.6.4.-Diagnóstico post-operatorio.	27
2.1.7.-Tratamiento.	27
2.1.8.-Profilaxis.	27
2.2.- <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	29
2.2.1.-Encuadramiento taxonómico.	30
2.2.2.-Estudio de los parásitos.	30
2.2.2.1.-Morfología del tercer estadio larvario (L3).	30
2.2.2.2.-Morfología del cuarto estadio larvario (L4).	31
2.2.2.3.-Morfología de adultos.	31
2.2.2.4.-Huevos.	38
2.2.2.5.-Ciclo de vida.	38
2.2.3.-Epidemiología.	40
2.2.4.-Anisakidosis causada por <i>H. aduncum</i> .	42
2.2.5.-Diagnóstico, tratamiento y profilaxis.	42
3.-ANTECEDENTES.	43
3.1.-Mantenimiento <i>in vitro</i> .	43
3.1.1.-Mantenimiento <i>in vitro</i> de anisákidos.	43
3.1.1.1.-Estudios de mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Pseudoterranova decipiens</i> .	43
3.1.1.2.-Estudios de mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Contracaecum osculatum</i> .	44

3.1.1.3.-Estudios de mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Anisakis</i> spp.	44
3.1.1.4.-Estudios comparativos <i>in vitro</i> de <i>Anisakis simplex</i> , <i>Pseudoterranova decipiens</i> , y <i>Contracaecum</i> sp.	47
3.1.1.5.-Estudios de mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	48
3.2.-Estudios de electroforesis.	49
3.2.1.- <i>Anisakis simplex</i> .	49
3.2.2.- <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	51
3.2.3.-Otros anisákidos.	51
3.3.-Estudios de actividades específicas de enzimas fijadoras de CO <sub>2</sub> .	52
3.4.-Estudios citogenéticos.	57
4.-MATERIAL Y MÉTODOS.	60
4.1.-Mantenimiento <i>in vitro</i> .	60
4.1.1.-Material biológico.	60
4.1.1.1.-Aislamiento e identificación de los parásitos.	60
4.1.2.-Medios de mantenimiento empleados.	63
4.1.3.-Preparación de medios de mantenimiento.	64
4.1.4.-Solución antibiótica.	65
4.1.5.-Axenización de los parásitos.	66
4.1.6.-Procedimiento de mantenimiento <i>in vitro</i> .	66
4.1.7.-Observación de los parásitos.	67
4.1.8.-Características del mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Anisakis simplex</i> .	67
4.1.9.-Características del mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	68
4.1.10.-Parámetros usados en el seguimiento del mantenimiento <i>in vitro</i> .	68
4.1.11.-Recuento de huevos.	69
4.1.12.-Medida de individuos adultos y huevos. Fotografías.	69
4.2.-Mantenimiento <i>in vitro</i> para estudios de enzimas fijadoras de CO <sub>2</sub> .	69
4.3.-Mantenimiento <i>in vitro</i> para estudios electroforéticos.	70
4.4.-Mantenimiento <i>in vitro</i> para estudios citogenéticos.	71
4.5.-Estudio de la actividad específica de enzimas fijadoras de CO <sub>2</sub> .	71
4.5.1.-Consideraciones generales sobre las medidas espectrofotométricas.	72
4.5.2.-Preparación de extractos proteicos.	72
4.5.3.-Determinación de la concentración de proteínas solubles en el extracto.	73
4.5.4.-Diálisis de los enzimas auxiliares.	75
4.5.5.-Detección de la actividad fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK).	75
4.5.5.1.-PEPCK en <i>Anisakis simplex</i> e <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	76
4.5.5.1.1.-Reactivos.	76
4.5.5.1.2.-Preparación de reactivos.	76
4.5.5.1.3.-Técnica empleada.	77
4.5.6.-Detección de la actividad enzima málica (EM) en dirección carboxilante.	77
4.5.6.1.-EM en <i>Anisakis simplex</i> e <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	78
4.5.6.1.1.-Reactivos.	78
4.5.6.1.2.-Preparación de reactivos.	78
4.5.6.1.3.-Técnica empleada.	78
4.5.7.-Detección de la actividad piruvato carboxilasa (PC).	79
4.5.7.1.-PC en <i>Anisakis simplex</i> e <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	80

4.5.7.1.1.-Reactivos.	80
4.5.7.1.2.-Preparación de reactivos.	80
4.5.7.1.3.-Técnica empleada.	80
4.5.8.-Detección de la actividad fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC).	81
4.5.8.1.-PEPC en <i>Anisakis simplex</i> e <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	82
4.5.8.1.1.-Reactivos.	82
4.5.8.1.2.-Preparación de reactivos.	82
4.5.8.1.3.-Técnica empleada.	82
4.5.9.-Relación entre PEPCK y PEPC.	83
4.5.10.-Relación entre EM y PC.	83
4.5.11.-Cálculo de la actividad específica..	84
4.6.-Electroforesis.	85
4.6.1.-Soluciones tampón.	86
4.6.1.1.-Preparación de los tampones.	86
4.6.2.-Preparación de geles de almidón.	87
4.6.3.-Preparación de extractos proteicos.	88
4.6.4.-Introducción de los extractos en el gel.	88
4.6.5.-Migración electroforética.	90
4.6.6.-Preparación de los geles para el revelado enzimático.	90
4.6.7.-Principio del revelado enzimático.	91
4.6.7.1.-Protocolos de revelado.	91
4.6.8.-Interpretación de los zimogramas.	95
4.7.-Métodos citogenéticos.	96
5.-RESULTADOS.	97
5.1.-Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Anisakis simplex</i> .	97
5.1.1.-Detalles morfológicos de L3, L4 y adultos de <i>Anisakis simplex</i> .	97
5.1.2.-Medidas de adultos y huevos de <i>Anisakis simplex</i> .	105
5.1.3.-Resultados de los mantenimientos <i>in vitro</i> de <i>Anisakis simplex</i> .	107
5.1.3.1.-Mantenimiento en atmósfera de aire y aire con 5% de CO <sub>2</sub> .	110
5.1.3.2.-Mantenimiento a pH constante.	113
5.1.3.3.-Cambios de pH al 5º día de mantenimiento.	115
5.1.3.4.-Mantenimiento en el medio RPMI + P.	118
5.1.3.4.1.-pH 7.2.	118
5.1.3.4.2.-Adición de pepsina en diferentes etapas de desarrollo. pH 4.0.	120
5.1.3.5.-Modificaciones con el medio RPMI y RPMI + P a pH constante.	123
5.1.3.6.-Tabla resumen de los mantenimientos de <i>Anisakis simplex</i> y estudios estadísticos.	130
5.2.-Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	135
5.2.1.-Detalles morfológicos de L3, L4 y adultos de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	135
5.2.2.-Medidas de adultos y huevos de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	141
5.2.3.-Resultados de los mantenimientos <i>in vitro</i> de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	146
5.2.3.1.-Mantenimiento en atmósfera de aire y aire con 5% de CO <sub>2</sub> .	146
5.2.3.2.-Mantenimiento a pH constante.	149
5.2.3.3.-Cambio de pH en el paso a L4.	152

5.2.3.4.-Mantenimiento con el medio RPMI, RPMI+P y suplementos con L-cisteína y glutation.	154
5.2.3.5.-Tabla resumen de los mantenimientos de <i>Hysterothylacium aduncum</i> y estudios estadísticos.	159
5.3.-Actividad específica de enzimas fijadoras de CO <sub>2</sub> .	162
5.3.1.- <i>Anisakis simplex</i> .	162
5.3.1.1.-PEPCK.	162
5.3.1.2.-EM.	163
5.3.1.3.-PC.	164
5.3.1.4.-PEPC.	164
5.3.2.- <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	165
5.3.2.1.-PEPCK.	165
5.3.2.2.-EM.	166
5.3.2.3.-PC.	167
5.3.2.4.-PEPC.	167
5.4.-Electroforesis de isoenzimas de desarrollo.	168
5.4.1.-MDH.	168
5.4.2.-EM.	168
5.4.3.-GPi.	169
5.4.4.-PGM.	169
5.4.5.-G6PDH.	170
5.4.6.-MPi.	171
5.4.7.-PGD.	172
5.4.8.-GLUDH.	173
5.4.9.-LAP.	173
5.5.-Estudios citogenéticos.	175
5.5.1.-Datos cariológicos del macho de <i>Anisakis simplex</i> . Meiosis.	175
5.5.2.-Datos cariológicos del macho de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	182
5.5.2.1.-Mitosis.	182
5.5.2.2.-Meiosis.	182
6. DISCUSIÓN.	198
6.1.-Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Anisakis simplex</i> .	198
6.1.1.-Influencia de la concentración de CO <sub>2</sub> atmosférico.	198
6.1.2.-Medios de mantenimiento y pH.	199
6.1.3.-La pepsina y el pH.	200
6.1.4.-Suplementos al medio RPMI+P.	201
6.1.5.-Suplemento del medio RPMI con 5% de sangre, ó 40% de suero.	202
6.1.6.-Adherencia de algunos individuos al fondo del pocillo.	202
6.1.7.-Ovoposiciones.	204
6.1.8.-Tamaño de adultos.	204
6.2.-Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	204
6.2.1.-Influencia del CO <sub>2</sub> atmosférico.	205
6.2.2.-Mantenimiento a pH constante.	205
6.2.3.-Mantenimiento con el medio RPMI, RPMI+P, y suplementos con L-cisteína y glutation.	205
6.2.4.-Ovoposiciones.	206

6.2.5.-Tamaño de adultos.	206
6.3.-Enzimas fijadoras de CO <sub>2</sub> .	207
6.4.-Electroforesis de isoenzimas de desarrollo.	209
6.5.-Estudios citogenéticos.	212
6.5.1.-Citogenética en <i>Anisakis simplex</i> .	212
6.5.2.-Citogenética de <i>Hysterothylacium aduncum</i> .	213
7.-CONCLUSIONES.	215
8.-BIBLIOGRAFÍA.	217

*Justificación*

## 1.-JUSTIFICACIÓN

Los nematodos parásitos *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*, se encuentran ampliamente distribuidos en peces de todo el mundo y de frecuente consumo entre la población, tales como la bacaladilla, jurel, merluza, caballa, salmón, sardinas, boquerones, arenque, atún, bacalao, etc.

La presencia de estos parásitos incide, por un lado, en la calidad del pescado que se presenta ante el consumidor. El pescado aparece poco apetecible e incluso repugnante, sobre todo cuando las larvas de *A. simplex* se agrupan en zonas visibles, como en la superficie, y se activan por el aumento de la temperatura. Esto provoca inmediatamente el rechazo del producto y reclamaciones por parte del consumidor.

Por otro lado, *A. simplex* es el principal agente causante de la anisakidosis, una afección parasitaria que afecta al hombre, y que compromete seriamente nuestra salud. En el caso de *Hysterothylacium*, el papel patógeno no está aún dilucidado.

El mantenimiento *in vitro* se presenta como una herramienta útil para disponer de parásitos en diferentes etapas de desarrollo, incluidos adultos, lo que nos puede permitir una correcta identificación morfológica.


Hasta el momento, ha habido muchos intentos de mantener *in vitro* estos parásitos, si bien los medios complejos e indefinidos son los únicos que han tenido algún éxito. Sin embargo, es necesario conseguir el mantenimiento en medios cada vez más definidos para facilitar los estudios fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos.

En este trabajo se ha jugado con diferentes condiciones de mantenimiento, como atmósfera, pH y composición del medio de mantenimiento, para que a partir de la larva aislada del pez (L3) se desarrolle hasta adulto sexualmente maduro. A partir de aquí, y con las condiciones óptimas de mantenimiento establecidas, se han obtenido individuos en diferentes etapas de desarrollo. Con ellas, se ha determinado la actividad específica de enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> (de especial importancia en el metabolismo de estos parásitos) durante el paso de L3 a L4.

Por otro lado, se ha hecho la determinación electroforética de 9 enzimas en diferentes etapas de desarrollo, con el fin de revelar posibles diferencias entre ellas unido a la creciente importancia que están adquiriendo a la hora de la identificación de distintas especies.

Por último, y con ejemplares sexualmente maduros, se ha realizado el estudio cariológico de ambos parásitos, hasta ahora desconocido y de sumo interés, sobre todo si tenemos en cuenta la reciente descripción de especies gemelas para ambos, basadas en determinaciones isoenzimáticas (en *A. simplex*) o morfológicas (en *H. aduncum*).





## *Introducción*

## 2.-INTRODUCCIÓN.

A continuación se expondrán los aspectos biológicos y fisiológicos de ambos parásitos, haciendo hincapié en su importancia como posibles causantes de anisakidosis y en la descripción de esta afección parasitaria.

### 2.1.-*Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809).

*A. simplex* es uno de los agentes causantes de la anisakidosis humana.

La anisakidosis humana, es una afección parasitaria causada por larvas L3 (tercer estadio larvario) de nematodos de la familia Anisakidae, y que afecta principalmente al segmento gastrointestinal, pudiendo causar en algunos casos un síndrome de larva migrans visceral.

Para contraer esta parasitosis es necesario previamente ingerir pescado o moluscos, crudos o semicrudos, parasitados por individuos de alguno de estos géneros:

*Anisakis*, *Pseudoterranova* o *Contracaecum*.

La primeras descripciones de adultos de *Anisakis* (aislados de un delfín) se realizaron en 1845 por Félix Dujardin.

Pero no fue hasta 1960 cuando los primeros casos de anisakidosis humana se dieron a conocer, en un estudio realizado en los Países Bajos por Van Thiel y col. (1960). Desde un principio ha habido gran confusión con respecto a la identificación de este nematodo, debido a la dificultad para asignar determinadas fases larvarias a las formas adultas. En primera instancia, las larvas aisladas de los tejidos humanos fueron clasificadas como *Eustoma rotundatum* (Van Thiel y col., 1960) pero en 1962 el propio Van Thiel las reclasificó como *Anisakis* sp. (Van Thiel, 1962).

Berland (1961) identificó dos tipos de larvas de *Anisakis* ligeramente diferentes morfológicamente, con probabilidad de pertenecer a especies diferentes: una forma común (*Anisakis* tipo I), y una forma menos frecuente (*Anisakis* tipo II). Otsuru y col. (1968) describieron la larva *Anisakis* tipo III procedente del pez "colín de Alaska" (*Theragra chalcogramma*). En 1966 se propone el nombre de *Anisakis marina* (Linnaeus 1767) para los "vermes del arenque" (Van Thiel, 1966), pero en 1971, tras una revisión de más de 20 especies previamente descritas del género *Anisakis*, Davey reconoció tres especies válidas (Davey, 1971): *A. simplex* (Rudolphi, 1809), *A. typica* (Diesing, 1860) y *A. physeteris* (Baylis, 1923).

Sin embargo Smith y Wootten (1978), discuten sobre la posibilidad de que *A. simplex* y *A. typica* sean la misma especie, y de que puedan existir otras dos especies: *A. schupakovi* y *A. insignis*.

El mantenimiento *in vitro* en medios indefinidos ha resultado de gran importancia para el esclarecimiento de la taxonomía de larvas del género *Anisakis*. Diversos autores como Pippy y Van Banning (1975), Grabda (1976) y Oshima y col. (1982) determinaron que las larvas de tipo I se correspondían con la especie *A. simplex*. Por otro lado, mediante modernas técnicas con endonucleasas de restricción, comparando fragmentos genómicos de larvas y adultos mediante electroforesis, se ha confirmado la correspondencia entre larvas de tipo I con *A. simplex* (Sugane, 1989), y larvas tipo II con *A. physeteris* (Matsuura y col., 1992).

Nascetti y col. (1986) y Orecchia y col. (1986), han demostrado la existencia de dos especies gemelas dentro de *A. simplex*, denominándolas *A. simplex* A y *A. simplex* B, presentando como patrones diferenciadores determinados *loci* enzimáticos y de distribución. Puesto que estas especies parecen ser dos grupos aislados reproductivamente, estos autores han propuesto el nombre de *A. pegreffii* para determinar a la especie *A. simplex* tipo A, de localización principalmente mediterránea, y *A. simplex sensu stricto* para el *A. simplex* tipo B, localizado principalmente en el Atlántico Norte. Esto parece concordar con el trabajo de Siles y col. (1997), en el que demuestran mediante RAPD la posible coexistencia de dos poblaciones de *A. simplex*, con considerable variabilidad genética entre ellas y diferente adaptación a distintos hospedadores.

Mattiucci y col. (1997) han sugerido la existencia de una nueva especie dentro del complejo *A. simplex*. Esta conclusión se puso de manifiesto tras el estudio de 24 *loci* enzimáticos, de los que 5 mostraron un comportamiento electroforético diferente a los de *A. simplex sensu stricto* y *A. pegreffii*. Se trataría de *Anisakis simplex* C, aislada reproductivamente de las otras dos especies, y distribuida en regiones australes y la región del Pacífico boreal (Paggi y col., 1998).

Recientemente, Paggi y col. (1998) han propuesto una nueva especie de *Anisakis* (*A. ziphidarum*) aislada de ballenas del Mediterráneo y aguas del Sur de África, en base a diferencias morfológicas e isoenzimáticas, que demuestran que se trata de una población reproductivamente aislada de las otras especies de *Anisakis* conocidas.

Desde el primer caso de anisakidosis notificado en Holanda por Van Thiel y col. (1960), miles de nuevos casos han sido notificados hasta la fecha incluyendo cerca de una decena en nuestro país. Este hecho se debe principalmente a ciertos hábitos alimenticios, que aunque son tradicionales en oriente, han sido importados por países occidentales.

### 2.1.1.-ENCUADRAMIENTO TAXONÓMICO.

Según Anderson (1992), la especie *Anisakis simplex* queda encuadrada así:

Clase: Nematoda.

Subclase: Secernentea.

Orden: Ascaridida.

Superfamilia: Ascaridioidea.

Familia: Anisakidae.

Subfamilia: Anisakinae.

Género: *Anisakis*.

Especie: *Anisakis simplex*.

### 2.1.2.-ESTUDIO DE LOS PARÁSITOS.

Las descripciones de los diferentes estadios larvarios (L3 y L4) y adultos están basados fundamentalmente en los trabajos de Grabda (1976), Weerasooriya y col. (1986), Huang y Bussieras (1988) y Sanmartín (1989).

#### 2.1.2.1.-MORFOLOGÍA DEL TERCER ESTADIO LARVARIO (L3).

El tercer estadio larvario o larva infestante, tiene una longitud comprendida entre 10 y 30 mm, y un diámetro de 0.5 mm. De color blanco, se reconoce fácilmente a la lupa por un segmento un poco más opaco situado en la extremidad anterior que se corresponde con el ventrículo.

Posee una cutícula irregularmente espaciada, discontinua y estriada transversalmente, más acentuada en las partes distales.

En su parte anterior terminal posee una estructura triangular dirigida ventralmente denominada diente. La boca es triangular y alrededor, recubiertos por la cutícula, posee tres prominencias prelabiales, situadas una dorsal bilobulada, y dos subventrales unilobuladas. Cada prominencia labial contiene dos esbozos de papilas.

El poro excretor se sitúa ventralmente, entre los dos labios subventrales todavía rudimentarios.

El esófago comprende tres regiones (Buzzell y Sommerville, 1985):

- Una larga región preventricular.
- Una pequeña zona de transición.
- Un ventrículo.

La región preventricular contiene abundantes músculos radiales y elementos glandulares, mientras que el ventrículo es principalmente glandular, aunque también dispone de algunos músculos radiales. Podemos encontrar en el esófago dos tipos de glándulas:

-Glándulas dorsales, que comienzan en la región preventricular a la altura del anillo nervioso, extendiéndose por la zona de transición y rodeando completamente el ventrículo.

-Glándulas subventrales, que comienzan en la región preventricular justo antes de la zona de transición, rodean el ventrículo y terminan al comienzo del intestino.

El primordio genital no se percibe en este estadio larvario, diferenciándose de la L4.

La parte posterior terminal es de forma cónica y se observa un mucrón. Además se encuentra el recto rodeado por tres glándulas anales, dos dorsales y una ventral; el ano está situado en posición ventral, próximo al extremo posterior.

#### 2.1.2.2.-MORFOLOGÍA DEL CUARTO ESTADIO LARVARIO (L4).

El estudio de la L4 de *A. simplex* se ha llevado a cabo a partir de experiencias con animales (Gibson, 1970; Weerasooriya y col., 1986), de los especímenes encontrados en humanos (Fujino y col., 1984), o bien obtenidas por mantenimiento *in vitro* (Grabda, 1976).

Según Huang y Bussieras (1988), no hay gran diferencia de longitud entre las larvas L3 y L4, aunque según hemos observado en nuestras experiencias, depende del tiempo de evolución de la larva. Las principales características de la L4 son:

-No se observa el diente ni el mucrón.

-Tiene el poro excretor en la misma posición que en la L3, pero menos visible.

-Su cutícula tiene más relieve, apareciendo pequeñas bandas transversales regularmente espaciadas y continuas, que le dan aspecto segmentado.

-Presenta tres labios bien evolucionados rodeando la abertura triangular de la cavidad bucal. El labio dorsal es más grande que los ventrales, y todos son bilobulados. Presenta papilas cefálicas localizadas cerca de la base de los labios. Cada labio bilobulado posee en el borde medio una delicada cresta denticular, que está compuesta por unos 35 a 45 dientes bifurcados, y unos pocos no bifurcados. Los dientes de los labios subventrales son anchos y cortos, mientras que los del labio dorsal son más finos y largos.

-Su genital es visible, observándose dos úteros hacia la mitad de la longitud del cuerpo en la futura hembra, y un esbozo de testículo en el futuro macho.

#### 2.1.2.3.-MORFOLOGÍA DE ADULTOS.

La descripción de las formas adultas está basada en los ejemplares obtenidos *in vitro* por Grabda (1976).

La boca se encuentra rodeada por tres labios: uno mayor, dorsal y dos algo más pequeños en posición ventro-lateral. Cerca del labio dorsal se pueden observar dos papilas labiales, y una papila en cada uno de los labios ventro-laterales. Cada labio está dividido anteriormente en dos lóbulos con bordes afilados. Existe una cresta de pequeños denticulos sobre los lóbulos. Ausencia de interlabios. El ventrículo puede ser cilíndrico y recto, o bien en forma de "S", conectando directamente con el intestino. El recto es fino y corto, y se dirige oblicuamente terminando en el ano en posición ventral.

Los machos pueden tener una longitud de 5.7 a 7.2 cm. El extremo posterior está usualmente encorvado. Se pueden observar numerosas papilas preanales en posición ventral frente a la cloaca. Existen seis pares de papilas postanales, cuatro pares cerca del extremo final y otros dos situados lateralmente con respecto al ano. Las espículas, en número de dos, son de tamaño desigual y su talla depende de la talla del espécimen. En la parte anterior, y tras el anillo nervioso, se pueden observar dos papilas, una dorsal y otra ventral.

Las hembras pueden medir de 5.6 a 10.4 cm de longitud. El sistema reproductor es típico de los ascáridos. La vulva está situada antes de la mitad del cuerpo. Posee dos úteros paralelos que se dirigen hacia el extremo posterior. Los ovarios son muy sinuosos (Grabda, 1976).

#### 2.1.2.4.-HUEVOS.

El tamaño de los huevos fértiles es de 39-42 micras por 41-43 micras, lisos, uniformes, finos y con blastómeros en diversos estados de desarrollo visibles en su interior (Grabda, 1976).

# LÁMINA 1

## *Anisakis simplex*, L3

**A:** Parte anterior

AN: Anillo Nervioso  
ES: Esófago  
Z: Zona de transición  
V: Ventrículo  
I: Intestino

**B:** Vista frontal de la parte anterior

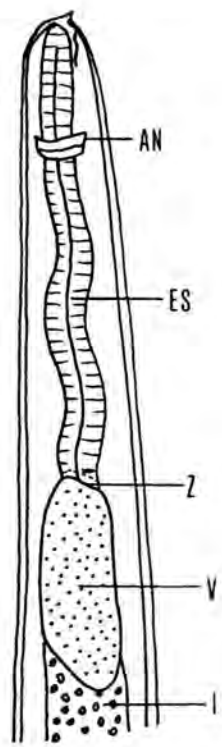
LD: Labio Dorsal  
P: Papila  
B: Boca  
D: Diente  
PE: Poro Excretor  
LV: Labios Ventrales

**C:** Vista lateral de la parte anterior

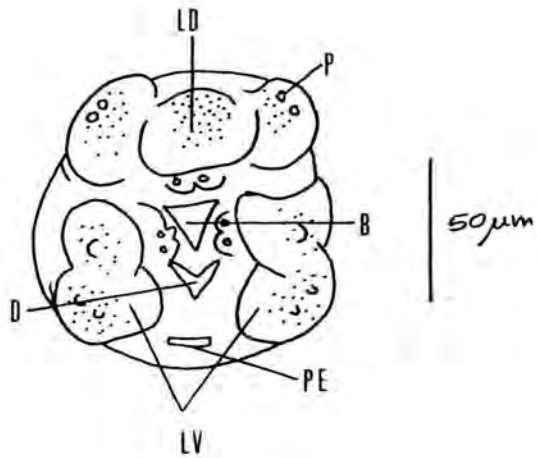
P: Papila  
D: Diente  
PE: Poro Excretor

**D:** Vista lateral de la parte posterior

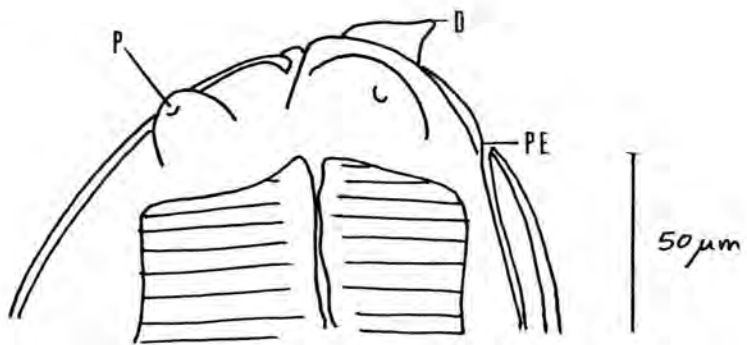
I: Intestino  
G: Glándulas rectales  
R: Recto  
A: Ano  
M: Mucrón



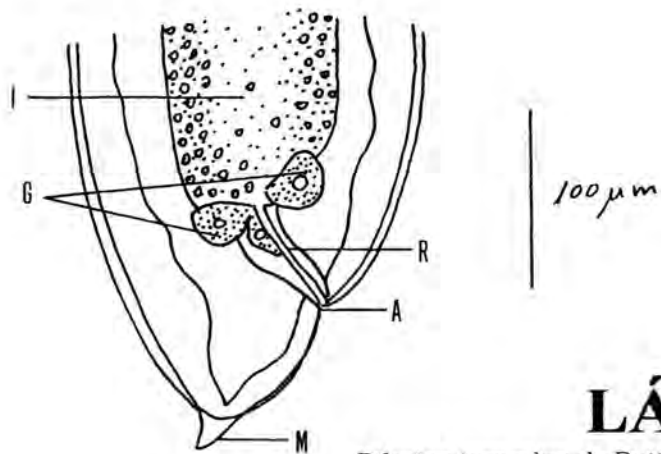
**A**



**B**



**C**



**D**

# LÁMINA 1

Dibujos tomados de Petter y Maillard (1988).



## LÁMINA 2

### *Anisakis simplex*, L4

A: Parte anterior, vista dorsal

LD: Labio Dorsal

P: Papila

B: Parte anterior, vista ventral

LV: Labio Ventral

P: Papila

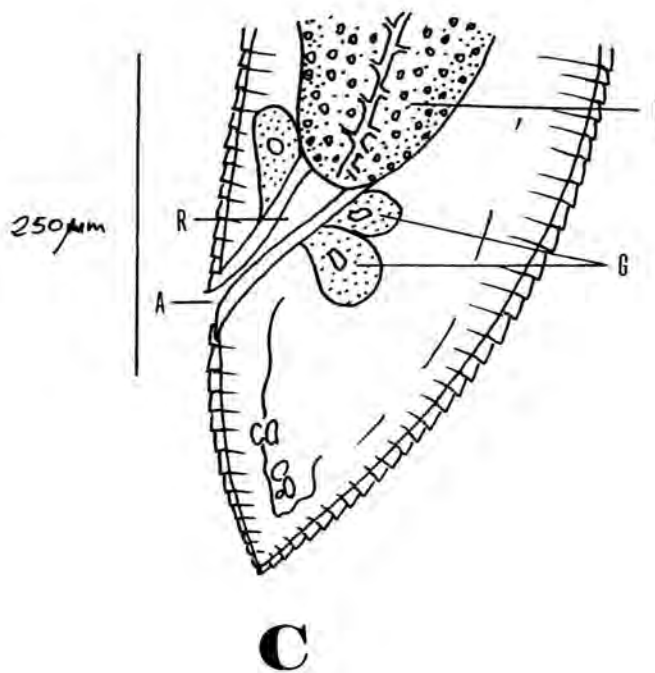
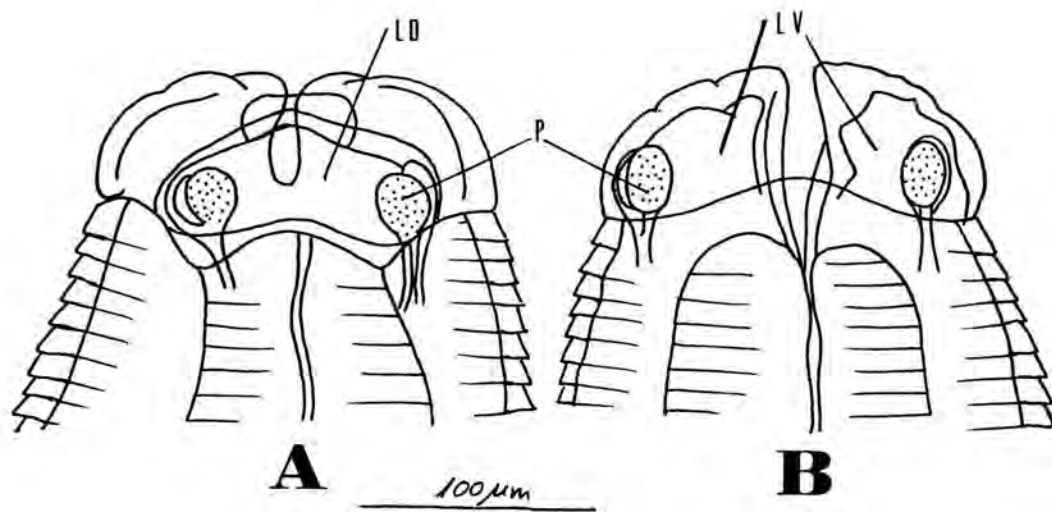
C: Vista lateral de la parte posterior

I: Intestino

G: Glándulas rectales

R: Recto

A: Ano



## LÁMINA 2

Dibujos tomados de Grabda (1976).

## LÁMINA 3

### *Anisakis simplex*, adulto

A: Parte anterior

B: Boca  
LD: Labio Dorsal  
LV: Labio Ventral  
PE: Poro Excretor  
AN: Anillo Nervioso  
P: Papila  
ES: Esófago

B: Detalle de la parte anterior, vista ventral

LV: Labios Ventrales  
P: Papila cefálica

C: Espícula derecha

V: Vaina  
E: Espícula

D: Parte posterior, vista lateral (macho)

I: Intestino  
EP: Espículas  
R: Recto  
A: Ano

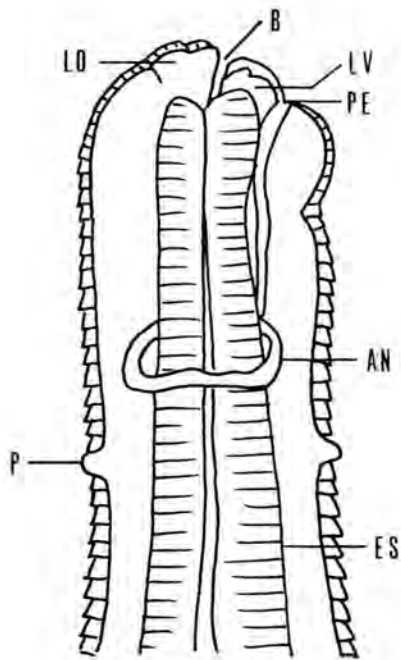
E: Parte posterior, vista ventral (macho)

EP: Espículas  
A: Ano  
PO: Papilas postanales

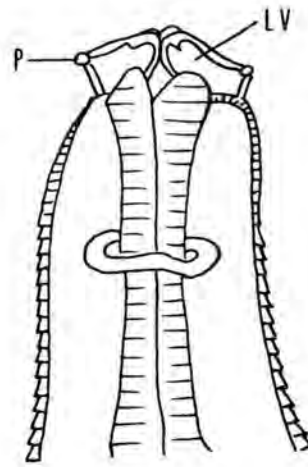
F: Espícula izquierda

# LÁMINA 3

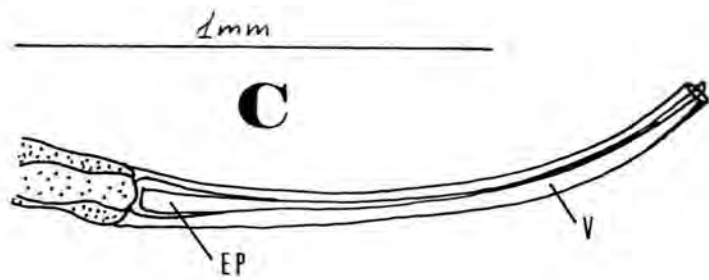
Dibujos tomados de Grabda (1976).



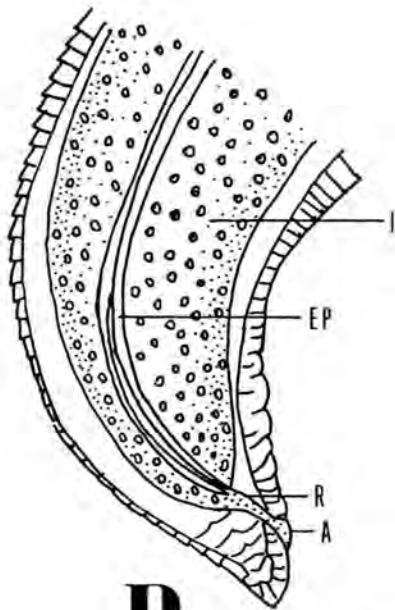
**A**



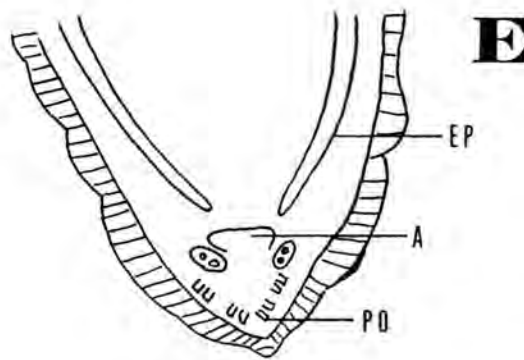
**B**



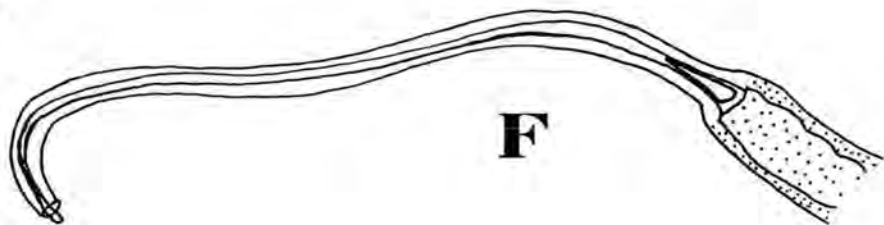
**C**



**D**



**E**



**F**

### 2.1.2.5.-CICLO DE VIDA.

Los adultos de *Anisakis* se encuentran en el tracto digestivo de mamíferos marinos, como cetáceos (ballenas, cachalotes, delfines) o pinnípedos (focas, leones marinos).

Los huevos de *Anisakis* son expulsados junto con las heces del hospedador al agua del mar. Evolucionan durante 20-27 días a una temperatura comprendida entre 5-7°C hasta eclosionar.

Hasta hace poco tiempo, se pensaba que del huevo se liberaba una larva en estado L2, envuelta en el resto excivial de la L1. Las L2 serían capaces de sobrevivir libres en el mar durante dos o tres meses, intervalo en el cual podrían ser ingeridas por un primer hospedador intermediario, que suelen ser crustáceos malacostráceos (eufausíidos) que forman parte del plancton del Ártico y Antártico (Smith, 1983; Hurst, 1984). En ellos se desarrollaría la L3 en 8 días aproximadamente (Van Thiel, 1976), siendo ya larva infectiva para el hospedador definitivo.

Sin embargo, recientes estudios han demostrado que, al igual que *Pseudoterranova*, *Contracaecum* (Koie y col., 1995), e *Hysterothylacium* (Koie, 1993), *A. simplex* sufre dos mudas en el interior del huevo durante la fase de evolución. De esta forma, la larva eclosionada está aún rodeada de una espesa cutícula del segundo estado larvario. La cutícula del primer estado larvario es muy fina, lisa y frágil y queda en el interior del huevo al eclosionar. La cutícula del segundo estado larvario queda rodeando a la incipiente L3, y es estriada y en forma de capullo. Esto podría ayudar a la flotabilidad del tercer estadio larvario. Cuando la L3 es ingerida por el crustáceo, probablemente es liberada del resto de la cutícula mediante las piezas bucales del hospedador. La L3 llega al intestino y, atravesando la pared intestinal, se establece en el hemocele del crustáceo (Koie y col., 1995).

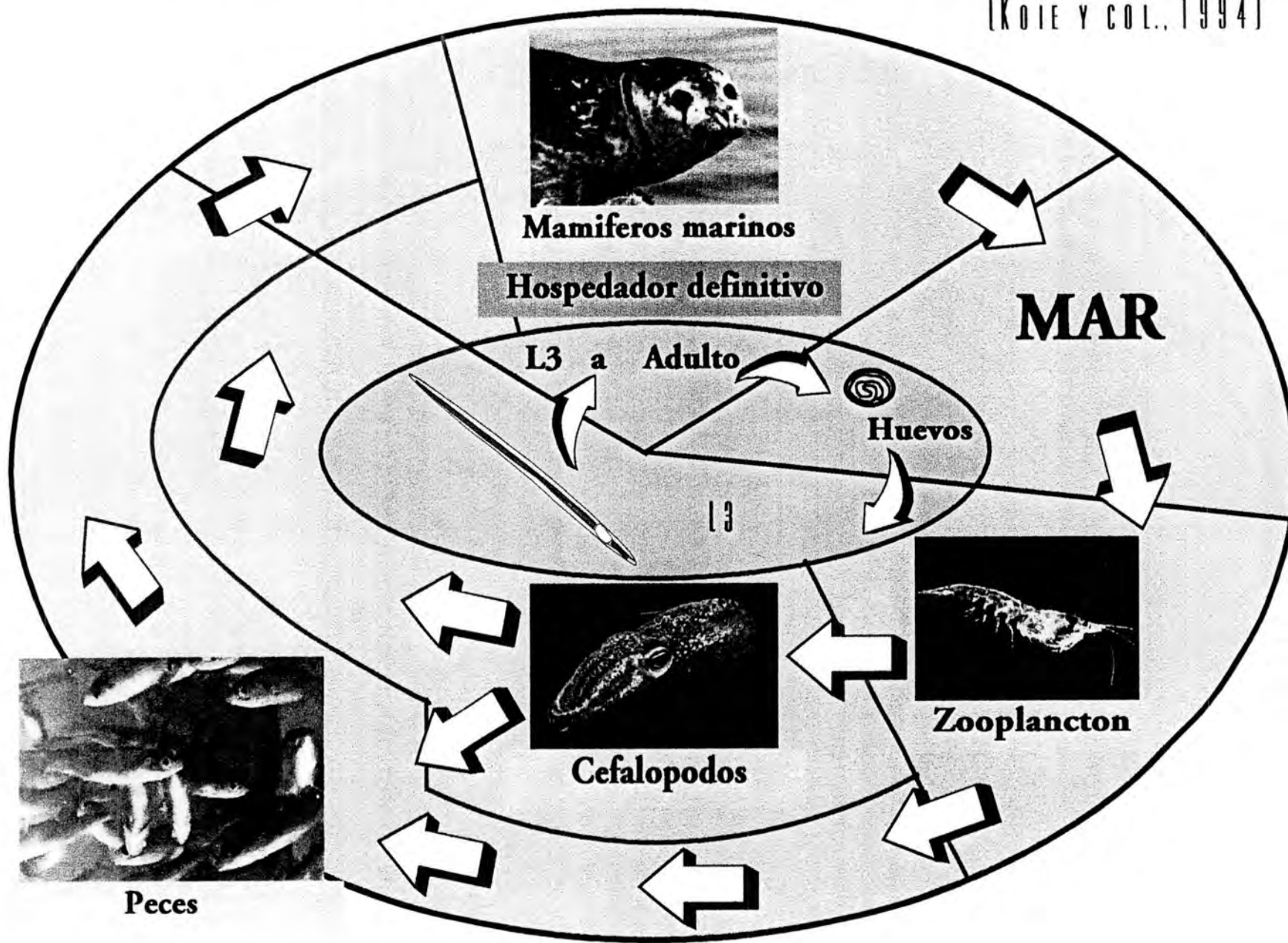
Los peces marinos y calamares, ingieren crustáceos infestados. Las larvas liberadas en la digestión se enquistan en sus vísceras. Por último, los mamíferos marinos se alimentan de peces, calamares y crustáceos infectados, desarrollándose las larvas en sus tracto digestivo hasta adultos, cerrándose el ciclo con la puesta de huevos tras la fecundación de las hembras por los machos.

Según algunos autores (Huang y Bussieras, 1988), es necesaria la presencia de un segundo hospedador, pues si el hospedador definitivo ingiere eufausíidos infectados con L3, éstas no llegan a desarrollarse. Los peces y cefalópodos pueden hacer el papel de hospedadores paraténicos, siguiendo el esquema depredador-presa, permaneciendo el parásito como L3 (Oshima, 1972; Koie, 1993).

En cuanto al hombre, se trata de un hospedador accidental, que se infesta sobre todo por la ingestión de pescados o calamares crudos, semicrudos, ligeramente salados, ahumados o sazonados con diversas especias, y parasitados con L3 de *Anisakis* spp. (Cochetton y col., 1991).

# Ciclo de vida de *Anisakis simplex*

[KOIE Y COL., 1994]



### 2.1.3.-EPIDEMIOLOGÍA.

La familia Anisakidae tiene una distribución mundial, encontrándose en la pesca de todos los mares y océanos. No obstante, ciertas especies tienen una distribución más limitada. En el caso de *A. simplex*, es más frecuente en aguas frías y polares (Davey, 1971; Smith y Wootten, 1978).

La importancia de los anisákidos, y en especial de *A. simplex*, radica en su capacidad para producir graves lesiones en el aparato digestivo del hombre, cuando éste ingiere pescado insuficientemente tratado térmicamente (Oshima, 1972).

La larva de *Anisakis* fue reconocida como patógeno potencial para el hombre en Holanda en 1955 (Van Thiel y col. 1960), sin embargo, desde 1940 ya se describen casos de granulomas eosinofílicos gástricos en varios boletines médicos de Japón, producidos posiblemente por estas larvas (Oshima, 1972).

La infección por anisákidos aparecen principalmente en los países donde el pescado se consume crudo o semicrudo, y está descrita en todo el mundo (Cocheton y col., 1991), si bien en América y Europa se denota un aumento que podría ser debido a la aparición de nuevos hábitos alimenticios procedentes del Oriente.

En Japón, investigadores de estos temas (Oshima, 1987), han llegado a la conclusión de que la fuente más importante de infestación la constituye la caballa (*Scomber japonicus*), debido a su popularidad, su costo y la costumbre de comerla en rebanadas de pescado crudo en vinagreta (sashimi, sushi). El salmón, arenque y calamar, aunque también se consumen, parecen que juegan un papel menos importante en la epidemiología de la enfermedad.

Desde 1940, diversas revistas médicas japonesas aluden a casos de granulomas eosinofílicos gástricos, invasiones de larvas de nematodos en la mucosa intestinal, abscesos de ileos asociados con intensas eosinofilia, ileítis, etc. (Oshima, 1972). A partir de aquí, el número de casos aumenta espectacularmente, de manera que en 1979, Yoshimura y col. aportan más de 500 casos ocurridos en menos de 3 años en Kanazawa (Yoshimura, 1979).

Nakata y col. (1980) diagnosticaron 41 casos de anisakidosis gástrica aguda desde Diciembre de 1975 a Diciembre de 1977 en pacientes de 16 a 72 años, la mayoría de los cuales por ingestión de caballa cruda. En 1981, sólo en las islas Kuyshu se describen 1041 nuevos casos. Desde Diciembre de 1983 a Junio de 1984, Toshiyuki y col. (1985) encuentran 12 casos de anisakidosis intestinal aguda debida también al consumo de caballa (*Scomber japonicus*) cruda en forma de sushi o sashimi.

En 1984, tiene lugar en Japón la XXVII Reunión de la Sociedad Japonesa del Tracto Digestivo. En esta reunión se describen 3141 casos de anisakidosis (Oshima, 1987). Sugimachi y col. (1985) tratan a 178 pacientes con anisakidosis gástrica y más tarde, Minamoto y col. (1991) describen dos nuevos casos de anisakidosis intestinal. Matsumoto y col. (1992) detectan seis casos de anisakidosis intestinal entre Febrero de 1983 y Junio de 1991.

Shirahama y col. (1992) presentan 18 casos de anisakidosis intestinal en pacientes con edades comprendidas entre 10 y 68 años, por ingestión de caballa y sardinas, entre otros pescados. Con este panorama, es probable que se produzcan en Japón al menos 1000 casos nuevos de anisakidosis por año (Oshima y Kliks, 1987). Así, hasta 1996, han sido ya publicados en Japón 20582 casos (Yagi y col., 1996).

En Taiwán, también se come tradicionalmente el pescado crudo. Al estudiar las especies de pescado de más consumo en este país, se observó que estaban parasitados, al menos con 14.2 larvas de *Anisakis* por pez parasitado. Sin embargo, la anisakidosis no es frecuente en la República Popular China ya que el pescado crudo se toma al final de las comidas, siendo el riesgo de infestación menor que en Japón donde se toma al principio de la comida, cuando el estómago está aún vacío (Oshima, 1987). Por otro lado, el pescado crudo se consume tradicionalmente junto con raíces de jengibre (*Zingiber officinale*), muy utilizado en la medicina tradicional China, y que posee principios activos que destruyen *in vitro* las larvas de *Anisakis*, como son el shogaol y el gingerol (Goto y col., 1990).

En Canadá, se realizó un estudio epidemiológico sobre el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), comparando los resultados con los previamente obtenidos treinta años antes. Los resultados fueron muy concluyentes: un aumento considerable de la prevalencia e intensidad de *A. simplex*, y sobre todo de *Pseudoterranova decipiens* en los filetes del bacalao (Chandra y Khan, 1988).

En los Estados Unidos, el pez roca (*Sebastes* spp.), el salmón (*Salmo salar*) y actualmente, los pescados de procedencia japonesa, son los principales causantes de anisakidosis por ser portadores de larvas de anisákidos y ser consumidos en los restaurantes japoneses de gran popularidad. El primer caso de anisakidosis se detectó en 1958, incrementándose notablemente el número de casos en los años 80. Little y MacPhail (1972) aislaron una larva L3 de anisákido (*Terranova*=*Pseudoterranova*) de la cavidad abdominal de un hombre de Massachusetts. Más tarde, Smith y Wootten (1978) describen 25 casos de anisakidosis en el período de 1974 a 1987, de los que 14 son producidos por *Pseudoterranova* y 11 por *Anisakis*. De esta manera, en contraste con la situación de Japón, la mayoría de los casos de anisakidosis en Estados Unidos están producidos por *Pseudoterranova* (Oshima, 1987).

En Latinoamérica, se han efectuado pocas investigaciones sobre anisákidos. En un estudio realizado por Iglesias y col. (1998) en México, se revela que el 100% de las lisas (*Mugil cephalus*) procedentes de las costas de Baja California Sur presentaban parasitación por *Contracaecum* sp., y que este mismo pescado se consume frecuentemente por la población en forma de cebiche (crudo con limón), por lo que no sería de extrañar que existieran casos de anisakidosis en esa zona.

En las costas del Caribe, Iglesias y col. (1998) detectaron también la presencia de larvas de *Contracaecum* en otro mugílido (*Mugil incilis*) de frecuente consumo en la población de Cartagena de Indias (Colombia).



En Chile, se ha determinado que el hospedador definitivo de *A. simplex*, es la ballena Sey (*Balaenoptera borealis*). Se han encontrado larvas de anisákidos en merluzas (*Merluccius merluccius*), congrios (*Conger conger*) y jureles (*Trachurus trachurus*). Los tres casos de anisakidosis humana hasta ahora comunicados en Chile, corresponden a formas gástricas causada por larvas de *Pseudoterranova* sp. (Carvajal, 1984) y *P. decipiens* (Mercado y col., 1997).

En Oceanía se ha descrito un caso en Hawaii (Deardoff y col., 1986).

En Europa, la fuente principal de infestación la constituye el bacalao (*Gadus morhua*) salado, arenque (*Clupea harengus*) y salmón (*Salmo salar*) ahumados. Los primeros casos vieron la luz en 1954 por la presencia de granulomas eosinofílicos gástricos e intestinales de etiología desconocida en varios pacientes (Van Thiel y col., 1960; Euzeby, 1973). Los casos se ven curiosamente multiplicados en los Países Bajos, hasta que Van Thiel y col. (1960), precisan la etiología de los granulomas, observando que estaban producidos por larvas de *Anisakis*. Los casos se suceden en Holanda durante los años 60 (Bijkerk, 1968) así como en el Norte de Europa como Gran Bretaña, Escandinavia, Francia, Bélgica, Alemania, etc. (Euzeby, 1973; Watt y col., 1979).

En 1984 se describe un caso de anisakidosis en Francia (Cocheton y col., 1984) pero probablemente no fuera el único, pues un estudio epidemiológico realizado por Huang (1988) muestra que numerosas especies de pescados de mercados parisinos (caballa -*Scomber scombrus*-, arenque -*Clupea harengus*-, sardina -*Sardina pilchardus*-, anchoa -*Engraulis encrasicolus*-, bacalao -*Gadus morhua*-, jurel -*Trachurus trachurus*-, merluza -*Merluccius merluccius*-, entre otros) presentan parasitación, no solo en vísceras sino también en musculatura. A partir de aquí, el número de casos diagnosticados comienza a aumentar (Petithory, 1988) hasta que, en otra encuesta epidemiológica realizada en Francia entre los años 1985 y 1995, se confirman 46 casos más de anisakidosis (Hubert y col., 1989; Cocheton y col., 1991; Bouree y col., 1987; Bouree y col., 1995). Huang y Bussieras describen varios casos más en Holanda en 1988 (Huang y Bussieras, 1988). En Sicilia, también se ha descrito un caso recientemente por Ioli y col. (1998).

En Portugal, existen estudios epidemiológicos sobre peces de frecuente consumo, como son la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) y sardina (*Sardina pilchardus*), que demuestran la abundante parasitación con larvas de *Anisakis*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (Carvalho-Varela y Cunha-Ferreira, 1982).

En España, había pocas referencias descritas sobre la presencia de estos parásitos en los pescados comerciales. Sin embargo, a partir del año 1987 han sido numerosos los trabajos publicados en este sentido, evidenciándose en todos ellos que es habitual la presencia de estos parásitos en el tracto digestivo y vísceras de las diferentes especies de peces, y que un porcentaje variable de los ejemplares estudiados sufren una infestación muscular en mayor o menor grado (Dehesa y col., 1989; Pereira-Bueno y col., 1989; Cuéllar y col., 1991; Sanmartín y col., 1989; Sanmartín y col., 1994; López-Giménez y Castell-Monsalve, 1994; Viú y col., 1996).

Un estudio epidemiológico sobre jureles (*Trachurus trachurus*) en lonjas de pescado y mercados municipales de la provincia de Granada, reveló que el 27,2% de las muestras, de un total de 305 individuos, estaban parasitadas por larvas de *A. simplex* (Ruiz Valero y col., 1992). Por otro lado, Adroher y col. (1996) realizan otro estudio epidemiológico en el Mercado Municipal de Granada, sobre jureles (*T. trachurus*) procedentes de las costas del Cantábrico, Atlántico y Mediterráneo. Un total del 39.4% de los jureles presentaban parasitación por anisákidos, y un 26.1% del total de jureles estaban parasitados por *A. simplex*. Los peces procedentes del Cantábrico estaban más parasitados (49.5%), seguidos de los procedentes de Atlántico (36.0%) y del Mediterráneo (6.3%).

El primer caso de anisakidosis en España fue descrito en el Hospital "Pío del Río Hortega" de Valladolid por Arenal Vera y col. (1991). Se trataba de un caso de abdomen agudo por oclusión de la luz apendicular por larva de *Anisakis*. Es el primer caso de anisakidosis humana del que se tiene conocimiento en España, y el primer caso de apendicitis aguda en la literatura médica mundial producida por este nematodo. También se produjeron en este caso asociaciones miálgicas y artrálgicas, siendo en este aspecto el segundo caso descrito en la literatura médica.

Posteriormente, López-Vélez y col. (1991), describen tres casos de anisakidosis en tres pacientes, de los cuales ninguno había viajado recientemente a zonas endémicas ni había comido en restaurantes en los que se sirven pescados importados, por lo que pueden ser considerados autóctonos. Sin embargo, los tres pacientes coinciden en la ingesta de sardinas (*Sardina pilchardus*) crudas como único antecedente epidemiológico común. Dos de los casos comenzaron clínicamente con un íleo paralítico obstructivo y el tercero como un síndrome de úlcus péptico de larga evolución. Los dos primeros fueron intervenidos, encontrando en piezas de biopsia una larva de *Anisakis simplex* adherida a la pared intestinal, mientras que en el tercer caso, mediante esofagogastroscofia explorativa, se extrajo una larva de *Pseudoterranova decipiens*.

Más tarde, Clavel y col. (1993) aportan el primer caso de anisakidosis causado por una L4 de *A. physeteris*. El parásito fue encontrado en la cavidad abdominal de una mujer de Zaragoza, que usualmente comía merluza (*Merluccius merluccius*) y bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) fritas.

Romeo y col. (1997) describen un caso de anisakidosis gástrica en un paciente de 75 años de edad, diagnosticado por endoscopia. El paciente había ingerido pescado cocinado insuficientemente en microondas y el diagnóstico fue confirmado por IgE específicas para *A. simplex*.

La anisakidosis de intestino grueso, aunque menos frecuente, también ha sido descrita en nuestro país recientemente. Louredo y col. (1997) muestran un caso de anisakidosis del colon como causa de abdomen agudo. Se trataba de una paciente de 57 años de edad que presentaba dolor abdominal cólico, diarrea y fiebre. Tras el estudio histológico de la pieza de resección, estos autores aislaron e identificaron morfológicamente dos parásitos de la especie *Anisakis*

*simplex*, rodeadas de un número creciente de eosinófilos, notable inflamación (que en algunos puntos llegaba a ser transmural), y edema. La paciente manifestó que consumía frecuentemente boquerones (*Engraulis encrasicolus*) en vinagre.

Recientemente, en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica celebrado en Barcelona (Diciembre de 1998), se ha expuesto un nuevo caso de anisakidosis gástrica producida por *A. simplex*, así como nuevos casos de anisakidosis intestinal.

En Andalucía, Valero y col. (1992) describen un caso de anisakidosis en Cádiz como consecuencia, según parece, de la ingestión de jureles (*Trachurus trachurus*) "en arenque" parasitados, en el que un individuo afectado de lupus eritematoso (tratado con esteroides durante tres años, tras los cuales abandona el tratamiento), ingresó en el hospital con epigastralgia irradiada a todo el abdomen. Tras intervención quirúrgica, se le extrajeron 7-8 larvas de anisákidos que atravesaban la pared ileal. La identificación de los nematodos reveló que se trataba de *A. simplex*.

En Jaen, se han detectado dos casos más de anisakidosis ileal debido al consumo de anchoas (*Engraulis encrasicolus*) crudas parasitadas con *A. simplex* (Olmo y col., 1998).

*A. simplex*, ha sido descrito como responsable de episodios que varían desde urticaria/angioedema hasta anafilaxia recidivante por mecanismo IgE mediado, tras la ingesta de pescado parasitado (Kasuya y col., 1989). En nuestro país se han descrito muchos casos en poco tiempo (Audicana y col., 1995; Pozo y col., 1995; Arduso Lovera y col., 1996; Rodríguez y Cuevas, 1997; Estrada y Gonzalo, 1997; Montoro y col., 1997; Fraj-Lázaro y col., 1998), e incluso se ha demostrado que los alérgenos pueden jugar un papel importante en el asma del adulto (Estrada y Gonzalo, 1997; Armentia y col., 1998) y en episodios de artralgias/artritis (Cuende y col., 1998). Además, se ha demostrado que estos alérgenos son resistentes al frío y calor (Audicana y col., 1995). Numerosos casos más han sido expuestos en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica celebrado en Barcelona (Diciembre de 1998).

Por ello, es necesario diferenciar claramente entre la infestación producida por anisákidos, denominada anisakidosis, y la sensibilización alérgica a estos parásitos. Esta última se produciría al ingerir, por contacto o incluso inhalación del aroma del pescado parasitado (Armentia y col., 1998), aunque estuviera congelado o cocinado, y que no implica necesariamente anisakidosis, pero que pueden darse conjuntamente.

#### 2.1.4.-PATOLOGÍA DE LA ANISAKIDOSIS.

Cuando la larva infestante (L3) es ingerida por el hombre, penetra en la pared del tracto digestivo. Esto produce una lesión traumática y causa un violento dolor acompañado de otros síntomas (hemorragia, inflamación, ulceración, etc.).

Recientemente, Perteguer y col. (1996) han determinado, mediante pruebas *in vitro* con sangre humana, que los AES (antígenos de excreción/secreción) de *A. simplex* tienen un cierto efecto anticoagulante, retrasando el tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina. A continuación sigue una reacción inflamatoria no específica, que acarrea la muerte de la larva. En el sitio de penetración de la larva se forma un granuloma eosinofílico o flemón alérgico (tipo Arthus) que se observa a menudo en los casos crónicos.

De esta forma, las alteraciones se pueden clasificar en seis tipos:

- 1.- Respuesta a cuerpo extraño.
- 2.- Reacción flemonosa.
- 3.- Lesión tipo absceso.
- 4.- Lesión absceso-granulosa.
- 5.- Lesión granulomatosa (parásito irreconocible e infiltración eosinófila).
- 6.- Episodios que varían de urticaria/angioedema a anafilaxia recidivante, por mecanismo IgE mediado.

La hipersensibilidad puede ser debida a sustancias excretadas-secretadas por las larvas vivas, pero también por los productos de descomposición de las larvas muertas en los tejidos (Smith y Wootten, 1978; Kasuya y col., 1989).

#### 2.1.5.-SINTOMATOLOGÍA DE LA ANISAKIDOSIS.

Existen tres formas clínicas de anisakiosis:

- 1.-Forma no invasiva o luminal.
- 2.-Forma invasiva.
- 3.-Reacciones asociadas.

##### 2.1.5.1.-FORMA NO INVASIVA O LUMINAL.

Es generalmente asintomática, aunque cuando dan síntomas son ligeros e inespecíficos. Varias horas después de la ingesta de pescado, el paciente nota molestias en el epigastrio y/o en la región retroesternal, referidas en ocasiones como "cosquilleos" y que se atribuyen a la emigración de las larvas desde el estómago a la orofaringe. Dichos síntomas pueden durar hasta una o dos semanas, para finalmente, expulsar la larva mediante tos o vómito. Estos casos a menudo están producidos por *Pseudoterranova*, probablemente por su menor capacidad para perforar paredes gástricas e intestinales. En América se han descrito varios casos (Kates y col., 1973; Jackson y col., 1981; Fontaine, 1985).

### 2.1.5.2.-FORMA INVASIVA.

En esta forma de anisakidosis, las L3 son capaces de penetrar en la mucosa y pared del tracto digestivo, utilizando como herramientas el diente de la zona cefálica y diferentes sustancias procedentes de las glándulas excretoras, que se han denominado genéricamente antígenos de excreción-secreción (AES) y que salen al exterior por el poro excretor. Entre otras sustancias, los productos ES están compuestos por enzimas histolíticas, como proteasas (Sakanari, 1990) y las recientemente descubiertas hialuronidasas (Hotez y col., 1994). Teniendo en cuenta que, el ácido hialurónico es un componente estructural muy abundante en el tejido conectivo localizado en lámina propia del tracto digestivo, las hialuronidasas pueden jugar un papel importante en la histólisis de la mucosa gastrointestinal (Hotez y col., 1994).

Además, Buzzell y Sommerville (1985) sugieren que las secreciones de las glándulas dorsales presentes en el esófago de *A. simplex*, pueden también estar involucradas en digestiones extracorporales lo que permiten la invasión de la mucosa gastrointestinal en el hombre.

La mayoría de las veces la forma invasiva de la anisakidosis está causada por larvas de *Anisakis*, aunque también se pueden producir por *Pseudoterranova* (Suzuki y col., 1972). Puede ser gástrica, intestinal o intraperitoneal.

#### 2.1.5.2.1.-GÁSTRICA.

Los síntomas se presentan generalmente a las 4-6 horas siguientes a la ingestión de pescado parasitado, aunque el margen de aparición puede oscilar entre 1 y 12 horas (Deardoff y col., 1986).

En casos de infestación masiva se puede producir el cuadro de anisakidosis gástrica aguda con dolor abdominal importante, náuseas, vómitos, diarrea y lesiones cutáneas urticariales que aparecen de 1 a 12 horas después de la ingesta. Otras veces se produce un cuadro de anisakidosis gástrica crónica en el que los pacientes refieren episodios intermitentes de dolor abdominal, náuseas y vómitos de meses e incluso años de duración (Sugimachi y col., 1985).

Durante la fase de penetración de la larva en la mucosa gástrica, el síntoma más relevante y frecuente es el dolor, y se ven acentuadas las náuseas y vómitos. En ocasiones aparece un ligero dolor en el pecho, lo que puede ser confundido con un amago de infarto cardíaco. Se pueden producir también calambres que en ocasiones pueden ser recidivos (Goldfain y Potet, 1984), así como irradiaciones variables: al omóplato derecho, a la zona posterior en forma de punzadas (Cocheton y col., 1984; Deardoff y col., 1986), y abdominales (Valero y col., 1992).

En muchas ocasiones, la anisakidosis gástrica suele ser confundida con úlceras, cánceres o pólipos estomacales. Otras veces son difíciles de diagnosticar por la inespecificidad de los síntomas, o bien éstos no se presentan, no pudiéndose realizar un diagnóstico rápido. En estos casos la enfermedad

evoluciona a manifestaciones crónicas, apareciendo dolores poco específicos que persisten durante meses o años. La tasa sanguínea de eosinófilos pasa de 4 al 40%, pero los otros leucocitos apenas se alteran (Oshima, 1972).

Yocogama y Yoshimura (1967) señalan la presencia de sangre en el jugo gástrico en el 70% de los casos estudiados. Por otro lado, Asami y Tomita (1967) describen, en algunos casos, la disminución de acidez gástrica, lo que pudiera favorecer la penetración de larvas en la pared del estómago. A veces, la anisakidosis gástrica puede estar causada por larvas de *Pseudoterranova*, observándose una eosinofilia periférica del 15%.

Cocheton y col. (1991) citan que, en general, los signos digestivos causados por *Pseudoterranova* son menos intensos que los provocados por larvas de *Anisakis*, pudiendo llegar a ser asintomáticos. Otras veces, los dolores pueden ser recidivos cada 5 ó 10 minutos, asociados a náuseas y vómitos.

En algunos casos, la epigastralgia se puede acompañar de pirosis retrointestinal y de importantes reacciones edematosas e inflamatorias que circundan al nematodo enclavado en la pared gástrica (López-Vélez y col., 1991).

Por último, Petithory y col. (1990) plantean la posibilidad de que *A. simplex* puede ser un cofactor importante en ciertas formas de cáncer gástrico.

#### 2.1.5.2.2.-INTESTINAL.

Los signos clínicos aparecen con una media de 7 días tras la ingestión de pescado parasitado, pero pueden ser más o menos tardíos. Lo más característico es un típico dolor abdominal agudo con náuseas, vómitos y diarreas. Pero ante la multitud de síntomas, la diferencia entre un ataque agudo y crónico es difícil de reconocer. Los síntomas más comunes son: irritación peritoneal con o sin obstrucción y dilatación de las asas del intestino delgado y grueso.

Las lesiones al intestino delgado dan lugar a un cuadro de abdomen agudo o de apendicitis (Arenal Vera y col., 1991), que puede conducir a una intervención quirúrgica, aunque las lesiones pueden ponerse en evidencia con una laparotomía. Estos síntomas aparecen poco antes de la formación de granulomas eosinofílicos, pudiendo aparecer éstos últimos en un plazo variable (Fontaine, 1985). La eosinofilia suele ser normal, pero pueden producirse casos de leucocitosis marcada (López-Vélez y col., 1991) o neutrofilia (Valero y col., 1992).

La anisakidosis de intestino grueso es menos frecuente, pero también ha sido descrita. Suele cursar como un cuadro de abdomen agudo, fuertes inflamaciones y edema (Louredo y col., 1997).

#### 2.1.5.2.3.-INTRAPERITONEAL.

La anisakidosis intraperitoneal está causada siempre por larvas de *Anisakis*. El parásito puede perforar el intestino y migrar al mesenterio, nódulos linfáticos, hígado y páncreas. A menudo suele hallarse por azar en una intervención quirúrgica (Little y MacPhail, 1972).

Se ha descrito también un posible caso de anisakiosis pulmonar acompañada de efusión del líquido pleural. El paciente mostraba elevada eosinofilia (31%) en sangre, así como episodios de urticaria en la zona afectada y antebrazos (Kobayashi y col., 1985).

En general, los síntomas se asemejan a los de tumor gástrico, úlcera gástrica, enteritis, apendicitis, colecistitis, cáncer de páncreas o peritonitis.

### 2.1.5.3.-REACCIONES ASOCIADAS.

a) Generales: fiebre moderada en las formas intestinales, raras veces pérdida de peso, urticaria, reacciones anafilácticas y reacciones maculopapulosas.

b) Locales: edemas segmentarios y poliartritis aguda.

### 2.1.6.-DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la anisakidosis puede realizarse por tres procedimientos diferentes:

- Mediante diagnóstico clínico.
- Mediante diagnóstico inmunológico.
- Mediante diagnóstico post-operatorio.

#### 2.1.6.1.- DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

En las formas gastroduodenales agudas, se debe investigar si en las horas o días precedentes, el afectado ha ingerido calamares o pescado crudo o poco cocinado, escabechado, salado o ahumado.

El diagnóstico debe ser complementado con exámenes radiológicos, que aunque no son específicos, son de gran ayuda (Nakata y col., 1980; Matsui y col., 1985). De esta manera, en los casos de anisakidosis gástrica aguda, es típica la visualización de pequeños hilos de 30 mm de longitud mediante técnicas de doble contraste. También en anisakidosis de colon y de íleon resulta de interés, si bien los edemas pueden dificultar la visualización (Sugimachi y col., 1985; Matsumoto y col., 1991; Minamoto y col., 1991; López-Vélez y col., 1991; Masafumi y col., 1992). En estos casos, el diagnóstico debe ser confirmado mediante una endoscopia (Foto 1) que puede ser gástrica, del duodeno proximal o del colon distal, según el tipo de anisakidosis (Romeo y col., 1997). Por otro lado, en procesos crónicos no se observa claramente por lo que fácilmente se puede confundir con otros procesos patológicos.

La fibroscopia gástrica, efectuada en buenas condiciones en las horas o días siguientes a la aparición de los primeros síntomas digestivos, permite encontrar el nematodo fijado por su extremidad cefálica a la mucosa gástrica y proceder a su exéresis con la ayuda de una pinza de biopsia (Bouree y col., 1987; Montigny y col., 1991) por lo que se puede proceder a la identificación del parásito.



Foto 1. Larvas de *Anisakis simplex* penetrando en la pared del tubo digestivo humano (diagnosticado por endoscopia).

Además de las características morfológicas cefálicas y caudales que permiten diferenciar a los anisákidos, el estudio de la ultraestructura cuticular también nos permite diferenciar géneros como *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Hysterothylacium* (Fredericksen y Specian, 1981).

El diagnóstico también puede realizarse mediante ultrasonidos de alta resolución, dando muy buenos resultados y permitiendo detectar lesiones en zonas como el íleo distal. Mediante esta técnica se puede ver un marcado adelgazamiento de las asas intestinales asociado a un estrechamiento de la luz intestinal, edema de los pliegues de Kerckring y disminución de la peristalsis. Se puede encontrar líquido ascítico que al examen citológico revela una infiltración eosinófila (Masafumi y col., 1992).

En las afecciones del intestino delgado, a veces el diagnóstico no puede ser configurado a partir de un examen del tejido afectado mediante una laparotomía. El aspecto macroscópico suele ser el de un tumor inflamatorio, asociado, en algunos casos, con hipertrofia de ganglios mesentéricos.

Las lesiones histológicas de la anisakidosis pueden ser un elemento de diagnóstico. Oshima y Kliks (1986) han clasificado las lesiones histológicas en cinco tipos:

- El tipo I es una reacción flegmonosa, asociada a una infiltración masiva de eosinófilos polinucleares, de hemorragias y exudados.
- El tipo II es una reacción de tipo "cuerpos extraños" o células gigantes, neutrófilos y eosinófilos que se disponen alrededor de la larva.
- El tipo III es una lesión de tipo absceso, constituyendo un foco de necrosis.
- El tipo IV es una lesión de tipo absceso-granuloma.
- El tipo V es un granuloma de eosinófilos donde no se encuentran prácticamente restos larvarios.



### 2.1.6.2.-DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO.

Es de interés en formas gástricas o intestinales pero, sobre todo, en cortes histológicos donde las lesiones son patentes pero que carecen de alguna larva o residuo de ésta identificables.

Las reacciones serológicas no tienen tiempo de ser positivas en anisakidosis gástricas agudas, pero pueden ser muy útiles para el diagnóstico en las formas subagudas o crónicas.

a) Intradermorreacción. Utilizada por varios autores japoneses en casos sospechosos de anisakidosis. Se han empleado diversos tipos de antígenos:

- Somáticos, extraídos de larvas de *Anisakis*.
- Antígenos de excreción-secreción (AES) debido a que la fiabilidad del test anterior es escasa (Kobayashi y col., 1968).
- Utilización de hemoglobina del parásito por Suzuki y col. (1974).

No obstante, el elevado número de falsos positivos hace que la intradermorreacción sea un test mediocre en el diagnóstico de la anisakidosis (Cocheton y col., 1991).

b) Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Utilizada para poner en evidencia, en el suero del paciente afectado, la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos de excreción-secreción (AES) del parásito (Suzuki y col., 1974; Sakanari y col., 1988).

c) Fijación del complemento. Ha permitido poner en evidencia anticuerpos inducidos por los componentes polisacáridicos de la larva (Cocheton y col., 1991).

d) Reacción de precipitación en medios gelificados. La inmunolectroforesis, la electrosinéresis y el método de Ouchterlony (Petithory y col., 1986) permiten obtener reacciones serológicas positivas con antígenos de *A. simplex*. La aparición de reacciones cruzadas con otras nematodosis se han dado en numerosas ocasiones, por lo que estas técnicas no se pueden considerar específicas.

e) RAST. Debido a la existencia de Ig E específicas anti-*Anisakis*, esta técnica ha sido utilizada, si bien da reacciones cruzadas con sueros de pacientes afectados de otras nematodosis, como por ejemplo por *Ascaris suum* (Desowitz y col., 1985; Sakanari y col., 1988).

f) Inmunoenzimáticos (ELISA y microELISA). Mediante estas técnicas se pueden detectar las IgG y la IgM frente a antígenos de *Anisakis* hasta 6 meses post-infestación. Sin embargo estas técnicas, al igual que las anteriores, pueden presentar reacciones cruzadas. Por este motivo, se están produciendo anticuerpos monoclonales (UA3 y UA6) que reconocen epitopos específicos de *Anisakis*, lo que podría ser una buena alternativa para llevar a cabo el diagnóstico preoperatorio de la anisakidosis humana (Iglesias y col., 1995).

g) Hemaglutinación. Los resultados que se obtienen son poco específicos (Cocheton y col., 1991).

h) Western-blot. Esta técnica aparece como el método inmunológico más sensible, ya que permite diagnosticar casos de anisakidosis de evolución crónica, que pueden ser ignorados. Se han utilizado antígenos de excreción/secreción (AES), pero los resultados más fiables aparecen cuando se utilizan antígenos somáticos (Petithory y col., 1991).

El diagnóstico inmunológico es útil en estudios epidemiológicos (Kobayashi, 1968), pero no para el diagnóstico clínico cotidiano, excepto en anisakidosis crónica, pues los anticuerpos aparecen muy tardíamente desde la infección.

### 2.1.6.3.-DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A ANISÁKIDOS.

Como se ha comentado anteriormente, el consumo de pescados cocinados o no, y parasitados con *A. simplex* es responsable de episodios que varían desde urticaria/angioedema hasta reacciones anafilácticas recidivantes, pero no son considerados como anisakidosis. Estos estudios sugieren que los episodios de anafilaxia se deben a la ingestión del parásito sin requerir infestación por parte del paciente. Por eso, se han venido haciendo varias pruebas para diagnosticar este tipo de sensibilización (Kasuya y col., 1989; Audicana y col., 1995; Arduso Lovera y col., 1996; Rodríguez y Cuevas, 1997; Estrada y Gonzalo, 1997; Fraj-Lázaro y col., 1998):

- Pruebas cutáneas con extractos de *A. simplex* (prick-test) y con extractos de pescado.
- Detección de IgE total mediante RAST.
- Determinación de IgE específica frente a *A. simplex*.
- Pruebas de liberación de histamina con extractos de *A. simplex* y extractos comerciales de pescados.
- Estudios de immunoblotting con extracto de *A. simplex* en gel de poliacrilamida.

Un resultado positivo al prick-test con extracto de *A. simplex*, acompañado de un resultado negativo con extracto de pescado, puede facilitar el diagnóstico de pacientes con alergia a este nematodo, y descartar alergias al pescado que venían considerándose de tipo alimentario. Sin embargo, las pruebas de hipersensibilidad en las que se emplean extractos de *A. simplex*, pueden presentar reacciones cruzadas con *Hysterothylacium aduncum*, por lo que Fernández-Caldas y col. (1998) sugieren que otros parásitos del pescado se deberían de considerar a la hora de evaluar reacciones alérgicas post ingestión de pescado.

#### 2.1.6.4.-DIAGNÓSTICO POST-OPERATORIO.

Permite confirmar la presencia de larvas o fragmentos de larvas en los tejidos. Si se practican resecciones segmentarias de intestino, pueden observarse engrosamiento transmural y edemas, granulomas e incluso el propio nematodo, que tras un estudio microscópico por secciones puede ser identificado.

#### 2.1.7.-TRATAMIENTO.

En la actualidad no se dispone de ningún fármaco antihelmíntico totalmente eficaz contra anisákidos, por lo que la eliminación de las larvas sólo se consigue de forma espontánea (tos, vómito, heces), o inducida precozmente por eméticos tras la ingesta de pescado sospechoso. Pero el tratamiento más importante es, tanto en anisakidosis gástrica como intestinal, la endoscopia y fibroscopia gástrica, que permite realizar la exéresis del parásito con pinzas de biopsia. Los síntomas desaparecen en los días siguientes. También se utiliza la resección quirúrgica de la zona intestinal afectada.

No obstante, en Japón han sido utilizados los antiácidos en formas gástricas poco complicadas y poco dolorosas. Además, se ha comprobado un cierto éxito del mebendazol tanto en larvas mantenidos *in vitro* como en ratas infectadas con larvas de *Anisakis* (Cocheton y col., 1991). Otros derivados imidazólicos pueden ser útiles, como el tiabendazol (durante 5 días) o el flubendazol. La corticoterapia en dosis moderadas sólo debe ser utilizada en casos de fenómenos alérgicos importantes junto con antibioterapia en casos de infecciones secundarias microbianas (Petithory y Marty, 1988).

#### 2.1.8.-PROFILAXIS.

La evisceración precoz de los pescados no es totalmente eficaz para eliminar todas las larvas de *Anisakis* presentes, pues algunas se encuentran en la musculatura (Bratney y Bishop, 1992). Sin embargo resulta aconsejable, pues cuanto más tiempo se tarde en eviscerar los pescados, los parásitos tienden a migrar a la musculatura, hecho que se ve incrementado si las temperaturas de conservación del pescado son altas (Smith y Wootten, 1975). Además, esta migración *post mortem* ocurre con mayor frecuencia en peces con musculatura "grasa" como son el jurel (*Trachurus trachurus*), la caballa (*Scomber scombrus*) o arenque (*Clupea harengus*), en relación con los peces de musculatura "no grasa", como la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), pescadilla (*Merlangius merlangus*) o la merluza (*Merluccius merluccius*), por lo que se aconseja especialmente el eviscerado tras la captura de peces del primer grupo, o bien una congelación inmediata (Smith, 1984).

Por el contrario, Huss y col. (1992) no consideran significativa la migración de parásitos de vísceras a musculatura de arenques si se almacenan a temperaturas de 0-1°C, por lo que este aspecto está aún cuestionado.

Lee y Chyu (1970), realizaron estudios de resistencia e infectividad con larvas de *Anisakis*, llegando a las siguientes conclusiones:

- La exposición de las larvas por encima de 60°C provoca la muerte inmediata de las mismas.
- La congelación por espacio de 1 a 6 horas a una temperatura de -10°C a -20°C no resulta suficiente para matar todas las larvas ensayadas, aunque la infectividad decrece gradualmente conforme lo hace la temperatura, llegando a ser nula tras una exposición de -20°C durante una hora.
- Las larvas tienen una relativa resistencia a altas concentraciones salinas, pudiendo sobrevivir 24 horas en solución salina al 20%, ó 3 días al 10%.
- Presentan especial resistencia a soluciones ácidas (pH 4.0 a 6.0), pudiendo sobrevivir durante un tiempo prolongado en ácido acético al 5%.

Con estos estudios, podemos concluir que ni la sal, ni el ahumado, ni el vinagre, ni el escabechado destruyen las larvas de *Anisakis*. Se debe huir del consumo de platos más o menos exóticos basados en pescado crudo (Adams y col., 1997). Entre nosotros, los boquerones en vinagre y las sardinas insuficientemente cocinadas constituyen los principales platos de riesgo.

La profilaxis se basa esencialmente en el tratamiento térmico del pescado a 60°C, durante al menos 10 minutos, o la congelación a -20°C durante al menos 24 horas. Estas medidas fueron aplicadas en los Países Bajos reduciéndose considerablemente la afección (Huang y Bussieras, 1988). Sin embargo, Audicana y col. (1995) demuestran que los tratamientos térmicos de congelado y ebullición, no son capaces de destruir los antígenos del parásito, por ello pueden darse episodios de anafilaxia en personas que consuman pescado parasitado por *A. simplex*, aunque el parásito haya sido destruido.

En China, es tradicional el consumo de pescado crudo condimentado con raíces de jengibre (*Zingiber officinale*) ricas en shogaol y gingerol, dos principios activos que se han mostrado letalmente eficientes, a concentraciones muy pequeñas, sobre larvas de *Anisakis* mantenidas *in vitro*. El consumo de estas raíces así como de hojas de *Perilla* con pescado crudo, puede disminuir el número de casos de anisakidosis (Goto y col., 1990).

Aunque el ciclo de vida de *A. simplex* es únicamente marino, no hay que desestimar el consumo de truchas de piscifactoría (trucha marrón -*Salmo trutta*-, trucha arcoiris -*S. gairdneri*-) como posible portador del parásito. Wootten y Smith (1974) demostraron que si se infestan estos peces con *Anisakis*, éstos pueden adaptarse al hospedador e incluso migrar a musculatura. Por otro lado, es frecuente en Europa la práctica de alimentar las truchas de piscifactoría con peces marinos no tratados adecuadamente, y es la causa de que, por ejemplo, las truchas de un reservorio de Inglaterra (Hanningfield Reservoir) presentaran prevalencias de parasitación de hasta un 61% (Wootten y Smith, 1974).

Por último, hay que comentar que la información incontrolada a la población de estos riesgos puede ser un arma de doble filo, y ha de hacerse con suma cautela. Se da el caso de que en el verano de 1987, los servicios veterinarios

italianos devolvieron sistemáticamente lotes de pescado parasitado a los países de procedencia (Francia, Holanda, Dinamarca, etc). Al mismo tiempo, la televisión alemana emitía un reportaje sobre la anisakidosis, lo que provocó un descenso del 70% en el consumo de pescado durante los días siguientes a la emisión (Hubert y col., 1989).

## 2.2.-*Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802).

Existen muchas confusiones referentes a la sistemática de *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802). Durante muchos años ha sido considerado un subgénero de *Contracaecum*, pero Hartwich (1957) restablece el género *Thynnascaris* en base a que este último no tiene sistema excretor en forma de cinta, el poro excretor se encuentra situado a nivel del anillo nervioso, y la madurez sexual se produce en peces, y no en aves o mamíferos marinos como sucede en *Contracaecum*. Soleim (1984) por su parte, realizó un estudio exhaustivo en el que comparó la morfología de *Thynnascaris adunca* y *Contracaecum spiculigerum*, llegando a la firme conclusión de que se trataban de diferentes géneros. Deardoff y Overstreet (1981) proponen la validez de género *Hysterothylacium*, considerando a *Thynnascaris* como sinónimo.

Si bien Punt (1941) hace sinónimo a *H. gadi* con *H. aduncum*, y es confirmado más tarde por Berland (1961), Petter (1969) y Fagerholm (1982), existen autores como Dollfus (1953), y más tarde Hartwich (1974) que las consideran dos especies válidas diferentes.

Los ascáridos de los peces teleósteos del noreste del Atlántico y mares del norte de Europa se han estudiado por algunos autores y son relativamente bien conocidos. Excluyendo aquellas especies insuficientemente descritas, existen varias especies de *Hysterothylacium* bien conocidas: *H. aduncum*, *H. gadi*, *H. auctum*, *H. rigidum* e *H. cornutum*. Sin embargo, la validez de *H. gadi* e *H. auctum* está bajo discusión, pues muchos autores los consideran como estadios juveniles de *H. aduncum* (Petter y Cabaret, 1995).

En un estudio de los ascáridos depositados en el Museo de Historia Natural de París realizado por Petter y Cabaret (1995), se realizaron estudios biométricos referentes a *H. aduncum* e *H. gadi*, así como en los hospedadores que fueron encontrados. De esta forma, la relación entre longitud de esófago/ancho de alas cervicales y longitud de apéndice ventricular/ancho de alas cervicales permiten distinguir dos subespecies dentro del género *Hysterothylacium*: *H. aduncum aduncum*, presente en especies como saboga (*Alosa fallax*), sábalo (*A. alosa*), aguja (*Belone belone*), rodaballo (*Psetta maxima*), rape (*Lophius piscatorius*), jurel (*Trachurus trachurus*), merluza (*Merluccius merluccius*) y faneca (*Trisopterus luscus*). Por otro lado está *H. aduncum gadi*, presente en abadejo (*Pollachius pollachius*), carbonero (*P. virens*), bacalao (*Gadus morhua*), pescadilla (*Merlangius merlangius*), caballa (*Scomber scombrus*) y salmón (*Salmo salar*).

### 2.2.1.-ENCUADRAMIENTO TAXONÓMICO.

Teniendo en cuenta que nuestros parásitos han sido aislados de *Trachurus trachurus*, y las relaciones longitud de esófago/ancho de alas cervicales y longitud de apéndice esofágico/ancho de alas cervicales, según Peter y Cabaret (1995) se puede decir que nuestra especie se corresponde con *H. aduncum aduncum*. Según Anderson (1992), el encuadramiento taxonómico de *H. aduncum* queda así:

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Ascaridida

Superfamilia: Ascaridoidea

Familia: Anisakidae

Subfamilia: Anisakinae

Género: *Hysterothylacium*

Especie: *Hysterothylacium aduncum*.

Sinonimias: *Hysterothylacium aduncum*, *Thynnascaris adunca*, *Contraecum aduncum*, *Contraecum clavatum*.

### 2.2.2.-ESTUDIO DE LOS PARÁSITOS.

Las descripciones morfológicas están basadas en los trabajos de Petter y Maillard (1988), Sanmartín (1994), y Petter y Cabaret (1995).

#### 2.2.2.1.-MORFOLOGÍA DEL TERCER ESTADIO LARVARIO (L3).

De longitud variable (desde 2.5 a 22 mm) y color blanquecino, y movimientos menos enérgicos que *Anisakis*. Cutícula finamente estriada transversalmente con aristas laterales en ambos lados del cuerpo en la zona anterior.

En su extremo anterior posee un diente en posición ventral y tres labios, uno en posición dorsal con dos pares de papilas laterales, y dos labios ventrales con un par de papilas cada uno.

El poro excretor se encuentra situado próximo al anillo nervioso (a diferencia de *Contraecum*).

Posee un esófago al final del cual se distinguen el ventrículo, un apéndice ventricular y un ciego intestinal de tamaño ligeramente desigual.

El aparato digestivo está bien diferenciado mientras que los órganos genitales son aún muy rudimentarios, siendo el primordio genital simple para los futuros machos y doble para las hembras.

La cola está provista de una especie de espina simple. La longitud de la cola es mayor en larvas que originarán hembras, que en las que darán lugar a machos.

#### 2.2.2.2.-MORFOLOGÍA DEL CUARTO ESTADIO LARVARIO (L4).

La región cefálica se encuentra ya bien diferenciada, y separada del resto del cuerpo por un estrangulamiento. Labios más desarrollados que la L3, presentando estructuras bien diferenciadas: un labio dorsal con dos papilas dobles, y dos subventrales con una papila doble, una simple y un anfidio. Presentan pequeños interlabios. La estriación de la cutícula se hace un poco más notable. En el extremo anterior se distinguen las alas cervicales vestigiales.

El poro excretor se sitúa a nivel del anillo nervioso. El apéndice ventricular y ciego intestinal son de dimensiones similares aunque no iguales.

El extremo posterior está provisto de un mucrón con numerosas espinas rudimentarias. La distancia entre el ano y la cola, junto con los vestigios genitales permiten la diferenciación entre larvas que darán machos o hembras.

#### 2.2.2.3.-MORFOLOGÍA DE ADULTOS.

Blanquecino, cilíndrico y de tamaño que varía entre 15 a 85 mm (Andersen, 1993). Cutícula más estriada transversalmente.

La región cefálica, está formada por tres labios, uno dorsal provisto de dos papilas dobles laterales, y dos labios subventrales con una papila doble casi ventral, otra simple y un anfidio lateral. La parte superior de los labios presenta expansiones internas membranosas, y entre las bases de los labios existen tres interlabios de aspecto triangular.

A continuación de los labios se originan dos expansiones laterales, denominadas alas cefálicas, bastante prominentes hasta el final del esófago y vestigiales hasta el extremo posterior.

El esófago ocupa aproximadamente el 1-10% de la longitud corporal. Se distinguen perfectamente el ventrículo, el apéndice ventricular y el ciego intestinal que son de dimensiones similares, pero no iguales. El poro excretor está próximo al anillo nervioso.

Para que se trate de *H. aduncum aduncum*, las medidas relativas entre apéndice ventricular/ancho de alas cervicales debe ser  $> 15$  y las de longitud de esófago/ancho de alas cervicales  $> 54$ , de lo contrario se trata de *H. aduncum gadi* (Petter y Cabaret, 1995).

El extremo posterior es de forma cónica y cubierto por numerosas espinas rudimentarias.

Los machos presentan dos espículas iguales con un tamaño que representa entre el 3 y 6% de la longitud corporal. En su parte posterior se observan cinco pares de papilas postanales, de las que cuatro son simples y uno doble. También numerosas papilas preanales que van de 27 a 37 en función de la longitud corporal. Existe una papila precloacal simple.

Las hembras son anfíelfas. La vulva se encuentra situada aproximadamente en el primer tercio de la longitud corporal.

## LÁMINA 4

### *Hysterothylacium aduncum*, L3

#### A: Parte anterior

AN: Anillo Nervioso  
PE: Poro Excretor  
ES: Esófago  
CI: Ciego Intestinal  
V: Ventrículo  
AV: Apéndice Ventricular  
I: Intestino

#### B: Vista frontal de la parte anterior

P: Papilas  
LD: Labios Dorsales  
D: Diente  
LV: Labio Ventral

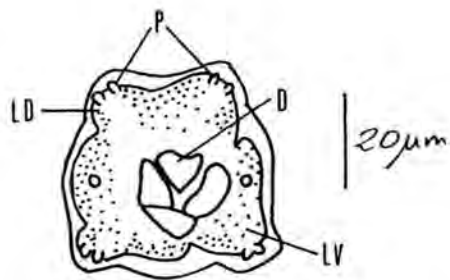
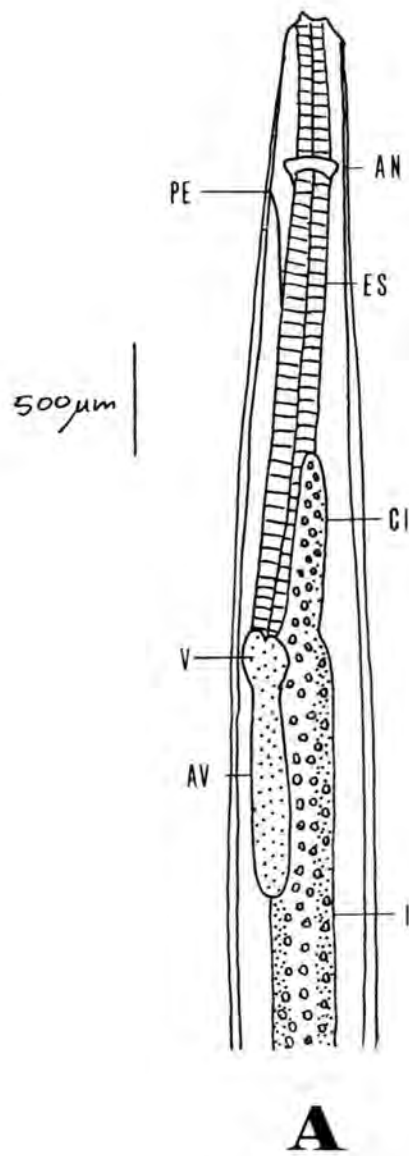
#### C: Vista lateral de la parte anterior

P: Papila  
D: Diente

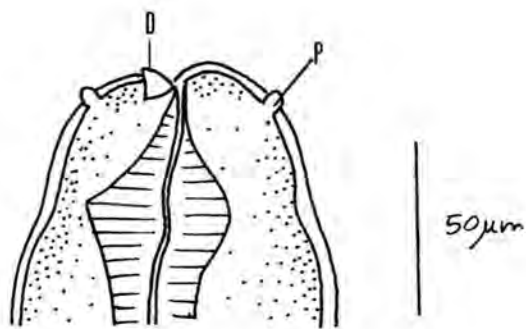
#### D: Vista lateral de la parte posterior

I: Intestino  
G: Glándulas rectales  
R: Recto  
A: Ano  
E: Espina

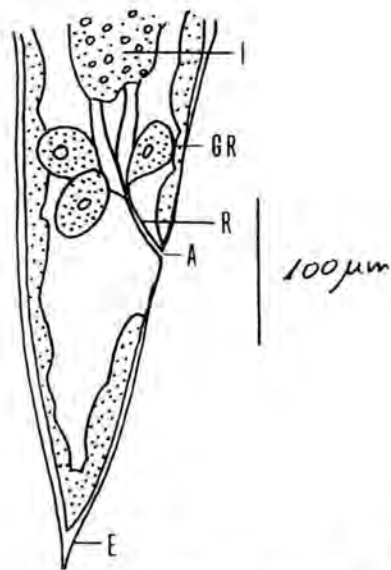




**B**



**C**



**D**

# LÁMINA 4

Dibujos tomados de Petter y Maillard (1988).

## LÁMINA 5

### *Hysterothylacium aduncum*, L4

A: Parte anterior

AN: Anillo Nervioso  
PE: Poro Excretor  
ES: Esófago  
CI: Ciego Intestinal  
V: Ventrículo  
AV: Apéndice Ventricular  
I: Intestino

B: Parte anterior, vista dorsal

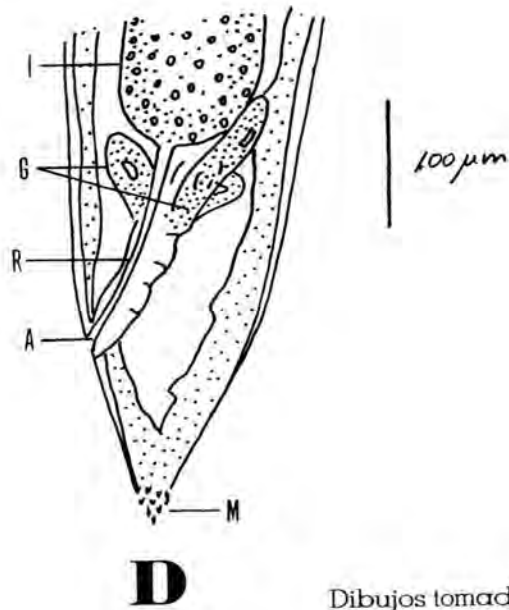
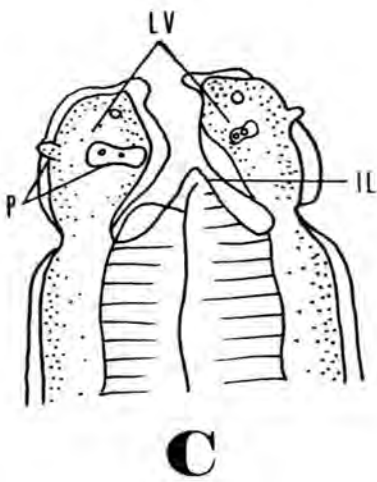
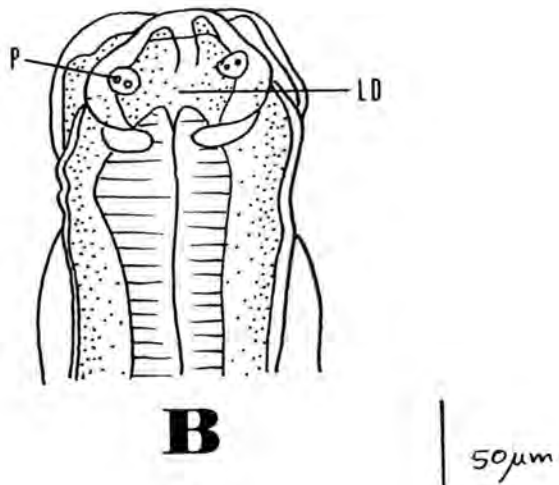
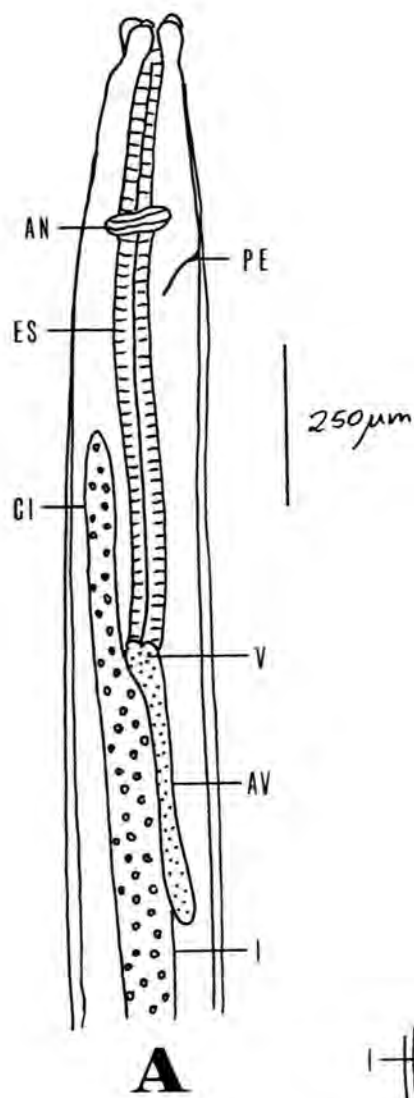
LV: Labio Dorsal  
P: Papila

C: Parte Anterior, vista ventral

LV: Labios Ventrales  
P: Papilas  
IL: Interlabio

D: Vista lateral de la parte posterior

I: Intestino  
G: Glándulas rectales  
R: Recto  
A: Ano  
M: Mucrón



# LÁMINA 5

Dibujos tomados de Petter y Cabaret (1995).

## LÁMINA 6

### *Hysterothylacium aduncum*, adulto

A: Parte anterior

AN: Anillo Nervioso  
PE: Poro Excretor  
ES: Esófago  
AC: Ala Cervical  
CI: Ciego Intestinal  
V: Ventrículo  
AV: Apéndice Ventricular  
I: Intestino

B: Detalle de la parte anterior, vista ventral

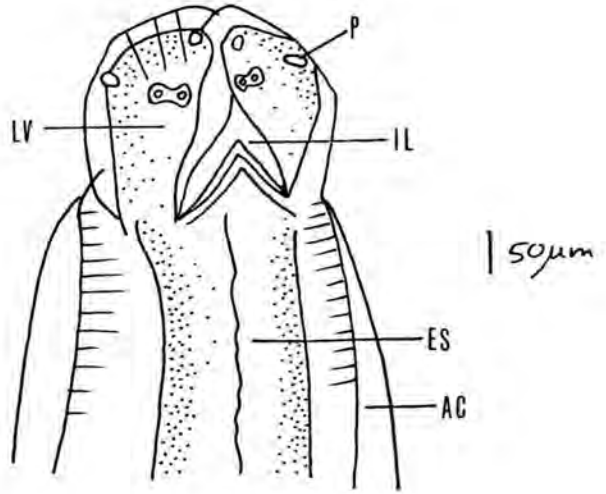
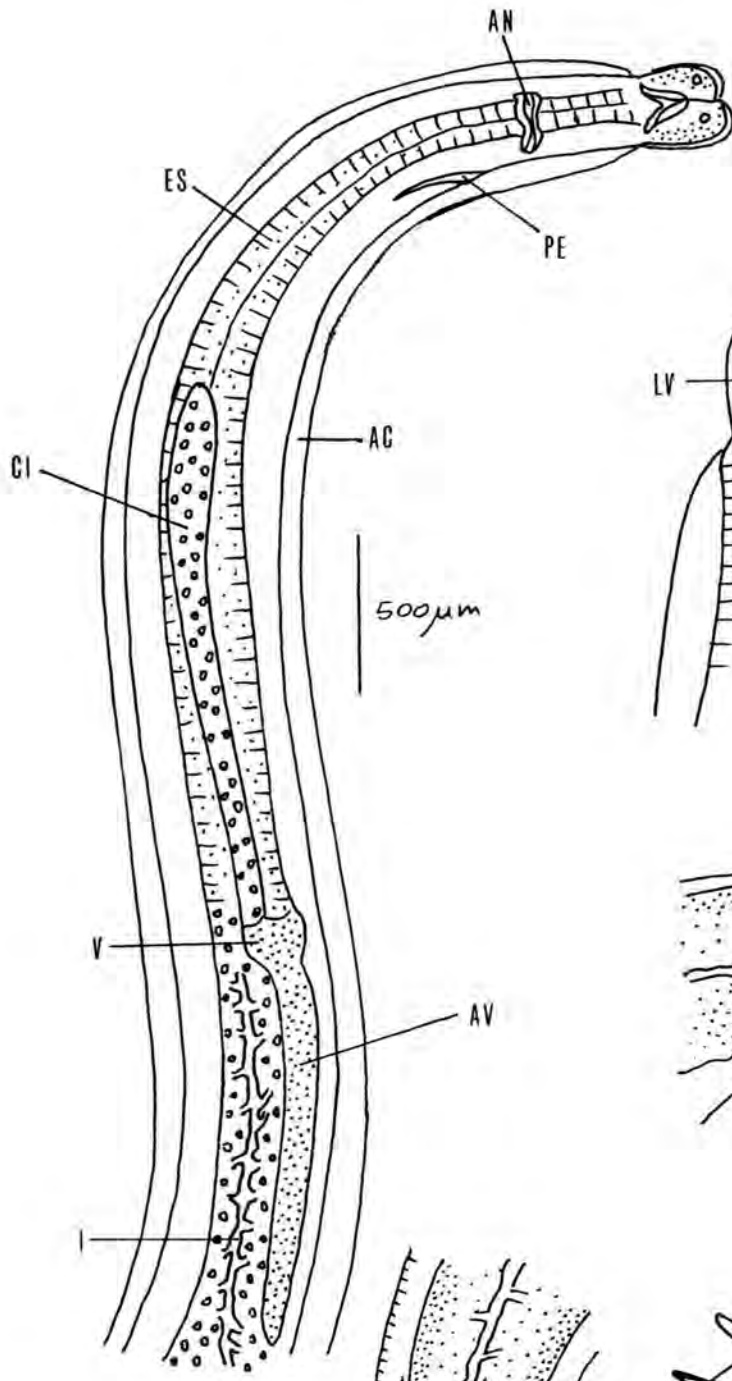
P: Papila  
IL: Interlabio  
ES: Esófago  
AC: Ala Cervical  
LV: Labio Ventral

C: Parte posterior, vista lateral (macho)

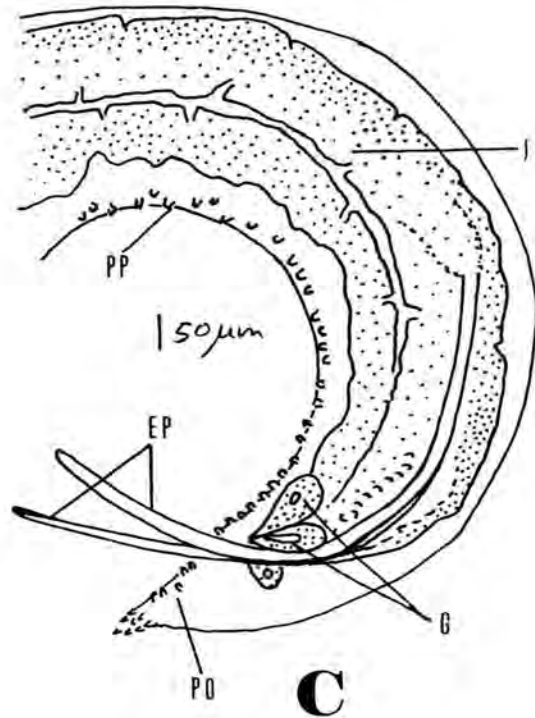
I: Intestino  
PP: Papilas Preanales  
G: Glándulas rectales  
EP: Espículas  
PO: Papilas postanales

D: Parte posterior, vista ventral (hembra)

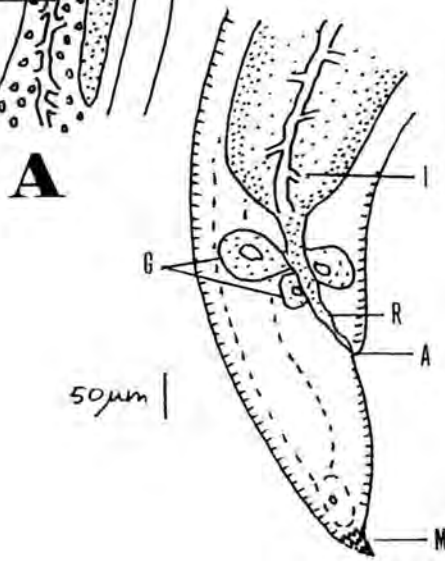
I: Intestino  
G: Glándulas rectales  
R: Recto  
A: Ano  
M: Mucrón



**B**



**C**



**D**

# LÁMINA 6

Dibujos tomados de González y Carvajal (1994).

#### 2.2.2.4.-HUEVOS.

Los huevos de *H. aduncum* son esféricos y con un diámetro comprendido entre 50 y 60 micras en el interior de los cuales, y dependiendo del estado de evolución se puede encontrar desde L1 a L3 (Koie, 1993).

#### 2.2.2.5.-CICLO DE VIDA.

Los adultos de *H. aduncum* habitan en el interior del intestino de muchos peces teleósteos. Las hembras ponen huevos que salen junto con las heces del hospedador al mar. En el interior de los huevos se desarrolla la larva L1 que más tarde evoluciona hasta L2. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que la L2, rodeada aún por el resto excivial, eclosionaba y podía vivir algún tiempo libre en el mar hasta que fuera ingerida por un primer hospedador intermediario como copépodos y otros invertebrados. En ellos mudaría a L3, aunque el resto de la cutícula nunca se ha podido demostrar, y por último el hospedador definitivo ingería los invertebrados con la L3, que mudarían dos veces más para llegar a adultos en el intestino del pez hospedador (Hurst, 1984).

Recientes estudios han demostrado que el ciclo es mucho más complejo, y no como se pensaba. Así, Koie (1993) demuestra que la larva que hay en el interior del huevo está rodeada por dos cutículas, y eclosiona en forma de L3. Los crustáceos son "hospedadores intermediarios" obligados, en donde crecen. Si el parásito alcanza en el crustáceo una talla superior a 3 mm, ya es infectivo para los peces, especialmente predadores como los gádidos, que son los hospedadores definitivos. En el tracto digestivo de estos peces sufre dos mudas más, transformándose en adulto y cerrándose así el ciclo.

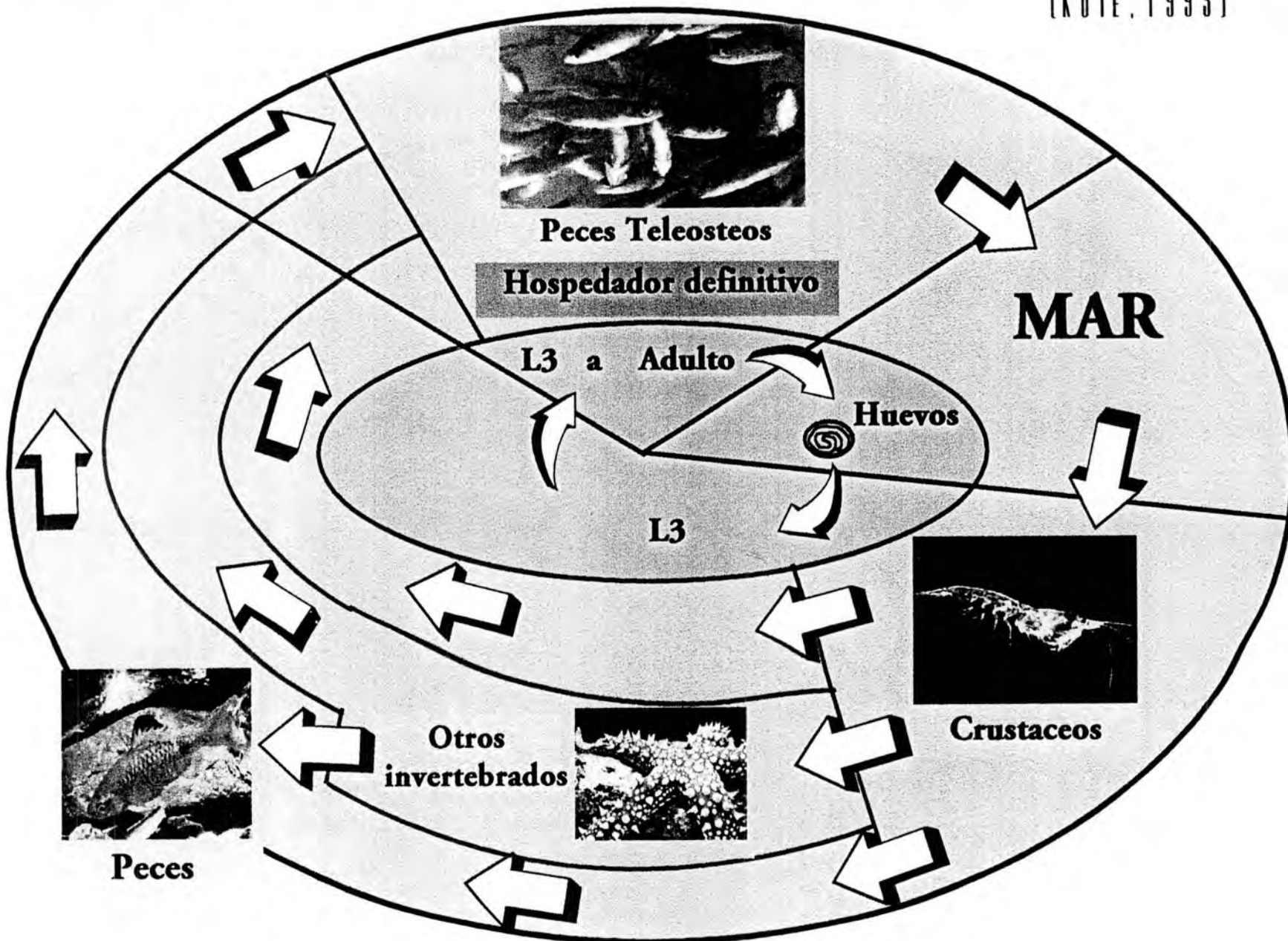
Si por el contrario, el tamaño que alcanza la L3 en el crustáceo es inferior a 1 mm, otro invertebrado puede actuar como segundo "hospedador intermediario", y si en éste tampoco se alcanza la talla de 3 mm, un pez puede actuar como tercer "hospedador intermediario". De esta manera, el número de hospedadores obligatorios en el ciclo de vida del parásito depende tanto de la talla del parásito como de la talla del hospedador.

En cualquier caso, el número de hospedadores invertebrados descritos para *Hysterothylacium* es muy diverso, e incluye unas 100 especies entre las que encontramos artrópodos (copépodos, mísidos, isópodos, anfípodos, eufasiidos, decápodos, cetonátaros), ctenóporos, cnidarios y equinodermos (Marcogliese, 1996).

Sin embargo, Measures y Hong (1995) realizan un estudio sobre la eclosión de huevos *in vitro* de *H. aduncum*, y demuestran mediante microscopía electrónica que la larva que eclosiona del huevo se encuentra en estadio L2. Estos autores argumentan que el estudio de Koie (1993) se realizó con eclosión forzada de los huevos, y es posible que las dos cutículas observadas podrían tratarse de una sola, rota en dos partes por efecto de la presión. Por lo tanto, el ciclo biológico no está aun dilucidado en este punto.

# Ciclo de vida de *Hysterothylacium aduncum*

(KOIE, 1993)



Puesto que las L3 se han encontrado tanto en intestino como en la cavidad corporal de los peces, existe la teoría de que si el tamaño de la L3 no es el adecuado, éstas migran durante un tiempo a la cavidad corporal donde se encapsulan y aumentan de tamaño, para posteriormente regresar a la luz intestinal, lo que apoya la teoría de la autoinfección vía L3 desde la cavidad corporal (Andersen, 1993).

Por otro lado, *H. aduncum* es capaz de cerrar su ciclo biológico en agua dulce, pues diversos estudios han encontrado larvas y adultos en invertebrados y peces de agua dulce. Así, Yoshinaga y col. (1987) demuestran que los huevos fértiles pueden eclosionar en agua dulce, y evolucionar las larvas en mísidos, pudiendo infectar posteriormente a truchas arcoiris (*Salmo gairdneri*).

### 2.2.3.-EPIDEMIOLOGÍA.

*Hysterothylacium aduncum* se encuentra en peces teleósteos de todo el mundo e incluso en peces de agua dulce (Yoshinaga y col., 1987). Como ejemplo de ello, ha sido descrito en salmones procedentes de norte del Atlántico (*Salmo salar*) pero también en cultivos de salmónidos en Chile (González y Carvajal, 1994), y aunque no provoca la muerte del pez, los altera y los hace susceptibles a otros patógenos (Carvajal y González, 1990; Carvajal y col., 1994). La prevalencia de *H. aduncum* ha ido en aumento en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*): datos epidemiológicos realizados en la isla de Quinchao (Chile) demuestran que en 1992, el 56% de salmones coho y el 27% de las truchas arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*) muestreadas estaban parasitadas (González y Carvajal, 1994).

En el espadín (*Sprattus sprattus phalericus*) procedente del Mar Negro han sido descritas tasas de infestación por *H. aduncum* del 100% (Tkachuk, 1996).

*H. aduncum* se ha detectado en 11 especies de pescados procedentes de mercados parisinos, entre los que se encuentran el sábalo (*Alosa finta*), anchoa (*Engraulis encrasicolus*), jurel (*Trachurus trachurus*), merluza (*Merluccius merluccius*), rubio (*Aspitrigal cuculus*), arenque (*Clupea harengus*), caballa (*Scomber scombrus*), merlán (*Merlangus merlangus*), pez roca (*Sebastes sp.*), bacalao (*Gadus morhua morhua*), sardina (*Sardina pilchardus*). De todos ellos, los mayores porcentajes de infestación se encontraron en rubio, pez roca, arenque y jurel (Huang, 1988). Han sido detectados en numerosos peces del Mediterráneo occidental (Petter y Maillard, 1988) como jurel, rubio, merluza y lubina (*Dicentrarchus labrax*), entre otros.

También ha sido encontrado en gran cantidad de arenques (*Clupea harengus*) en el Atlántico Norte, pero preferentemente en peces de menor talla. Se observó que al aumentar la latitud en la que se captura el arenque, también lo hace la tasa de parasitación (Chenoweth y col., 1986).

Andersen (1993) observó que la infestación de los bacalao (*Gadus morhua*) del fiordo de Oslo está ligada a la época del año. Las L3 de *H. aduncum* fueron encontradas con mayor abundancia durante los meses de Enero-Abril.



Koie (1993), realizó un estudio de parasitación en un total de 43 especies de peces, capturados a distintas profundidades de las costas de Islas Feroe. En 36 de esas especies encontró parasitación por *H. aduncum*.

En España, Adroher y col. (1996) realizaron un estudio sobre la parasitación de jurel (*Trachurus trachurus*) por anisákidos, llegando a la conclusión de que existe una gran diferencia de parasitación por *H. aduncum* dependiendo de la procedencia de los pescados. Así, los procedentes del Cantábrico presentan una prevalencia de 82.3%, los del Atlántico 22.0% y los menos parasitados son los del Mediterráneo con 5.6%. La mayor prevalencia se observa en la cavidad corporal de peces con tamaño comprendido entre 29 y 30 cm, y capturados durante Febrero-Marzo y Septiembre-Noviembre. También ha sido descrito en pescados de las costas gallegas en sus distintos estadios larvarios y adultos por Sanmartín y col. (1989 y 1994).

La anisakidosis, hasta ahora venía incluyendo tres variedades dependiendo del parásito causante: anisakiosis (causada por *Anisakis*), pseudoterranovosis (causada por *Pseudoterranova*) y contracaecosis (por *Contracaecum*) (Cheng, 1976). El primer caso de anisakiosis fue aportado por Van Thiel (1960) en Holanda y fue causado por *A. simplex*. Por su parte, el primer caso de pseudoterranovosis fue descrito en los Estados Unidos por Rausch (1967) y fue causado por *P. decipiens*. El primer caso de contracaecosis por *C. osculatum* fue aportado por Shaum y Müller (1967) en Alemania.

La cuestión referente a la posible implicación de *Hysterothylacium* como potencial causante de anisakidosis está bastante discutida. Vermeil y col. (1975) no tuvieron éxito en la infestación de conejos con larvas de *Thynnascaris aduncum*. Huang (1988) realiza ensayos con ratas infestándolas con larvas de *Hysterothylacium* sp., que fueron introducidas en la cavidad peritoneal y buscadas a los 15 minutos por autopsia de las ratas. Los resultados fueron totalmente negativos por lo que según este autor, no pueden ser causantes de infestaciones humanas. Sin embargo, Norris y Overstreet (1976), estudiando los ascáridos de peces del Golfo de México, aíslan cuatro tipos de nematodos del género *Hysterothylacium*, denominándolos como MA, MB, MC y MD según el tamaño del ciego intestinal y apéndice ventricular de cada uno de ellos. Estos autores reconocen al tipo MB como capaz de penetrar rápidamente en la pared del tracto digestivo de ratones, mientras que bajo las mismas condiciones experimentales, las larvas del tipo MA son incapaces de penetrar en tejidos de ratones, como recientemente han confirmado los estudios de González (1998). Petter (1969) y Overstreet y Meyer (1981) lanzan la hipótesis de que *H. aduncum* procedente de sardina (*Sardina pilchardus*) podría ser uno de los causantes de anisakidosis humana. Sin embargo, Yagi y col. (1996) describieron por primera vez un caso de anisakidosis no invasiva por consumo de pescado crudo, causado por un adulto inmaduro de *H. aduncum*.

#### 2.2.4.-ANISAKIDOSIS CAUSADA POR *H. aduncum*.

El único caso de anisakidosis por *H. aduncum* fue descrito por Yagi y col. (1996). Se trató de un paciente japonés de 55 años de edad que visitó el hospital debido a un dolor abdominal crónico acompañado de diarrea. Se encontró un nematodo hembra de 5 cm de longitud que fue evacuado por heces, tras lo cual no se observó ningún síntoma más, y la diarrea desapareció. El paciente había ingerido un mes antes bacalao (*Gadus morhua*) crudo llamado "Tara no kobujime" así como "Ruibe" (rebanadas de salmón -*Salmo salar*- crudo y frío).

#### 2.2.5.-DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

No hay nada descrito acerca del diagnóstico, tratamiento y profilaxis de la anisakidosis causada por *H. aduncum* debido a la falta de casos diagnosticados.

*Antecedentes*

### 3.-ANTECEDENTES.

#### 3.1.-MANTENIMIENTO *IN VITRO*

Para que el mantenimiento *in vitro* de un parásito tenga éxito, es necesario tener en cuenta el medio ambiente natural en el que se desenvuelve, esto es, las condiciones de vida que le ofrece el hospedador (Sommerville, 1970). Así por ejemplo, en la oveja, la transformación del tercer estadio larvario de *Haemonchus contortus* desde la larva infectiva hasta que se establece en su hospedador, se inicia probablemente por estímulos físico-químicos. Esta transformación puede ser igualmente inducida *in vitro* bajo condiciones en las que se reproduzcan ciertas características del hospedador, como el pH, nutrientes, concentración de CO<sub>2</sub> y temperatura (Silverman, 1965; Sommerville, 1966; Mapes, 1969).

De la misma manera, *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum* pueden requerir estímulos semejantes. En este sentido, es interesante la similitud existente entre especies de distintas superfamilias como *Strongyloidea* y *Ascaridoidea*, que parecen emplear estímulos similares para obtener el mismo fin. Los estudios realizados en esta línea, tratan de desglosar el conjunto de estímulos físico-químicos que intervienen en el desarrollo de estos parásitos.

#### 3.1.1.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE ANISÁKIDOS.

##### 3.1.1.1.-ESTUDIOS DE MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Pseudoterranova decipiens*.

En 1960, Rogers y Sommerville (1960) irradiaron con luz ultravioleta el área posterior al poro excretor de *Phocanema decipiens*<sup>(1)</sup> produciéndose, según estos autores, una estimulación del sistema excretor que llevaría consigo una liberación de un "fluido desenvainador". No obstante, esta evidencia fue desestimada por deficiente.

Sin embargo, estos autores han sugerido repetidas veces la existencia de una vinculación entre la recepción de estímulos por parte del hospedador y el sistema endocrino. Esto traería como consecuencia la liberación de un "fluido desenvainador" que intervendría en la ecdisis de los parásitos (Roger, 1962; Roger y Sommerville, 1963). Este "fluido desenvainador" en el caso de *Haemonchus contortus* está compuesto por la enzima leucina aminopeptidasa, y por otro factor termolábil con muchas propiedades en común con la leucina aminopeptidasa, y que es capaz de atacar la cutícula de manera aislada (Rogers, 1970).

La maduración de *Phocanema decipiens* desde L3 fue realizada por Townsley y col. (1963) en un medio de mantenimiento complejo: medio 199 suplementado con extracto de hígado de buey, 10% de extracto de embrión de pollo y 5% de glucosa.

<sup>(1)</sup>*Phocanema* = *Terranova* = *Porrocaecum* = *Pseudoterranova* (Eiras, 1993).

Algo más tarde, Davey (1965) describió la histoquímica y citología de *Phocanema decipiens* mediante el mantenimiento *in vitro*, utilizando para ello el medio descrito por Townsley y col. (1963) a 35°C. En esta experiencia los nematodos formaban una nueva cutícula y mudaban. Sin embargo, en solución de ClNa al 0.9%, la ecdisis estaba inhibida aunque hubo formación de una nueva cutícula.

Davey y Kan (1967, 1968) estudiaron la ecdisis de *Phocanema decipiens in vitro*. Estos autores expusieron la teoría de que la ecdisis está acompañada por un ciclo previo de neurosecreción, mediante el cual se libera una hormona que actúa ejerciendo un control sobre las glándulas secretoras que liberan a su vez el "fluido deservainador". El elemento más importante de este fluido es la enzima leucín aminopeptidasa, que se libera por vía del conducto excretor, al espacio que queda entre las dos cutículas.

Estas observaciones impulsaron a Davey (1971) a proponer que los medios complejos contienen elementos, no presentes en la solución de ClNa al 0.9%, que estimulan la actividad de las células neurosecretoras. La ecdisis podía ser estimulada en ClNa al 0.9% con la adición de hormonas juveniles de insectos (Davey, 1971). El efecto de estas hormonas (farnesil metil-éter y noradrenalina) compromete la redistribución de agua corporal en la larva junto con la activación de células neurosecretoras (Davey, 1995).

Likely y Burt (1989) mantuvieron larvas de tercer estado de *Pseudoterranova decipiens* hasta la madurez sexual, a 35°C, en el medio API-1 (medio complejo), y en una fase gaseosa compuesta por 85% de N<sub>2</sub>; 10% de CO<sub>2</sub>; 5% de O<sub>2</sub>. La temperatura óptima utilizada por diversos autores para el mantenimiento de *P. decipiens* ha oscilado entre 35°C (Davey, 1965; Likely y Burt, 1989) y 37°C (Davey y Kan, 1968).

### 3.1.1.2.-ESTUDIOS DE MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Contracaecum osculatum*.

Likely y Burt (1992), mantuvieron larvas de *Contracaecum osculatum* de tercer estado a 35°C y en el medio API-1 (complejo) suplementado inicialmente con cisteína y a pH 4.5, y suplementado a la semana con hemina bovina, bajo una atmósfera de 85%N<sub>2</sub>; 10%CO<sub>2</sub>; 5%O<sub>2</sub>. En este trabajo obtienen adultos entre los días 37-46 y se hace mención a que en las mismas condiciones *Anisakis simplex* también lo hace entre los días 33-35, aunque no se detallan los resultados.

### 3.1.1.3.-ESTUDIOS DE MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Anisakis* spp.

Varios investigadores han estudiado la morfología y el ciclo de vida de *Anisakis simplex* empleando, para ello, el mantenimiento *in vitro* como herramienta para el desarrollo del parásito, desde que eclosiona del huevo hasta la ovoposición de hembras maduras. En estos estudios se han empleado medios complejos indefinidos con gran variedad de componentes.

Diversos autores han mantenido huevos fértiles de *Anisakis* hasta su eclosión y salida de las incipientes larvas. Van Banning (1971) introduce huevos fértiles de *Anisakis* en agua del mar a 5-7°C determinando su eclosión a los 20-27 días y manteniéndose las larvas móviles por encima de 7 semanas. Hatsushika (1979) comprueba que el medio de mantenimiento más favorable para que los huevos de *A. physeteris* eclosionaran, era el agua de mar a una temperatura de 27°C, tras 6 días de incubación. Estas larvas podían sobrevivir tres semanas más. Según este autor, el agua dulce y la solución fisiológica, aunque promueven la eclosión, no permiten la supervivencia de las larvas.

Bratley y Clark (1992) realizan un estudio con huevos fértiles de *A. simplex* B incubándolos en agua de mar a distintas temperaturas comprendidas entre -0.7 y 24.3°C, y llegan a la conclusión de que a mayor temperatura, el inicio y duración de la eclosión es menor y el número de huevos eclosionados es mayor. Así, el inicio de eclosión puede variar de 3 días a 24°C hasta 74-81 días a 1.9°C, mientras que la duración de la eclosión variaba de 5 días a 24.3°C hasta 55-72 días a 3.8°C. El porcentaje de eclosión varió entre un rango de 30-60%. Por otro lado, las larvas eclosionadas se expusieron durante 5 días a copépodos del género *Tisbe* sp. pero no encontraron ninguno infectado.

Hojgaard (1998) determinó que el tiempo de eclosión (variable en un rango de 3-21 días) es inversamente proporcional a la temperatura de mantenimiento (en un rango experimentado de 5 a 21°C), y que la proporción final de huevos eclosionados aumenta con la salinidad y es mayor a 13°C y menor a 21°C. El tiempo de supervivencia media de las larvas eclosionadas fue de 92-131 días, aumentando con la salinidad pero decreciendo con la temperatura. En el agua dulce, aunque también se produjeron eclosiones, las larvas murieron en pocas horas. A la vez, la exposición de los huevos a la luz, reduce significativamente el tiempo de eclosión, por lo que este autor concluye que *A. simplex* está adaptado a un ambiente marino de tipo pelágico.

La evolución desde L3 hasta la producción de huevos en *A. simplex* fue estudiada en primera instancia por Van Banning (1971), usando como medio de mantenimiento un extracto de hígado digerido a pH 2.0 y suplementado con suero bovino. Al paso de 26-98 días los nematodos alcanzaron el estado adulto con longitudes de 3.5 a 7 cm en los machos, y 4.5 a 15 cm las hembras. Van Banning (1971) concluyó que el rango de temperaturas más apropiado para la maduración de las larvas de *Anisakis* oscilaba entre 34 y 37°C. En el rango de 10-11°C la larva se mostraba inactiva y permanecía en el mismo estado larvario sin evolucionar, y se observaba alta mortalidad a temperaturas de 38°C y superiores.

Yasuraoka y col. (1967) ya observaron que para *Anisakis*, la temperatura de mantenimiento *in vitro* de 25°C inhibía la muda. Por el contrario se producía muda a 33°C, aunque de manera más lenta que a 37°C.

Schulz (1974) realizó experimentos de incubación de larvas de *Anisakis* sp. en un medio complejo, compuesto por extracto de embrión de pollo, extracto de hígado, proteína hidrolizada y suero de cerdo. Utilizó una temperatura de 39°C y una atmósfera del 5% CO<sub>2</sub> en aire. Las primeras L4 se observaban al tercer día de mantenimiento, y un promedio del 50% de las larvas sobrevivían 18 días, pero sus intentos por obtener individuos adultos fueron infructuosos.

Sommerville y Davey (1976), estudiaron diversos factores que podían intervenir en la ecdisis y supervivencia de *Anisakis* sp., como tipo de medio de mantenimiento (Krebs-Ringer, solución de ClNa al 0.9% o medio 199), presión de CO<sub>2</sub> (0%, 5% en aire, ó 40% en aire) e influencia de la temperatura (25.5°C, 33.5°C, 37.5°C, 40.5°C). Si bien el medio 199 pareció ser el más beneficioso para los parásitos, estos autores determinaron que la temperatura óptima de mantenimiento es de 37.5°C, aunque a 35.5°C mudan en igual proporción a L4 pero más lentamente. A 40.5°C mueren en un plazo de 40 horas de incubación.

En lo que se refiere a la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>, Sommerville y Davey comprobaron que la presión de 5% de CO<sub>2</sub> es necesaria y puede actuar como desencadenante de la muda en las primeras 40 horas de mantenimiento.

En la conservación de los parásitos previo al mantenimiento, tanto en el medio Krebs-Ringer como en el medio 199, si se almacenaban a 5°C durante 12 días, por lo general la mitad de los parásitos son inviables para sobrevivir 4 días de posterior incubación.

Por otra parte Sommerville y Davey (1976) estudiaron la alimentación de la L3, llegando a la hipótesis de que no ingerían solución de sal ni de glucosa, ya que su adición al 0,5% al medio Krebs-Ringer no prolongaba la supervivencia. Para ello utilizaron lisamina-rodamina B conjugada con el suero bovino, que da fluorescencia rosa bajo la luz ultravioleta o dorada bajo la luz azul. Cuando los helmintos del 4º estadio larvario eran incubados durante 30 minutos en medio que contenía suero conjugado con rodamina, el fluorocromo era detectado a lo largo del tracto alimentario. En la faringe se detectaba una banda que se extendía dentro del lumen del ventrículo. Sin embargo, los gusanos del tercer estadio que eran elegidos en diversas etapas de desarrollo anteriores al paso a L4, cuando se exponían al medio con fluorocromo, éste era detectado en el recto, apertura del poro excretor, alrededor de la boca, pero nunca en el intestino, ventrículo ni a lo largo de la faringe.

Grabda (1976) realiza el mantenimiento *in vitro* de *A. simplex* a partir de la L3 en un medio complejo compuesto por hígado bovino, 0.2% de pepsina y ClNa al 0.9%, ajustando el pH a 2.0 y la temperatura de incubación de 36-37°C. La muda a L4 se producía entre los días 4º y 7º, y tras 14 días se producía el paso a adulto, pudiéndose observar huevos en el medio de mantenimiento al paso de 4-9 días tras la última muda. Mediante este mantenimiento, Grabda realiza una descripción detallada del tercer y cuarto estadio larvario, así como los adultos de *A. simplex*.

Carvajal y col. (1981) realizaron el mantenimiento de larvas de *Anisakis* procedentes de la "merluza chilena" (*Merluccius gayi*), y basándose en el medio de Townsley y col. (1963), compuesto por un homogeneizado de hígado bovino, sangre humana, ajustado a pH 2.0, y a una temperatura de 34°C, determinaron la morfología de los adultos identificándolos como *A. simplex*.

Iglesias y col. (1997) realizaron diversos mantenimientos *in vitro* con larvas L3 de *A. simplex*. En primer lugar, determinaron que la temperatura más apropiada era de 37°C, de entre las diferentes temperaturas de mantenimiento ensayadas: 23°C, 28°C, 33°C y 37°C, utilizando para ello diferentes medios: RPMI, MTL, LIT+R9, M3, MEM y Grace. A continuación ensayaron, a 37°C, diversos medios semidefinidos: RPMI, RPMIVT, M3M, M3VT y M3VT+RPMI. Las observaciones en cuanto a movilidad, mudas a L4 y supervivencias, fueron más positivas para los medios RPMI y M3M. La influencia del CO<sub>2</sub> en una proporción de 5% fue indispensable para el paso de L3 a L4. Además se demostró que el tamaño inicial de la larva es muy importante para el desarrollo del parásito *in vitro*, pues en los parásitos de tamaño inferior a 12 mm se observó menor supervivencia media y máxima que en los individuos de tamaño superior a 20 mm.

En este trabajo también se juega con el cambio de pH del medio de mantenimiento de 7.2 a 4 y viceversa cuando los parásitos mudaron a L4, observándose que los parámetros de supervivencia media y máxima se incrementan en ambos casos. Por otro lado se hace referencia a una sustancia de color marrón que aparece a modo de capuchón en la cabeza de los parásitos, fenómeno también observado en el mantenimiento *in vitro* de otros nematodos como por ejemplo en el caso de *Strongyloides venezuelensis* (Maruyama y Nawa, 1997).

### 3.1.1.4.-ESTUDIOS COMPARATIVOS DE MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* Y *Contracaecum* sp.

Carvajal y col. (1981) incubaron L3 de anisákidos en el medio descrito por Van Banning (1971), a una temperatura de 34°C. De esas larvas, el 42% y 25% de las L3 de *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* respectivamente, evolucionaron a adultos, utilizando así el mantenimiento *in vitro* como método de identificación de parásitos.

Mercer y col. (1986) realizan un estudio comparativo de la evolución *in vitro* de tres especies de anisákidos: *P. decipiens*, *A. simplex* y *Contracaecum* sp. Emplearon dos medios de mantenimiento (medio 199 y solución de ClNa al 0.9%) en cada uno de los cuales se ensayó con atmósfera de aire, y de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, utilizando siempre 37°C como temperatura de mantenimiento. Para *P. decipiens*, en el medio 199 bajo atmósfera de aire, todos los individuos producían nueva cutícula aunque sólo un 60% experimentaban ecdisis. Bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, todos los individuos producían nueva cutícula y cerca del 90% mudaban. En la solución de ClNa al 0.9% bajo atmósfera de aire, todos los individuos formaban nueva cutícula y mudaban. Bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, todos los individuos formaban nueva cutícula y mudaban cerca del 90%.



Para *A. simplex*, en el medio 199 bajo atmósfera de aire, todos los individuos producían nueva cutícula, pero solo un 70% experimentaban ecdisis. Bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, todos los individuos mudaban. En la solución de ClNa al 0.9% bajo atmósfera de aire, todos los individuos producían nueva cutícula, pero escasamente un 10% experimentaban ecdisis. Bajo atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, todos los individuos formaban nueva cutícula y mudaban un 80%. Para *Contraecum sp.*, en el medio 199 bajo atmósfera de aire, todos los individuos producían nueva cutícula, y mudaban un 70%. Bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, un 70% formaban nueva cutícula y mudaban. En la solución de ClNa al 0.9% bajo aire, todos los individuos formaban nueva cutícula y el 40% mudaban. Pero bajo atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el 70% formaban nueva cutícula y solo el 25% mudaban a L4.

En vista de las similitudes de los ciclos de vida de las tres especies de nematodos, es presumible que el estímulo físico-químico sea similar. Por otra parte, si el estímulo que dispara la evolución en las tres especies está íntimamente ligado, se podría establecer una idea simple, reproducible para la mayoría de sistemas de cultivo de nematodos, o al menos de anisákidos.

### 3.1.1.5.-ESTUDIOS DE MANTENIMIENTO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *Hysterothylacium aduncum*.

El mantenimiento *in vivo* de *Hysterothylacium aduncum* ha sido estudiado por varios autores. Yoshinaga y col. (1987) demuestran que *H. aduncum* puede desarrollarse en agua dulce. De esta manera, los huevos fértiles son capaces de eclosionar en agua dulce, y las larvas pueden infectar al mísido *Neomysis intermedia*. También se demuestra que las L3 pueden infectar a la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), mantenida a 12.5-17.5°C, y evolucionar hasta adultos.

Koie (1993) estudia diversos aspectos del ciclo de vida y morfología de este parásito mediante el mantenimiento *in vivo*, que incluía desde la eclosión de huevos fértiles hasta la obtención de adultos y hembras grávidas. El mantenimiento comenzaba con la extracción de huevos fértiles de hembras grávidas, y tras la incubación durante 5 días en agua de mar a 20°C, eclosionaban. Si la temperatura de incubación era de 5°C, el tiempo hasta la eclosión se prolongaba hasta 2 semanas. El ciclo se cerraba tras la infección de diversos invertebrados (copépodos, mísidos, anfípodos) y finalmente la infección de peces con los invertebrados parasitados. Todos los hospedadores se mantuvieron a una temperatura de 10-12°C.

Balbuena y col. (1998) también han estudiado la eclosión de huevos recolectados de hembras grávidas de *H. aduncum gadi*, y demuestran que pueden eclosionar fácilmente (en solución salina al 2%) a 5°C entre 10-25 días tras la deposición, y que las larvas de tercer estadio pueden infectar a copépodos de la especie *Acartia tonsa*.

El mantenimiento *in vitro* puede facilitar la labor de obtención de los estadios larvarios y adultos en el laboratorio. En este sentido, existen algunos trabajos realizados en nuestro Departamento, sobre el mantenimiento *in vitro* de este parásito. Adroher y col. (1991) emplean dos medios de mantenimiento semidefinidos: RPMI + 20% de suero bovino fetal inactivado por calor y M3, junto con un control de PBS a pH 7.2, y se incubaron a distintas temperaturas: 6, 15, 23, 27 y 37°C.

La temperatura más propicia fue, independientemente del medio empleado, de 15°C. Las mayores supervivencias se encontraron en el medio M3, y además en estas condiciones se notó un ligero retraso en las mudas a L4 y adultos si el mantenimiento se realizaba en presencia hemina. También tuvieron en cuenta la influencia del CO<sub>2</sub>, llegando a la conclusión de que estimula la ecdisis en RPMI, pero no en M3.

### 3.2.-ESTUDIOS DE ELECTROFORESIS.

Según Paggi y col. (1985), los estudios electroforéticos de los diferentes *loci* de nematodos pueden aportar importantes beneficios, así:

- 1.- Se hace posible el estudio de la estructura genética de las poblaciones naturales, y comparar la variabilidad genética utilizando los parámetros adecuados.
- 2.- Se puede evaluar la divergencia genética y la relación filogenética existente entre distintas especies.
- 3.- Detectar especies "gemelas" que a nivel biológico y morfológico resultan iguales.
- 4.- Se pueden identificar especímenes mediante claves bioquímicas, ya sean larvas o adultos.
- 5.- Por último, se pueden detectar fenómenos de hibridación y el significado evolutivo de los mismos.

#### 3.2.1.-*Anisakis simplex*

Han sido varios los estudios electroforéticos realizados con el género *Anisakis*.

Cain y Kaleysa (1980) realizaron el estudio electroforético en gel de poliacrilamida de 18 *loci* sobre 4 géneros de anisákidos: *Anisakis*, *Phocanema*, *Contracaecum* y *Sulcascaris*. El estudio se realizó con larvas individuales, y encontraron que ciertas enzimas presentaban patrones electroforéticos específicos para cada parásito: la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la malato deshidrogenasa (MDH). La ADH presentó dos isoenzimas para cada uno de los 4 géneros, incluso independientemente del hospedador y del lugar geográfico de su captura, mientras que la MDH presentaba para *Anisakis*, *Sulcascaris* y *Phocanema*, una, dos y tres isoenzimas respectivamente.

Un poco más tarde, Paggi y col. (1985) realizan estudios bioquímicos para dilucidar la taxonomía de diferentes nematodos, como *Parascaris equorum*, *Ascaris suum* y el género *Anisakis*. Para éste último género, el mismo grupo de investigadores publicó un año más tarde un estudio más profundo. Así, Nascetti y col. (1986), investigaron electroforéticamente un total de 22 loci para estudiar la variación genética de las especies gemelas *Anisakis simplex* A y *Anisakis simplex* B, morfológicamente iguales, pero de hábitat diferentes: la A procedente del Mediterráneo y la B del Atlántico. De las enzimas estudiadas, la Superóxido dismutasa (SOD), Adenilato kinasa (ADK-2) y Leucin aminopeptidasa (LAP-2), mostraron alelos distintos en *Anisakis simplex* A y *Anisakis simplex* B, por lo que de esta forma se podría realizar una identificación de larvas o adultos mediante este procedimiento. Basándose en este estudio, Nascetti y col. (1986) proponen los nombres de *Anisakis pegreffii* y de *Anisakis simplex* para denominar a *Anisakis simplex* A y *Anisakis simplex* B respectivamente.

Orecchia y col. (1986) estudian la relación existente entre las larvas y adultos del complejo *Anisakis simplex*, en el que se incluyen *A. simplex* A y *A. simplex* B, y por otro lado *Anisakis* tipo II, confirmando que éste último se trata de *A. physeteris*. De las 22 enzimas estudiadas electroforéticamente, 19 son capaces de discriminar entre los dos tipos de larvas. Por su parte, la estructura genética de *A. physeteris* también se estudió en estos 22 loci enzimáticos (Mattiucci y col., 1986), detectándose que 11 de ellos son monomórficos, mientras que los restantes son polimórficos mostrando de 2 a 7 alelos.

Mattiucci y col. (1997) realizaron el análisis de 24 loci de anisákidos del complejo *Anisakis simplex*, aislados de hospedadores intermediarios/paraténicos y definitivos de varias partes del mundo. En este trabajo se pone de manifiesto la presencia de otra posible especie de *Anisakis simplex*, denominado *A. simplex* C, debido a la presencia de alelos diferentes a los de *A. simplex sensu stricto* y *A. pegreffii* en 5 loci determinados. Según estos autores, *A. simplex sensu stricto* se encuentra marcadamente en hospedadores del Atlántico y círculo polar Ártico, y *A. pegreffii* principalmente en el Mediterráneo. *A. simplex* C se encuentra en regiones australes como Sudáfrica y sur de Australia presentando a su vez algunas diferencias genéticas entre las dos poblaciones. Además, se comprueba el aislamiento reproductivo entre *A. simplex* C y las otras dos especies, a pesar de coincidir en los mismos mares e incluso en los mismos hospedadores. *A. simplex* C también ha sido descrito en la región del Pacífico boreal, junto con *A. simplex sensu stricto* entre otros anisákidos, pero siempre como poblaciones reproductivamente aisladas (Paggi y col., 1998).

Recientemente, Paggi y col. (1998) han propuesto una nueva especie de *Anisakis* (*A. ziphidarum*) aislada de ballenas del Mediterráneo y aguas del Sur de África, en base a diferencias morfológicas e isoenzimáticas, que demuestran que se trata de una población reproductivamente aislada de las otras especies de *Anisakis* conocidas.

### 3.2.2.-*Hysterothylacium aduncum*

Los trabajos electroforéticos sobre enzimas de *H. aduncum* son aún escasos. Martín Sánchez y col. (1998) realizaron un estudio electroforético de los loci GPI y PGM de numerosos individuos del género *H. aduncum*, aislados de hospedadores capturados en el mar Cantábrico (*Trachurus trachurus* y *Micromesistius poutassou*) y Mediterráneo andaluz (*Phycis blennoides*). En este trabajo se llegó a la conclusión de que ambas enzimas son polimórficas, a diferencia de la especie *H. auctum* que presenta monomorfismo para la PGM (Szostakowska y Mylak, 1996).

Cuando se relacionaron los loci GPI y PGM de los parásitos aislados de los hospedadores del Cantábrico, no se observaron diferencias concluyentes, sin embargo cuando se relacionaron con los aislados de peces del Mediterráneo se observaron algunas diferencias, lo que podría sugerir la existencia de subespecies dentro del complejo *H. aduncum* (Martín Sánchez y col., 1998).

### 3.2.3.-OTROS ANISÁKIDOS.

Al igual que en el género *Anisakis*, también ha sido estudiada la estructura genética de los demás anisákidos potencialmente patógenos para el hombre: *Pseudoterranova* y *Contracaecum*.

En este sentido es interesante el trabajo realizado por Bullini y col. (1986) en el se analiza electroforéticamente la variabilidad genética de 25 loci, de 17 especies de la superfamilia Ascaridoidea, englobadas en dos grupos: los que necesitan en su ciclo de vida uno o varios hospedadores homeotérmicos, y los que necesitan hospedadores poiquilotermos y homeotermos, entre los que se encuentran *A. simplex* A, *A. simplex* B, *A. physeteris* y varias especies de *Contracaecum*. Estos autores llegan a la conclusión de que en este último grupo, la variabilidad genética es mayor, lo que le permite una mayor adaptación a los más de 100 hospedadores diferentes en los que se ha descrito.

Paggi y col. (1991) estudiaron un total de 1017 "gusanos del bacalao" (*Pseudoterranova decipiens*) recolectados de hospedadores del Atlántico Norte, y mares de Noruega y Barents. Tras el estudio de 16 loci enzimáticos, llegaron a la conclusión de que estaban ante tres especies diferentes, denominadas provisionalmente como *P. decipiens* A, B y C, y que no sólo se diferenciaban a nivel genético, sino también a nivel morfológico y de distribución, así como de preferencia de hospedadores.

En 1994, Orecchia y col.(1994) realizan el estudio de 24 loci enzimáticos sobre un conjunto de larvas y adultos de la especie *Contracaecum osculatum* procedentes del Antártico. Este estudio reveló la coexistencia de dos poblaciones reproductivamente aisladas denominadas provisionalmente *C. osculatum* D y E, que además no se corresponden con ninguna de las tres especies previamente

detectadas por Nascetti y col. (1993) en la región del Atlántico Ártico Boreal (designadas como *C. osculatum* A, B y C). Por lo tanto, *C. osculatum* vendría a englobar un conjunto de 5 especies genéticamente diferentes, y que formarían el complejo *C. osculatum*.

Más tarde, George-Nascimento y Llanos (1995) llegan a la conclusión de que los "gusanos de la foca" (*Pseudoterranova* sp.) que habitan en el Sur-Este del Océano Pacífico, no se corresponden con ninguna de las especies de *Pseudoterranova decipiens* procedentes de los mares del Norte de Europa, descritas por Paggi y col. (1991). Según George-Nascimento y Llanos (1995), es lógico pensar que unos parásitos tan alejados geográficamente, y que parasitan a diferentes hospedadores, presenten características distintas. Por un lado, el diferente número y distribución de papilas caudales en los machos, y por otro, el diferente comportamiento electroforético de un total de 5 loci enzimáticos estudiados.

Mattiucci y col. (1998), han realizado una identificación isoenzimática de los anisákidos *A. simplex*, *C. osculatum* y *P. decipiens*, presentes en las aguas de Japón. Según estos autores, la especie aislada *P. decipiens* está compuesta por dos especies gemelas: la primera se corresponde con *P. decipiens* C, previamente descrita en el Atlántico Norte, y la segunda *P. decipiens* D del Japón. Estas dos especies están genéticamente bien diferenciadas mediante 5 de los 19 loci testados. Además, *P. decipiens* D se corresponde morfológicamente con *Porrocaecum azarasi* por lo que estos autores proponen el nombre de *Pseudoterranova azarasi* para esta especie.

Del mismo modo, *P. decipiens* C presenta la misma morfología y el mismo tipo de hospedadores que *Ascaris bulbosa*, por lo que proponen el nombre de *Pseudoterranova bulbosa* para esta especie. Las especies aisladas de *A. simplex* se correspondieron con *A. simplex sensu stricto*, y las de *C. osculatum* lo hicieron con *C. osculatum* A.

Por último, Paggi y col. (1998) han estudiado los nematodos anisákidos procedentes de la región boreal del Pacífico, encontrando marcadas diferencias genéticas dentro de los tres géneros estudiados: *Anisakis*, *Contracaecum* y *Pseudoterranova*. Mediante el estudio de 24 loci enzimáticos, estos autores han comprobado la existencia de al menos seis especies reproductivamente aisladas: *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex* C, *C. osculatum* A, *P. decipiens* B, *P. bulbosa* y *P. azarasi*.

### 3.3.-ESTUDIOS DE ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE ENZIMAS FIJADORAS DE CO<sub>2</sub>.

El medio ambiente de un parásito es el cuerpo de otro animal, y en ese sentido, los niveles de CO<sub>2</sub> presentes en el entorno juegan un papel muy importante para los helmintos. En muchos de estos parásitos, la fijación de CO<sub>2</sub> está directamente involucrada en el metabolismo de los carbohidratos.

Mientras que en el aire, la presión de  $\text{CO}_2$  es extremadamente baja (0.3 mm Hg), los niveles en tejidos animales son mucho más altos, desde 2-10 mm Hg en la sangre de peces hasta 600 mm Hg en el caso de intestino delgado de mamíferos y aves.

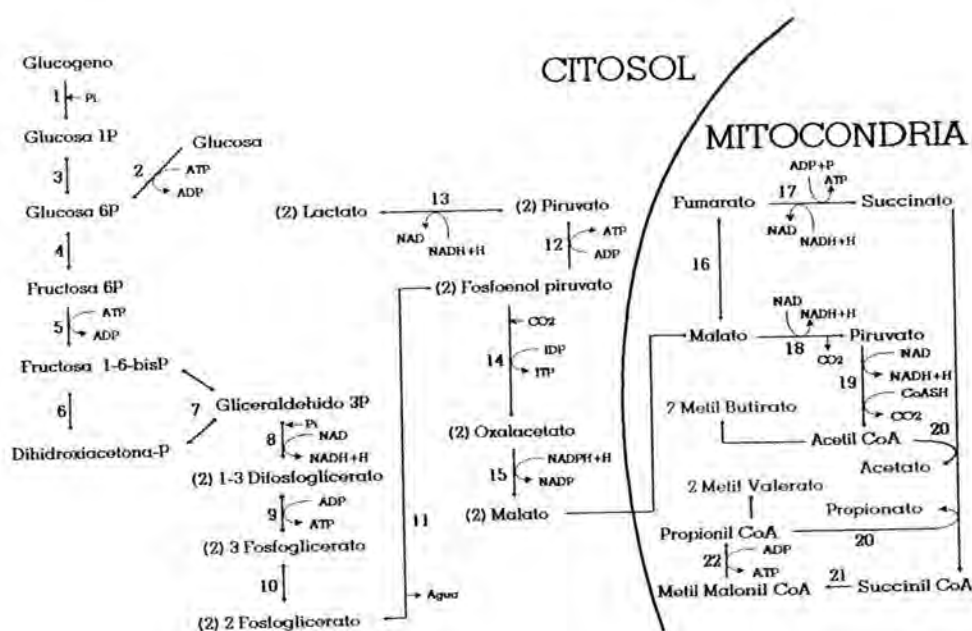
Según Barrett (1981), el metabolismo de los parásitos helmintos difiere de los mamíferos en tres puntos importantes:

- 1.-El número de sustratos que los helmintos pueden catabolizar está limitado, y en la mayoría de las especies, los carbohidratos son la única fuente de energía.
- 2.-El Acetil-CoA no ocupa el mismo papel central que en el metabolismo de los mamíferos. En estos parásitos, el fosfoenol piruvato es la clave metabólica.
- 3.-La degradación de sustratos no se produce completamente hasta  $\text{CO}_2$  y agua, sino que es característico la excreción de productos finales complejos, normalmente ácidos orgánicos.

Los carbohidratos, son posiblemente la única fuente energética para los helmintos, y puede ser almacenada en forma de glucógeno o de trehalosa. Las rutas metabólicas que pueden sufrir los carbohidratos han sido muy bien estudiadas en ascáridos como *Ascaris lumbricoides* (Barrett, 1981). La glucosa, proveniente principalmente del glucógeno, sufre la glucólisis para dar fosfoenol piruvato (PEP). Una vez llegado a este punto, el PEP puede seguir dos rutas:

- 1.-Transformarse mediante la acción de la piruvato kinasa (PK) en piruvato, para derivar en una fermentación y generar lactato. Normalmente los niveles de PK son muy bajos, por lo que el parásito utiliza la segunda ruta alternativa.
- 2.-Mediante la acción de la PEPCK, y con el concurso de IDP y  $\text{CO}_2$  se transforma en oxalacetato, que posteriormente pasa a malato por la acción de la málico deshidrogenasa. El malato entonces entra en la mitocondria en donde sufre una dismutación. Parte del malato se descarboxila hasta piruvato mediante una EM- $\text{NAD}^+$  dependiente (en contraste con los vertebrados, en donde la EM es citoplasmática y  $\text{NADP}^+$  dependiente), obteniéndose equivalentes de reducción.

Por otro lado, el malato está en continuo equilibrio con el fumarato por una enzima fumarasa, y el fumarato se reduce hasta succinato mediante una reductasa. Esta reducción implica una parte de la cadena de citocromos por lo que tiene como resultado la fosforilación de ADP, formándose ATP (Esquema 1).



**Esquema 1.** Metabolismo de los carbohidratos en *Ascaris lumbricoides* (Barrett, 1981). (1) Fosforilasa; (2) Hexokinasa; (3) Fosfoglucomutasa; (4) Glucosa fosfato isomerasa; (5) Fosfofructokinasa; (6) Triosa fosfato isomerasa; (7) Aldolasa; (8) Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; (9) Fosfoglicerato kinasa; (10) Fosfogliceromutasa; (11) Enolasa; (12) Piruvato kinasa; (13) Lactato deshidrogenasa; (14) Fosfoenol piruvato carboxikinasa; (15) Malato deshidrogenasa; (16) Fumarasa; (17) Fumarato reductasa; (18) Enzima málica; (19) Complejo piruvato deshidrogenasa; (20) Acil CoA transferasa; (21) Metil malonil CoA mutasa; (22) Metil malonil CoA decarboxilasa.

Landsperger y Harris (1976) comprobaron en *A. suum* que la EM actúa como reguladora del proceso de dismutación, de manera que según lo que necesite el parásito, poder reductor o ATP, el malato se transforma en piruvato o succinato, respectivamente.

De esta forma, estos nematodos utilizan una parte del ciclo de Krebs (desde succinato hasta oxalacetato), aunque en dirección inversa, por lo que puede ser descrito como un "ciclo de Krebs parcial inverso". Por consiguiente, los primeros productos del catabolismo de los carbohidratos son: piruvato y succinato. Una molécula de propionil-CoA se puede condensar con otra para dar finalmente 2-metil valerato, o bien una molécula de succinato se condensa con otra para dar finalmente 2-metil butirato, que son los principales productos finales de reacción junto con otros ácidos volátiles minoritarios (acetato y propionato).

La principal ruta metabólica de los carbohidratos en estos nematodos implica por tanto, la fijación de CO<sub>2</sub> transformando el PEP en oxalacetato, que posteriormente se reduce a malato.

Los parásitos helmintos pueden dividirse por tanto en dos tipos, los que fijan  $\text{CO}_2$  y disponen de un "ciclo de Krebs parcial inverso" y los que utilizan principalmente la glucólisis. Esta división no es absoluta, pues en realidad se producen las dos rutas, por lo que es más correcto hablar de relación entre PK/PEPCK. En *A. lumbricoides* esta relación es muy baja (0.02), pero se sabe que no hay necesariamente una correlación con el grado de relación filogenética. La relación PK/PEPCK es por tanto diferente entre los helmintos, presentándose estas enzimas como lugares estratégicos de regulación que dependerán del medio en el que se encuentre el parásito.

En todos los helmintos estudiados se ha encontrado la secuencia completa de enzimas presentes en el ciclo de Krebs, sin embargo en parásitos como *A. lumbricoides*, la baja actividad de éstas restringe severamente la capacidad de este ciclo, por lo que no es una ruta importante en el metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, la razón de su funcionamiento podría ser la de proveer de intermediarios que se necesiten en otras rutas, mediante interconversión de esqueletos carbonados (Barrett, 1981).

Pero en la naturaleza, existen al menos 5 enzimas fijadoras de  $\text{CO}_2$ : fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK), enzima málica (EM), fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), piruvato carboxilasa (PC) y fosfoenol piruvato carboxitransfosforilasa (PEPCT).

La PEPCK ha sido una de las enzimas más estudiadas en parásitos, protozoos como *Trypanosoma cruzi* (Cataldi de Flombaum y col., 1977; Cazzulo y col., 1980) y *Crithidia fasciculata* (Cazzulo y col., 1980), en acantocéfalos como *Moniliformis dubius* (Cornish y col., 1981), en cestodos como *Hymenolepis diminuta* (Wilkes y col., 1982) o *Moniezia expansa* (Behm y Bryant, 1974), y en nematodos como *Setaria digitata* (Banu y col., 1991).

La PEPCK de *A. suum* ha sido objeto de varios estudios; Van Der Bossche y Borgers (1973) estudian la distribución subcelular de las enzimas digestivas de este parásito, determinando que la mayor parte de la enzima ( $78.1\% \pm 10.4$ ) se encuentra en el citoplasma, frente a la encontrada en fracción nuclear, fracción mitocondrial pesada y ligera, y fracción microsomal.

Wilkes y col. (1982) purifican la enzima y determinan sus propiedades moleculares así como las condiciones óptimas para la determinación de la actividad enzimática. Más tarde, Rohrer y col. (1986) también hacen lo mismo introduciendo además estudios sobre los estimuladores e inhibidores ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , ATP, ITP, GTP, entre otros) que actúan sobre el proceso enzimático.

Existen numerosos trabajos en los que se determinan la actividad enzimática de la EM en dirección descarboxilante sobre diversos organismos, todos ellos coincidiendo en la necesidad de la presencia de  $\text{NADP}^+$  como cofactor enzimático, que en el transcurso de la reacción se reduciría a NADPH. El método fue descrito por primera vez por Ochoa (1955) utilizando hígado de paloma, y más tarde por Hsu y Lardy (1969) que modifican el procedimiento para optimizarlo.



McKelvey y Fioravanti (1984, 1985) determinan los requerimientos y la actividad de esta enzima en dirección descarboxilante para *Hymenolepis diminuta* llegando a la conclusión de que es necesario la presencia del sistema transhidrogenasa NADPH-NAD<sup>+</sup> para que la EM pueda actuar, al igual que ocurre con la filaria *Setaria digitata* (Unnikrishnan y Raj, 1995). Fioravanti (1982) determina la necesidad de la presencia de NADPH para la actuación de la EM de *Hymenolepis microstoma*, al igual que ocurre en bacterias como *Escherichia coli* (Brow y Cook, 1981) o en protozoos como *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo y col., 1977).

Pero la EM juega también un papel importante en la fijación de CO<sub>2</sub> y en este sentido existen trabajos que hacen referencia a ello; Cataldi de Flombaum y col. (1977) y Cazzulo y col. (1980) determinan la actividad enzimática de la EM en dirección carboxilante para *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia fasciculata*, en el que utilizan NADPH como cofactor enzimático, que se oxidaría a NADP<sup>+</sup>. Sin embargo, en parásitos cercanos filogenéticamente a *Anisakis* e *Hysterothylacium*, como puede ser *Ascaris suum*, se ha determinado que la EM es dependiente de NADH tal y como se ha comentado anteriormente, tanto en sentido carboxilante como descarboxilante, determinándose además el mecanismo cinético de la enzima (Landsperger y col., 1978; Park y col., 1984; Mallick y col., 1991) y su distribución dentro de la mitocondria (Köler y col., 1983). Además juega un papel muy importante en la regulación de la reacción de dismutación intramitocondrial comentada anteriormente (Landsperger y Harris, 1976).

La PEPCK juega por tanto un papel primordial en el metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, la actividad de esta enzima junto con la EM y la LDH, todas ellas características del metabolismo anaerobio, no es constante durante los distintos estados evolutivos del parásito. Vanover-Detling y Komuniecki (1989) determinaron la actividad de estas enzimas en L2, L3, L4, adultos jóvenes y maduros de *A. suum*, de manera que las actividades fueron sustancialmente altas en las L3 (por encima de los niveles de la L2), alcanzando valores próximos a los determinados en adultos. Por el contrario, se encontraron con una importante actividad de enzimas propias del metabolismo aerobio (citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y citocromo oxidasa), sobre todo en las L3 alcanzando el valor máximo en las L4 y disminuyendo dramáticamente en los adultos. Todo eso sugiere que las L3 y L4 poseen enzimas involucradas en el metabolismo aerobio y anaerobio.

Annabaeva y Soprunov (1975) determinan las condiciones óptimas para medir la actividad PEPC en *Ascaris suum* y en *Fasciola hepatica*. Por otro lado, la filaria *Molinema dessetas* también presenta actividad enzimática de la PEPC. Loiseau y col. (1993) la purificaron, midieron su actividad y estudiaron sus inhibidores.

La PC parece poco frecuente en helmintos, y sólo se han detectado niveles de actividad muy bajos en *Moniezia expansa* y *Echinococcus granulosus*, mientras que no ha sido detectada en *Ascaris suum* (Barrett, 1981).

### 3.4.-ESTUDIOS CITOGENÉTICOS.

Los estudios cariológicos (mitosis y meiosis) son de suma importancia pues permiten comprender los mecanismos cromosómicos que han podido intervenir en la diferenciación y evolución de especies. Con el estudio de las mitosis, se puede reconocer la existencia de una aberración en el número de cromosomas o en la morfología, mientras que en el estudio de la meiosis se reconocen los cambios estructurales que sufren los cromosomas. Además, este tipo de estudios permiten, en ocasiones, dilucidar las dudas que aparecen a la hora de encuadrar taxonómicamente especies que se diferencian entre sí en rasgos morfológicos a veces inapreciables. De esta forma, se ha comprobado la sinonimia de especies que inicialmente se creían distintas, como *Ascaris suum* y "*Ascaris ovis*" (Vassilev y Mutafova, 1974).

Diversos estudios citogenéticos en especies del Phylum Nematoda, han aportado información sobre el número de cromosomas, tamaño y variaciones cromosómicas estructurales y numéricas, así como el mecanismo de determinismo del sexo. Walton (1924) estudió la gametogénesis de 36 especies de nematodos. En este trabajo se determinó que el número de cromosomas podía oscilar entre  $n=1$  (para macho y hembra de *Ascaris megaloccephala univalens*) hasta  $n=24$  (para la hembra de *Ascaris lumbricoides*). Más tarde, Walton (1959) presenta una lista con 50 especies de nematodos en donde se recoge el número de cromosomas de cada una de ellas, apreciándose que en más de la mitad, el número se encuentra comprendido entre  $n=5$  y  $n=7$ . En esta lista se recogen tres miembros de la familia Anisakidae: *Contraecum clavatum* ( $n=12$ ), *C. incurvum* ( $n=21$ ) y *C. spiculigerum* ( $n=5$ ), pero no se especifica el sexo de los parásitos.

Como se puede observar en los casos anteriores, el número de cromosomas presentes en una especie no ofrece indicio alguno sobre el grado de afinidad con otra especie. De esta forma, aunque especies próximas pueden tener el mismo número de cromosomas, como las hembras de *Ostertagia circumcincta* y *O. trifurcata* con  $2n=12$  (Valero y col., 1982a), o *Ascaridia galli*, *A. compar* y *A. dissimilis* con  $n=5$  (Mutafova, 1972 y Mutafova, 1975), o bien *Ascaris lumbricoides* y *A. suum* con  $n=24$  (Homedes, 1933), puede ocurrir que especies relacionadas entre sí muestren distinto número de cromosomas, como se ha visto anteriormente en especies de *Contraecum*, o como pasa con *Onchocerca volvulus* ( $2n=8$ ) y *O. gutturosa* ( $2n=10$ ) (Hirai y col., 1985). Por el contrario, especies de distintos géneros pueden presentar igual número de cromosomas, como es el caso de machos y hembras de *Gongylonema pulchrum* y *Heterakis spumosa*, ambos con  $2n=10$  (Valero y col., 1982b, y Valero y col., 1982c).

Los cromosomas sufren profundas modificaciones morfológicas a lo largo del ciclo celular, por lo que la metafase mitótica se considera como la más adecuada para realizar medidas de tamaño cromosómico. Siguiendo este criterio, se ha podido comprobar que los nematodos presentan gran variabilidad en el tamaño de sus cromosomas, pero a menudo son pequeños.

En ciertas especies del género *Dipetalonema*, el tamaño cromosómico apenas alcanza  $3 \mu\text{m}$ , mientras que en *Protostrongylus rufescens* los cromosomas pueden alcanzar  $6 \mu\text{m}$  (Cutillas y col., 1987), llegando a  $12 \mu\text{m}$  en el caso del cromosoma sexual X de *Graphidium strigosum* (Pretel y Valero, 1984).

En ocasiones, a lo largo del ciclo celular se pueden producir variaciones en la estructura de los cromosomas, como son las deleciones, duplicaciones, inversiones y traslocaciones. Aunque hasta ahora no hay referencias respecto a deleciones y duplicaciones en cromosomas de nematodos, Valero y col. (1983a) realizaron un estudio comparativo de los cariotipos de *Trichuris suis* y *T. ovis* en donde se puso de manifiesto la diferente posición del centrómero en el par mayor de cromosomas de ambas especies. Estos autores sugieren como explicación una posible inversión pericéntrica que podría explicar la posición del centrómero, y lo que es más, la posible causa de diferenciación de estas especies en su evolución. También se han sugerido fenómenos de traslocación cromosómica en el estudio de profases meióticas de *Heterakis spumosa* (Valero y col., 1982c).

En otras ocasiones, a lo largo del ciclo celular se pueden producir variaciones cromosómicas numéricas por procesos de fusión y fisión (cambios Robertsonianos), en los que se conserva el material genético. Este proceso parece ser la explicación de la presencia de un isocromosoma sexual X estable en *Graphidium strigosum* (Martínez y Valero, 1984). Además, se puede perder parte del material genético (aneuploidia), o que aparezca una dotación cromosómica múltiple del número básico (poliploidia). Este último caso ha sido detectado en varios nematodos, como en una población triploide de *Meloidogyne hapla* (Janati y Dalmaso, 1981), o en *Bunostomum trigonocephalum* (Valero y col., 1983b).

En algunos representantes del género *Ascaris*, se ha detectado un fenómeno denominado de "eliminación" o "disminución cromosómica". El fenómeno consiste en que en la primera división blastomérica del huevo fecundado, se producen dos células hijas, en una de las cuales, los cromosomas policéntricos, característicos de la línea germinal se rompen en varios fragmentos. Los fragmentos céntricos constituyen el cariotipo de los descendientes de esta célula, en la que los segmentos acrocéntricos se eliminan en la siguiente división mitótica. La otra célula permanece intacta y tras varias mitosis darán un clon celular que constituirá el tejido germinal. Todas las demás células producirán el soma. Este fenómeno ya fue descrito por Boveri (1887) en *Parascaris equorum* (= *Ascaris megalcephala*), y estudiado más profundamente por otros autores (Pasteels, 1948; Serra y Picciochi, 1960). Desde entonces se ha detectado en otros nematodos como por ejemplo *Physaloptera indiana* (Goswami, 1976).

Por último, la presencia de B-cromosomas también se ha descrito en nematodos como *Trichuris ovis* y *T. globulosa* (Goswami, 1978), *Marshallagia marshalli* (Valero y Pretel, 1979), *Haemonchus contortus* (Pretel y col., 1982), y *T. suis* y *T. ovis* (Valero y col., 1983a).

Por otro lado, los estudios cariológicos nos aportan información sobre los mecanismos del determinismo sexual de una especie determinada. Desde que en 1906, Marcus (1906) encontró que en *Ascaris mystax* los espermatozoides poseían un cromosoma menos que los oocitos, el mecanismo XX-XO ha sido puesto de manifiesto en numerosos nematodos, como en diversas especies de *Ascaridia* (Mutafova, 1972 y Mutafova, 1976), diversas especies de *Trichinella* (Mutafova y col., 1980), *Nematodirus abnormalis* y *Graphidium strigosum* (Pretel y Valero, 1984a; Pretel y Valero, 1984b), *Subulura brumpti* y *Dictyocaulus filaria* (Cutillas y col., 1985a; Cutillas y col., 1985b) y *Hexameta* sp. (Mutafova, 1994), entre otros.


Entre los nematodos, también se han descrito numerosas especies con el sistema de determinación sexual XX-XY. Sakaguchi y col. (1980) ponen de manifiesto este sistema en *Dirofilaria immitis*, y más tarde, Valero y col. (1982b) hacen lo propio con *Gongylonema pulchrum*. Como ejemplo de otras especies citaremos a *Brugia pahangi* y *B. malayi* (Sakaguchi y col., 1983), *Trichuris ovis* y *T. globulosa* (Goswami, 1978), *Trichuris muris* (Spakulová y col., 1994), y *B. transfuga* (Mutafova, 1995).

El sistema de cromosomas sexuales múltiples se ha observado en diferentes nematodos. En este sistema, el número de cromosomas determinantes del sexo puede ser variable y oscila entre 6 univalentes en *Ascaris canis* (Walton, 1916), 5 univalentes en *Ascaris suum* y *A. ovis* (Mutafova, 1975), 4 univalentes en *Toxascaris leonina* y 2 univalentes en *Toxocara canis* y *T. cati* (Mutafova, 1995).

El sistema de cromosomas sexuales múltiples con cromosoma Y, se ha puesto también de manifiesto en especies como *Ascaris incurva* (Goodrich, 1914; Goodrich, 1916), *Cylindrocorpus longistoma* (Chin y Taylor, 1969) y *Baylisascaris transfuga* (Mutafova, 1995).

La haplodiploidia del tipo arrenotoquia, es un sistema de reproducción en el que el óvulo aparece a consecuencia de una oogénesis normal, con su correspondiente mitosis, por lo que los óvulos sin fecundar dan lugar exclusivamente a machos, y los óvulos fecundados darán lugar a hembras. De esta forma, los machos tienen la mitad de cromosomas que las hembras. White (1973), afirma que la haplodiploidia puede ser considerada como un sistema genético donde existen cromosomas X, pero no autosomas, y cuyo mecanismo de determinación sexual sería  $X_1 \dots X_n, 0$ . Este mecanismo de determinación se ha observado en de parásitos del Orden Oxyurida, uno de los grupos más antiguos de parásitos nematodos (Adamson, 1984). También se han descrito parásitos haplodiplontes con reproducción del tipo telitoquia, en donde la oogénesis de la hembra no presenta meiosis por lo que todos los descendientes son hembras. Tal es el caso de *Strongyloides papillosus* (Zaffagnini, 1972).

Hasta la fecha, no existen referencias acerca del comportamiento cromosómico y número de cromosomas de *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*, por lo que resulta de mucho interés esclarecer este punto, sobre todo si tenemos en cuenta la reciente descripción de especies gemelas para ambos, basadas en determinaciones isoenzimáticas (en *A. simplex*) o morfológicas (en *H. aduncum*).



*Material y Métodos*

#### 4.-MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1.-MANTENIMIENTO *IN VITRO*.

Cuando se habla de "cultivo", normalmente se interpreta como un procedimiento en el que a partir de un individuo se obtiene otro u otros semejantes. En nuestro caso, a partir de un estado de desarrollo L3, se ha conseguido la transformación a L4 y posteriormente el adulto maduro sexualmente. Sin embargo, nuestro trabajo tampoco se puede considerar como un mero "mantenimiento", pues se han producido cambios evolutivos en el parásito. Teniendo en cuenta estas premisas, en este trabajo se hablará de "mantenimiento", si bien se tienen en cuenta las diferencias existentes entre ambos términos.

##### 4.1.1.-MATERIAL BIOLÓGICO.

Las L3 de *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum* se aislaron de los hospedadores *Micromesistius poutassou* (bacaladilla) y *Trachurus trachurus* (jurel) respectivamente, adquiridos en el Mercado Municipal de Abastos de Granada.

##### 4.1.1.1.-AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PARÁSITOS.

Una vez en el laboratorio, con ayuda de pinzas y tijeras apropiadas, se realizó una disección completa del hospedador siguiendo la línea alba desde el ano, pasando por el abdomen, hasta la cavidad torácica. A continuación se extrajo el tubo digestivo, hígado, gónadas y mesenterio, siendo depositados en una placa Petri con solución salina de ClNa al 0,9% para su examen (Fotos 2, 3, 4 y 5). Mediante un pincel y aguja enmangada se procedió al aislamiento de las larvas de *A. simplex* libres en la placa.

Para *H. aduncum*, se dejó una placa Petri con solución salina de ClNa al 0,9% conteniendo las vísceras durante un intervalo de varios minutos, a una temperatura de 6-8°C. Durante este tiempo las larvas se liberan de las cápsulas que las contienen y se pueden recoger con un pincel. Seguidamente, todos los parásitos se lavaron varias veces con solución salina en una nueva placa Petri, para proceder a su identificación con la ayuda de un microscopio estereoscópico. En los casos que no fue posible la identificación por este procedimiento, se examinaron entre portaobjetos y cubreobjetos con una gota de solución salina al microscopio óptico, pero durante un período de tiempo no muy prolongado para evitar que se dañaran.

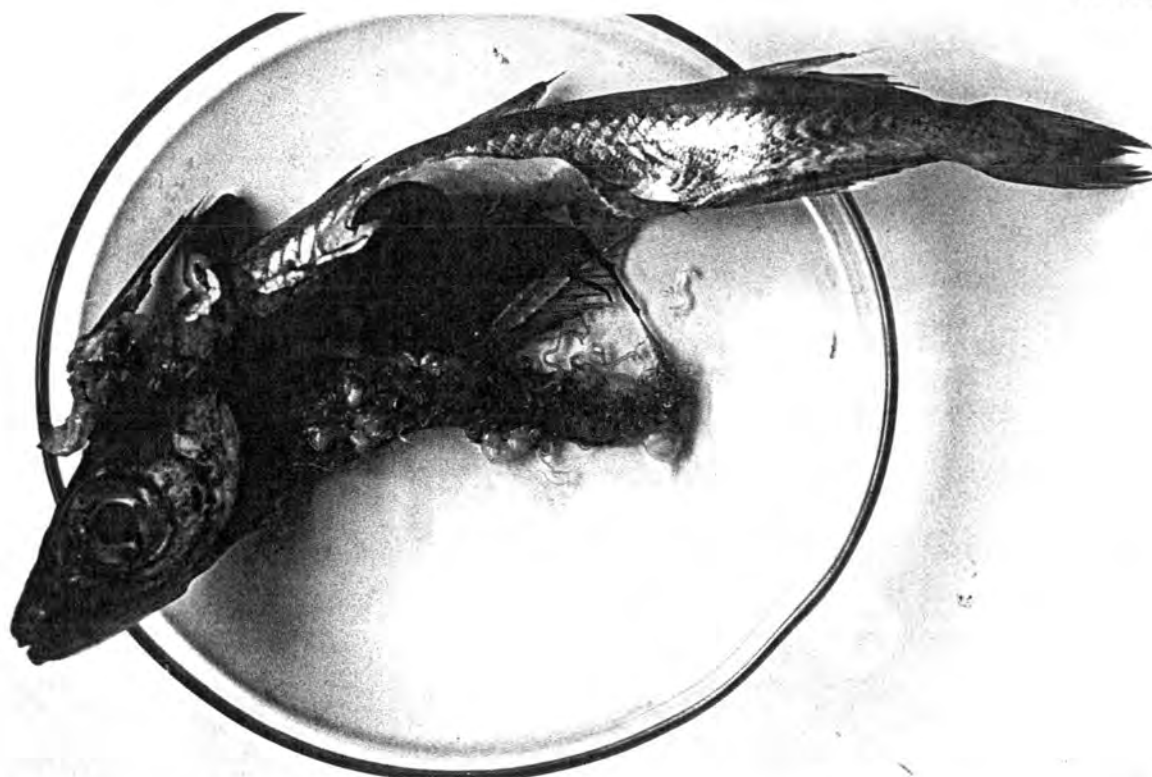


Foto 2. Disección de bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) parasitada por larvas de *Anisakis simplex*.



Foto 3. Detalle de larvas de *A. simplex* encapsuladas y libres en cavidad abdominal de bacaladilla.



Foto 4. Larvas de *Anisakis simplex* encapsuladas en cavidad abdominal de bacaladilla.

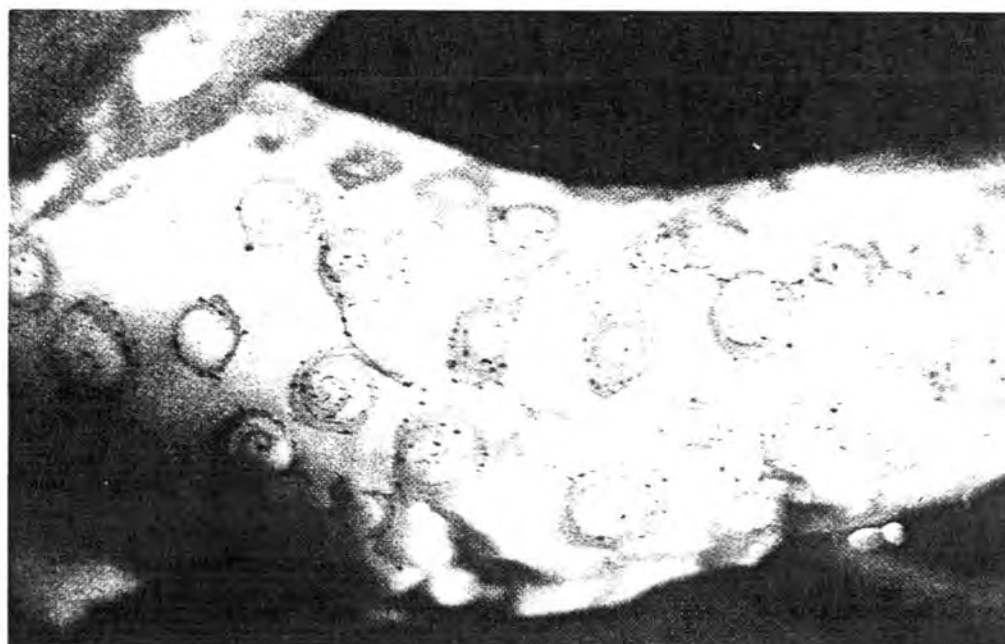


Foto 5. Larvas de *A. simplex* encapsuladas en hígado de bacaladilla.



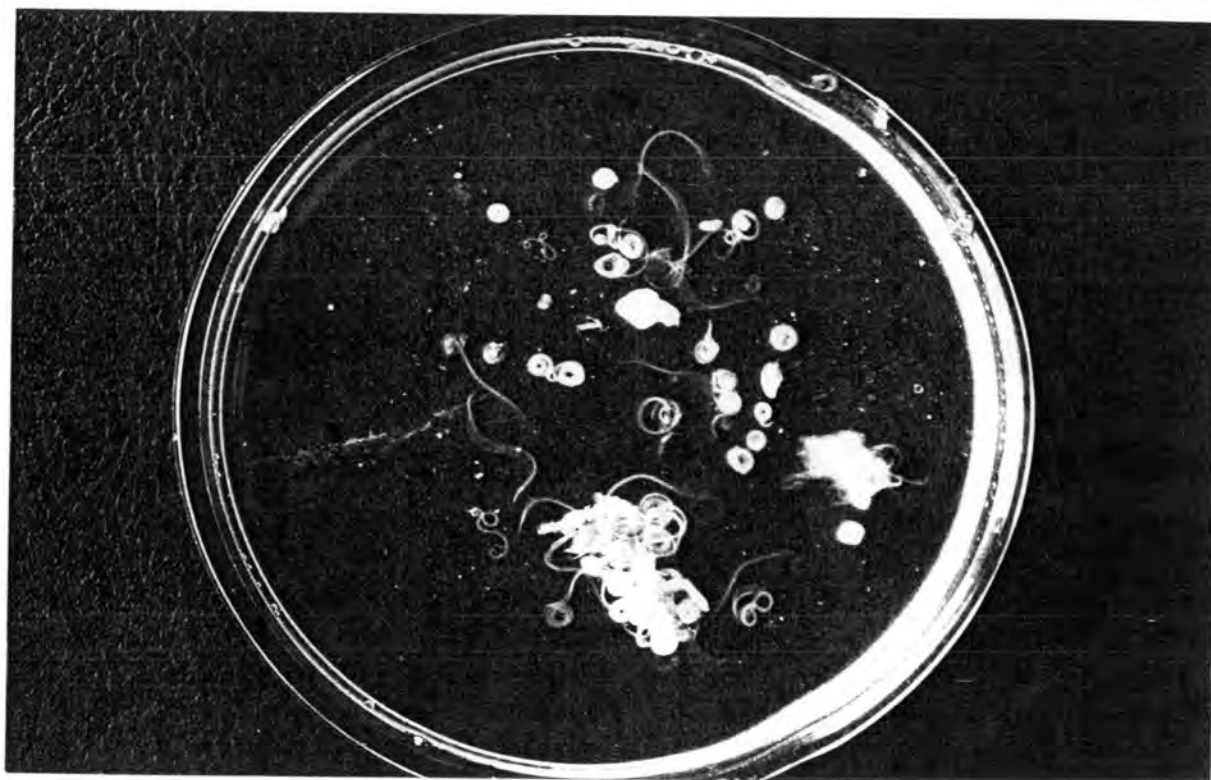


Foto 6. Larvas de *Anisakis simplex* aisladas en una placa Petri.

#### 4.1.2.- MEDIOS DE MANTENIMIENTO EMPLEADOS

Se han ensayado varios medios de mantenimiento definidos y semidefinidos, para establecer las diferencias de comportamiento y evolución *in vitro* de *A. simplex* e *H. aduncum*. A continuación se enumeran los medios, seguidos de la abreviatura empleada para designar a cada uno de ellos.

Los medios utilizados fueron:

1-Solución salina de ClNa al 0,9% (SS).

2-Solución de tampón fosfato sódico, pH 7.3 (PBS).

3-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor (RPMI) ajustado a pHs 2.0, 4.0, 7.2 y 9.

4-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 40% (v/v) inactivado por calor (RPMI + 40%SBFI) ajustado a pH 4.0.

5-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor y 5% (v/v) de sangre de caballo (RPMI + S) ajustado a pHs 2.0, 4.0 y 7.2.

6-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor y 4 mM de glutatión (RPMI+G) ajustado a pH 4.0.

7-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor y 4 mM de L-cisteína. (RPMI+C) ajustado a pH 4.0.

8-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor y adicionado de 1% (p/v) de pepsina (RPMI+P) ajustado a pHs 2.0, 4.0 y 7.2.

9-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 40% (v/v) inactivado por calor y adicionado de 1% (p/v) de pepsina (RPMI+40%SBFI+P) ajustado a pH 4.0.

10-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor y adicionado de 5% (p/v) de pepsina (RPMI+5%P) ajustado a pH 4.0.

11-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor adicionado de 1% (p/v) de pepsina y 4 mM de glutatión (RPMI+P+G) ajustado a pH 4.0.

12-RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 20% (v/v) inactivado por calor adicionado de 1% (p/v) de pepsina y 4 mM de L-cisteína (RPMI+P+C) ajustado a pH 4.0.

#### 4.1.3.-PREPARACIÓN DE MEDIOS DE MANTENIMIENTO.

El medio SS se preparó con agua bidestilada y una proporción de 0.9% (p/v) de cloruro sódico, utilizando un agitador magnético. Se esterilizó mediante autoclave a una presión positiva de 1.2 Kg/cm<sup>2</sup> y 125°C durante 30 minutos.

El medio PBS se preparó:

-ClNa	8.00 g
-PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	1.21 g
-PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.34 g
-H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p. 1000 ml

El pH final de la solución fue de 7.3.

Se agitó y esterilizó mediante autoclave en iguales condiciones que el medio anterior.

El medio RPMI se adquirió en forma de polvo a la casa comercial *BioWhittaker*. Según indica el fabricante, se mezcló por agitación 16.4 g de polvo por cada litro de agua bidestilada. A continuación se le añadió suero bovino fetal que previamente se inactivó por calor (a 56°C durante media hora), en una

proporción del 20% (v/v). Luego se ajustó al pH elegido según la experiencia, y se procedió a la filtración esterilizante mediante equipos de filtración, de plástico adecuado, provistos de filtros de 0.22 micras de diámetro de poro, -previamente esterilizados al autoclave- y bajo presión positiva suministrada por una bomba.

Para esterilizar los medios, se llevan los aparatos de filtración al interior de una cámara de flujo laminar.

Los demás medios de mantenimiento se prepararon tomando como base el RPMI sin esterilizar, añadiéndoles las cantidades de productos correspondientes a cada medio y, por último, realizando la filtración esterilizante.

Si los medios de mantenimiento, una vez preparados, no pueden ser esterilizados por cualquier motivo, se guardan a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Una vez filtrados, los medios de mantenimiento se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 100 ml, contenidas en frascos de vidrio borosilicado previamente esterilizados en autoclave. Para comprobar su esterilidad, se siembran muestras de los medios filtrados en placas de TSA, incubándolas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Pasado este tiempo se extrae con cuidado una gota del medio incubado, y se examina entre porta y cubreobjetos al microscopio óptico. Si se observa presencia de microorganismos se deberá repetir la operación de filtración esterilizante hasta que el control dé negativo.

Los aparatos de filtración, frascos, pipetas, y en general, todo el material destinado para mantenimiento se lavan con detergente apropiado para material destinado a cultivo celular. A continuación se enjuagan minuciosamente con agua destilada y se esterilizan al autoclave.

Los frascos utilizados son de dos tipos: de vidrio borosilicado de alta pureza, con ausencia absoluta de iones pesados, o de plástico, especialmente diseñados y esterilizados por radiación gamma en fábrica.

#### 4.1.4.-SOLUCIÓN ANTIBIÓTICA.

Para la axenización de los parásitos se empleó solución antibiótica (Iglesias y col., 1997) con la siguiente composición (para un volumen de 10 ml):

-Sulfato de gentamicina	80 mg
-Anfotericina B	0.625 mg
-Penicilina G	10000 U.I
-Sulfato de estreptomycinina	10 mg
-Solución de Hank 's	4.5 ml

Una vez preparada se le aplica una filtración esterilizante. Si el volumen es superior a 10 ml, se guarda protegida de la luz en alícuotas de 10 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses; si por el contrario el volumen filtrado es igual o menor se guarda a  $4^{\circ}\text{C}$  protegida de la luz, lista para su uso inmediato o en un intervalo no superior a 10 días.

#### 4.1.5.-AXENIZACIÓN DE LOS PARÁSITOS.

Una vez aislados e identificados los parásitos, deben ser axenizados pues contienen gran cantidad de microorganismos que pueden crecer y multiplicarse en el medio de mantenimiento, afectando directa e indirectamente el normal desarrollo del parásito.

El proceso de axenización se realiza en la cámara de flujo laminar. Para ello se dispone de una batería de pocillos alemanes, previamente enjuagados en alcohol de 70°, y se les añade 2 ml de solución antibiótica en cada uno.

Con la ayuda de una aguja enmangada dispuesta a modo de anzuelo, se deposita en cada pocillo un máximo de 10 parásitos y se deja transcurrir un intervalo de 30 minutos, al cabo de los cuales el parásito está listo para su pase a un medio de mantenimiento estéril (Iglesias y col., 1997).

#### 4.1.6.-PROCEDIMIENTO DE MANTENIMIENTO *IN VITRO*.

La cámara de flujo laminar es uno de los elementos más importantes para que se lleve a buen término, tanto la preparación de los medios de mantenimiento y solución antibiótica, como la puesta en mantenimiento de los parásitos. Por ello es muy importante su limpieza frecuente con alcohol de 70° y en general su mantenimiento en condiciones asépticas.

Es aconsejable que antes de su utilización se limpie con un germicida, o en su defecto con alcohol de 70°, y que permanezca con luz ultravioleta desde una hora antes de comenzar a trabajar.

Además de todo ello, se dispone de un mechero de gas que permanecerá encendido en los momentos de trabajo para asegurar la esterilidad de la atmósfera en la que se trabaja.

El mantenimiento se realiza en una placa estéril de poliestireno de 24 pocillos, con una capacidad máxima de 3 ml cada uno. Se destapa la placa cerca del mechero de manera apropiada para que las condiciones de los pocillos sigan siendo estériles. Igualmente se abre el frasco en el que está contenido el medio de mantenimiento seleccionado y, mediante la ayuda de una jeringa y aguja estériles de un sólo uso, se extrae la alícuota de medio que se va a utilizar y con sumo cuidado se va repartiendo en cantidad de 1 ml ó 2 ml, según la experiencia, en cada pocillo.

Es conveniente, antes de realizar cualquier operación que implique peligro de contaminación, realizar un rápido flameado teniendo en cuenta su resistencia térmica.

Una vez dispuesto el medio en cada uno de los pocillos, mediante una jeringa de insulina, se añaden diez microlitros de solución antibiótica con el objeto de eliminar posibles contaminaciones producidas en el transcurso de las operaciones, o procedentes del parásito. A continuación se deposita un parásito por pocillo con la ayuda de una aguja enmangada a modo de anzuelo, que se conserva en etanol. Después se tapa la placa previo ligero flameado.

Fuera de la cámara de flujo laminar, se procede a la numeración de cada pocillo para la identificación de cada parásito, y el etiquetado de la placa en la que se indica la especie de parásito, código de identificación de la experiencia, medio de mantenimiento empleado y fecha del comienzo del mantenimiento. Concluida esta operación, depositamos la placa en el incubador a la temperatura y atmósfera seleccionadas.

Como consecuencia del consumo de nutrientes por el parásito, así como la aparición de metabolitos, es necesario la renovación del medio de mantenimiento. Se lleva a cabo cada 4 días mediante el procedimiento descrito anteriormente, a excepción del lavado en solución antibiótica, pues si no hay contaminación, no es necesario.

#### 4.1.7.-OBSERVACIÓN DE LOS PARÁSITOS.

Cada parásito se identifica y numera en un cuaderno de notas. Cada 24 horas se observa la movilidad, evolución y estado de desarrollo de cada uno de los parásitos. La observación se realiza con un microscopio invertido a 40 aumentos normalmente, llegándose a 100, 200 e incluso 400 aumentos para ciertos detalles.

#### 4.1.8.-CARACTERÍSTICAS DEL MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Anisakis simplex*.

Todas las experiencias de mantenimiento se iniciaron con larvas L3. En el mantenimiento de *A. simplex*, los parásitos seleccionados no estaban encapsulados sino libres en la cavidad corporal del hospedador, a excepción de aquellas experiencias en las que se compara precisamente la evolución de los parásitos, según se encontraran o no encapsulados en el momento de la disección del hospedador.

El tamaño inicial de la larva fue siempre superior a 1.2 cm de longitud, pues de lo contrario los resultados que se obtienen pueden verse afectados (Iglesias y col., 1997). Teniendo en cuenta el trabajo de Iglesias y col. (1997), el mantenimiento se realizó siempre a una temperatura de 37°C.

Los parásitos que pasaron al cuarto estadio larvario (L4) tras la tercera muda (M3), se identificaron en el mismo pocillo en donde fueron mantenidos por las características morfológicas diferenciadoras con respecto a la L3, como carencia del diente y del mucrón, cutícula con más relieve, labios bien evolucionados, entre otras (Huang y Bussieras, 1988). También podemos identificar los restos de la muda en el fondo del pocillo.

Tanto en estado de L3 como L4, *A. simplex* se puede adherir al fondo del pocillo que lo contiene. Puede ocurrir que un mismo individuo se adhiera al pocillo en varias ocasiones. En cualquier caso, sólo se ha contabilizado la primera vez en la que el parásito se adhiere. En los gráficos se representan con el término "pegados".

El paso a preadulto se detectó por la presencia de restos de la muda (M4) del 4º estadio larvario, así como el desarrollo de los labios y la fuerte estriación de la cutícula.

En los casos en que se observó ovoposición de alguna hembra, en los gráficos se indica el primer día en que se detectó, utilizando el término "Ovoposiciones". A continuación se desarrolla otro gráfico indicando el número de huevos diarios observados hasta el final de la ovoposición, con el término "Nº Huevos-Nº Hembra" en el caso de haber varias hembras ovopositando.

#### 4.1.9.-CARACTERÍSTICAS DEL MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Hysterothylacium aduncum*.

En el mantenimiento de *H. aduncum*, todas las larvas utilizadas se encontraban en tercer estadio larvario (L3). El tamaño inicial de la larva fue siempre superior a 5 mm, y se encontraron libres en cavidad abdominal o intestino del hospedador. El mantenimiento se realizó a 13°C en todas las experiencias.

Los parásitos que pasaron al cuarto estadio larvario (L4) tras la tercera muda (M3), se identificaron en el mismo pocillo en donde fueron cultivados por las características morfológicas diferenciadoras con respecto a la L3, como carencia del diente, mucrón con más espinas, cutícula con algo más de relieve en sus estriaciones, labios más evolucionados, presencia de interlabios entre otras (Petter y Maillard, 1988), así como la presencia de restos de la muda (M3) en el fondo del pocillo.

El paso a preadulto se detectó por la presencia de restos de la muda (M4), por el mayor desarrollo de los labios y una cutícula más estriada.

En los casos en que se observó ovoposición de alguna hembra, en los gráficos se indica el primer día en que se detectó, utilizando el término "Ovoposiciones". A continuación se desarrolla otro gráfico indicando el número de huevos diarios observados hasta el final de la ovoposición, con el término "Nº Huevos-Nº Hembra" en el caso de haber varias hembras ovopositando.

#### 4.1.10.-PARÁMETROS USADOS EN EL SEGUIMIENTO DEL MANTENIMIENTO *IN VITRO*.

Los parámetros elegidos como significativos para comparar la evolución de los parásitos en distintas condiciones de mantenimiento han sido los siguientes:

n = número inicial de individuos.

$S_{av} \pm ES$  = supervivencia media  $\pm$  error estándar de los parásitos, expresados en días.

$S_{50}$  = día a partir del comienzo del mantenimiento, en el que sobreviven la mitad de los individuos.

$S_{max}$  = supervivencia máxima, o día en el que muere el último parásito de una experiencia.

L4=número de parásitos que mudan a L4.

L5=número de parásitos que mudan a L5. El término L5 incluye tanto a preadultos como a adultos, dependiendo del grado de maduración sexual que alcancen.

Sav±ES, L5=supervivencia media±error estándar de la L5, expresado en días.

O=número de hembras que ovopositan.

NHT=número de huevos totales.

#### 4.1.11.-RECuento DE HUEVOS.

En las experiencias en las que se produjo ovoposición de hembras, se realizó un recuento diario de los huevos. Para ello, diariamente, se cambia el parásito a un nuevo pocillo con medio de mantenimiento. El pocillo que queda vacío, se raya -mediante una aguja- por su cara inferior externa en forma de cuadrícula para facilitar el recuento, que se realizó mediante el microscopio invertido. A continuación, los huevos se recogieron con una pipeta Pasteur y se guardaron en un tubo Eppendorf con formol al 10%.

#### 4.1.12.-MEDIDA DE INDIVIDUOS ADULTOS Y HUEVOS. FOTOGRAFÍAS.

Se han realizado medidas de *A. simplex* e *H. aduncum*, tanto machos como hembras (no ovopositoras), eligiendo aquellos individuos que al morir se encontraban en buenas condiciones y con todas sus estructuras visibles. Una vez que se detectó la muerte del parásito, inmediatamente se fijaron con alcohol de 70°, y posteriormente se aclararon con alcohol-glicerina durante el tiempo necesario en cada caso. A continuación se montaron entre porta y cubreobjetos con glicerina como medio de montaje, y se realizaron las medidas.

Los individuos que aparecen en las fotografías se aclararon con lactofenol y azul de algodón durante el tiempo necesario, y se montaron entre porta y cubre con lactofenol como medio de montaje.

En el caso de los huevos, fueron recogidos del pocillo mediante una pipeta Pasteur, lavados y conservados en un frasco con formol al 10%. Finalmente, se montaron entre porta y cubreobjetos, se midieron y fotografiaron.

#### 4.2.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* PARA ESTUDIOS DE ACTIVIDADES DE ENZIMAS FIJADORAS DE CO<sub>2</sub>.

El mantenimiento *in vitro* de *A. simplex* e *H. aduncum* se ha realizado en masa con el medio RPMI+P en frascos de 50 ml de capacidad, en los que se dispuso 20 ml de medio y 20 parásitos. Los mantenimientos en masa para estudios enzimáticos se han realizado para obtener los siguientes estados de desarrollo:

- L3 recién aislado del pez, encapsulada en sus vísceras (no necesita mantenimiento). (L3E).
- L3 recién aislado del pez, libre en cavidad abdominal (no necesita mantenimiento). (L3P).
- L3 de 48 horas de mantenimiento (L348H).
- L4 recién mudadas (L4R).
- L4 de 24 horas de mantenimiento (L424H).
- L4 de 48 horas de mantenimiento (L448H).

Por ello, no ha sido necesario renovar el medio de mantenimiento. *A. simplex* se mantuvo a 37°C e *H. aduncum* a 13°C, ambos en atmósfera húmeda del 5% de CO<sub>2</sub>.

Cada parásito fue examinado al microscopio estereoscópico para verificar su estado de desarrollo. Posteriormente se lavaron con solución salina y se guardaron individualmente en tubos Eppendorf a -80°C hasta el momento de su utilización.

En el caso de los individuos encapsulados, se les liberó previamente de la cápsula bajo el microscopio estereoscópico, en una placa Petri con solución salina al 0.9% y 0°C, con el fin de evitar la reactivación del parásito.

#### 4.3.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* PARA ESTUDIOS ELECTROFORÉTICOS.

El mantenimiento *in vitro* de *A. simplex* e *H. aduncum* se ha realizado en placas de poliestireno con el medio RPMI + P de la manera habitual descrita hasta ahora.

El mantenimiento ha ido encaminado a la obtención de parásitos en distintos estadios de desarrollo:

- L3 recién aislado del pez (no necesita mantenimiento). (L3P).
- L3 de 48 horas de mantenimiento (L348H).
- L4 de 48 horas de mantenimiento (L448H).
- L4 de 12 días (L412D).
- L5 de 48 horas (L548H).
- L5 de 12 días (L512D).

Una vez que los parásitos alcanzan el estadio de desarrollo deseado, se recogen del medio de mantenimiento, se lavan con solución salina al 0.9% y se guardan individualmente en tubos Eppendorf debidamente etiquetados en un congelador a -80°C.



#### 4.4.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* PARA ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS.

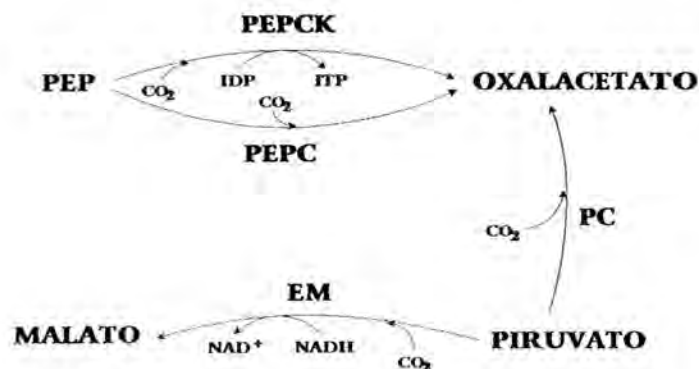
El mantenimiento *in vitro* de *A. simplex* e *H. aduncum* se ha realizado en masa con el medio RPMI+P en frascos de 50 ml de capacidad, en los que se dispuso 20 ml de medio y 20 parásitos. El medio de mantenimiento se renovó cada 4 días. La temperatura de mantenimiento para *A. simplex* fue de 37°C, y para *H. aduncum* de 13°C, ambos en atmósfera de aire+5% de CO<sub>2</sub>. Los parásitos se observaban diariamente bajo el microscopio estereoscópico, de manera que los ejemplares dañados o moribundos se eliminaban, y al paso de 3-4 meses desde el inicio del mantenimiento, se sacaban para proceder al estudio citogenético.

#### 4.5.-ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ENZIMAS FIJADORAS DE CO<sub>2</sub>.

Existen 5 enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> que entran a formar parte del metabolismo de los seres vivos:

- Fosfoenol-piruvato carboxikinasa, PEPCK (EC: 4.1.1.49).
- Enzima málica, EM (EC: 1.1.1.39).
- Fosfoenol-piruvato carboxilasa, PEPC (EC: 4.1.1.31).
- Piruvato carboxilasa, PC (EC: 6.4.1.1).
- Fosfoenol-piruvato carboxitransfosforilasa, PEPCT (EC: 4.1.1.38).

Todas se caracterizan por catalizar reacciones que parten de un sustrato con "n" átomos de carbono, para dar un producto con "n+1" átomos de carbono que se podrá incorporar a otras rutas biosintéticas. En este trabajo se han ensayado las actividades enzimáticas de las 4 primeras, pues la PEPCT sólo está descrita para microorganismos y plantas. Las actividades de estas enzimas en dirección carboxilante se pueden resumir en el siguiente esquema:



#### 4.5.1.-CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS.

Las medidas espectrofotométricas se han realizado a 37°C para *A. simplex* y a 13°C para *H. aduncum*. Para ello se dispuso de un baño termostatzado, conectado al espectrofotómetro, que se puso en marcha 30 minutos antes de realizar las medidas. Por otra parte, las cubetas en donde ya se habían añadido todos los reactivos necesarios (a excepción del reactivo desencadenante de la reacción) para medir una determinada actividad enzimática, se introdujeron durante el tiempo necesario para que el contenido de la misma estuviera a la temperatura elegida.

Antes de introducir las cubetas en el carro del espectrofotómetro, se limpiaron meticulosamente las caras externas con alcohol de 96°. Tras añadir el reactivo desencadenante de la reacción, las cubetas se agitaron para homogeneizar todos los reactivos.

Previamente a la medida de la actividad de cada una de estas enzimas, y para ambos parásitos, se pusieron a punto todas las técnicas. Para ello se realizaron las pruebas pertinentes con el fin de que, en las condiciones de medida, la actividad fuese máxima.

Las actividades enzimáticas se midieron espectrofotométricamente de manera que, para cada enzima y estado de desarrollo del parásito, se hicieron tres extractos independientes. Para la medida de la actividad enzimática siempre se realizó un blanco y un ciego, que se le restó a la actividad. Los resultados obtenidos vienen expresados como la media  $\pm$  error estándar.

#### 4.5.2.-PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

Para medir una actividad enzimática determinada, es necesario previamente hacer un extracto de proteínas de los parásitos. En este estudio se han determinado actividades enzimáticas de 6 estados de desarrollo en *A. simplex* (L3E, L3P, L348H, L4R, L424H y L448H), y de 5 estados de desarrollo en *H. aduncum* (L3P, L348H, L4R, L424H y L448H). La elaboración del extracto fue idéntica, independientemente del estado de desarrollo del parásito y de la actividad enzimática que se pretendía medir.

Los parásitos en sus distintos estados de desarrollo estudiados, se guardaban congelados a -80°C. Es necesario no romper la cadena de frío por lo que en el momento en que se sacaban del congelador, se depositaban en un recipiente con hielo para que su temperatura no fuera superior a 0°C.

Para *A. simplex* se hizo un extracto de 5 individuos, mientras que para *H. aduncum* el extracto fue de 10 individuos (el tamaño de las larvas de *H. aduncum* es menor, por lo que se necesitan más individuos para tener suficiente cantidad de proteínas en el extracto). El extracto se realizó por homogeneización en un tubo Eppendorf con la ayuda de un pistilo de plástico que se adapta perfectamente al mismo.

Mediante este proceso, se rompen los tejidos del parásito pero no las células, por lo que a continuación se somete el extracto a una congelación rápida en nitrógeno líquido (-196°C) seguida de trituración con el potter hasta descongelación para conseguir la ruptura celular.

Una vez conseguido el extracto, se le agrega 500 microlitros de un tampón de Tris-Sacarosa 0.01:0.25M, pH 7.4 (Vargas, 1978). Además, al tampón se le añadió glutation en concentración 0.001M para la protección de los grupos -SH, y 0.001M de EDTA para eliminar en lo posible la presencia de metales divalentes e inhibir proteasas.

Tampón Tris-Sacarosa (10 ml) :

0.0120 g	Tris.
0.8540 g	Sacarosa.
0.0030 g	Glutation.
0.0146 g	EDTA.
10 ml	Agua bidestilada.

Ajustar pH a 7.4 con ClH ó NaOH.

Una vez obtenido el extracto homogeneizado en el tampón Tris-Sacarosa, se agita y se extrae del tubo Eppendorf con la ayuda de una micropipeta depositándolo en tubos de centrifuga previamente refrigerados con hielo, y posteriormente equilibrados se centrifugan a 45.000 g durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada de alta velocidad. A continuación se extrae el sobrenadante con una micropipeta y se deposita en un nuevo tubo Eppendorf refrigerado con hielo picado.

#### 4.5.3.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN EL EXTRACTO

Para saber la cantidad de proteína soluble de la se dispone en el extracto, se realiza el método espectrofotométrico de Lowry y col. (1951).

Reactivos:

Lowry A:	0.2 g Na OH. 1.0 g CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> . 50 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada.
Lowry B:	0.05 g SO <sub>4</sub> Cu·5H <sub>2</sub> O. 0.10 g tartrato sódico. 10 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada.

Lowry C: De preparación extemporánea.  
50 ml de Lowry A.  
1 ml de Lowry B.

Reactivo de Folin comercial, diluido al 50% con agua bidestilada.  
Albúmina, a una concentración de 1 mg/ml.

Método:

Se prepara una curva patrón con 5 muestras de concentración conocida según el siguiente protocolo:

Muestra patrón	Albúmina ( $\mu$ l)	Agua bidestilada ( $\mu$ l)
1	0	200
2	10	190
3	20	180
4	30	170
5	40	160

La muestra tiene un volumen de 0.2 ml.

A continuación se añade a cada muestra 1 ml de Lowry C, se agita y se esperan 15 minutos a temperatura ambiente.

Se añade 0.1 ml de Folin, se agita y se esperan 20 minutos a temperatura ambiente. Por último se mide espectrofotométricamente la absorbancia a 640 nm obteniendo la curva patrón.

Paralelamente se preparan tres muestras duplicadas de cada extracto problema.

Muestra problema	Extracto ( $\mu$ l)	Agua bidestilada ( $\mu$ l)
1	10	190
2	20	180
3	50	150

Las muestras seguirán el mismo tratamiento que las muestras patrón (adición de Lowry C y reactivo de Folin) midiéndose la absorbancia de cada muestra problema a 640 nm. La absorbancia final considerada es la media de la obtenida para cada muestra, y ésta se interpola en la curva patrón para saber la concentración de proteínas.

De esta manera, el extracto del parásito se encuentra preparado para la medida de la actividad enzimática deseada. Si una vez utilizado nos queda extracto, se puede congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  para volverlo a usar en cualquier otra ocasión, teniendo en cuenta el hacer una medida control por si la actividad de la enzima hubiera disminuido en el proceso de congelación-descongelación, o durante el tiempo de almacenamiento.

#### 4.5.4.-DIÁLISIS DE LOS ENZIMAS AUXILIARES.

Para determinar la actividad de un enzima se requiere en ocasiones el concurso de una enzima auxiliar en la mezcla de reacción (en nuestro caso, la PEPCK, PC y PEPC, necesitan de MDH como enzima auxiliar). Esta enzima suele presentarse comercialmente en forma de suspensión en una solución de sulfato amónico de elevada concentración, con lo que se protege el enzima, pero es prácticamente inactivo. Para que el enzima pueda ejercer su función, debe dializarse para eliminar la mayor cantidad de sulfato amónico posible y así permitirle ejercer su función en la mezcla de reacción.

La cantidad de enzima necesitada fue dializada en un tubo de diálisis de 6.3 mm de diámetro en 1 litro de tampón fosfato sódico 0.01M, pH 7.5, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas previas a su utilización.

La enzima, al introducirla en el tubo de diálisis, fue diluida convenientemente con el mismo tampón de fosfatos para facilitar el manejo de los volúmenes. Luego se extrajo y se conservó en hielo hasta su utilización (antes de 24h).

Para la preparación del tampón de fosfato sódico se pesaron las siguientes cantidades:

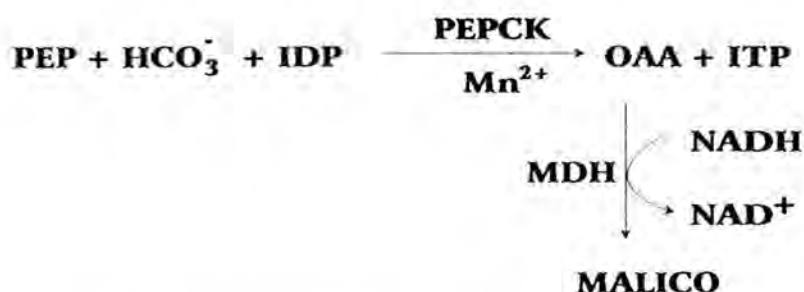
Solución A	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0.688 g/500 ml
Solución B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3.581 g/1000 ml

Una vez recompuestas ambas disoluciones, se va agregando lentamente la solución A sobre la B en continua agitación hasta comprobar que el pH queda en 7.5.

#### 4.5.5.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXIKINASA (PEPCK), EC: 4.1.1.49.

Para la detección de la actividad fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK) se utilizó el procedimiento espectrofotométrico empleado por Vargas (1978) modificado, empleando el sistema málico deshidrogenasa  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  acoplado.

La carboxilación enzimática del fosfoenol piruvato (PEP) se realiza con  $\text{CO}_3\text{HNa}$  utilizando IDP como nucleótido coenzimático y  $\text{SO}_4\text{Mn}$  como cofactor. El oxalacetato (OAA) formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa.



#### 4.5.5.1.-PEPCK en *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*.

##### 4.5.5.1.1.-REACTIVOS.

- Tampón Tris-ClH, 0.1 M, pH 7.4.
- Solución de  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0.03M.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.00025M.
- Solución extemporánea de IDP (sal sódica), 0.03M.
- Málico deshidrogenasa (MDH), como enzima auxiliar, (E.C. 1.1.1.37), c.s.p. 2.5 U.
- Extracto de *Anisakis simplex*, c.s.p. 40  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta.
- Extracto de *Hysterothylacium aduncum*, c.s.p. 25  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016 M, gaseada con  $\text{CO}_2$ .
- Solución extemporánea de fosfoenol piruvato (PEP) (sal sódica, monohidrato), 0.03M.

##### 4.5.5.1.2.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Para un total de 15 cubetas, las cantidades de reactivos utilizadas son las siguientes:

- Tampón Tris-ClH, 0.1 M, pH 7.4: 0.012 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0.003M: 0.05 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.00025M: 0.0045 g/1.5 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de IDP (sal sódica), 0.03M: 0.0165 g/1.125 ml agua bidestilada.
- Extracto de *A. simplex* c.s.p. 40  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Extracto de *H. aduncum* c.s.p. 25  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- MDH, como enzima auxiliar: 40 U.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016M<sup>(1)</sup>: 0.084 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de PEP (sal sódica, monohidrato), 0.03M: 0.0125 g/2 ml agua bidestilada.

<sup>(1)</sup>Una vez preparada la solución de bicarbonato sódico (10 ml), se gasea con  $\text{CO}_2$  a una presión de 0.01 Bares, durante 3 minutos, justo antes de añadirla a la mezcla de reacción.

## 4.5.5.1.3.-TÉCNICA EMPLEADA.

Tomando como modelo el protocolo de Vargas (1978) y adaptándolo a nuestros requerimientos previamente determinados, para *A. simplex* se prepararon las cubetas en este orden:

	BLANCO	CIEGO	MUESTRA
Tampón TRIS-ClH	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml
SO <sub>4</sub> Mn	0.050 ml	0.050 ml	0.050 ml
NADH	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
IDP	0.075 ml	0.075 ml	0.075 ml
MDH	2.5 unidades	2.5 unidades	2.5 unidades
H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p. 1.555 ml	c.s.p. 1.555 ml	c.s.p. 1.555 ml
Extracto	0	40 µg proteína	40 µg proteína
CO <sub>3</sub> HNa gaseado	0.250 ml	0.250 ml	0.250 ml
PEP	0.100 ml	0	0.100 ml
VOLUMEN TOTAL	1.555 ml	1.555 ml	1.555 ml

Tras un breve período de estabilización de la mezcla de reacción en la cubeta, se inicia la reacción por adición de PEP y se sigue espectrofotométricamente a 340 nm y 37°C durante un período aproximado de 6 minutos.

La técnica para *H. aduncum* es la misma, pero de extracto se utilizan 25 µg proteína/cubeta, y la temperatura de medida espectrofotométrica es de 13°C.

El pH final de ambas reacciones es de 6.6.

## 4.5.6.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMA MÁLICA (EM) EN DIRECCIÓN CARBOXILANTE, EC: 1.1.1.39.

Para la detección de la actividad enzima málica (EM) se tuvo en cuenta los trabajos de Park y col., (1984) y Mallick y col., (1991), y se utilizó el procedimiento espectrofotométrico empleado por Cataldi de Flombaum y col. (1977) modificado.

La carboxilación enzimática del ácido málico se realiza con CO<sub>3</sub>HNa utilizando SO<sub>4</sub>Mn como cofactor y en presencia de NADH. La reacción transcurre así:



4.5.6.1.-EM en *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*.

4.4.6.1.1.-REACTIVOS.

- Tampón Tris-ClH, 0.1M, pH 7.4.
- Solución de SO<sub>4</sub>Mn, 0.002M.
- Solución extemporánea de βNADH (sal disódica), 0.00025M.
- Extracto c.s.p. 25 μg proteína/cubeta, tanto en *A. simplex* como en *H. aduncum*.
- Solución extemporánea de CO<sub>3</sub>HNa, 0.016 M gaseada con CO<sub>2</sub>.
- Solución extemporánea de piruvato sódico, 0.008M.

4.5.6.1.2.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Para un total de 15 cubetas, las cantidades son las siguientes:

- Tampón Tris-ClH, pH 7.2, 0.1M: 0.012 g/10 ml.
- Solución de SO<sub>4</sub>Mn, 0.002M: 0.1689 g/50 ml.
- Solución extemporánea de βNADH (sal disódica), 0.00025M: 0.0028 g/1.5 ml.
- Extracto de *A. simplex* c.s.p. 25 μg proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Extracto de *H. aduncum* c.s.p. 25 μg proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Solución extemporánea de CO<sub>3</sub>HNa, 0.016 M<sup>(1)</sup>: 0.084 g/10 ml.
- Solución extemporánea de piruvato sódico, 0.008M: 0.0132 g/1.5 ml.

<sup>(1)</sup>Una vez preparada la solución de bicarbonato sódico (10 ml), se gasea con CO<sub>2</sub> a una presión de 0.01 Bares, durante 3 minutos, justo antes de añadirla a la mezcla de reacción.

4.5.6.1.3.-TÉCNICA EMPLEADA.

Teniendo en cuenta los trabajos de Cataldi de Flombaum (1977), y adaptándolos a nuestros requerimientos previamente determinados, para *A. simplex* se prepararon las cubetas en este orden:



	BLANCO	CIEGOS	MUESTRAS
Tampón TRIS-ClH	0.320 ml	0.320 ml	0.320 ml
SO <sub>4</sub> Mn	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
NADH	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml
Extracto	0	25 µg proteína	25 µg proteína
CO <sub>3</sub> HNa gaseado.	0.160 ml	0.160 ml	0.160 ml
PIRUVATO	0.100 ml	0	0.100 ml
VOLUMEN TOTAL	1 ml	1 ml	1 ml

Tras un breve período de estabilización de la mezcla de reacción en la cubeta, se inicia la reacción por adición de PEP y se sigue espectrofotométricamente a 340 nm y 37°C durante un período aproximado de 6 minutos.

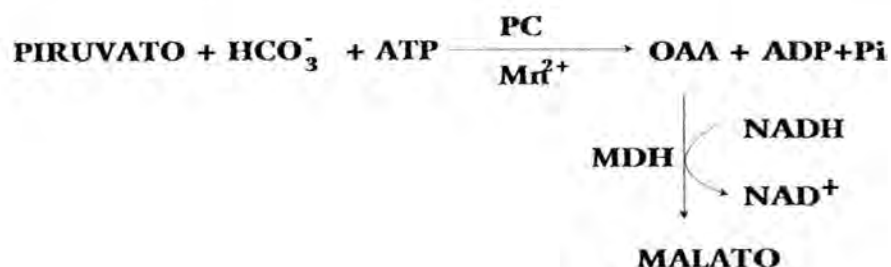
La técnica para *H. aduncum* es la misma, pero la temperatura de medida espectrofotométrica es de 13°C.

El pH final de ambas reacciones es de 6.9.

#### 4.5.7.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD PIRUVATO CARBOXILASA (PC), EC: 6.4.1.1.

Para la detección de la actividad piruvato carboxilasa (PC) se utilizó el procedimiento espectrofotométrico empleado por Cataldi de Flombaum y col. (1977) modificado.

La carboxilación enzimática del piruvato se realiza con CO<sub>3</sub>HNa utilizando ATP como nucleótido coenzimático y SO<sub>4</sub>Mn como cofactor. El OAA formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa. La reacción transcurre así:



#### 4.5.7.1.-PC en *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*.

##### 4.5.7.1.1.-REACTIVOS.

- Tampón Tris-ClH, 0.1M, pH 7.4.
- Solución de  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0.002M.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.0005M.
- Solución extemporánea de ATP (sal disódica), 0.0015M.
- Málico deshidrogenasa (MDH) como enzima auxiliar (E.C. 1.1.1.37), c.s.p.5 U/cubeta.
- Extracto de *A. simplex* c.s.p. 100  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta.
- Extracto de *H. aduncum* c.s.p. 50  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016 M gaseada con  $\text{CO}_2$ .
- Solución extemporánea de piruvato sódico, 0.016M.

##### 4.5.7.1.2.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Para un total de 15 cubetas, las cantidades de reactivos utilizadas son las siguientes:

- Tampón Tris-Cl, 0.1M, pH 7.4: 0.012 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución de  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0.002M: 0.1689 g/50 ml.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.0005M: 0.0057 g/0.75 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de ATP (sal disódica), 0.0015M: 0.0138 g/0.75 ml agua bidestilada.
- MDH, como enzima auxiliar: 75 U.
- Extracto de *A. simplex* c.s.p. 100  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta obtenido según el apartado 4.4.2.
- Extracto de *H. aduncum* c.s.p. 50  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016M<sup>(1)</sup>: 0.084 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de piruvato sódico, 0.016M: 0.026 g/0.75 ml agua bidestilada.

<sup>(1)</sup>Una vez preparada la solución de bicarbonato sódico (10 ml), se gasea con  $\text{CO}_2$  a una presión de 0.01 Bares, durante 3 minutos, justo antes de añadirla a la mezcla de reacción.

##### 4.5.7.1.3.-TÉCNICA EMPLEADA.

Teniendo en cuenta los trabajos de Cataldi de Flombaum (1977), y adaptándolos a nuestros requerimientos previamente determinados, para *A. simplex* se prepararon las cubetas en este orden:

	BLANCO	CIEGOS	MUESTRAS
Tampón TRIS-ClH	0.320 ml	0.320 ml	0.320 ml
SO <sub>4</sub> Mn	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
NADH	0.050 ml	0.050 ml	0.050 ml
ATP	0.050 ml	0.050 ml	0.050 ml
MDH	5 unidades	5 unidades	5 unidades
H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml
Extracto	0	100 µg proteína	100 µg proteína
CO <sub>3</sub> HNa gaseado.	0.160 ml	0.160 ml	0.160 ml
PIRUVATO	0.050 ml	0	0.050 ml
VOLUMEN TOTAL	1 ml	1 ml	1 ml

Tras un breve período de estabilización de la mezcla de reacción en la cubeta, se inicia la reacción por adición de PEP y se sigue espectrofotométricamente a 340 nm y 37°C durante un período aproximado de 6 minutos.

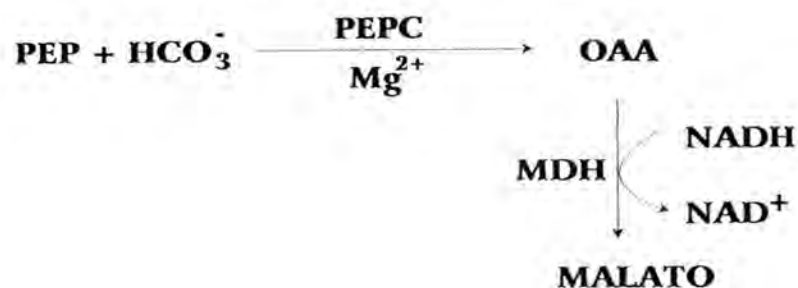
La técnica para *H. aduncum* es la misma, pero de extracto se utilizan 50 µg proteína/cubeta, y la temperatura de medida espectrofotométrica es de 13°C.

El pH final de ambas reacciones es de 6.8.

#### 4.5.8.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXILASA (PEPC), EC: 4.1.1.31.

Para la detección de la actividad fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) se utilizó el procedimiento espectrofotométrico empleado por Cataldi de Flombaum y col. (1977) modificado.

La carboxilación enzimática del piruvato se realiza con CO<sub>3</sub>HNa como nucleótido coenzimático y Cl<sub>2</sub>Mg como cofactor. El OAA formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa. La reacción transcurre así:



#### 4.5.8.1.-PEPC en *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum*.

##### 4.5.8.1.1.-REACTIVOS.

- Tampón Tris-Maleato, 0.1M, pH 6.0.
- Solución de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 0.03M.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.0005M.
- Málico deshidrogenasa (MDH) como enzima auxiliar (E.C. 1.1.1.37), c.s.p.10 U/cubeta.
- Extracto c.s.p. 100  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta, tanto en *A. simplex* como en *H. aduncum*.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016 M gaseada.
- Solución extemporánea de PEP (sal sódica, monohidrato), 0.01M.

##### 4.5.8.1.2.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Para un total de 15 cubetas, las cantidades de reactivos utilizadas son las siguientes:

- Tampón Tris-Maleato, 0.1M, pH 6.0: 0.605 g Tris + 0.58 g Maleato/50 ml agua bidestilada, ajustar pH 6.0 con  $\text{ClH}$  ó  $\text{NaOH}$ .
- Solución de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 0.03M: 0.6 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de  $\beta\text{NADH}$  (sal disódica), 0.0005M: 0.00575 g/1.5 ml agua bidestilada.
- MDH, como enzima auxiliar: 150 U.
- Extracto de *A. simplex* c.s.p. 100  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Extracto de *H. aduncum* c.s.p. 100  $\mu\text{g}$  proteína/cubeta preparado según apartado 4.4.2.
- Solución extemporánea de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0.016M<sup>(1)</sup>: 0.084 g/10 ml agua bidestilada.
- Solución extemporánea de PEP (sal sódica, monohidrato), 0.01 M: 0.0345 g/1.5 ml agua bidestilada.

<sup>(1)</sup>Una vez preparada la solución de bicarbonato sódico (10 ml), se gasea con  $\text{CO}_2$  a una presión de 0.01 Bares, durante 3 minutos, justo antes de añadirla a la mezcla de reacción.

##### 4.5.8.1.3.-TÉCNICA EMPLEADA.

Teniendo en cuenta los trabajos de Cataldi de Flombaum (1977), y adaptándolos a nuestros requerimientos previamente determinados, para *A. simplex* se prepararon las cubetas en este orden:

	BLANCO	CIEGOS	MUESTRAS
Tampón TRIS-Maleato	0.320 ml	0.320 ml	0.320 ml
Cl <sub>2</sub> Mg	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
NADH	0.100 ml	0.100 ml	0.100 ml
MDH	10 unidades	10 unidades	10 unidades
H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml	c.s.p. 1 ml
Extracto	0	100 µg proteína	100 µg proteína
CO <sub>3</sub> HNa gaseado	0.160 ml	0.160 ml	0.160 ml
PEP	0.100 ml	0	0.100 ml
VOLUMEN TOTAL	1 ml	1 ml	1 ml

Tras un breve período de estabilización de la mezcla de reacción en la cubeta, se inicia la reacción por adición de PEP y se sigue espectrofotométricamente a 340 nm y 37°C durante un período aproximado de 6 minutos.

La técnica para *H. aduncum* es la misma, pero la temperatura de medida espectrofotométrica es de 13°C.

El pH final de ambas reacciones es de 5.7.

#### 4.5.9.-RELACIÓN PEPCK Y PEPC

Los reactivos utilizados en la determinación de la actividad específica de la PEPCK son los mismos que en la PEPC, a excepción del IDP necesario para detectar la actividad PEPCK. Por eso, es lógico pensar que la actividad detectada como PEPCK pueda ser la suma de las actividades de ambas enzimas.

Sin embargo, las condiciones de medida de estas enzimas han sido diferentes. Por ello se ha procedido a determinar, en ambos parásitos, la actividad específica de la PEPC en las condiciones de la PEPCK, es decir, utilizando los mismos reactivos y concentraciones que en la PEPCK, pero con ausencia de IDP. La actividad neta PEPCK se calcula restando la actividad PEPC de la actividad experimental PEPCK hallada espectrofotométricamente.

#### 4.5.10.-RELACIÓN ENTRE EM Y PC.

Los reactivos utilizados en la determinación de la actividad específica de la EM, son los mismos que en la PC, a excepción del ATP y MDH necesarios para detectar la actividad PC. Por eso, es lógico pensar que la actividad detectada como PC pueda ser la suma de las actividades de ambas enzimas.

Sin embargo, las condiciones de medida de estas enzimas han sido diferentes. Por ello se ha procedido a determinar, en ambos parásitos, la actividad específica de la EM en las condiciones de la PC, es decir, utilizando los mismos reactivos y concentraciones que en la PC, pero con ausencia de ATP y MDH. La actividad neta de PC se calcula restando la actividad EM de la actividad experimental PC hallada espectrofotométricamente.

#### 4.5.11.-CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA .

El cálculo de la actividad específica de cada una de las enzimas ensayadas se ha hecho aplicando la siguiente fórmula:

$$Ae = \frac{\Delta A/\text{min} \times V \times 1000}{10^{-6} \times 6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol} \times 1 \text{ cm} \times V2 \times P}$$

donde:

$\Delta A/\text{min}$	Incremento de absorbancia por minuto.
V	Volumen final de la mezcla de reacción, en ml.
$6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$	Coefficiente de extinción molar del NADH y NADPH a 340 nm.
V2	Volumen de extracto añadido, en ml.
P	mg de proteína/ml de extracto.

La actividad específica se expresa en nanomoles de sustrato transformado en cada caso<sup>(1)</sup>, por minuto y mg de proteína.

- <sup>(1)</sup>Para la PEPCK, en nanomoles de PEP.  
 Para la EM, en nanomoles de piruvato.  
 Para la PC, en nanomoles de piruvato.  
 Para la PEPC, en nanomoles de PEP.

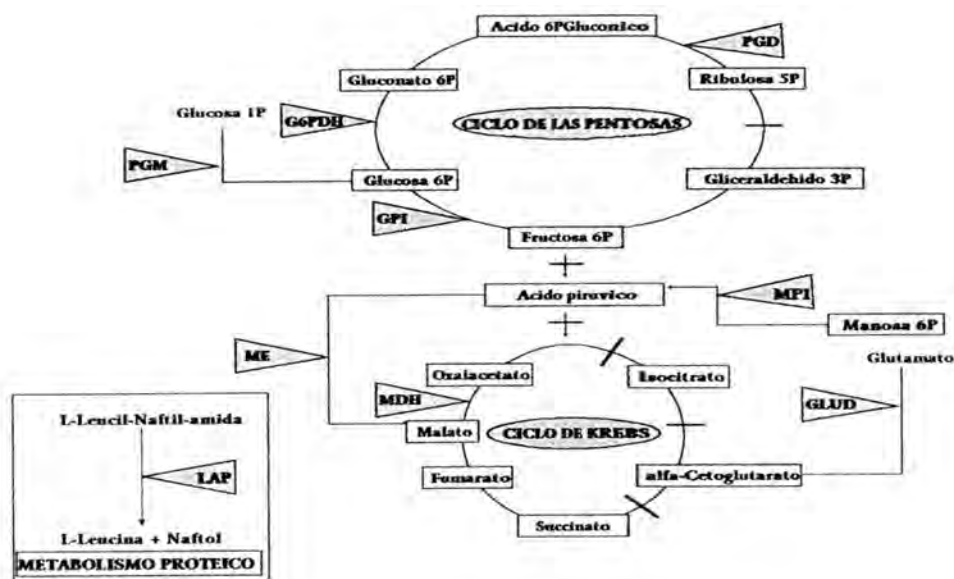
### 4.6.-ELECTROFORESIS

Se han estudiado mediante electroforesis las siguientes enzimas:

Enzima	Nº Código	Estructura <sup>(1)</sup>	Locus	Tampón
Malato deshidrogenasa	EC 1.1.1.82	DÍMERO	MDH	TRIS/Citrato/EDTA
Enzima málica	EC 1.1.1.39	DÍMERO	EM	TRIS/Citrato/EDTA
Glucosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.9	DÍMERO	GPI	TRIS/Maleato
Fosfoglucomutasa	EC 2.7.5.1	MONÓMERO	PGM	TRIS/Maleato
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	EC 1.1.1.49	DÍMERO	G6PDH	TRIS/Maleato
Manosa 6 fosfato isomerasa	EC 5.3.1.8	MONÓMERO	MPi	TRIS/Citrato
6 Fosfogluconato deshidrogenasa	EC 1.1.1.44	DÍMERO	PGD	TRIS/Maleato
Glutamato deshidrogenasa	EC 1.4.1.3	no descrita	GLUDH	TRIS/Citrato
Leucin aminopeptidasa	EC 3.4.11.1	MONÓMERO	LAP	TRIS/Citrato

<sup>(1)</sup> Según Mattiucci y col., (1997).

Todas las enzimas fueron de migración anódica. La integración metabólica de las enzimas estudiadas es la siguiente:



## 4.6.1.-SOLUCIONES TAMPÓN.

En la electroforesis se han utilizado dos tipos de tampones:

- Tampón de gel, que sirve para confeccionar el gel.
- Tampón de electrodos, que sirve para establecer la unión entre electrodos y el gel de almidón.

Las electroforesis se han realizado "en sistema continuo", pues el tampón de gel y de electrodos ha sido el mismo, aunque éste último más concentrado, a diferencia de los sistemas discontinuos que tienen tampones con composiciones diferentes.

Se han utilizado 3 soluciones tampón diferentes:

- Tampón Tris-Maleato (TM), pH 7.4
- Tampón Tris-Citrato (TC), pH 8.6
- Tampón Tris-Citrato-EDTA (TCE), pH 9.5

Con estos tampones se han estudiado las siguientes enzimas:

TAMPÓN DE GEL	ENZIMAS
TM 7.4	G6PDH, GPI, PGM, PGD
TC 8.6 y NADP <sup>+</sup>	LAP, MPI, GLUDH
TCE 9.5	MDH, EM

## 4.6.1.1.-PREPARACIÓN DE LOS TAMPONES:

Las soluciones tampón pueden ser preparadas y conservadas en refrigeración durante varias semanas.

## TAMPÓN TRIS-MALEATO (TM), pH 7.4:

*Tampón de electrodos:*

TRIS	60.5 g.
ÁCIDO MALEICO	58.0 g.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.0 g.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	5 litros.
Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH ó ClH.	

*Tampón del gel:*

TAMPÓN DE ELECTRODOS TM, pH 7.4	40 ml.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	400 ml.
Se ajusta el pH.	



## TAMPÓN TRIS-CITRATO (TC), pH 8.6.

*Tampón de electrodos:*

TRIS	400 g.
ÁCIDO CÍTRICO	87 g.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	5 litros.
Se ajusta el pH a 8.3 con ácido cítrico ó NaOH.	

*Tampón del gel:*

$\beta$ NADP <sup>+</sup> (sal sódica) en agua destilada	4.0 ml.
TAMPÓN DE ELECTRODOS TC, pH 8.6	18.7 ml.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	400.0 ml.
Se ajusta el pH.	

## TAMPÓN TRIS-CITRATO-EDTA (TCE), pH 9.5.

*Tampón de electrodos:*

TRIS	96.9 g.
ÁCIDO CÍTRICO	40.0 g.
EDTA	14.64 g.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	5 litros.
Se ajusta el pH a 9.5 con ácido cítrico ó NaOH.	

*Tampón del gel:*

TAMPÓN DE ELECTRODOS TCE, pH 9.5	80 ml.
AGUA DESTILADA, c.s.p.	400 ml.
Se ajusta el pH.	

## 4.6.2.- PREPARACIÓN DE GELES DE ALMIDÓN.

En la electroforesis se ha utilizado como soporte el gel de almidón, en detrimento de la poliacrilamida y otros soportes (acetato de celulosa, agarosa), ya que presenta numerosas ventajas: es más barato, no es tóxico, no necesita aparataje complicado y da muy buenos resultados (Pasteur y col., 1987).

El gel de almidón se prepara en un erlenmeyer en cantidad suficiente, con una mezcla de almidón al 10% y el tampón de gel correspondiente. La mezcla se calienta en un mechero de gas con agitación continua, y cuando cambia de consistencia se sigue calentando durante medio minuto más con agitación enérgica. A continuación se desgasifica mediante vacío con una trompa de agua y se vierte la mezcla en un molde horizontal de dimensiones 20 cm x 18 cm x 1 cm. Por último se coloca con cuidado una placa de vidrio sobre el molde.

Al enfriarse la mezcla, el almidón se polimeriza adquiriendo estructura de gel. Se puede conservar durante algunas horas protegiéndolo con un film de plástico para que no pierda humedad.

#### 4.6.3.-PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Los parásitos se recolectaron e identificaron del hospedador o del medio de mantenimiento, y se lavaron en solución salina estéril. A continuación se introdujeron de uno en uno en tubos Eppendorf bien rotulados y se congelaron rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Los extractos proteicos se prepararon de dos formas:

- A partir de un sólo gusano.
- A partir de un grupo de 5 gusanos, en los casos en los que no se detectó ninguna banda para una determinada enzima.

La preparación de los extractos proteicos se hizo momentos antes de la electroforesis, según la técnica de Martín Sánchez y col. (1994). Una vez seleccionados los parásitos con los que se va a ensayar, se sacan del congelador y se sitúan los tubos Eppendorf que los contienen en una gradilla refrigerada sobre un acumulador de frío. En el mismo tubo, mediante un pistilo de plástico, se homogenizan el/los parásitos rompiendo los tejidos del parásito. Para la ruptura celular, se somete el homogeneizado a una congelación rápida en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) seguida de trituración con el potter hasta descongelación.

A continuación, en cada tubo se añade  $40\ \mu\text{l}$  de una solución de Tritón X-100 al 5% en agua destilada, se homogeniza y se rotula el tipo de parásito así como el estado de desarrollo, especificando si el extracto está compuesto por un parásito o por un grupo de 5 parásitos.

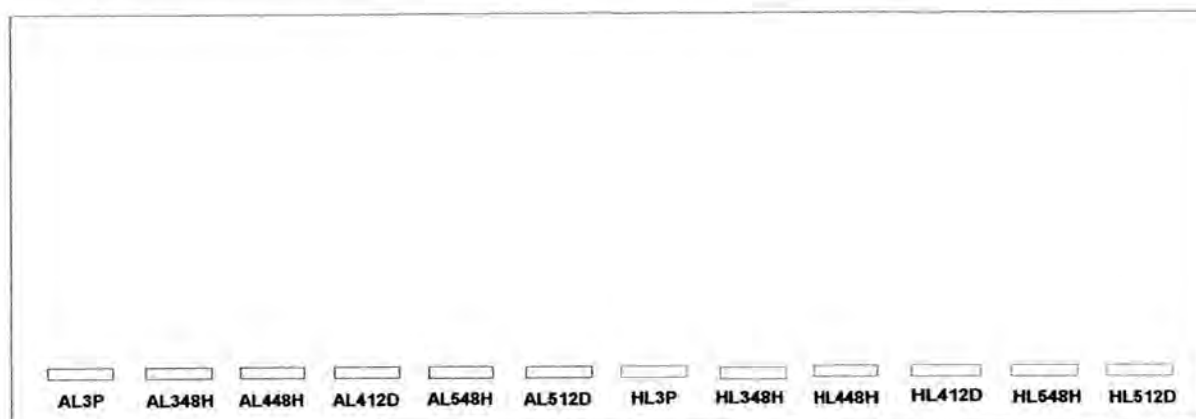
Por último, se realiza una centrifugación refrigerada ( $4^{\circ}\text{C}$ ) a 4000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante es el extracto proteico utilizado, que se recupera con una micropipeta y se introduce en nuevos tubos Eppendorf, rotulados y ordenados, en una gradilla refrigerada sobre un acumulador de frío.

#### 4.6.4.-INTRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS EN EL GEL

En primer lugar se humedecen los dientes de un peine de electroforesis con una solución al 0.5% de azul de bromofenol en agua destilada, y se introduce en el gel excavando 12 ranuras verticales. El azul de bromofenol actúa como indicador del frente de migración.

Mediante unas pinzas, tomamos un rectángulo de papel Watman (dimensiones  $0.9\ \text{cm} \times 1\ \text{cm}$ ) y lo impregnamos en el sobrenadante que resulta de la centrifugación, introduciéndolo en una de las ranuras del gel. Así se hace con cada uno de los extractos a lo largo de las 12 excavaciones, teniendo siempre cuidado en la identificación del extracto que introducimos en cada ranura. A cada ranura excavada en el gel se le asignó siempre el mismo tipo de extracto.

En el siguiente esquema se representa un gel de electroforesis con las 12 ranuras excavadas, y el tipo de extracto que se le asignó a cada una de ellas.



En las ranuras de color azul se introducen los extractos de *A. simplex* según el orden:

AL3P	Larva L3 recién aislada del pez.
AL348H	Larva L3 de 48 horas de mantenimiento.
AL448H	Larva L4 de 48 horas de mantenimiento, post muda M3.
AL412D	Larva L4 de 12 días de mantenimiento, post muda M3.
AL548H	Adulto de 48 horas de mantenimiento, post muda M4.
AL512D	Adulto de 12 días de mantenimiento, post muda M4.

En las ranuras de color rojo se introducen los extractos de *H. aduncum* según el orden:

HL3P	Larva L3 recién aislada del pez.
HL348H	Larva L3 de 48 horas de mantenimiento.
HL448H	Larva L4 de 48 horas de mantenimiento, post muda M3.
HL412D	Larva L4 de 12 días de mantenimiento, post muda M3.
HL548H	Adulto de 48 horas de mantenimiento, post muda M4.
HL512D	Adulto de 12 días de mantenimiento, post muda M4.

Por último, cada molde se etiqueta con un número de gel inscrito en la ficha de electroforesis.

Todas las electroforesis realizadas se anotaron en un bloc de notas con las siguientes características: sistema tampón, numeración de los pocillos y correspondencias, revelados que se realizarán, voltaje, amperaje, y potencia.

## 4.6.5.-MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA

Una vez preparado el molde del gel con los extractos correspondientes, se llena la cubeta de electroforesis con el tampón de electrodos y se coloca el molde sobre la cubeta teniendo en cuenta que los extractos queden próximos al cátodo. A continuación, mediante las esponjas, establecemos un puente de unión entre el tampón de electrodos y el gel, y se coloca una placa de cristal, para asegurar el contacto sobre la que colocamos un acumulador de frío.

La cubeta así dispuesta se introduce en un frigorífico donde tendrá lugar la migración. El proceso comenzará cuando unamos los electrodos al generador, previo ajuste del voltaje y la intensidad. El producto del voltaje (en V) por la intensidad (en mA) no superará nunca 10.000 (10 W).

Las condiciones en las que se produce la migración electroforética (anódica) se resumen en la siguiente tabla:

TAMPÓN	ENZIMA	V	mA	W	TIEMPO
TM 7.4	G6PDH GPI PGM PGD	75	65-70	6	6 horas
TC 8.6	LAP MPi GLUDH	80-90	50-60	4-6	5 horas
TCE 9.5	MDH EM	-	110	-	5-8 horas

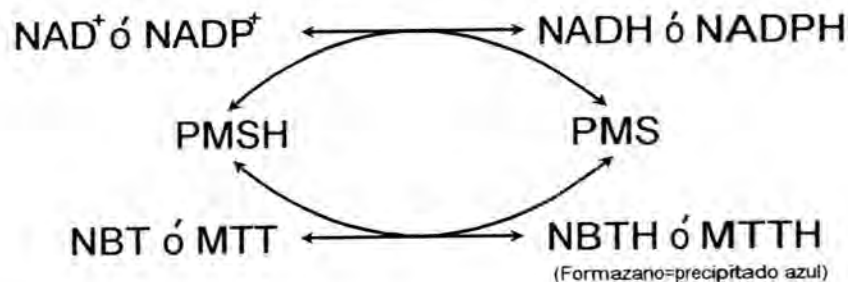
## 4.6.6.-PREPARACIÓN DE LOS GELES PARA EL REVELADO ENZIMÁTICO.

Cuando observemos que el frente de azul de bromofenol ha migrado lo suficiente, se cortará la corriente continua y se extraerá el gel del molde. Quitamos los rectángulos de papel Watman y ponemos el gel sobre una placa para cortar geles. Con la ayuda de un cortageles separamos hasta un total de 4 láminas de 2 mm de espesor, y se transporta cada una de ellas a una cubeta en donde se realizará el revelado. En cada cubeta se añadirá la solución de revelado correspondiente a la enzima que queramos revelar, rotulando debidamente cada cubeta.

#### 4.6.7.-PRINCIPIO DEL REVELADO ENZIMÁTICO

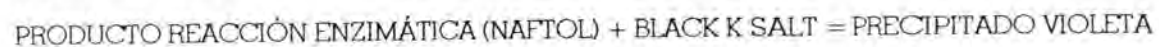
Una vez que las enzimas han migrado, es necesario hacerlas visibles en el gel mediante una reacción enzimática que transcurre en presencia de los coenzimas e iones necesarios en cada caso. Pero es necesario que, al menos uno de los componentes de esa reacción, sea coloreado para poner de manifiesto el lugar en donde transcurre la reacción, y por lo tanto el lugar donde ha migrado la enzima. A esto se le llama revelado enzimático.

Para revelar las actividades enzimáticas se ha utilizado el "sistema tetrazolio" compuesto por NBT (nitro azul de tetrazolio) ó MTT (metil-tiazolil tetrazolio), y PMS (metosulfato de fenacina). En cada reacción enzimática entran en juego el  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  de tal forma que se acopla el sistema tetrazolio para dar compuestos coloreados de la siguiente forma:



Pero esta reacción sólo puede ser usada si el enzima utiliza  $\text{NAD}^+$  ó  $\text{NADP}^+$  como aceptor de un átomo de hidrógeno del substrato, como es el caso de las enzimas MDH, EM, PGD, G6PDH y GLUDH. También puede ocurrir que se deshidrogene el producto de la reacción usando una segunda enzima que utiliza esos coenzimas, como es el caso de la PGM, MPi y GPI.

En el caso de la LAP se utiliza una sal de diazonio cuya reacción general transcurre así:



##### 4.6.7.1.-PROTOSCOLOS DE REVELADO.

Los protocolos de revelado comprenden tres etapas:

1º-Una primera en la que se mezclan reactivos de preparación no extemporánea y que pueden ser conservados en el frigorífico a  $4^\circ\text{C}$  durante horas, lo que facilita el trabajo. Sigue un período de incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

2º-En la segunda etapa se mezcla con una solución de agar (excepto en el caso de la LAP que no se necesita agar) que se mantiene a  $40^\circ\text{C}$  en el baño María y se agrega a la lámina de gel dispuesta en la cubeta.

A continuación se incuba la cubeta a 37°C, o en el frigorífico a 4°C en el caso de la GPI, hasta que la coloración sea lo suficientemente clara, momento en el que se detiene la coloración con una solución de fijación.

3°-La tercera etapa es el proceso de fijación que se prolongará durante 10-12 horas a 4°C. Para ello se emplea una solución compuesta por:

-Alcohol de 96°	1 litro.
-Ácido acético	400 ml.
-Glicerina	200 ml.
-Agua destilada	400 ml.

Pasado este tiempo, ya se puede proceder a lavar los geles bajo el grifo para retirar los restos de agar, se seca y se interpretan los resultados de movilidad electroforética observados, anotándose en un bloc de notas mediante los esquemas oportunos.

El gel puede sellarse con plástico y conservarse en refrigeración durante mucho tiempo, incluso años si son congelados.

A continuación se presentan los protocolos utilizados para el revelado de cada enzima.

#### MDH, EC: 1.1.1.82

Tampón TRIS-ClH (0.2 M), pH 8.0	8 ml.
<sup>(1)</sup> Solución A	5 ml.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
βNADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.
Se incuba a 37°C durante 30 minutos.	
PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml.
Se revela a 37°C.	

Se añade la solución de fijación.

<sup>(1)</sup>Solución A: se disuelve 3.1 g de NaCO<sub>3</sub> anhidro en 15 ml de agua destilada. Después de la disolución, se pone en un baño de hielo para añadirle lentamente 3.35 g de ácido L-málico. Después se añade agua destilada hasta completar 10 ml, y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

EM, EC: 1.1.1.39

Tampón TRIS-ClH (0.2 M), pH 8.0	8 ml.
<sup>(1)</sup> Solución A	5 ml.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
βNAD <sup>+</sup> al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.
Se incuba a 37°C durante 30 minutos.	
PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml.

Se revela a 37°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(1)</sup>Solución A: se disuelve 3.1 g de NaCO<sub>3</sub> anhidro en 15 ml de agua destilada. Después de la disolución, se pone en un baño de hielo para añadirle lentamente 3.35 g de ácido L-málico. Después se añade agua destilada hasta completar 10 ml, y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

GPI, EC: 5.3.1.9

Tampón TRIS-ClH (0.2 M), pH 8.0	10 ml.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
βNADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	0.5 ml.
βNAD <sup>+</sup> al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.
Fructosa 6 fosfato, sal dipotásica	30 mg.
Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se le añade:	
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	50 μl.
PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml.

Se revela a 4°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

PGM, EC: 2.7.5.1

Tampón TRIS-ClH (0.2 M), pH 8.0	10 ml.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
βNADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	0.5 ml.
βNAD <sup>+</sup> al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.
Glucosa 1 fosfato (sal dipotásica)	300 mg.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se le añade:

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	50 $\mu$ l.
PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.

G6PDH, EC: 1.1.1.49

Tampón TRIS-ClH (0.2M), pH 8.0	10 ml.
Glucosa 6 fosfato, sal sódica	20 mg.
EDTA	10 mg.
$\beta$ NADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se añade:

PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR 2%	5 ml.

Se revela a 37°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

MPI, EC: 5.3.1.8

Tampón TRIS-ClH (0.2 M), pH 8.0	8 ml.
Manosa 6 fosfato, sal sódica	25 mg.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
$\beta$ NADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	0.5 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se le añade:

Fosfoglucosa isomerasa	50 $\mu$ l.
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	100 $\mu$ l.
PMS al 1% en agua destilada	1 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml.

Se revela a 37°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

PGD, EC: 1.1.1.44

Tampón TRIS-ClH (0.2M), pH 8.0	10 ml.
Ácido 6 fosfogluconico	40 mg.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5 M)	1 ml.
$\beta$ NADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	1 ml.
NBT al 1% en agua destilada	1 ml.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se añade:



PMS al 1% en agua destilada	1 ml
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml

Se revela a 37°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

#### GLUDH, EC: 1.4.1.3

Tampón TRIS-ClH, pH 8.0	8 ml.
Ácido L-glutámico, sal sódica al 16.9% en agua destilada	5 ml.
βNADP <sup>+</sup> (sal sódica) al 1% en agua destilada	2.5 ml.
NBT al 1% en agua destilada	2 ml.
Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se añade:	
PMS al 1% en agua destilada	0.5 ml.
<sup>(2)</sup> AGAR al 2%	5 ml.

Se revela a 37°C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(2)</sup>Agar al 2%: para 100 ml, se prepara con 2 g de agar, 50 ml de agua destilada y 50 ml de tampón Tris-ClH, pH 8.0.

#### LAP, EC: 3.4.11.1

<sup>(3)</sup> Tampón TRIS-C, pH 5.5	40 ml.
L-leucil-beta-naftil amida	100 mg.
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.5M)	5 ml.
Se incuba a 37°C durante 30 minutos.	
Black K Salt	30 ml.

Se revela a 37° C.

Se añade la solución de fijación.

<sup>(3)</sup>El tampón TRIS-C, está compuesto por:

TRIS	24.2 g.
Anhídrido maleico	19.6 g.
Agua destilada	1000 ml.
Ajustar el pH a 5.5 con ClH.	

#### 4.6.8.-INTERPRETACIÓN DE LOS ZIMOGRAMAS

Después del revelado enzimático se observan unas bandas que se corresponden con las isoenzimas. El conjunto de bandas se denomina patrón de bandas.

Si repitiéramos la electroforesis de una misma enzima, es posible que no tuviéramos las bandas a la misma altura, pues la velocidad de migración está condicionada a muchos factores externos, sin embargo, la relación de altura entre las bandas es la misma.

Cuando el enzima presentó más de una banda, se expresó con el n°1 el de mayor movilidad electroforética, y con el n°2 el de menor movilidad electroforética.

#### 4.7.-MÉTODOS CITOGENÉTICOS.

El método empleado para el estudio citogenético de *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium aduncum* ha sido la técnica de Slizynski (tomada de Gonzales y Malmann, 1970).

-En primer lugar se eligieron ejemplares de ambas especies perfectamente desarrollados (machos y hembras) procedentes del mantenimiento *in vitro* en medio RPMI+P, pH 4.0. Bajo el microscopio estereoscópico se disectaron cuidadosamente, sobre una gota de agua destilada, para extraer los genitales.

-A continuación, se introducen los genitales durante 20 minutos en agua destilada para que las células se hipotonicen y conseguir una buena separación de los cromosomas.

-Durante este tiempo se preparan unos portaobjetos extendiendo una gota de albúmina de Mayer a lo largo de los mismos, y calentándolos posteriormente sobre una resistencia calorífica para que la albúmina se desnaturalice. Luego se coloca una gota de ácido acético al 50% en el centro del portaobjetos, en donde se colocarán los genitales.

-Se recorta un trozo de papel de celofán de medidas 2x2 cm y se coloca sobre la preparación, y sobre el papel de celofán un trozo de papel de filtro de tamaño 7.5x2.5 cm.

-Con la ayuda de una varilla de vidrio y con el extremo de la misma se golpea sobre el papel de filtro para aplastar las gónadas y extender el material.

-Se quita el papel de filtro y se sumerge la preparación en una caja de Petri con ácido acético al 50%. Transcurridos unos pocos minutos, el papel de celofán se libera y se deja secar la preparación al aire.

-Por último, se procede a la tinción con Giemsa (al 10% en solución tampón de fosfatos de pH 6.8) durante 25 minutos. Se retira el colorante, se lava y se deja secar hasta el momento de la observación microscópica.

*Resultados*

5.-RESULTADOS.

5.1.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Anisakis simplex*.

5.1.1.-DETALLES MORFOLÓGICOS DE L3, L4 y ADULTOS DE *Anisakis simplex*.

Como resultado de los mantenimientos realizados, se presentan las siguientes fotografías de los estados larvarios L3, L4 y adultos.

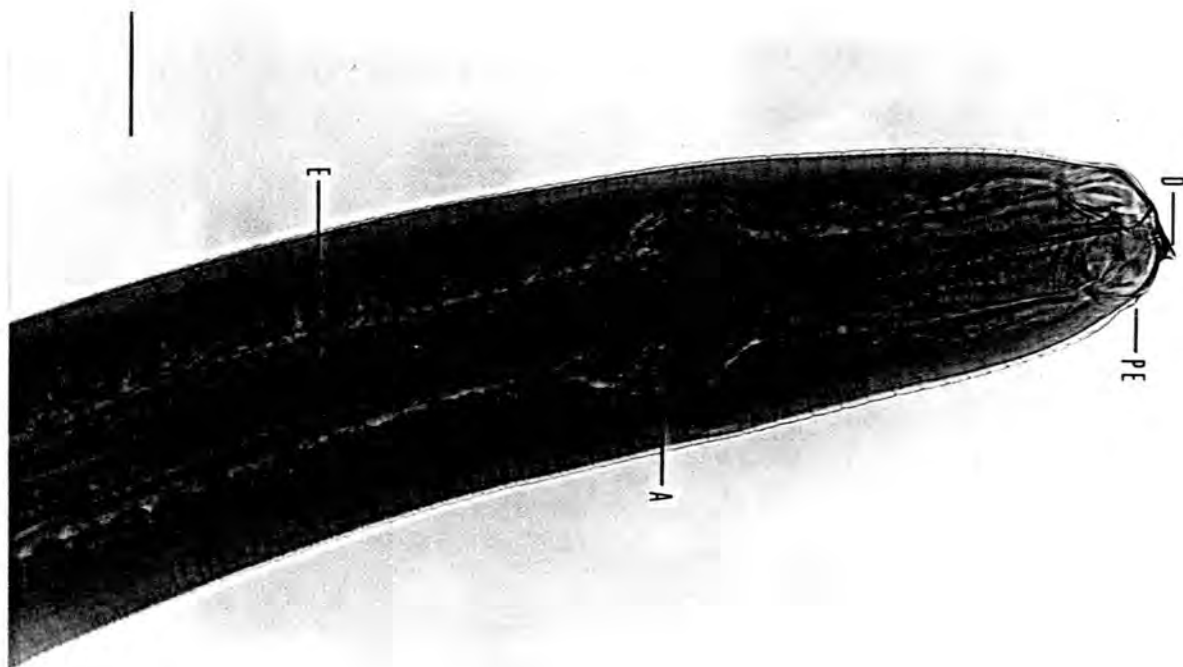


Foto 7. L3 de *Anisakis simplex*. Extremo anterior. La barra equivale a 100  $\mu$ m. D=Diente. PE=Poro excretor. A=Anillo nervioso. E=Esófago.

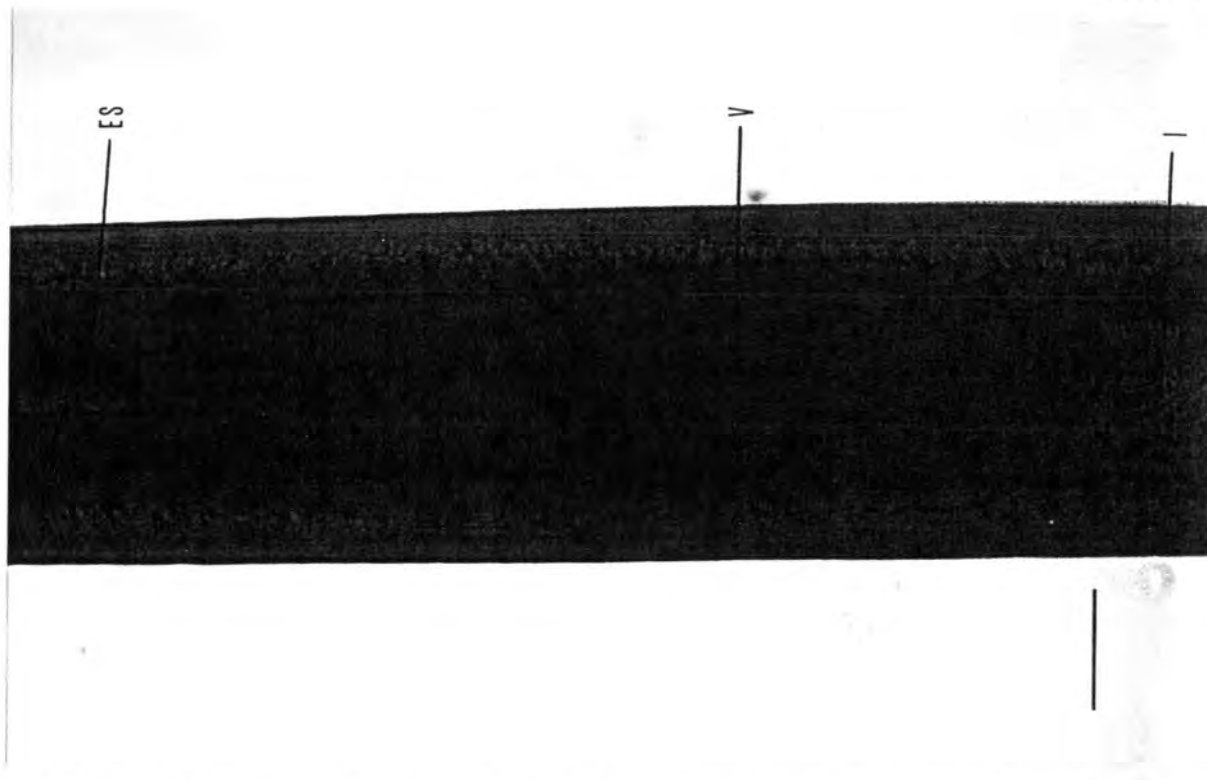


Foto 8. L3 de *Anisakis simplex*. Parte anterior. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ . ES=Esófago. V=Ventrículo. I=Intestino.

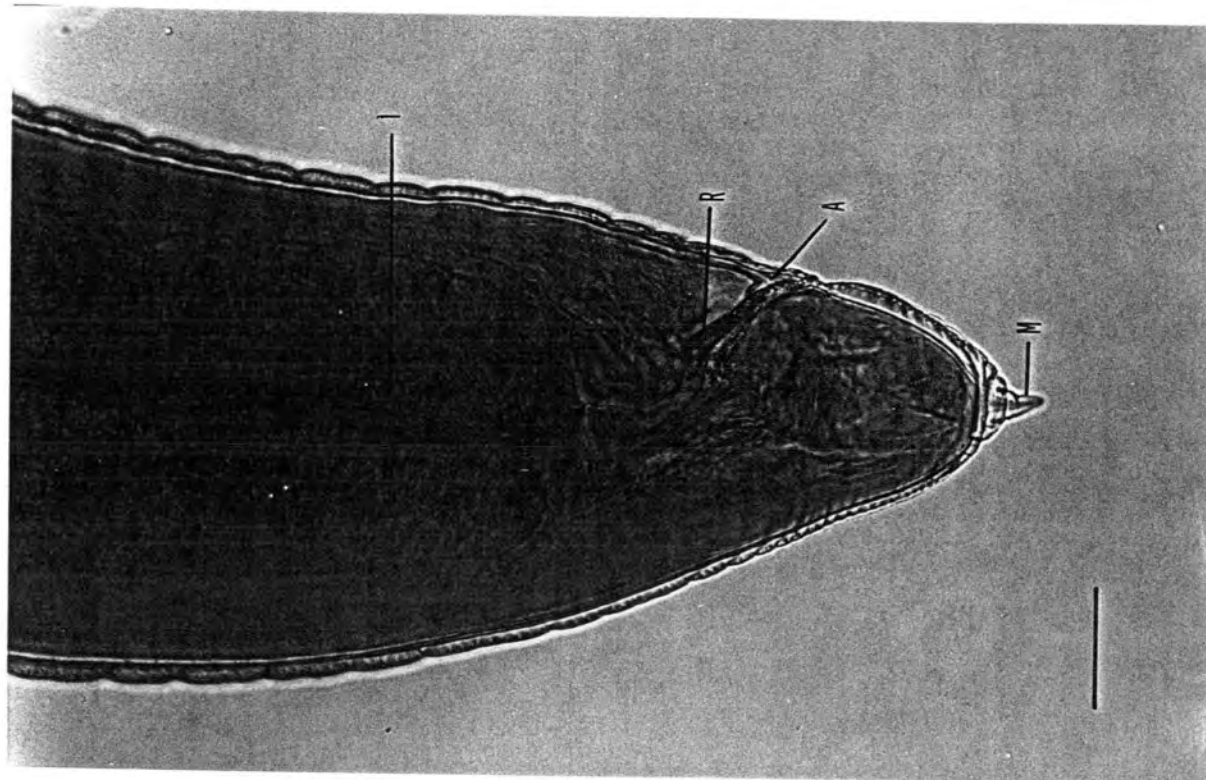


Foto 9. L3 de *Anisakis simplex*. Extremo posterior. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ . I=Intestino. R=Recto. A=Ano. M=Mucrón.

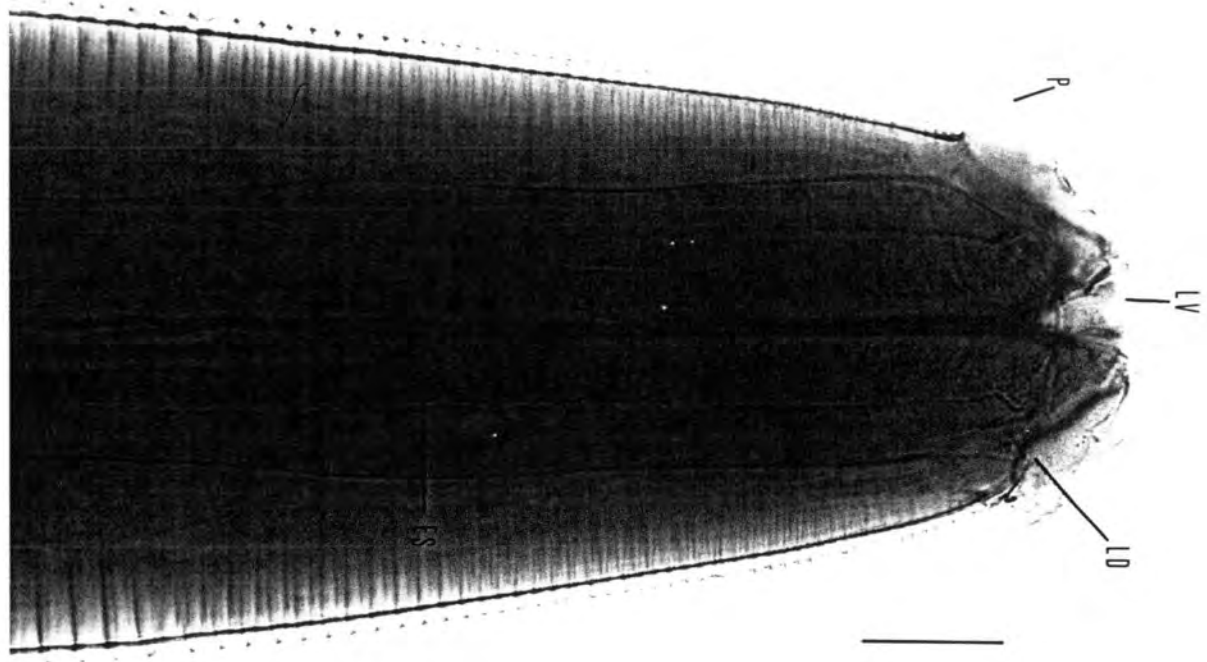


Foto 10. L4 de *Anisakis simplex*. Extremo anterior. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .  
P=Papila. LV=Labio ventral. LD=Labio dorsal.

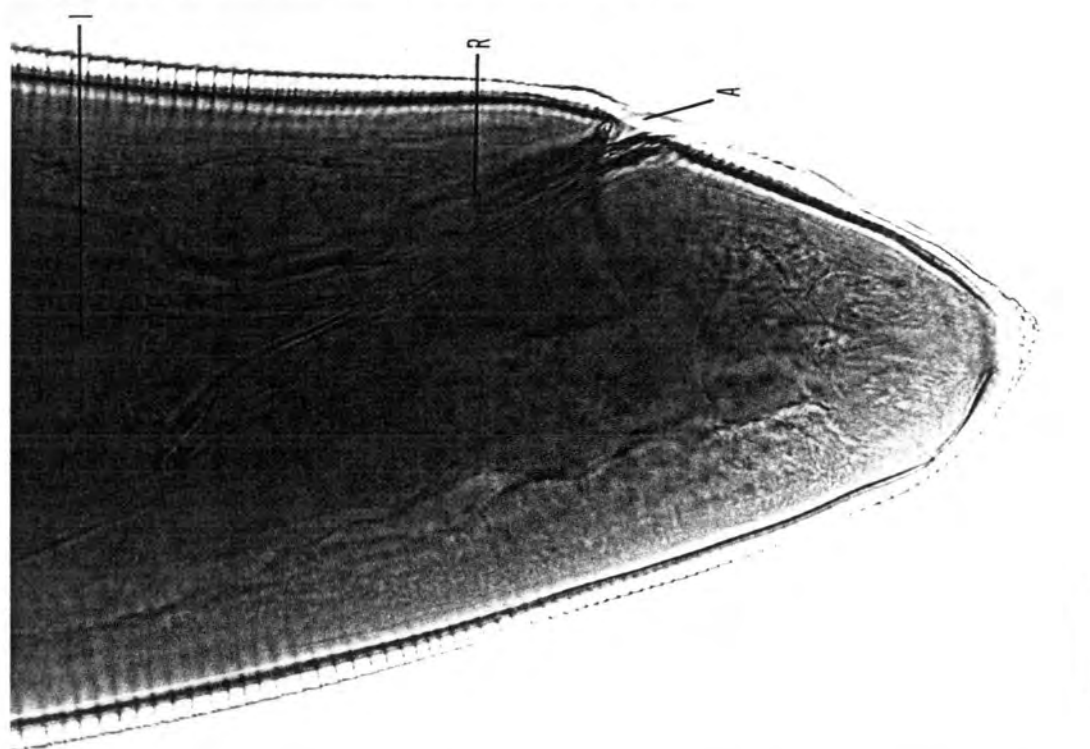


Foto 11. L4 de *Anisakis simplex*. Extremo posterior. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .  
I=Intestino. R=Recto. A=Ano.

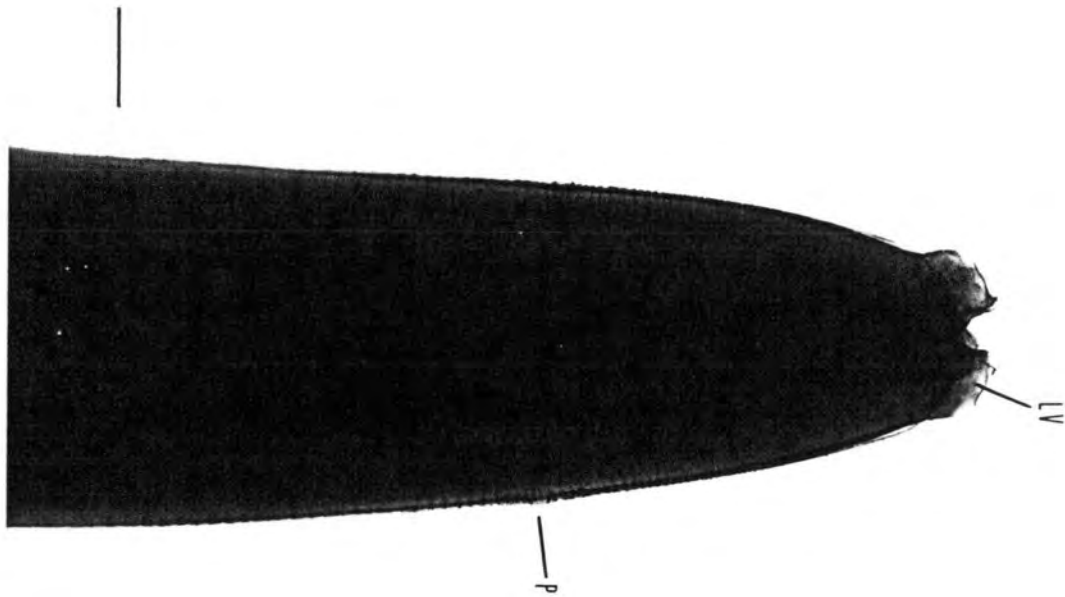


Foto 12. Adulto macho de *Anisakis simplex*. Extremo anterior. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ . LV=Labio ventral. P=Papila cefálica.

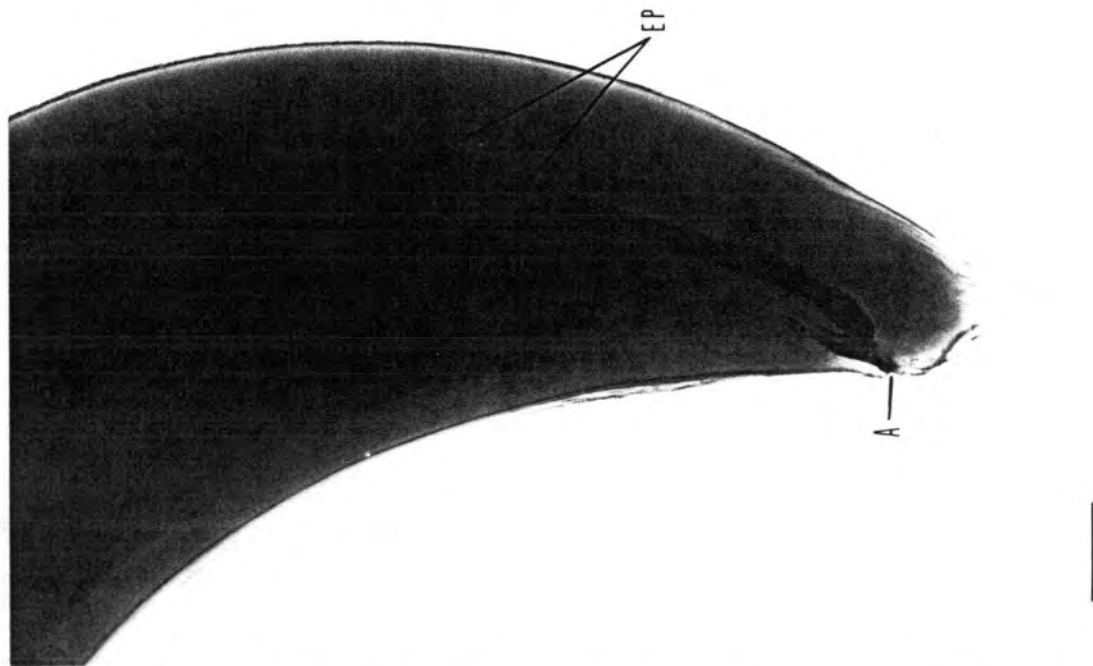


Foto 13. Adulto macho de *Anisakis simplex*. Extremo posterior. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ . EP=espículas. A=Ano.

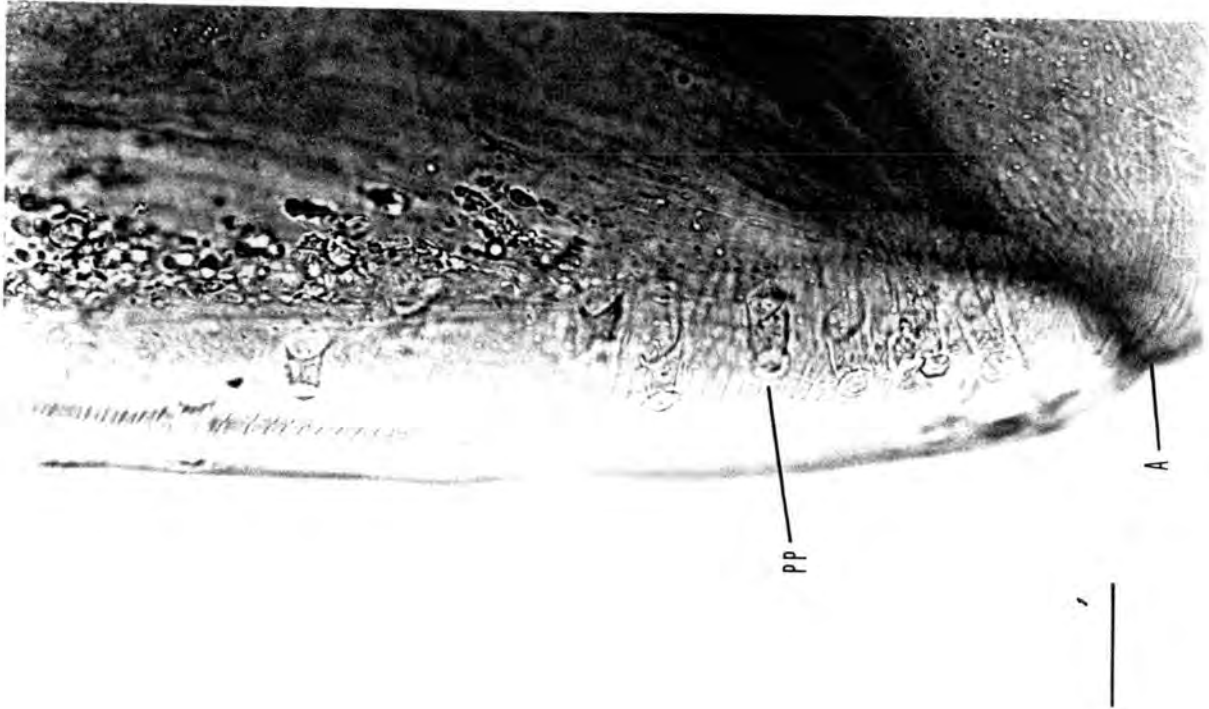


Foto 14. Adulto macho de *Anisakis simplex*. Detalle de la parte posterior. La barra equivale a 50  $\mu$ m. PP=Papilas preanales. A=Ano.

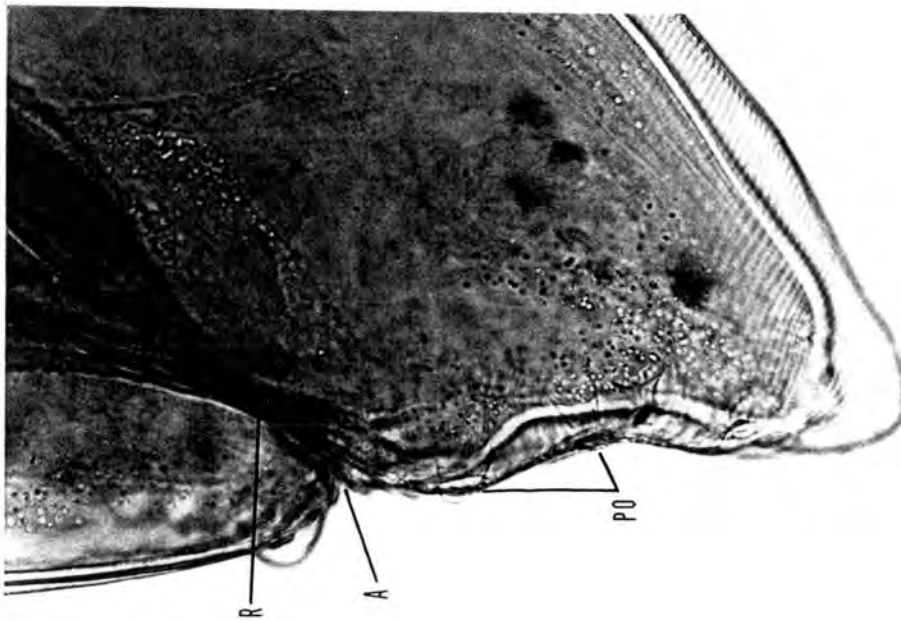


Foto 15. Adulto macho de *Anisakis simplex*. Detalle del extremo posterior. La barra equivale a 50  $\mu$ m. R=Recto. A=Ano. PO=Papilas post-anales.



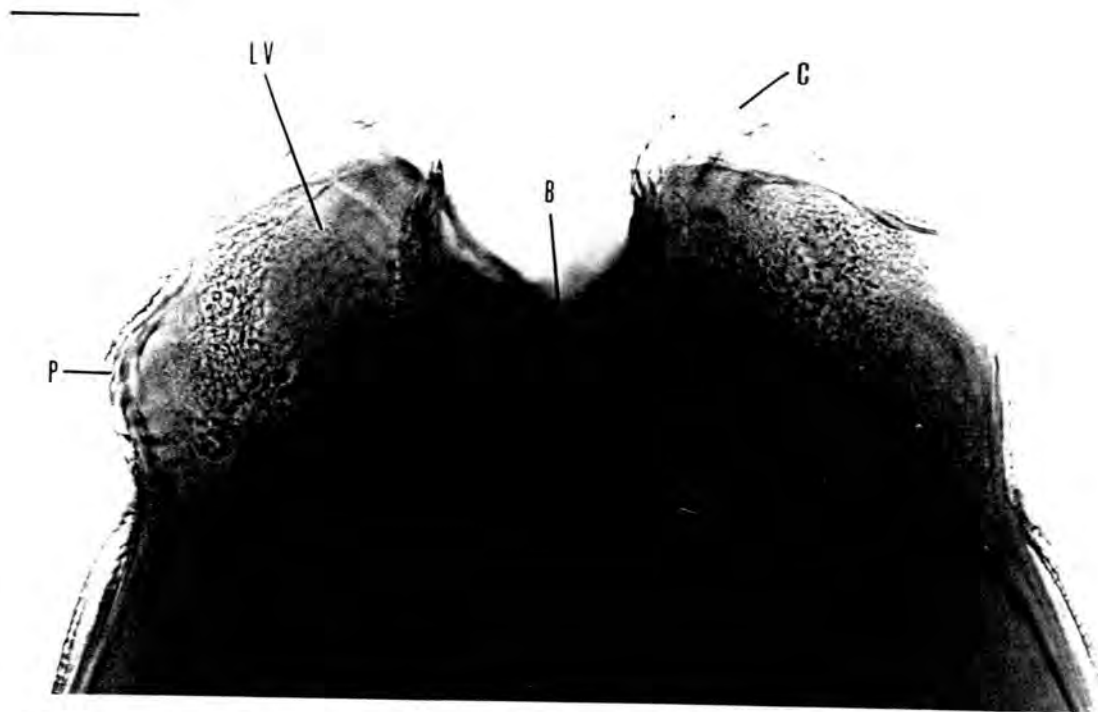


Foto 16. Detalle del extremo anterior de adulto macho de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ . P=papilas. LV=Labioventral. B=Boca. C=Cresta.

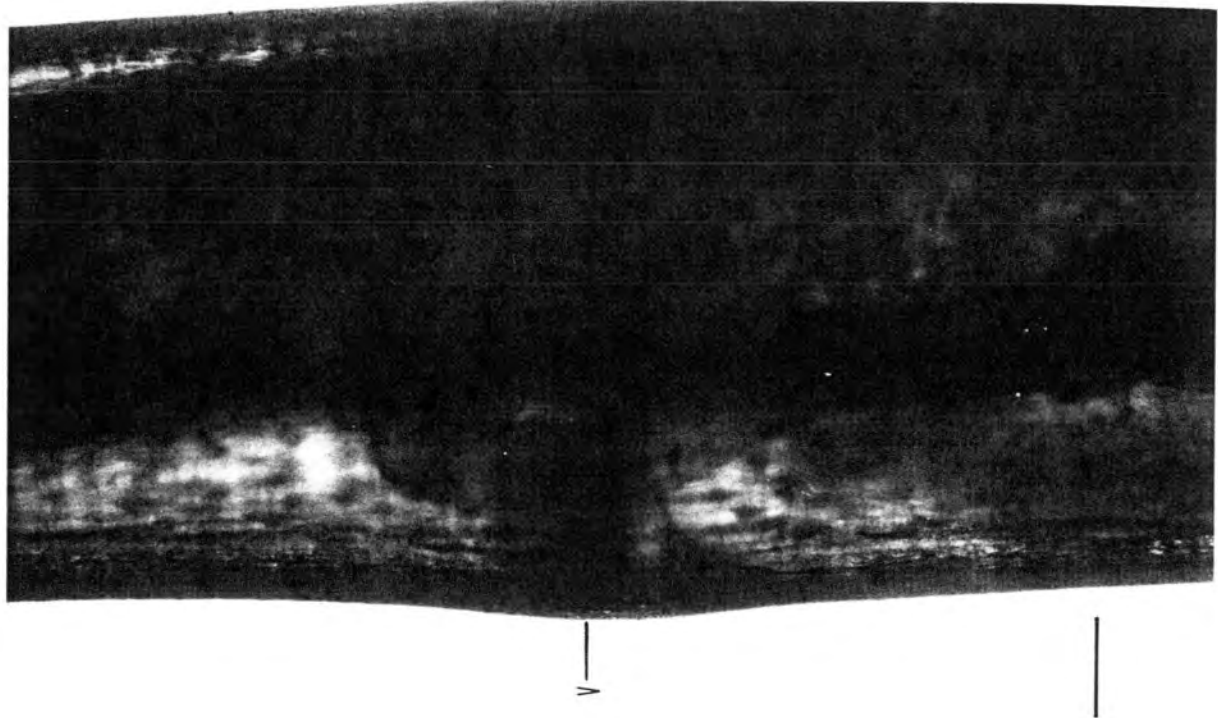


Foto 17. Detalle de adulto hembra de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 200  $\mu$ m. V=Vagina.

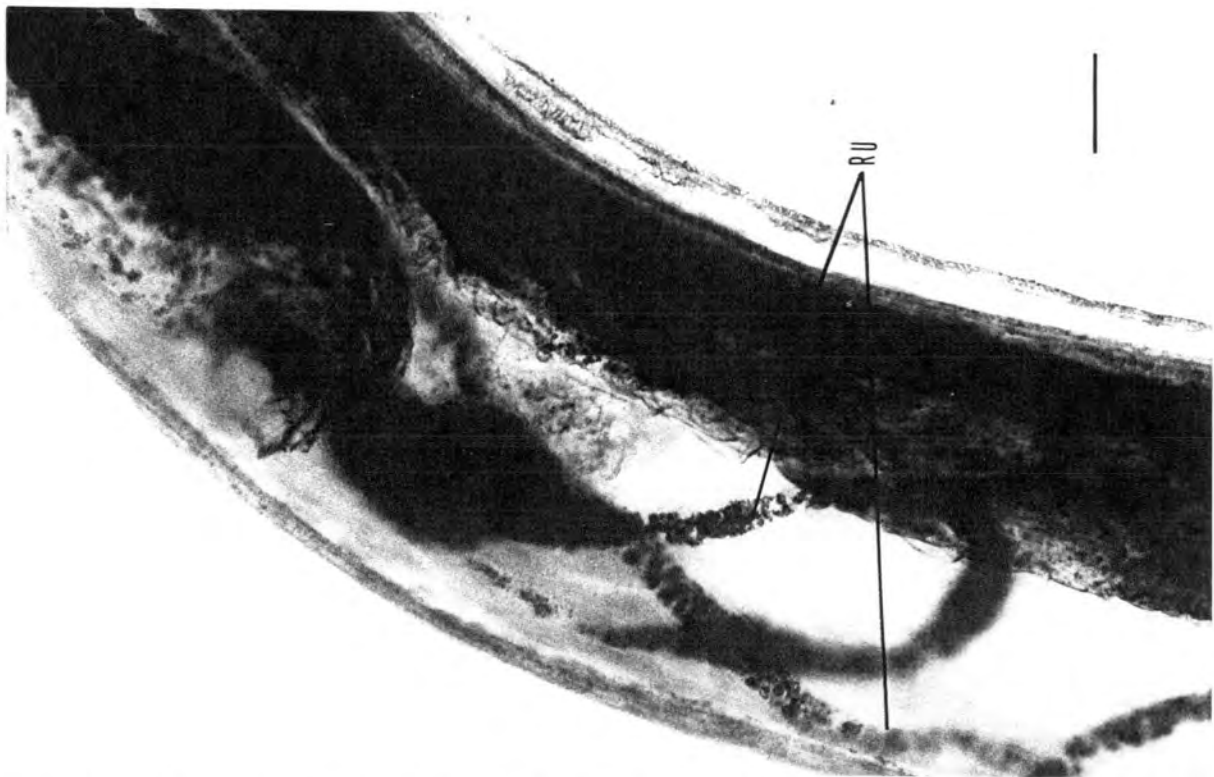


Foto 18. Detalle de adulto hembra de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 200  $\mu$ m. RU=Ramas uterinas.

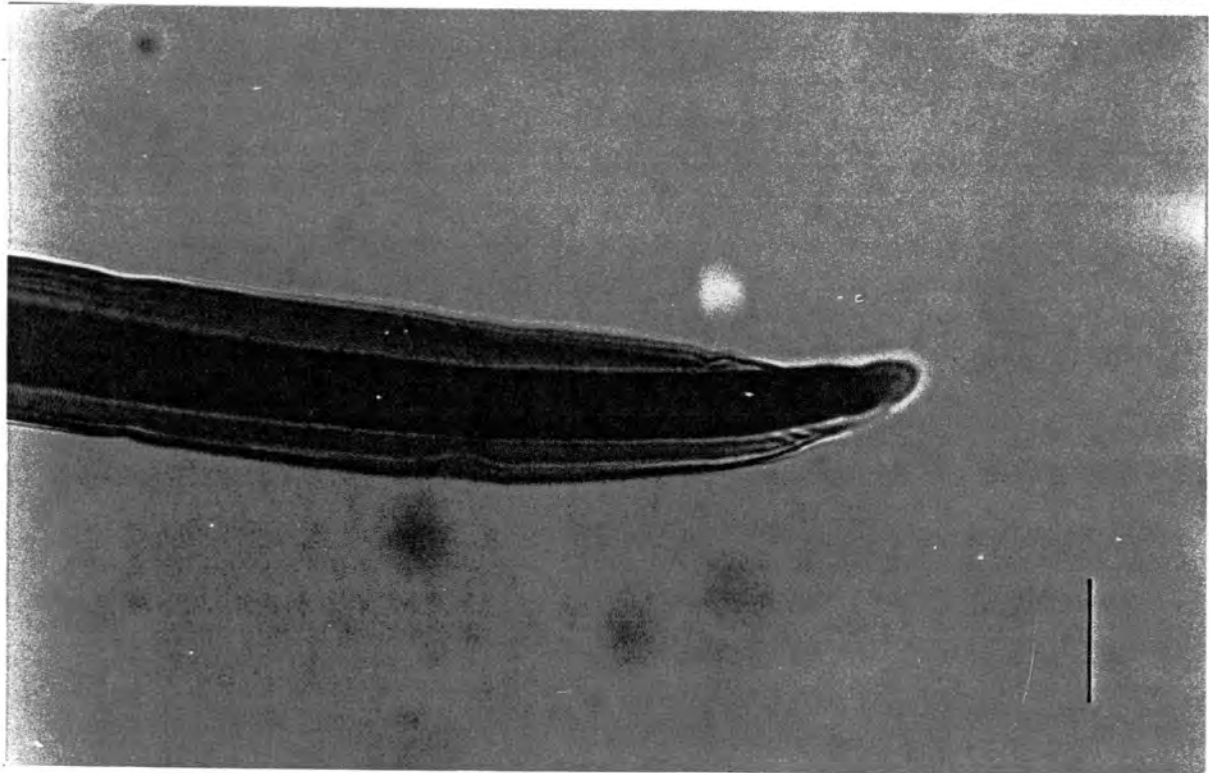


Foto 19. Detalle de una espícula de adulto macho de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ .

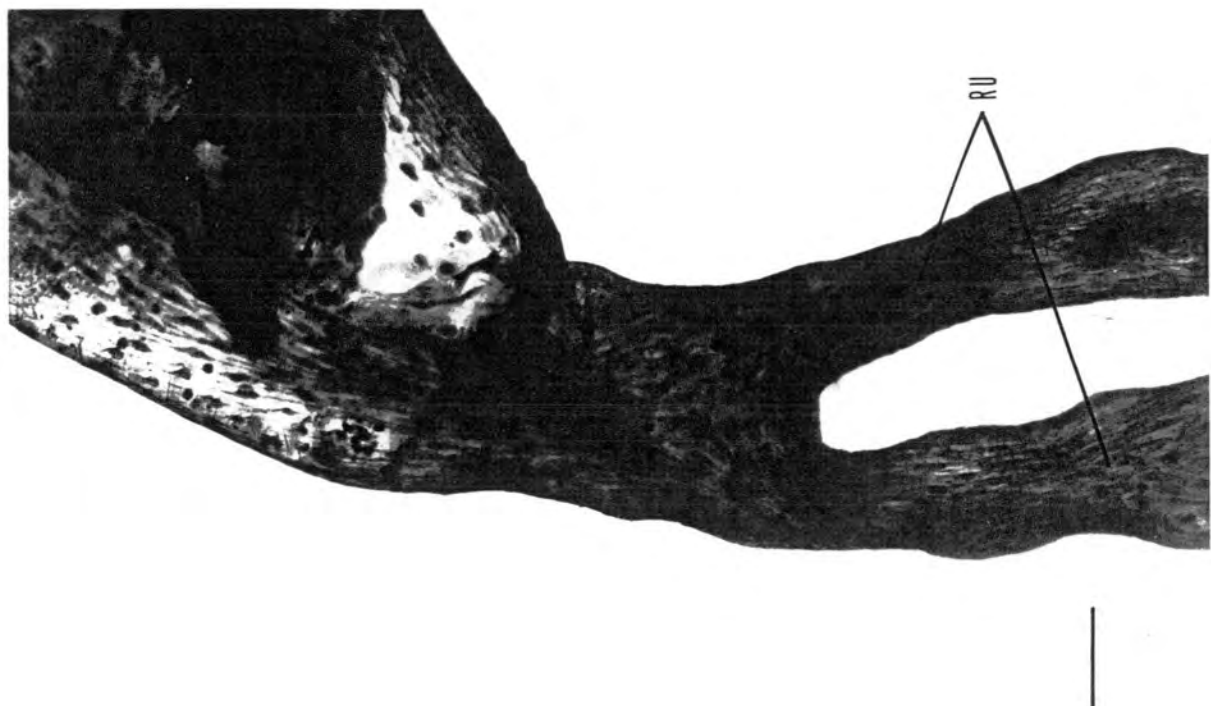


Foto 20. Detalle del genital (obtenido por disección) de adulto hembra de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ . RU=Ramas uterinas.

### 5.1.2.-MEDIDAS DE ADULTOS Y HUEVOS DE *Anisakis simplex* OBTENIDOS IN VITRO.

El tamaño de la larva se ve aumentado con respecto a la L4 en el momento de la ecdisis, pero es a partir de la muda M4 cuando se puede observar a simple vista como el tamaño y grosor del parásito aumenta considerablemente, sobre todo al paso de 15-20 días tras la muda, desarrollando el tamaño máximo a partir de los 45-60 días. Por esta razón, el tamaño de los parásitos tras la M4 es variable, dependiendo del tiempo de supervivencia.

En la TABLA I se muestran las medidas medias, máximas y mínimas de L5 de *A. simplex* obtenidas en nuestros estudios tras, al menos, 45 días de mantenimiento como L5.

TABLA I. Medidas medias  $\pm$ ES, máximas y mínimas para L5 de *A. simplex* (en mm).

	MACHOS (n=20)			HEMBRAS (n=22)		
	Media $\pm$ ES	Min	Max	Media $\pm$ ES	Min	Max
Longitud total	44 $\pm$ 0,28	38	65	49 $\pm$ 0,18	45	80
Ancho máximo	1.32 $\pm$ 0.03	1.25	1.45	1.41 $\pm$ 0.03	1.35	1.50
Distancia anillo nervioso-boca	0.875 $\pm$ 0.070	0.625	1.175	0.785 $\pm$ 0.060	0.550	1.000
Longitud de esófago	3.550 $\pm$ 0.200	3.250	4.875	5.125 $\pm$ 0.170	4.750	6.750
Longitud ventrículo	1.25 $\pm$ 0.05	1.00	1.40	1.85 $\pm$ 0.09	1.5	2.5
Ancho ventrículo	0.375 $\pm$ 0.010	0.300	0.425	0.625 $\pm$ 0.030	0.500	0.700
Distancia papilas-boca	0.975 $\pm$ 0.070	0.750	1.250	0.985 $\pm$ 0.030	0.750	1.125
Longitud de espícula mayor	1.450 $\pm$ 0.050	1.325	1.625			
Longitud de espícula menor	0.975 $\pm$ 0.020	0.875	1.050			
Ancho máximo espículas	0.022 $\pm$ 0.001	0.020	0.025			
Distancia ano-extremo final	0.295 $\pm$ 0.01	0.250	0.350	0.260 $\pm$ 0.030	0.150	0.375

Los huevos obtenidos eran infértiles, pues procedían de hembras que se desarrollaron aisladas en un pocillo, por lo que con frecuencia aparecían con contornos irregulares, y en muchos casos carecían de la cubierta exterior (Fotos 21 y 22). Se midieron un total de 50 huevos seleccionados por su buen estado de conservación y contornos regulares. El tamaño medio  $\pm$ ES de los huevos fue de 50.5  $\pm$  0.7 x 44.4  $\pm$  0.5  $\mu$ m.

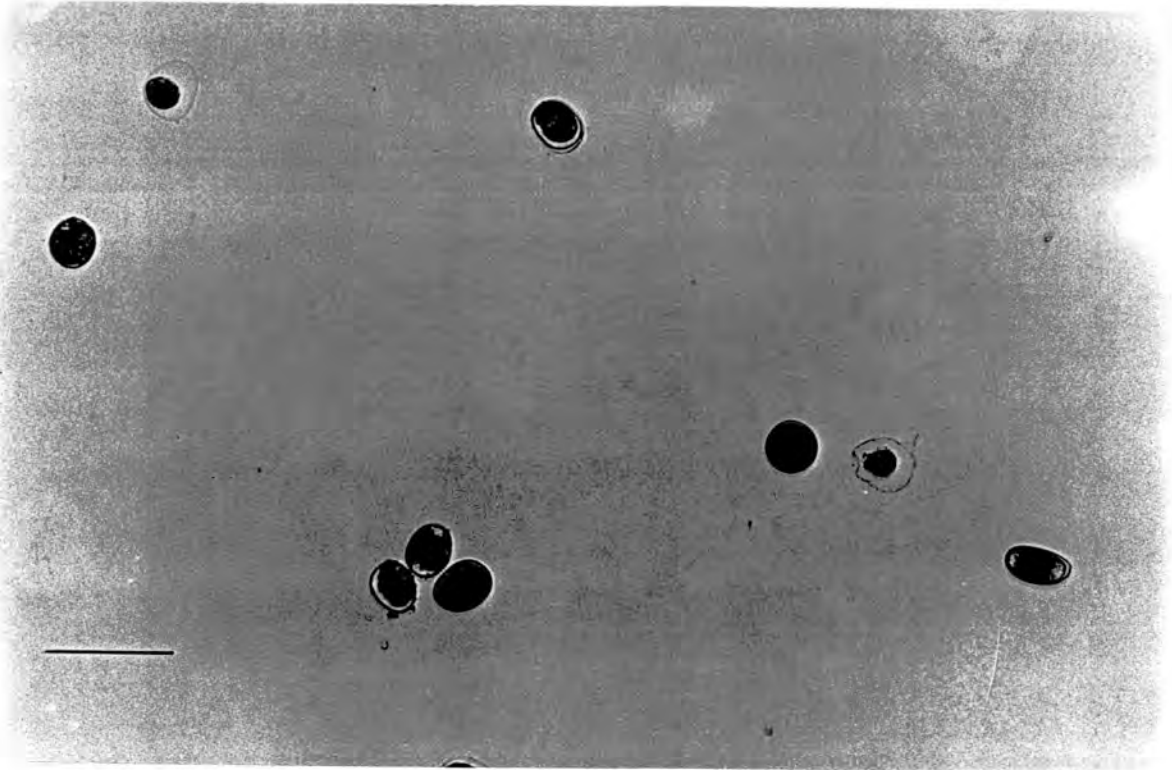


Foto 21. Huevos de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

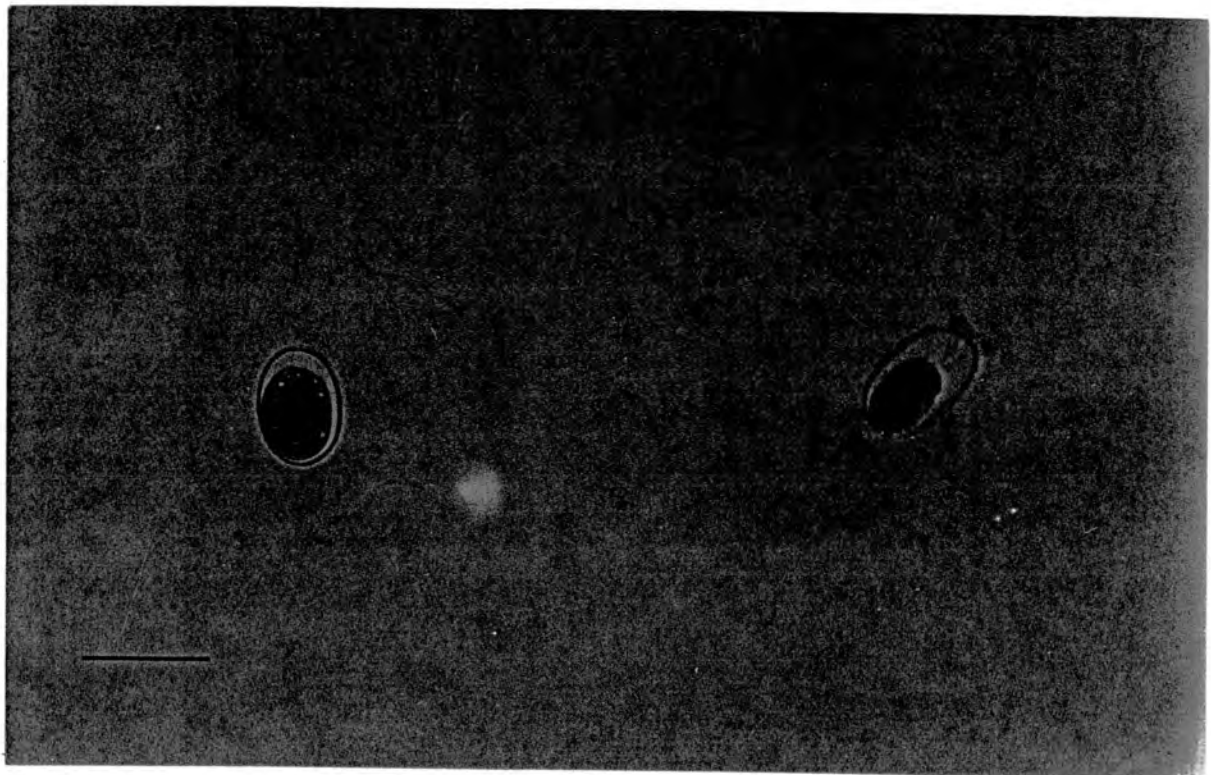


Foto 22. Huevos de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.3.-RESULTADOS DE LOS MANTENIMIENTOS *IN VITRO* DE *Anisakis simplex*.

La movilidad de los parásitos tras el paso a L4, se ve muy acentuada hasta transcurridas unas 48-72 horas, pudiéndose observar los restos de la cutícula anterior en forma de vaina estriada en el pocillo (Foto 23).

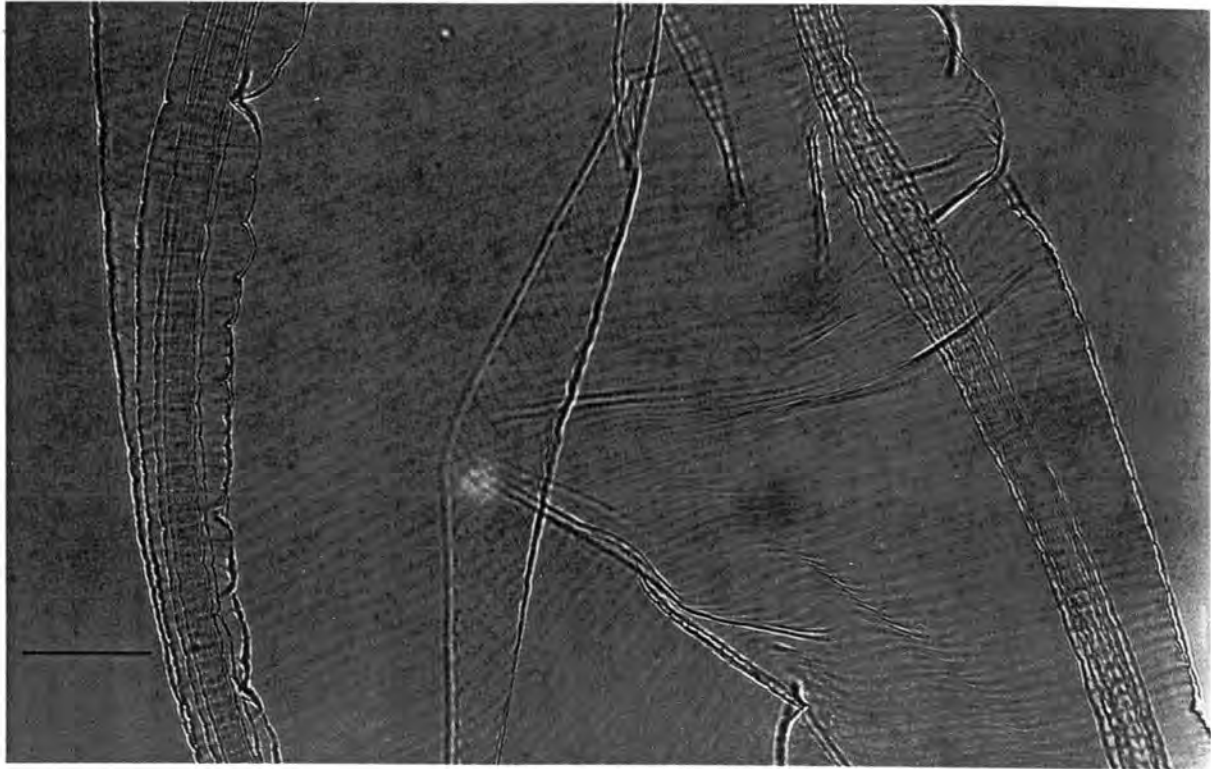


Foto 23. Restos de la cutícula de la L3 de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

En algunas ocasiones, tanto en estado de L3 como L4, *A. simplex* segrega una sustancia marrón con la que puede quedar adherida al fondo del pocillo (Fotos 24 y 25).

Se ha observado que un mismo individuo puede adherirse al pocillo en varias ocasiones, pudiendo permanecer adherido después de muerto. En otras ocasiones, no se observó la adhesión al pocillo, pero sí restos de esa sustancia en la zona cefálica del parásito.

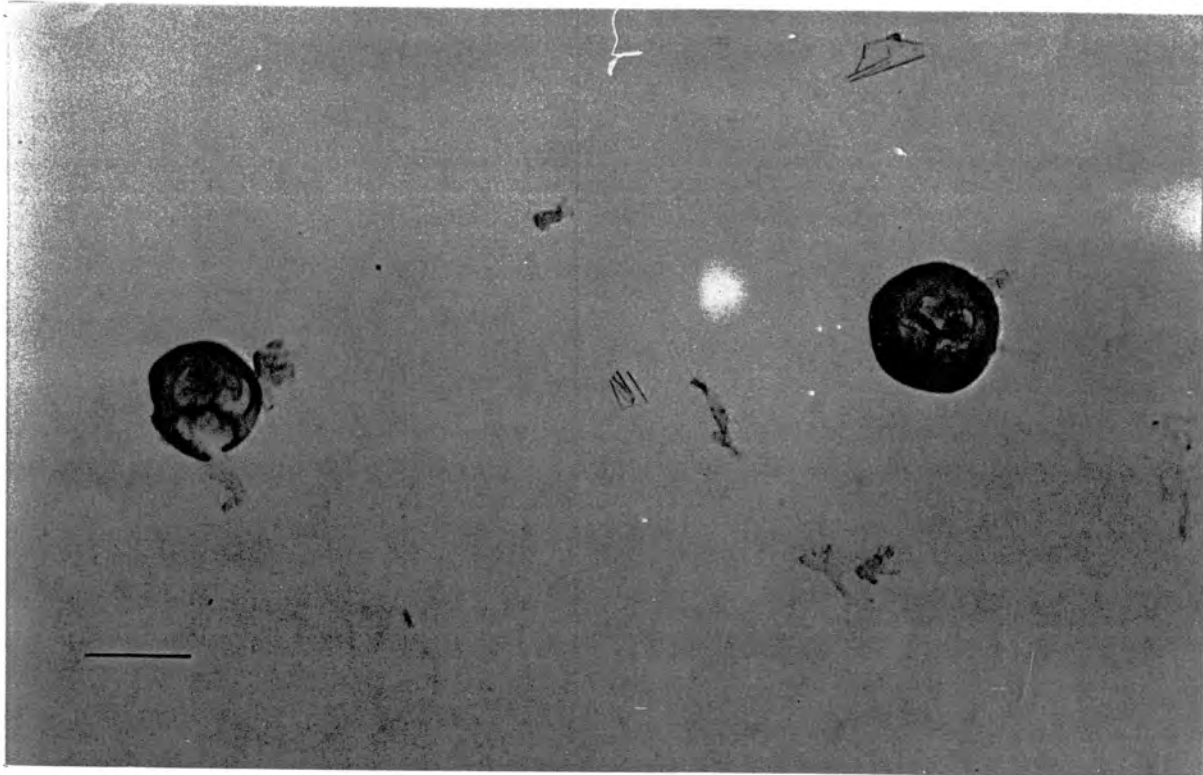


Foto 24. Restos de la "sustancia marrón" en el fondo del pocillo. Nótese la huella correspondiente a los tres labios. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ .

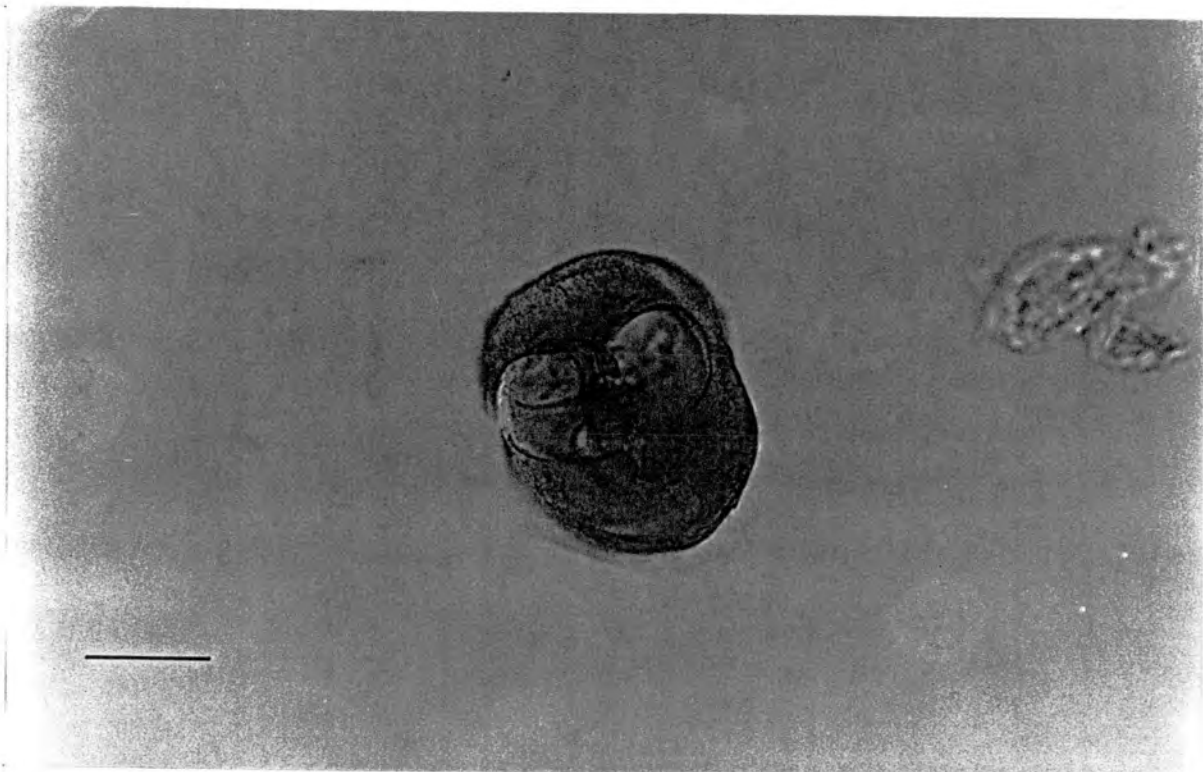


Foto 25. Restos de la "sustancia marrón" en el fondo del pocillo. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

En el paso a L5, los restos de la vaina del 4° estadio larvario se pudieron observar de dos formas: como una vaina completa fuertemente estriada transversalmente (Foto 26), lo que la diferencia de la M3, o bien la ecdisis se produjo a lo largo de dos o tres días, desprendiéndose la vaina gradualmente y no de una pieza, sino en forma de anillos o pequeños cilindros estriados.

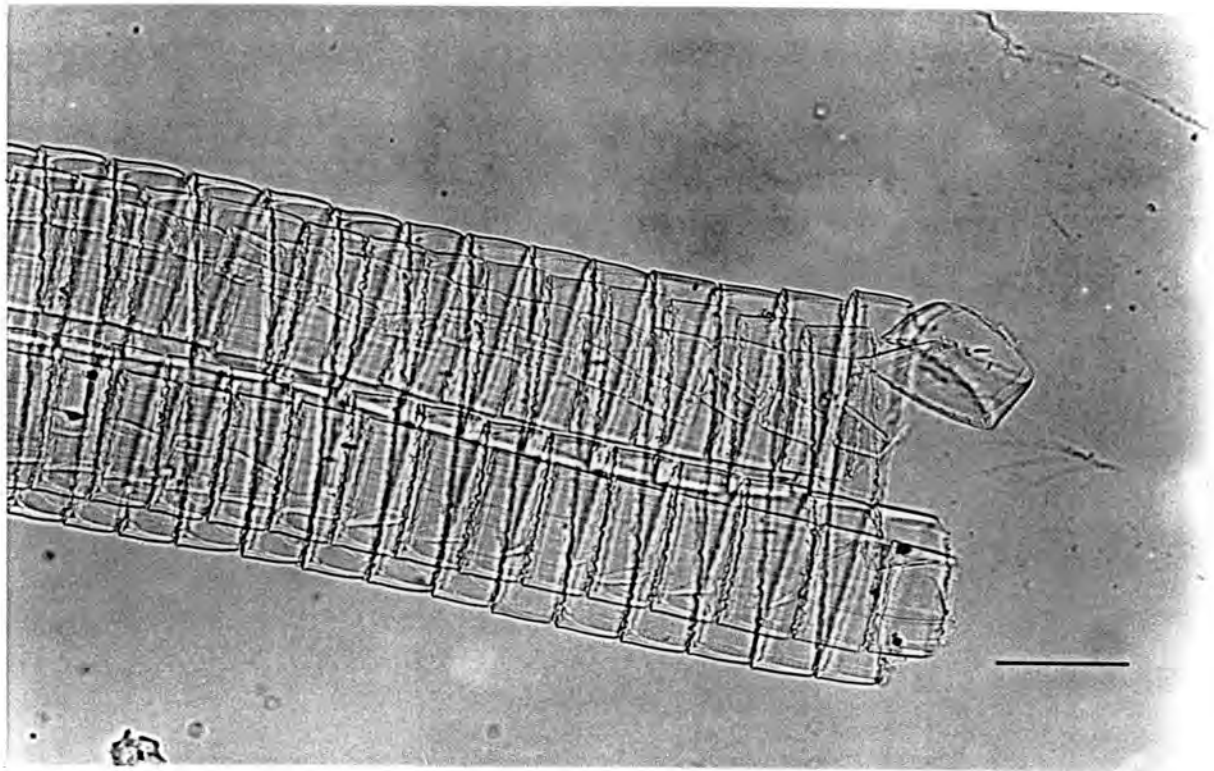


Foto 26. Restos de la cutícula de la L4 de *Anisakis simplex*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .



5.1.3.1.-MANTENIMIENTO EN ATMÓSFERA DE AIRE Y ATMÓSFERA DE AIRE CON 5% DE CO<sub>2</sub>.

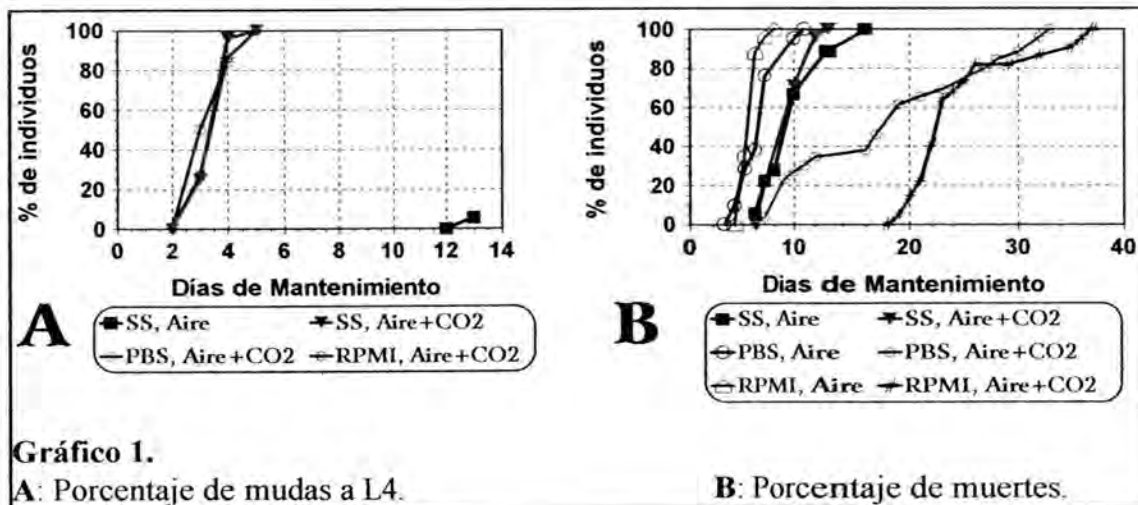
Se ha realizado una experiencia compuesta por seis lotes de larvas en los medios SS, PBS y RPMI, bajo atmósfera de aire y de aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

En la TABLA II se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos.

TABLA II

Medio	n	Atmósfera	Sav±ES	S50	Smax	L4
SS	18	Aire	10.5±0.5	10	16	1(5.5%)
SS	24	Aire con 5% de CO <sub>2</sub>	10.0±0.4	10	15	24(100%)
PBS	21	Aire	7.3±0.5	7	13	no
PBS	26	Aire con 5% de CO <sub>2</sub>	18.9±1.7	19	35	22(84%)
RPMI	25	Aire	6.4±0.2	7	10	no
RPMI	22	Aire con 5% de CO <sub>2</sub>	24.9±0.8	22	37	22(100%)

Los mayores porcentajes de muda a L4 se producen siempre en los medios con CO<sub>2</sub>. En el Gráfico 1 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.



A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 2 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio SS con atmósfera de aire. Aunque un total de 8 parásitos (44.4%) iniciaron la muda a L4 entre los días 3º y 8º, sólo un individuo (5.5%) completó la ecdisis en el día 13º. Se detectó 1 individuo (5.5%) adherido al pocillo el 7º día de mantenimiento.

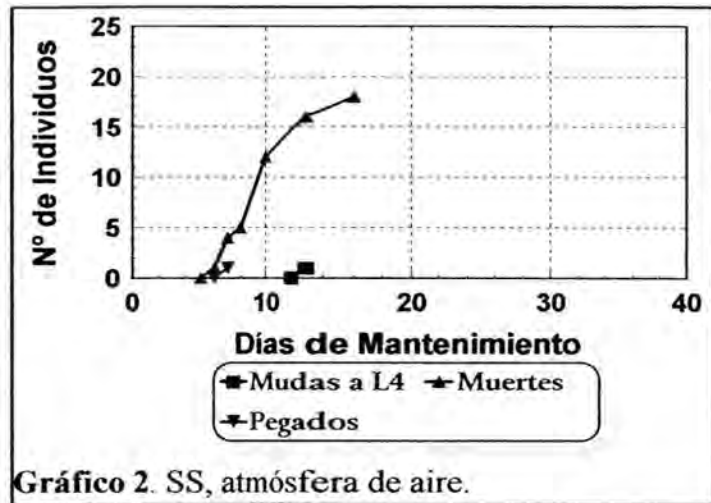


Gráfico 2. SS, atmósfera de aire.

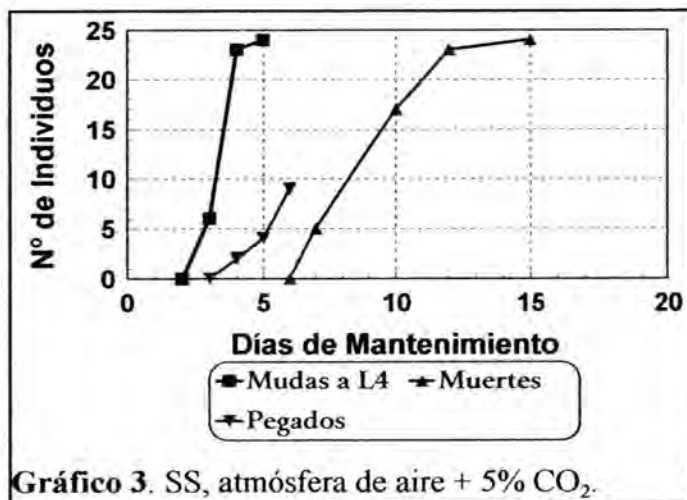


Gráfico 3. SS, atmósfera de aire + 5% CO<sub>2</sub>.

En el Gráfico 3 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio SS con atmósfera de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los individuos alcanzaron el 4º estadio larvario entre los días 3º y 5º. Sin embargo las supervivencias media y máxima fueron muy similares a la experiencia anterior.

Se observaron 9 individuos (37.5%) adheridos al pocillo entre los días 3º y 6º.

En el Gráfico 4 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio PBS con atmósfera de aire.

Ningún individuo alcanzó el 4º estadio larvario, aunque 15 individuos (71.4%) comenzaron la ecdisis. Se observó un individuo (4.7%) adherido al pocillo el día 3º de mantenimiento.

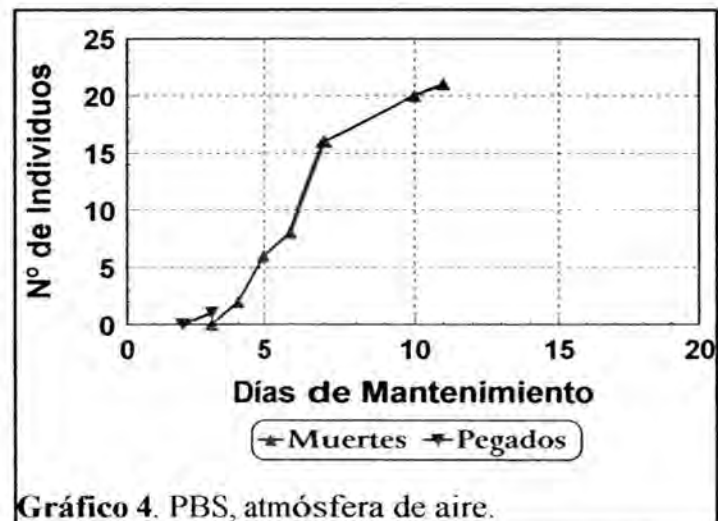


Gráfico 4. PBS, atmósfera de aire.

En el Gráfico 5 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio PBS con atmósfera de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. En este caso, 22 individuos (84%) alcanzan el 4<sup>o</sup> estadio larvario entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día.

Las supervivencias medias y máximas se incrementan con respecto a los casos anteriores. Entre los días 4<sup>o</sup> y 14<sup>o</sup> se detectan 7 individuos (26.9%) adheridos al fondo del pocillo.

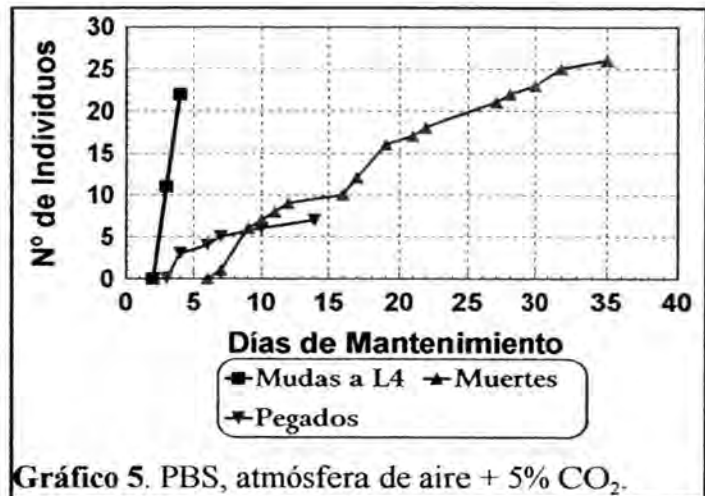


Gráfico 5. PBS, atmósfera de aire + 5% CO<sub>2</sub>.

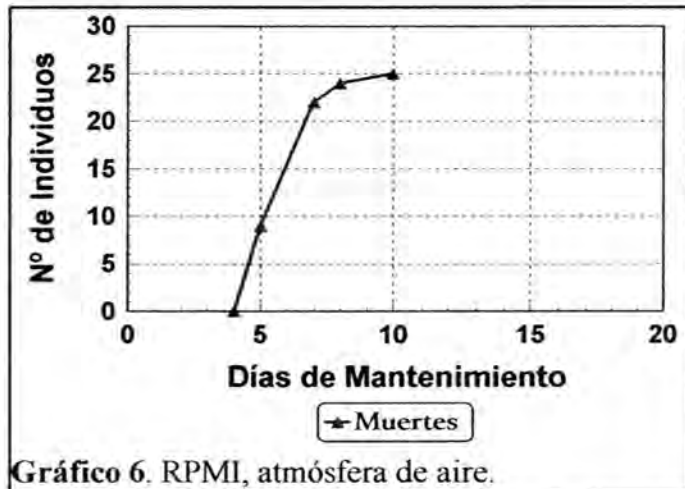


Gráfico 6. RPMI, atmósfera de aire.

En el Gráfico 6 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio RPMI con atmósfera de aire. Aunque 15 individuos (60%) comenzaron la ecdisis entre los días 3<sup>o</sup> y 9<sup>o</sup>, no se produjo la muda de ningún individuo.

En el Gráfico 7 se muestra detalladamente la evolución de los parásitos en el medio RPMI con atmósfera de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los individuos alcanzan el 4<sup>o</sup> estadio larvario entre los días 3<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup>. Se observaron 17 individuos (77.3%) adheridos al fondo del pocillo entre los días 4<sup>o</sup> y 20<sup>o</sup>.

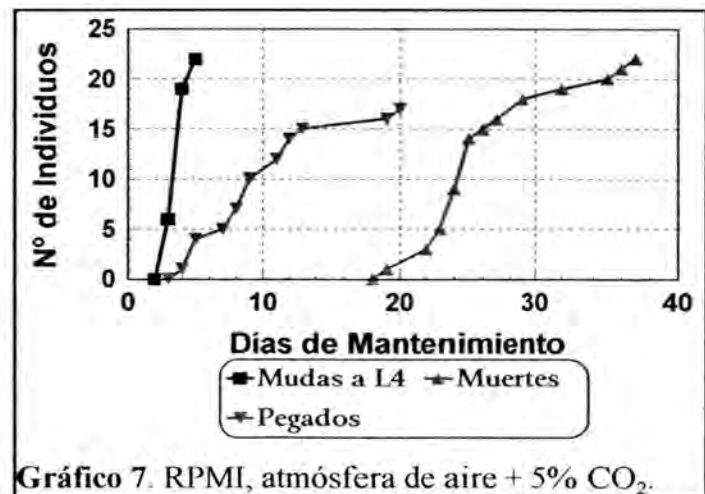


Gráfico 7. RPMI, atmósfera de aire + 5% CO<sub>2</sub>.

A partir de aquí todas las experiencias se desarrollaron con el medio RPMI y atmósfera de aire con un 5% de CO<sub>2</sub>.

## 5.1.3.2.-MANTENIMIENTO A pH CONSTANTE.

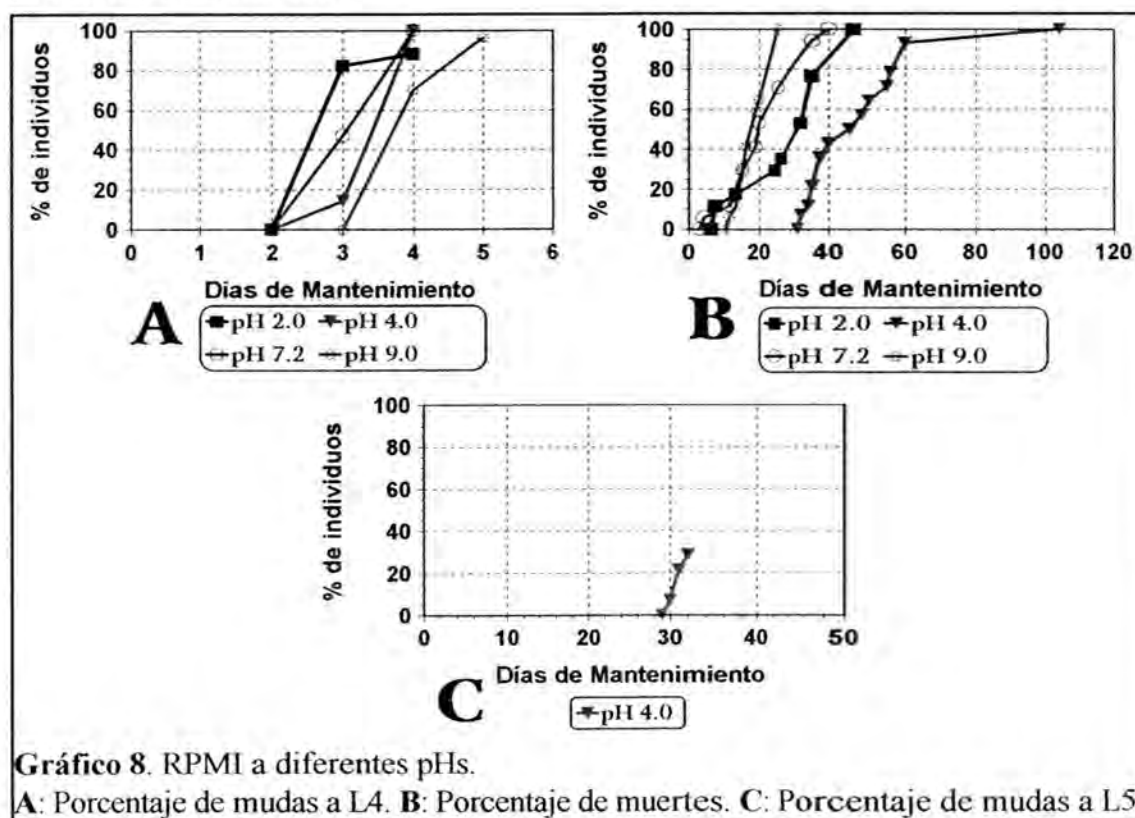
Se ha realizado una experiencia con 4 lotes de individuos en el medio RPMI a distintos pHs: 2.0, 4.0, 7.2 y 9.0. En la TABLA III se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos.

TABLA III

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L4	L5	Sav±ES, L5
RPMI, pH 2.0	17	31.0±3.0	32	46	15(88.2%)	no	no
RPMI, pH 4.0	14	49.4±4.8	44	104	14(100%)	4(28.6%)	26.7±8.9
RPMI, pH 7.2	17	23.5±2.5	20	40	17(100%)	no	no
RPMI, pH 9.0	17	19.6±1.3	19	26	16(96.1%)	no	no

Se observa como a pH 4.0, la Sav, S50 y Smax son bastante mayores que en el resto de los pHs, obteniéndose un 28.6% de L5, mientras que en el resto de pHs no se obtiene ninguna L5. Si analizamos con detalle cada una de las experiencias, observaremos como también hubo diferencias en la muda M3.

En el Gráfico 8 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.



A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 9 se observa como a pH 2.0, sólo 15 (88.2%) de los 17 individuos mudaron a L4, y lo hicieron entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

No se observó ningún ejemplar en estadio L5.

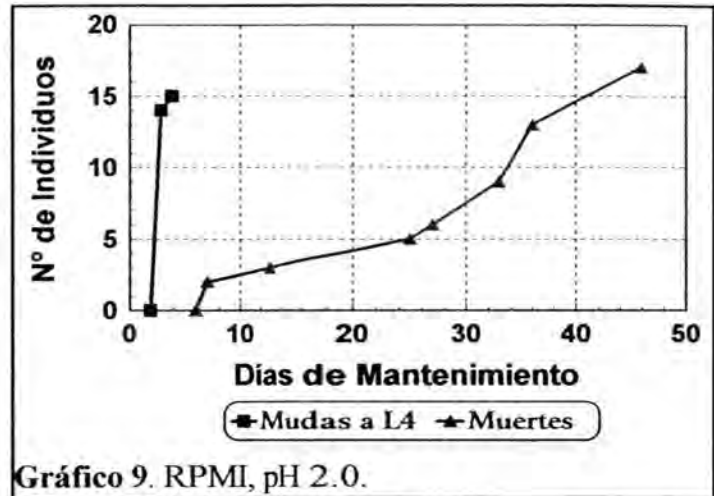


Gráfico 9. RPMI, pH 2.0.

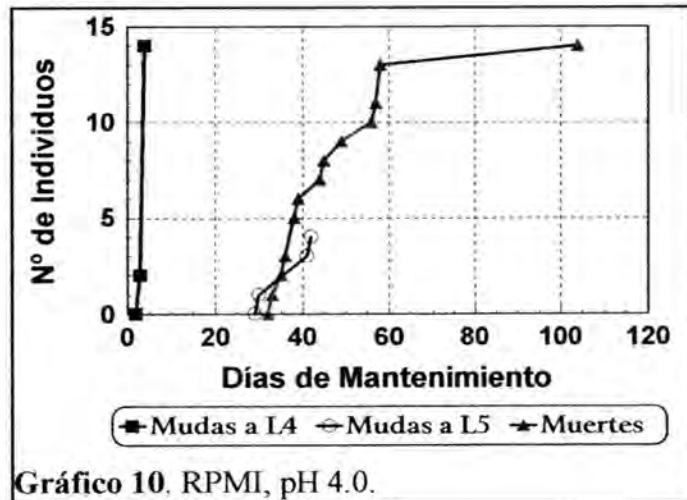


Gráfico 10. RPMI, pH 4.0.

En el Gráfico 10 se observa como a pH 4.0, todos los individuos mudaron a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

También se observaron 4 individuos (28.6%) en estadio L5, entre los días 30<sup>o</sup> y 42<sup>o</sup>. Tres fueron hembras (75%) y el restante, macho (25%).

En el Gráfico 11 se detallan los resultados obtenidos a pH 7.2. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> cuatro día de mantenimiento, pero no se detecta ninguna L5. Se observan 12 individuos (70.5%) adheridos al fondo del pocillo entre los días 4<sup>o</sup> y 18<sup>o</sup>.

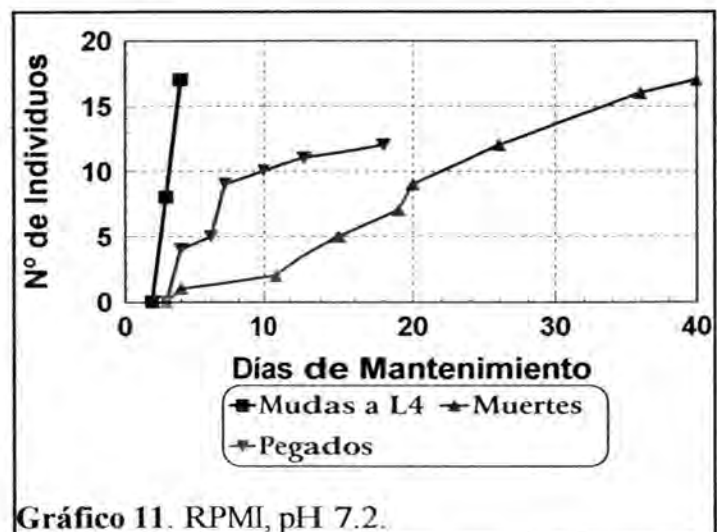


Gráfico 11. RPMI, pH 7.2.

En el Gráfico 12 se detallan los resultados obtenidos a pH 9.0. Se puede observar que 16 individuos (96.1%) mudan a L4 entre el 4° y 5° día de mantenimiento.

A partir del 11° día comienzan a morir las larvas progresivamente hasta el día 26°.

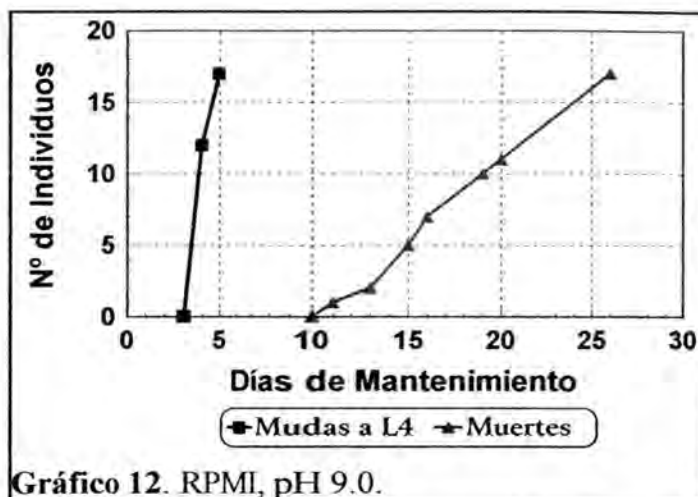


Gráfico 12. RPMI, pH 9.0.

### 5.1.3.3.-CAMBIOS DE pH AL 5° DÍA DE MANTENIMIENTO.

Se han experimentado diversos cambios de pH sobre el medio RPMI. Los cambios de pH se han realizado al 5° día de mantenimiento, cuando todos los parásitos mudaron a L4, con el objetivo de comprobar si un repentino y brusco cambio de pH afecta a su desarrollo. Como control se empleó el medio RPMI a pH 4.0.

En la TABLA IV se expresan resumidamente los resultados de cada uno de los lotes. En todos ellos se observó un 100% de mudas a L4, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 13).

TABLA IV

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5
RPMI, pH 7.2 α 2.0	21	23.3±0.6	25	32	no	no
RPMI, pH 7.2 α 3.0	21	24.0±1.0	24	42	no	no
RPMI, pH 7.2 α 4.0	25	48.0±4.8	41	119	5(20%)	39.2±10.0
RPMI, pH 4.0 α 7.2	24	36.2±1.6	38	50	no	no
RPMI, pH 4.0	21	51.5±4.4	47	115	4(19%)	31.0±10.5

Los cambios de pH 7.2 α 2.0 y 3.0 no parecen aportar grandes beneficios al parásito. El único cambio de pH en el que se observan adultos ha sido de pH 7.2 α 4.0, pero los resultados son muy similares que los del lote control (pH 4.0 durante toda la experiencia).

En el Gráfico 13 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.

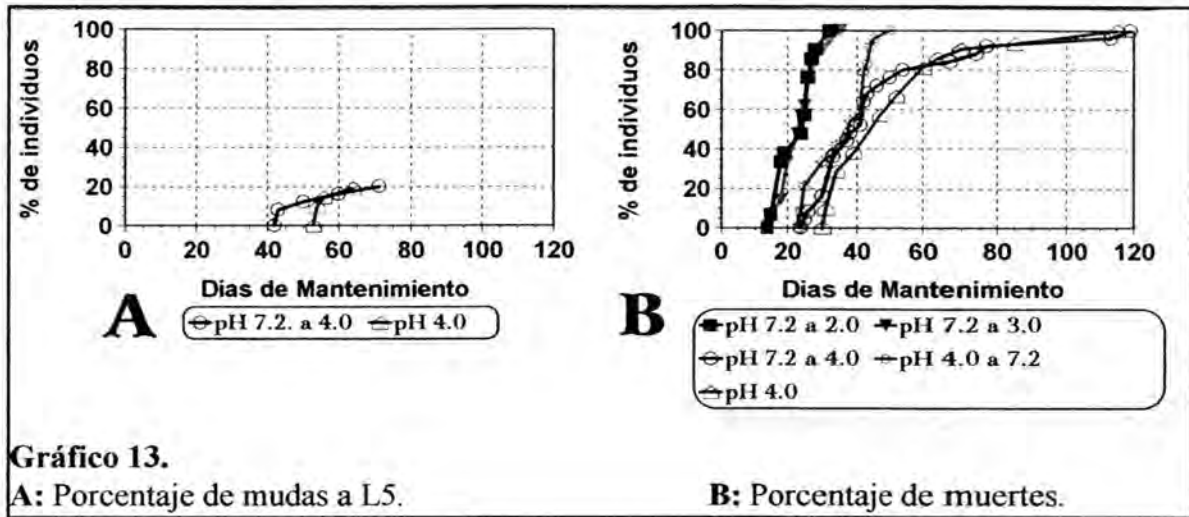


Gráfico 13.

A: Porcentaje de mudas a L5.

B: Porcentaje de muertes.

A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 14 observamos la evolución de los parásitos en el medio RPMI a pH inicial de 7.2, y cambio a 2.0 en el 5º día de mantenimiento. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3º y 4º día de mantenimiento, y se detectaron 7 individuos (33.3%) adheridos al fondo del pocillo entre los días 3º y 5º.

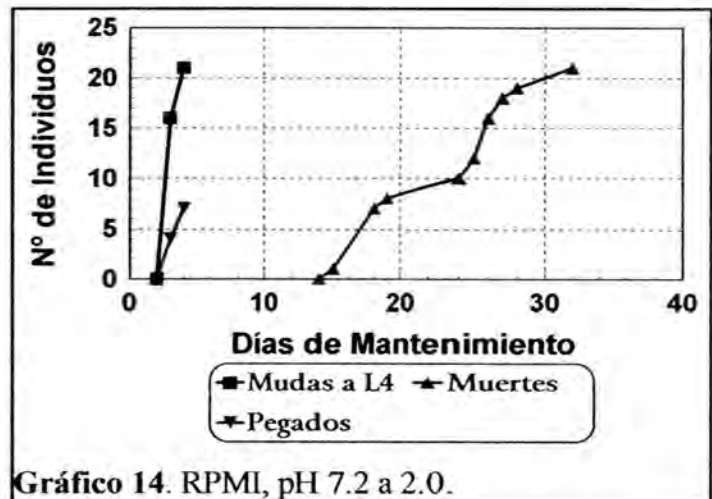


Gráfico 14. RPMI, pH 7.2 a 2.0.

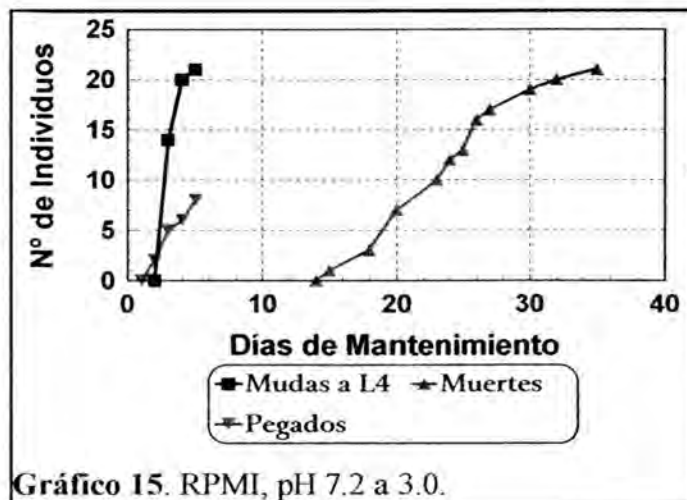


Gráfico 15. RPMI, pH 7.2 a 3.0.

En el Gráfico 15 se observa como cuando se cambia de pH 7.2 a 3.0 al 5º día de mantenimiento, no aparecen diferencias con respecto al cambio a pH 2.0. Todos los parásitos pasan a L4 entre el 3º y 5º día de mantenimiento. Se detectan 8 individuos (38%) adheridos al fondo del pocillo entre los días 2º y 5º.





## 5.1.3.4.-MANTENIMIENTO EN EL MEDIO RPMI+P.

El medio RPMI, se ha suplementado con pepsina en una proporción del 1% (p/v) (RPMI+P), utilizando los pHs más favorables según las experiencias anteriores (pH 7.2 y 4.0). Además, la pepsina fue añadida al medio en diferentes etapas de desarrollo para saber cuándo es necesaria para el parásito.

## 5.1.3.4.1.-pH 7.2.

Se ha realizado una experiencia en el medio RPMI compuesta por tres lotes de parásitos; uno a pH 7.2, al que se le adicionó 1% de pepsina desde el inicio del mantenimiento, y otro al que se le adicionó al 5º día de mantenimiento, cuando todos los individuos mudaron a L4. El tercer lote fue un control con el medio RPMI a pH 7.2 sin pepsina.

En la TABLA V se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos. En todas las experiencias se observó un 100% de mudas a L4, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 19).

TABLA V

Medio	n	S <sub>av</sub> ±ES	S50	S <sub>max</sub>	L5
RPMI+P, pH 7.2	12	29.4±1.0	28	40	no
Inicio: RPMI, pH 7.2 5º día: RPMI+P, pH 7.2	15	27.1±1.8	31	35	no
RPMI, pH 7.2	12	26.5±1.1	27	36	no

A la vista de los resultados, la pepsina a este pH parece no afectar a los parásitos, pues todos los parámetros obtenidos son similares.

En el Gráfico 19 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.

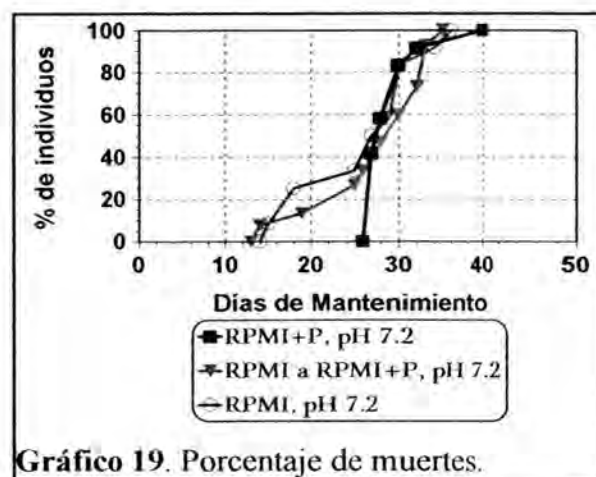


Gráfico 19. Porcentaje de muertes.

En los siguientes gráficos podemos observar la evolución detallada de los parásitos en estos medios de mantenimiento.

En el Gráfico 20 se detalla la evolución de los parásitos en el medio RPMI+P a pH 7.2. Todos los individuos mudaron a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> día. Un total de 3 individuos (25%) se adherieron al fondo del pocillo entre los días 5<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup>.

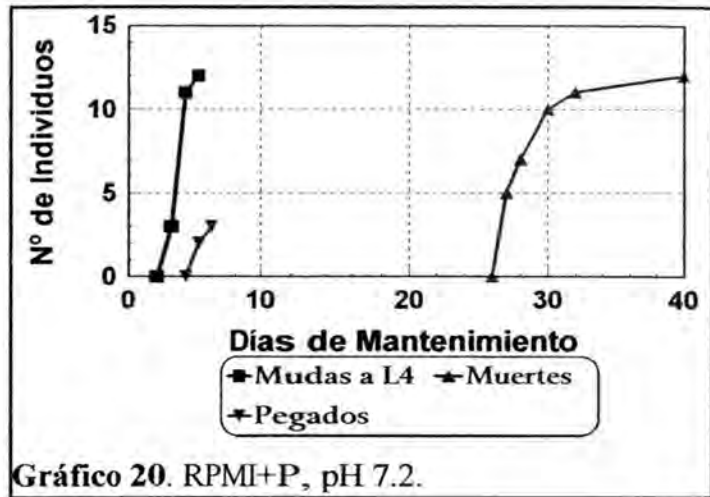


Gráfico 20. RPMI+P, pH 7.2.

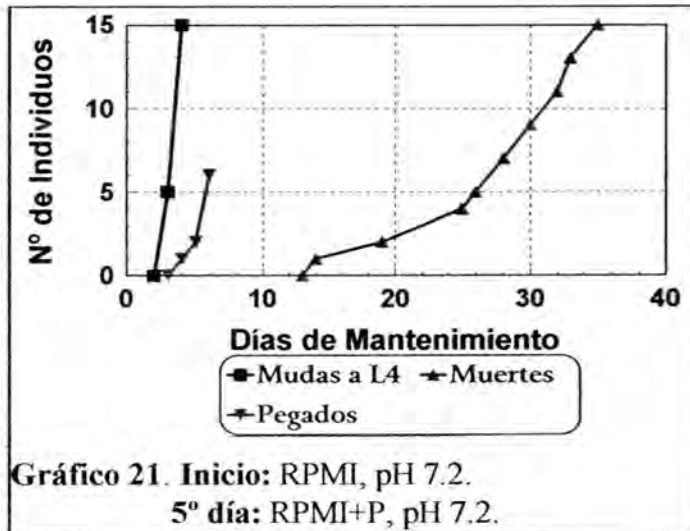


Gráfico 21. Inicio: RPMI, pH 7.2.  
5º día: RPMI+P, pH 7.2.

En el Gráfico 21 se detalla la evolución de los parásitos cuando se inicia el mantenimiento con el medio RPMI a pH 7.2, y se suplementa con 1% de pepsina al 4<sup>o</sup> día. Todos los individuos mudaron a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> día. Se observan 6 individuos (40%) adheridos al fondo del pocillo entre el 4<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> día.

En el Gráfico 22, observamos la evolución de los parásitos en un control con el medio RPMI a pH 7.2. Todos los individuos mudan a L4 y aparecen 9 individuos (75%) pegados al pocillo entre los días 3<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup>.

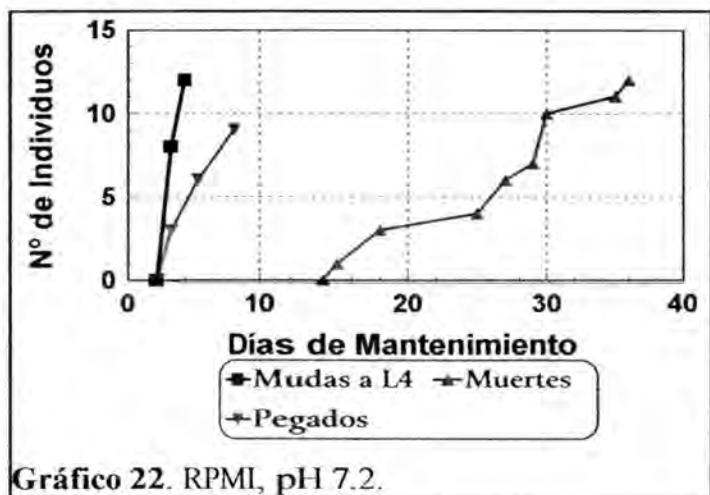


Gráfico 22. RPMI, pH 7.2.

#### 5.1.2.4.2.-ADICIÓN DE PEPSINA EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO. pH 4.0.

Se ha querido comprobar la influencia que tiene la pepsina a pH 4.0, añadiéndola en diferentes etapas de desarrollo del parásito. Así, se hizo una experiencia compuesta por cuatro lotes de parásitos en el medio RPMI. El primer lote se inició con el medio RPMI+P, al segundo se le añadió un 1% de pepsina en el 5° día, al tercero en el 14° día, y al último en el 21° día de mantenimiento. Se realizó un control a pH 4.0 sin pepsina.

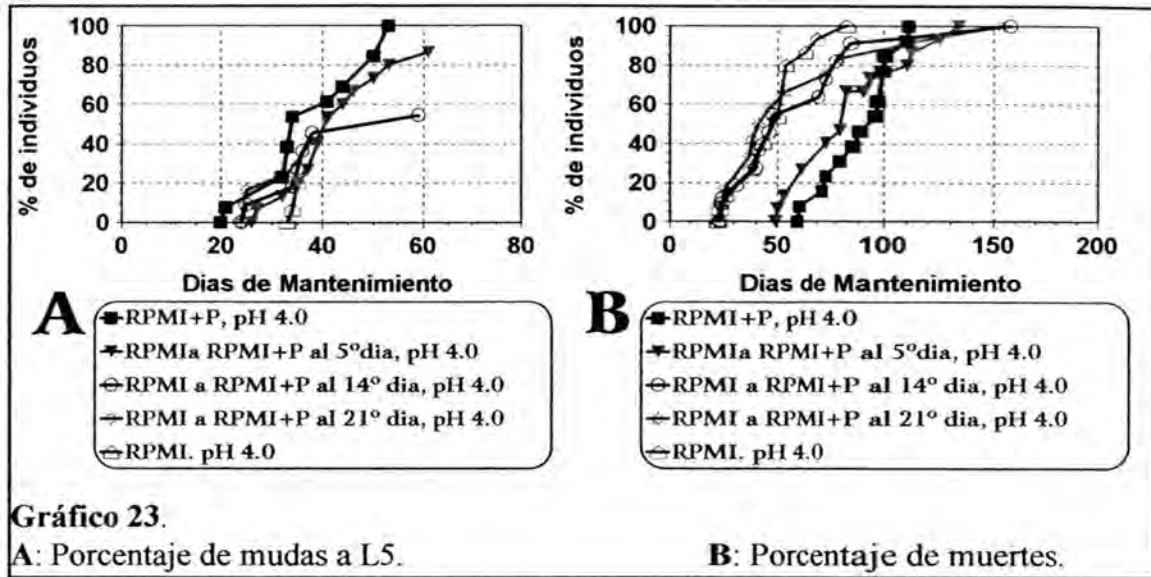
En la TABLA VI se muestra la composición de los lotes y los resultados obtenidos. En todas las experiencias se observó un 100% de mudas a L4, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 23).

TABLA VI

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5
RPMI+P, pH 4.0	13	91.3±4.1	97	111	13(100%)	51.8±5.3
Inicio: RPMI, pH 4.0 5° día: RPMI+P, pH 4.0	15	87.0±6.5	85	134	13(86.6%)	49.9±7.0
Inicio: RPMI, pH 4.0 14° día: RPMI+P, pH 4.0	11	63.8±11.2	48	158	6(54.5%)	48.6±16.7
Inicio: RPMI, pH 4.0 21° día: RPMI+P, pH 4.0	12	60.5±11.2	41	154	5(41.6%)	56.2±17.4
RPMI, pH 4.0	15	50.0±3.7	50	85	3(20.0%)	31.5±2.4

La pepsina parece ejercer un efecto positivo sobre los parásitos en todos los casos con respecto al mantenimiento sin pepsina. Pero si se añade desde el principio del mantenimiento, los parámetros referentes a Sav, S50 y número de L5 se ven incrementados con respecto a la adición posterior de pepsina.

En el Gráfico 23 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.



En los siguientes gráficos podemos observar la evolución detallada de los parásitos en estos medios de mantenimiento.

En el Gráfico 24 podemos observar como en el medio RPMI+P, el porcentaje de muda a L4 sigue siendo del 100% entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Además, todos los individuos mudaron a L5 entre los días 20<sup>o</sup> y 52<sup>o</sup>, observándose 5 machos (38.4%) y 8 hembras (61.6%).

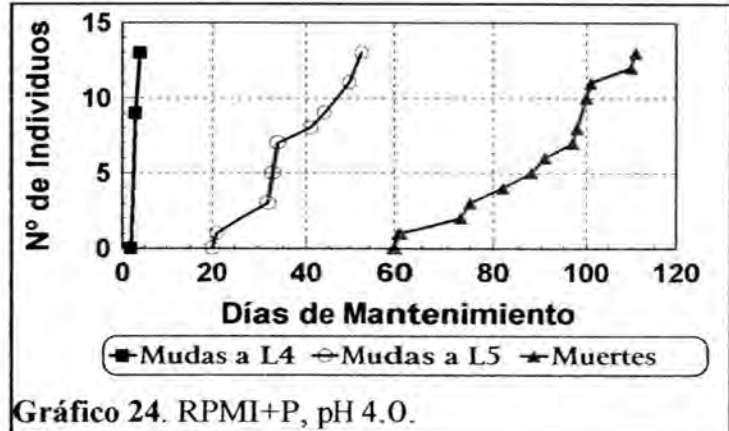
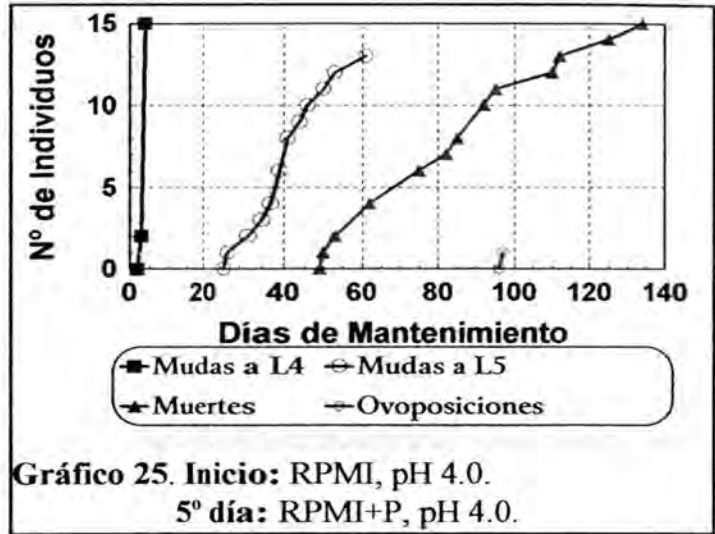
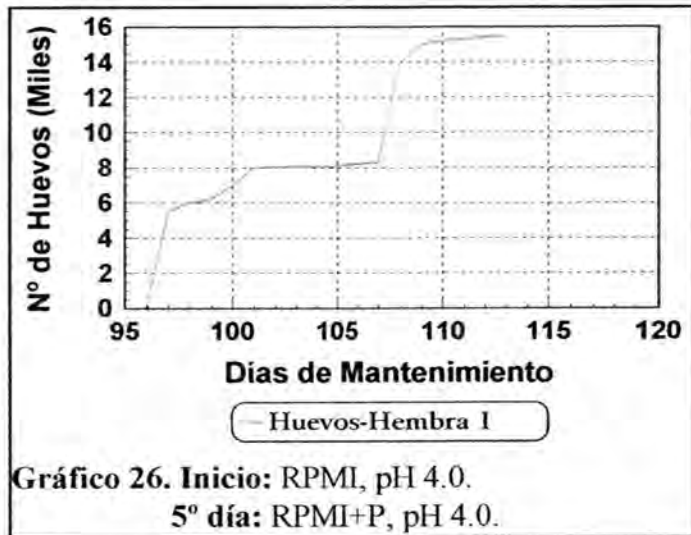


Gráfico 24. RPMI+P, pH 4.0.

En el Gráfico 25, podemos observar los resultados obtenidos cuando comenzamos con el medio RPMI a pH 4.0, y al 5° día adicionamos 1% de pepsina. Todos los individuos mudan a L4 entre el tercer y cuarto día de mantenimiento. Se observan 13 individuos adultos (86.6%), entre los días 27° y 60°, de los que 6 fueron machos (46.1%) y 7 hembras (53.9%). Además una de las hembras (14.2% de hembras) ovopositó el día 97° de mantenimiento, 51 días después de realizar la M4.



**Gráfico 25. Inicio:** RPMI, pH 4.0.  
**5° día:** RPMI+P, pH 4.0.



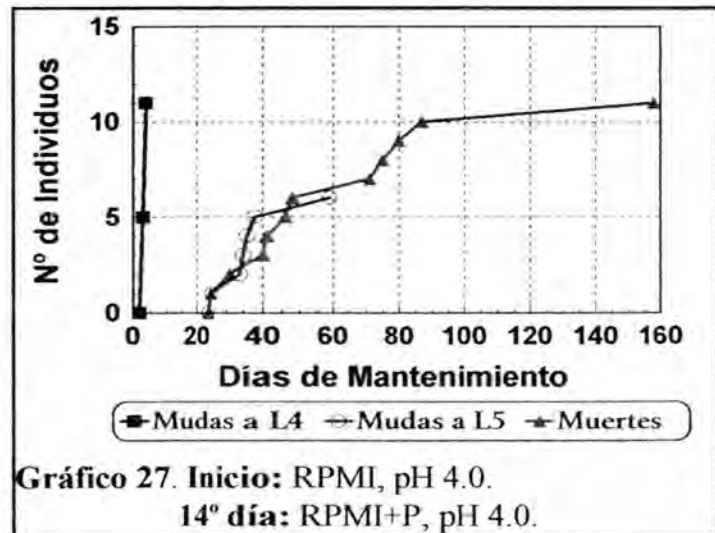
**Gráfico 26. Inicio:** RPMI, pH 4.0.  
**5° día:** RPMI+P, pH 4.0.

**Gráfico 26.**

El número total de huevos fue de 15442, que se contaron durante un espacio de 16 días (desde el día 97° hasta el día 113° de mantenimiento).

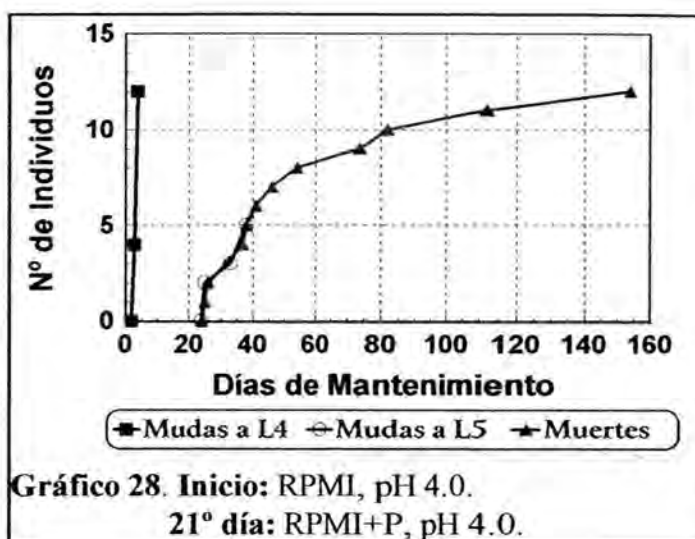
El número máximo de huevos ovopositados en un día fue de 5672.

En el Gráfico 27 observamos detalladamente la evolución de los parásitos en el medio RPMI a pH 4.0, y adición de pepsina al 14° día de mantenimiento. Todos los parásitos mudan a L4 entre el 3° y 4° día de mantenimiento. Entre el día 25° y 60° se desarrollan 6 individuos (54.5%) a L5, 2 machos (40%) y 4 hembras (60%).

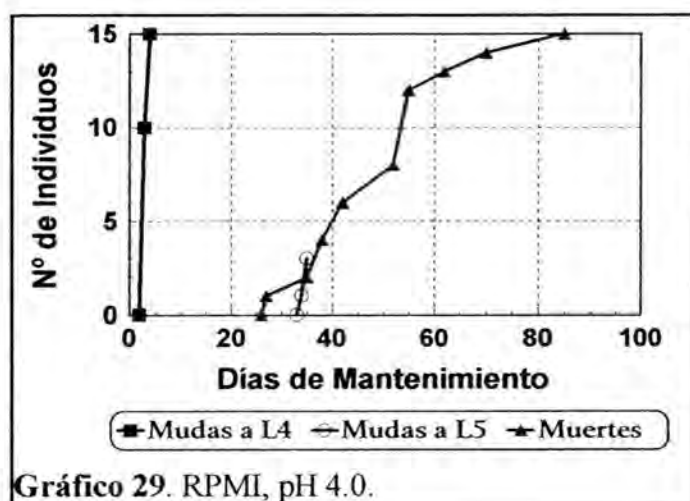


**Gráfico 27. Inicio:** RPMI, pH 4.0.  
**14° día:** RPMI+P, pH 4.0.

En el Gráfico 28 se observa la evolución de los parásitos cuando se comienza con el medio RPMI a pH 4.0, y se cambia a RPMI+P en el 21<sup>er</sup> día. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Se observaron 5 individuos L5 (41%) entre los días 25<sup>o</sup> y 38<sup>o</sup>, de los que 3 fueron machos (60%) y 2 hembras (40%).



**Gráfico 28.** Inicio: RPMI, pH 4.0.  
21<sup>o</sup> día: RPMI+P, pH 4.0.



**Gráfico 29.** RPMI, pH 4.0.

En el Gráfico 29 observamos la experiencia control con RPMI a pH 4.0. Todos los parásitos mudaron a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

Se observaron 3 individuos (20%) en estadio L5, dos machos (66.6%) y una hembra (33.3%), entre los días 34<sup>o</sup> y 35<sup>o</sup>.

#### 5.1.3.5.-MODIFICACIONES CON MEDIO RPMI y RPMI+P a pH CONSTANTE.

Se ha suplementado el medio RPMI+P, a pH 4.0, con:

- 4 mM de glutatión, medio descrito como RPMI+P+G.
- 4 mM de L-cisteína, medio descrito como RPMI+P+C.

Se ha suplementado también el medio RPMI, a pH 4.0, con:

- 4 mM de glutatión, medio descrito como RPMI+G.
- 4 mM de L-cisteína, medio descrito como RPMI+C.
- Pepsina al 5% (p/v), medio descrito como RPMI+5%P.

Como controles, se han utilizado los medios RPMI+P y RPMI, a pH 4.0.

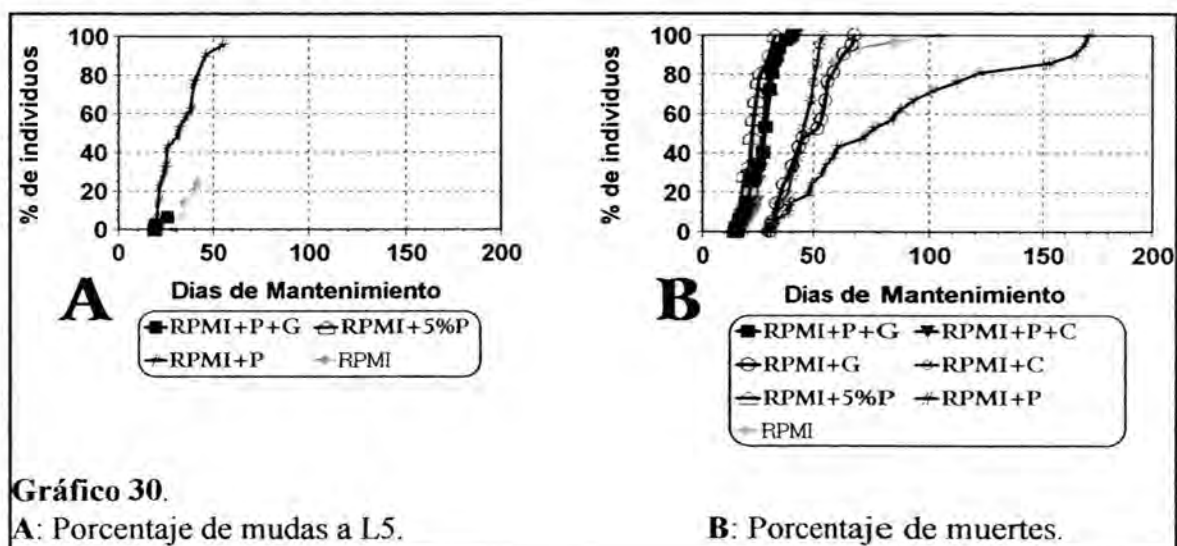
En la TABLA VII se expresan resumidamente los resultados de cada una de las experiencias. En todas las experiencias se observó un 100% de mudas a L4, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 30).

TABLA VII

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5
RPMI+P+G, pH 4.0	47	27.5±0.8	28	40	3(6.3%)	19.5±10.2
RPMI+P+C, pH 4.0	47	28.2±0.6	27	42	no	no
RPMI+G, pH 4.0	21	49.5±2.7	52	70	no	no
RPMI+C, pH 4.0	21	45.1±1.5	45	55	no	no
RPMI+5%P, pH 4.0	21	23±0.8	23	32	1(4.7%)	3.0
RPMI+P, pH 4.0	21	88.0±9.8	78	171	20(95.2%)	62.6±17.6
RPMI, pH 4.0	29	50.1±3.1	49	104	7(24.1%)	31.4±5.8

Según estos datos, la adición de glutatión, cisteína ó 5% de pepsina al medio no mejora los resultados obtenidos en las experiencias control.

En el Gráfico 30 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.



En los siguientes gráficos podemos observar la evolución detallada de los parásitos en estos medios de mantenimiento.

En el Gráfico 31 se muestra la evolución de los parásitos en el medio RPMI+P+G. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Los parámetros de supervivencia son bastante pobres, pero se observan 3 individuos (6.3%) que mudaron a L5 entre los días 20<sup>o</sup> y 26<sup>o</sup>, de los que 2 fueron machos (66.6%) y una hembra (33.3%).

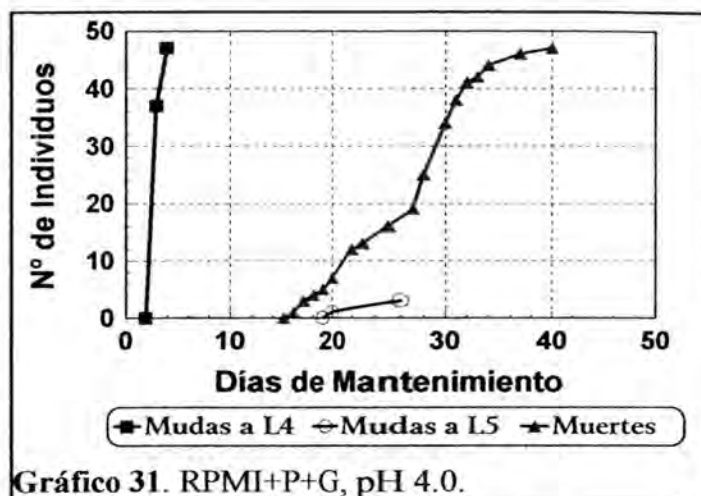


Gráfico 31. RPMI+P+G, pH 4.0.

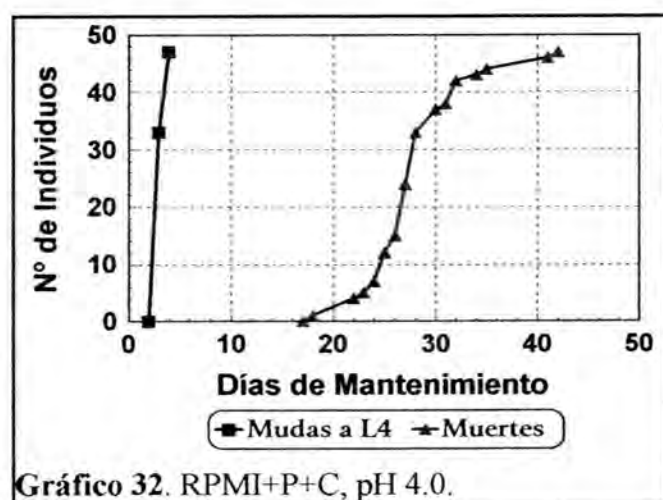


Gráfico 32. RPMI+P+C, pH 4.0.

En el Gráfico 32 se observa como el medio RPMI+P+C no aportó ningún beneficio a los parásitos. Aunque todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento, no se observan L5, y los parámetros de supervivencia son pobres.

En el Gráfico 33 se detalla la evolución de los parásitos en el medio RPMI+G. Aunque todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento, no se observa ningún individuo en estado L5.

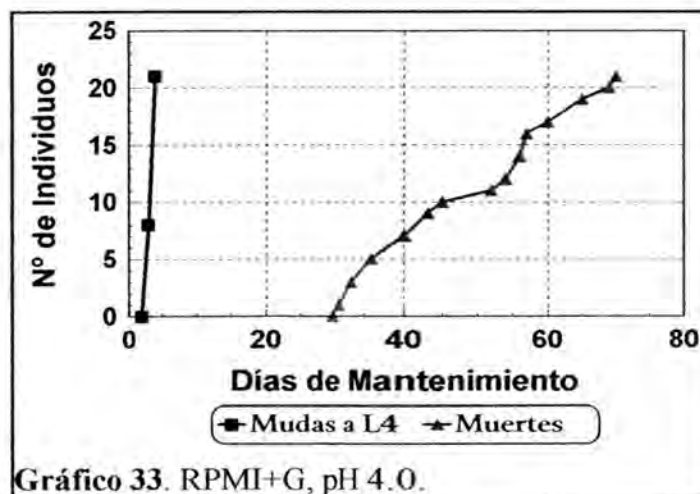


Gráfico 33. RPMI+G, pH 4.0.



En el Gráfico 34 podemos observar como en el medio RPMI+C, todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 5<sup>o</sup> día de mantenimiento, y no se observa ninguna L5. Los parámetros de supervivencia son menores con respecto a la experiencia anterior.

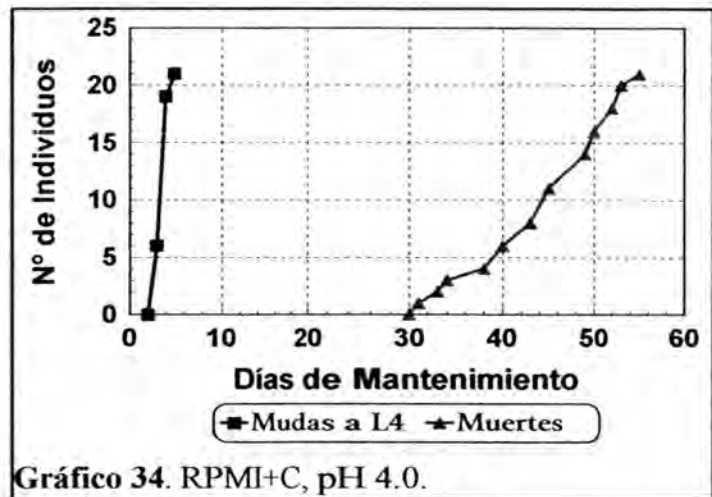


Gráfico 34. RPMI+C, pH 4.0.

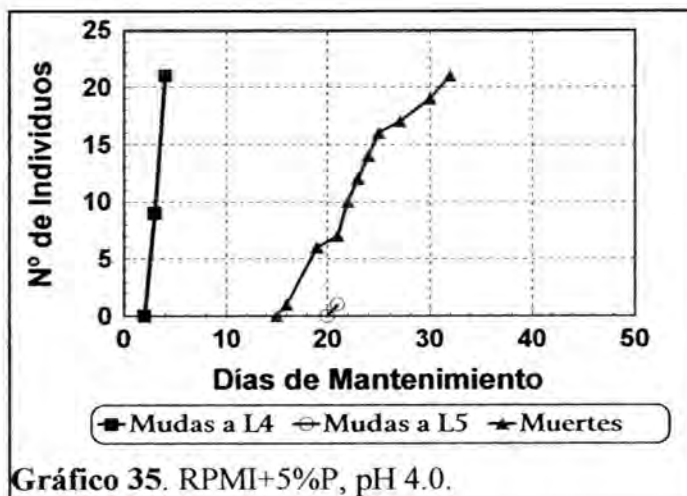


Gráfico 35. RPMI+5%P, pH 4.0.

En el Gráfico 35 se muestran los resultados obtenidos con el medio RPMI+5%P. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Se observa que un individuo muda a L5 (6.7%) el día 21<sup>o</sup>, macho, pero muere a los 3 días.

En el Gráfico 36 se detalla la evolución de los parásitos en el medio control RPMI+P, a pH 4.0. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Se observan 20 L5 (95.2%) entre los días 22<sup>o</sup> y 56<sup>o</sup>, de los que 11 resultaron machos (55%) y 9 hembras (45%).

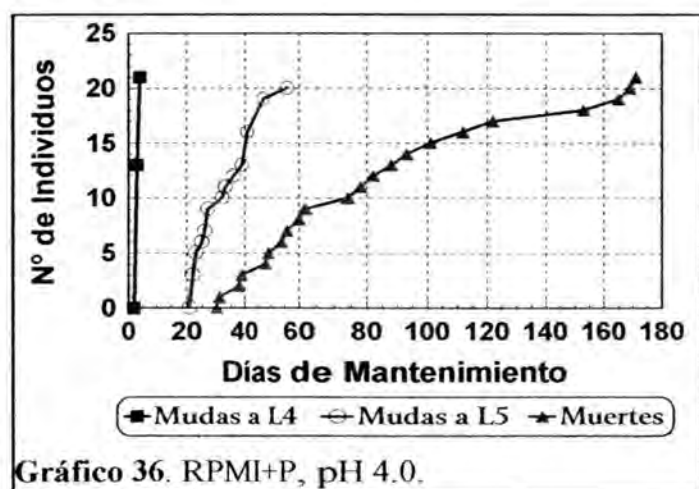


Gráfico 36. RPMI+P, pH 4.0.

En el Gráfico 37 se detalla la evolución de los parásitos en el medio control RPMI a pH 4.0. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Se observan 7 L5 (24.1%) entre los días 30<sup>o</sup> y 42<sup>o</sup>, de los que 3 resultaron machos (42.8%) y 4 hembras (57.1%).

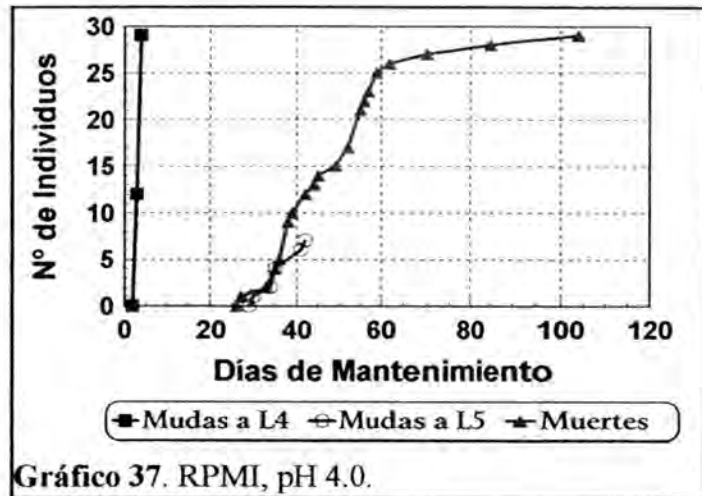


Gráfico 37. RPMI, pH 4.0.

A continuación, se inició otra experiencia en el medio RPMI a pH 2.0 y pH 4.0. Para cada uno de estos pHs, el medio se suplementó, en un lote, con pepsina al 1%, en otro lote con sangre al 5%, y el último lote con suero al 40%.

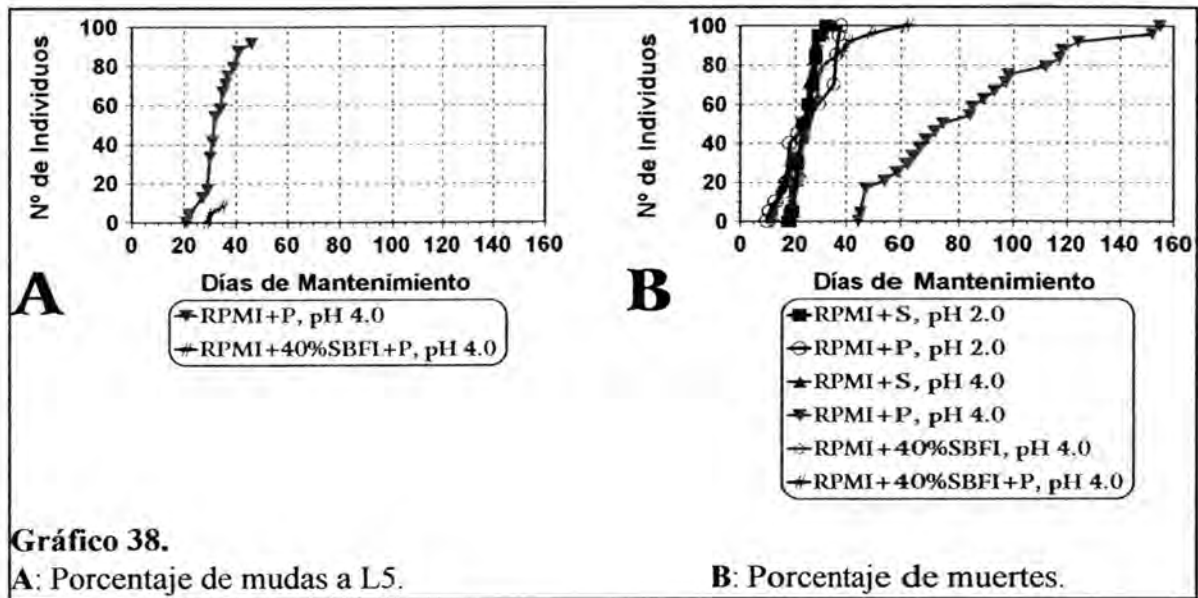
En la TABLA VIII se muestra la composición de los lotes y los resultados obtenidos. En todas las experiencias se observó un 100% de mudas a L4, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 38).

TABLA VIII.

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5
RPMI+S, pH 2.0	20	24.7±0.8	23	32	no	no
RPMI+P, pH 2.0	20	26.0±2.1	23	38	no	no
RPMI+S, pH 4.0	24	24.5±0.7	24	35	no	no
RPMI+P, pH 4.0	24	84.0±6.4	74	155	22(91.6%)	56.1±5.9
RPMI+40%SBFI, pH 4.0	24	24.8±0.8	23	35	no	no
RPMI+40%SBFI+P, pH 4.0	22	28.2±2.4	25	62	2(9.0%)	24.0±4.0

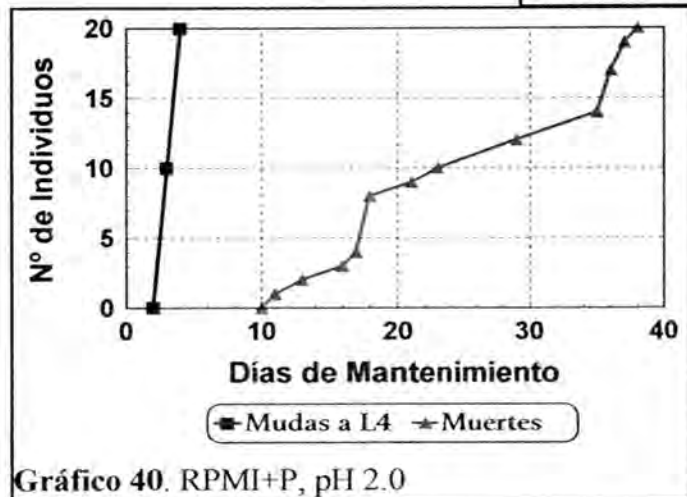
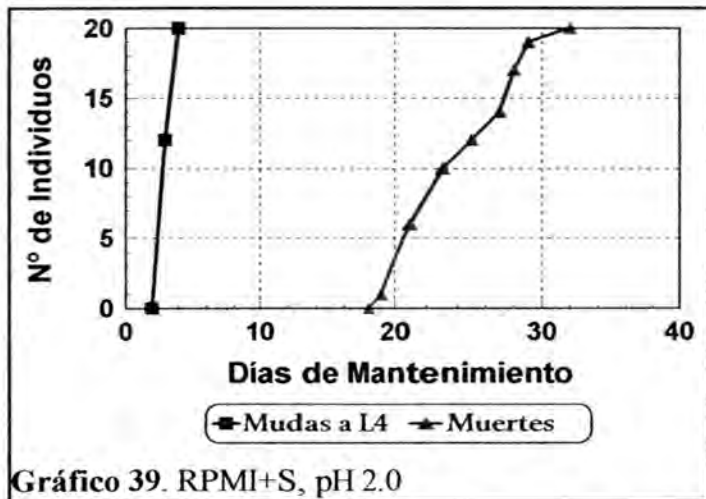
Mientras que el medio RPMI+P a pH 4.0 influye de manera positiva sobre el desarrollo de los parásitos, como se ha puesto de manifiesto en experiencias anteriores, las demás modificaciones han disminuido las posibilidades de los parásitos en este medio.

En el Gráfico 38 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.



En los siguientes gráficos podemos observar la evolución detallada de los parásitos en estos medios de mantenimiento.

En el Gráfico 39 se muestran los resultados cuando se emplea el medio RPMI+S a pH 2.0. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día. Se observó que el parásito ingería sangre pues su intestino aparecía con segmentos más oscuros que en medios sin sangre.



En el Gráfico 40 se indican los resultados obtenidos con el medio RPMI+P, pH 2.0. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

En el Gráfico 41 observamos la evolución de los parásitos en el medio RPMI+S, pH 4.0. Todos los parásitos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

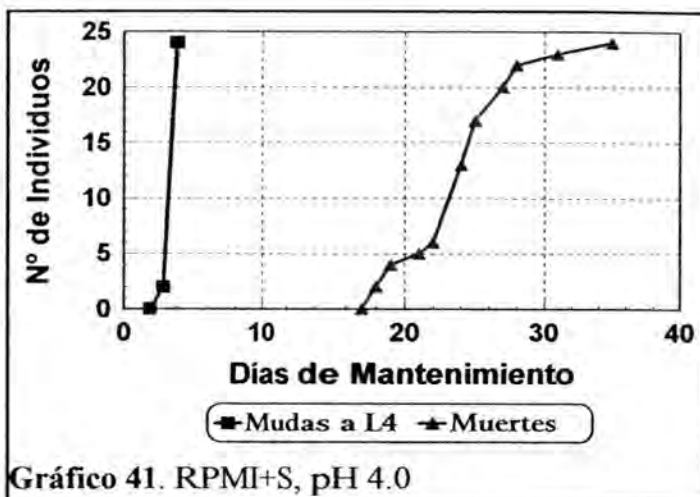


Gráfico 41. RPMI+S, pH 4.0

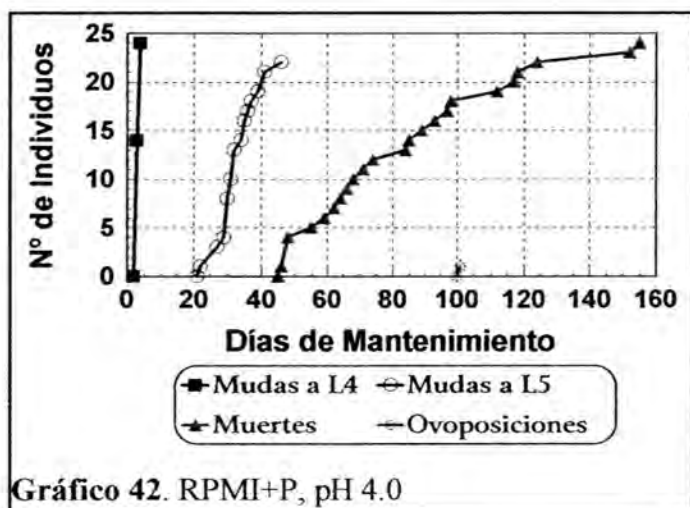


Gráfico 42. RPMI+P, pH 4.0

En el Gráfico 42 se detalla la evolución de los parásitos en el medio RPMI+P, pH 4.0. Todos los parásitos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento. Entre los días 22<sup>o</sup> y 46<sup>o</sup> se observan 22 individuos (91.6%) en estadio L5, de los que 10 fueron machos (45.8%) y 12 hembras (54.2%). Una de las hembras (7.8%) ovopositó en día 101<sup>o</sup>, 55 días después de mudar a L5.

En el Gráfico 43 se detalla la curva de ovoposición de esta hembra.

El total de huevos contados asciende a 190793, durante un período comprendido entre el día 101<sup>o</sup> al 143<sup>o</sup> (42 días). El número máximo de huevos contados en un día fue de 16790 en el día 113<sup>o</sup>.

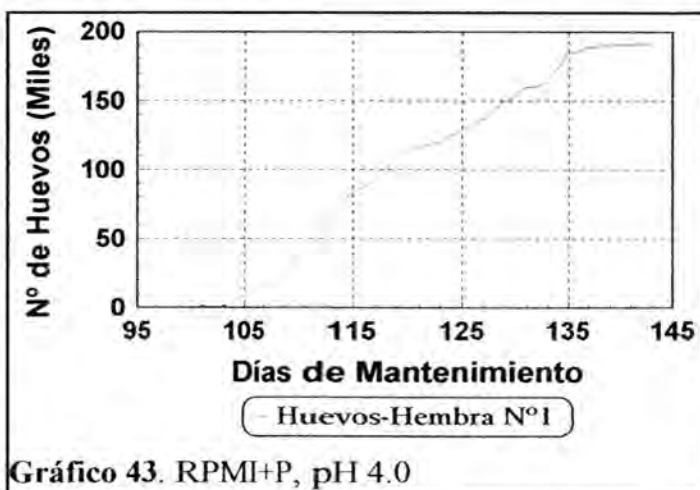


Gráfico 43. RPMI+P, pH 4.0

En el Gráfico 44 se aprecia como el suplemento del 40% de suero no es muy favorable para los parásitos. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día de mantenimiento.

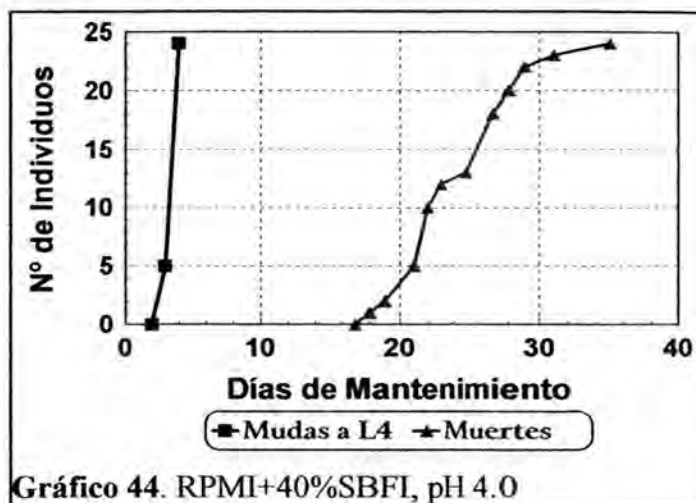


Gráfico 44. RPMI+40%SBFI, pH 4.0

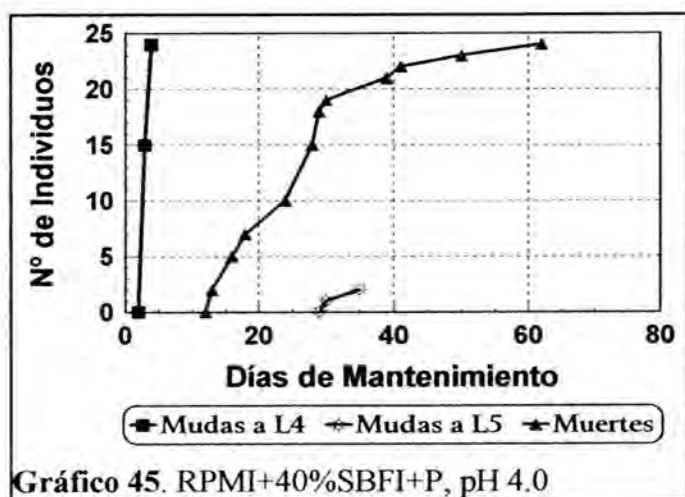


Gráfico 45. RPMI+40%SBFI+P, pH 4.0

En el Gráfico 45 se detalla la evolución de los parásitos en el medio RPMI+40%SBFI+P, a pH 4.0. Parece que la pepsina influye positivamente pues se observan 2 adultos (8.3%) entre los días 30<sup>o</sup> y 35<sup>o</sup>, un macho y una hembra. Además la supervivencia máxima es de 62 días. Sin embargo, el suplemento de suero al 40% no parece influir positivamente si comparamos este gráfico con el 42 (20% de suero).

### 5.1.3.6.-TABLA RESUMEN DE LOS MANTENIMIENTOS DE Anisakis simplex Y ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.

Con todos los resultados presentados hasta ahora, se resumen en la siguiente página los resultados de todas las experiencias (RESUMEN 1).

RESUMEN I. Mantenimientos de *A. simplex* en diferentes condiciones.

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5	O	NHT
SS, atmósfera aire	18	10.5±0.5	10	16	no	0	no	no
SS, atmósfera 5% CO <sub>2</sub>	24	10.0±0.4	10	15	no	0	no	no
PBS, atmósfera aire	21	7.3±0.5	7	13	no	0	no	no
PBS, atmósfera 5% CO <sub>2</sub>	26	18.9±1.6	19	35	no	0	no	no
RPMI, atmósfera aire	25	6.4±0.2	7	10	no	0	no	no
RPMI, atmósfera 5% CO <sub>2</sub>	22	24.9±0.8	22	37	no	0	no	no
RPMI, pH 2.0	17	31.0±3.0	32	46	no	0	no	no
RPMI, pH 4.0	14	49.4±4.8	44	104	4(28.6%)	26.7±8.9	no	no
RPMI, pH 7.2	17	23.5±2.5	20	40	no	0	no	no
RPMI, pH 9.0	17	19.6±1.2	19	26	no	0	no	no
RPMI, pH 7.2 α 2.0	21	23.3±0.6	25	32	no	0	no	no
RPMI, pH 7.2 α 3.0	21	24.0±1.0	24	42	no	0	no	no
RPMI, pH 7.2 α 4.0	25	48.0±4.9	41	119	5(20.0%)	39.2±10.0	no	no
RPMI, pH 4.0 α 7.2	24	36.2±1.6	38	50	no	0	no	no
RPMI, pH 4.0	21	51.5±4.4	47	115	4(19.0%)	31.0±10.5	no	no
RPMI+P, pH 7.2	12	29.4±1.0	28	40	no	0	no	no
Inicio: RPMI, pH 7.2. 5° día: RPMI+P, pH 7.2	15	27.1±1.8	31	35	no	0	no	no
RPMI, pH 7.2	12	26.5±1.1	27	36	no	0	no	no
RPMI+P, pH 4.0	13	91.3±4.1	97	111	13(100%)	51.8±5.3	no	no
Inicio: RPMI, pH 4.0. 5° día: RPMI+P, pH 4.0	15	87.0±6.5	85	134	13(86.6%)	49.9±7.0	no	no
Inicio: RPMI, pH 4.0. 14° día: RPMI+P, pH 4.0	11	63.8±11.2	48	158	6(54.5%)	48.6±16.7	1(14.2%)	15442
Inicio: RPMI, pH 4.0. 21° día: RPMI+P, pH 4.0	12	60.5±11.2	41	154	5(41.6%)	56.2±17.4	no	no
RPMI, pH 4.0	15	50.0±3.7	50	85	3(20.0%)	31.5±2.5	no	no
RPMI+P+G, pH 4.0	47	27.5±0.8	28	40	3(6.3%)	19.5±10.2	no	no
RPMI+P+C, pH 4.0	47	28.2±0.6	27	42	no	no	no	no
RPMI+G, pH 4.0	21	49.5±2.7	52	70	no	no	no	no
RPMI+C, pH 4.0	21	45.1±1.5	45	55	no	no	no	no

RESUMEN 1. Mantenimientos de *A. simplex* en diferentes condiciones (2).

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5	O	NHT
RPMI+5%P, pH 4.0	21	23.0±0.8	23	32	1(4.7%)	3.0±0	no	no
RPMI+P, pH 4.0	21	88.0±9.8	78	171	20(95.2%)	62.6±17.6	no	no
RPMI, pH 4.0	29	50.1±3.1	49	104	7(24.1%)	31.4±5.8	no	no
RPMI+S, pH 2.0	20	24.7±0.8	23	32	no	no	no	no
RPMI+P, pH 2.0	20	26.0±2.1	23	38	no	no	no	no
RPMI+S, pH 4.0	24	24.5±0.8	24	35	no	no	no	no
RPMI+P, pH 4.0	24	84.0±6.4	74	155	22(91.6%)	56.1±5.9	1(7.8%)	190793
RPMI+40%SBFI, pH 4.0	24	24.8±0.8	23	35	no	no	no	no
RPMI+40%SBFI+P, pH 4.0	22	28.2±2.4	25	62	2(9.0%)	24.0±4.0	no	no

En las siguientes tablas se indica el valor de P (calculado a partir del método estadístico de la "t" de Student) en las que se han comparado la Sav±ES de cada uno de los lotes que componen las distintas experiencias realizadas. Se considera que existe diferencia significativa entre un par de valores para  $P < 0.05$ .

Medios SS, PBS y RPMI (pH 7.2) con y sin CO<sub>2</sub> al 5%.

	SS, Aire	SS, CO <sub>2</sub>	PBS, Aire	PBS, CO <sub>2</sub>	RPMI, Aire
SS, CO <sub>2</sub>	0.42, ns <sup>1</sup>				
PBS, Aire	$4.1 \cdot 10^{-5}$	$9.6 \cdot 10^{-5}$			
PBS, CO <sub>2</sub>	$3 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$3.5 \cdot 10^{-7}$		
RPMI, Aire	$2.3 \cdot 10^{-6}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$8.5 \cdot 10^{-2}$ , ns	$1.1 \cdot 10^{-7}$	
RPMI, CO <sub>2</sub>	$2.2 \cdot 10^{-6}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$1.6 \cdot 10^{-7}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$

ns<sup>1</sup>: diferencia no significativa.

Medio RPMI a diferentes pHs.

	pH 2.0	pH 4.0	pH 7.2
pH 4.0	$2.7 \cdot 10^{-3}$		
pH 7.2	$6.3 \cdot 10^{-2}$ , ns	$7.5 \cdot 10^{-5}$	
pH 9.0	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$	0.16, ns

Medio RPMI. Cambios de pH al 5° día de mantenimiento.

	7.2 α 2.0	7.2 α 3.0	7.2 α 4.0	4.0 α 7.2
7.2 α 3.0	0.53, ns			
7.2 α 4.0	$4.8 \cdot 10^{-5}$	$7.1 \cdot 10^{-5}$		
4.0 α 7.2	0	$2.3 \cdot 10^{-7}$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	
4.0	$2.2 \cdot 10^{-6}$	$5.4 \cdot 10^{-6}$	0.6, ns	$2.6 \cdot 10^{-3}$

Medios RPMI y RPMI+P, pH 4.0.

	RPMI+P	Inicio: RPMI 5° día: RPMI+P
Inicio: RPMI 5° día: RPMI+P	0.25, ns	
RPMI	$6.1 \cdot 10^{-2}$ , ns	0.76, ns



Medios RPMI y RPMI+P, pH 4.0.

	RPMI+P	Inicio: RPMI 5° día: RPMI+P	Inicio: RPMI 14° día: RPMI+P	Inicio: RPMI 21° día: RPMI+P
Inicio: RPMI 5° día: RPMI+P	0.56, ns			
Inicio: RPMI 14° día: RPMI+P	$3.1 \cdot 10^{-2}$	0.07, ns		
Inicio: RPMI 21° día: RPMI+P	$1.7 \cdot 10^{-2}$	$4.6 \cdot 10^{-2}$	0.83, ns	
RPMI	$2.9 \cdot 10^{-7}$	$3.8 \cdot 10^{-5}$	0.24, ns	0.36, ns

Diferentes suplementos sobre el medio RPMI, pH 4.0.

	RPMI+P+G	RPMI+P+C	RPMI+G	RPMI+C	RPMI+5%P
RPMI+P+C	0.48, ns				
RPMI+G	$1.7 \cdot 10^{-7}$	$2.2 \cdot 10^{-6}$			
RPMI+C	$2.2 \cdot 10^{-6}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	0.15, ns		
RPMI+5%P	$2.2 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-6}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$2.2 \cdot 10^{-6}$	
RPMI+P	$6.9 \cdot 10^{-6}$	$7.6 \cdot 10^{-6}$	$7.9 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-6}$

Suplemento del medio RPMI con sangre, pepsina y 40% de suero, a pHs 2.0 y 4.0.

	RPMI+S pH 2.0	RPMI+P pH 2.0	RPMI+S pH 4.0	RPMI+P pH 4.0	RPMI+40%SBFI pH 4.0
RPMI+P, pH 2.0	0.55, ns				
RPMI+S, pH 4.0	0.85, ns	0.49, ns			
RPMI+P, pH 4.0	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	$5.9 \cdot 10^{-8}$		
RPMI+40%SBFI, pH 4.0	0.92, ns	0.58, ns	0.78, ns	$5.9 \cdot 10^{-8}$	
RPMI+40%SBFI+P, pH 4.0	0.18, ns	0.49, ns	0.14, ns	0	0.17, ns

5.2.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Hysterothylacium aduncum*.

5.2.1.-DETALLES MORFOLÓGICOS DE L3, L4 Y ADULTOS DE *Hysterothylacium aduncum*.

Como resultado de los mantenimientos realizados, se presentan las siguientes fotografías de los estados larvarios L3, L4 y adultos.

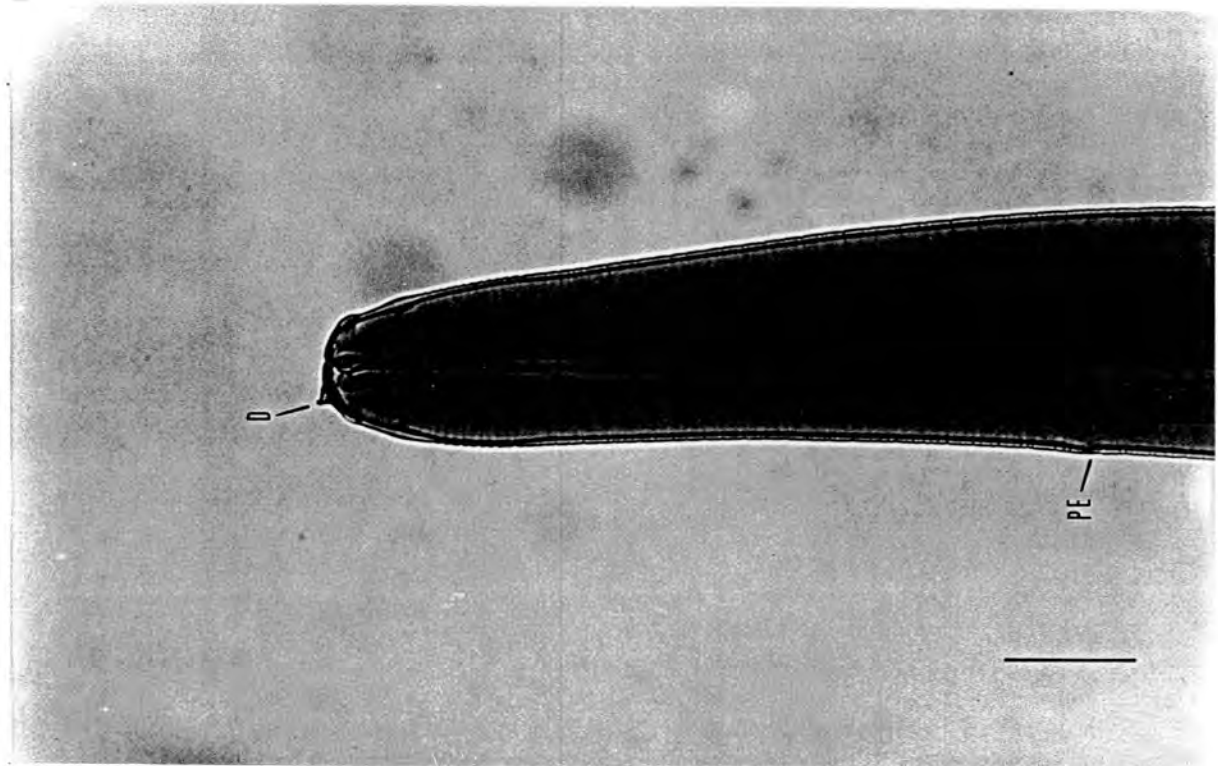


Foto 27. Extremo anterior de L3 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu$ m. D=Diente. PE=Poro excretor.

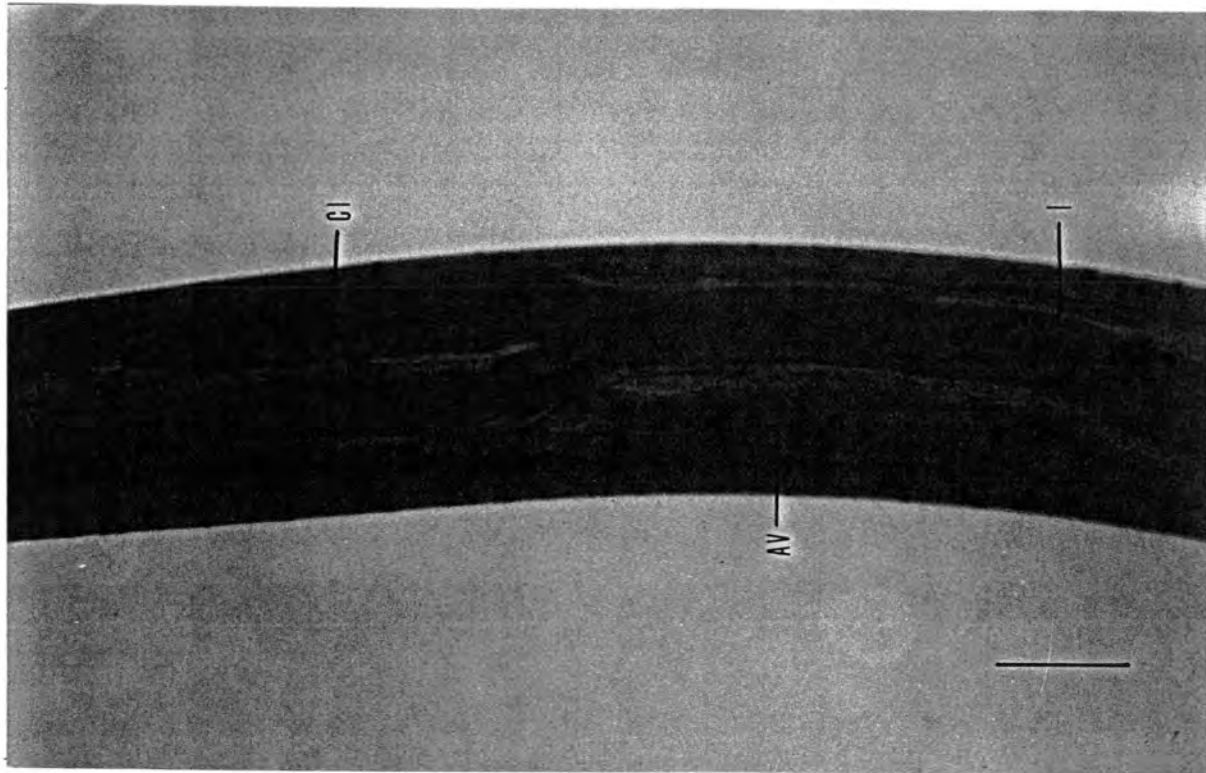


Foto 28. Parte anterior de L3 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ . CI=Ciego intestinal. AV=Apéndice ventricular. I=Intestino.

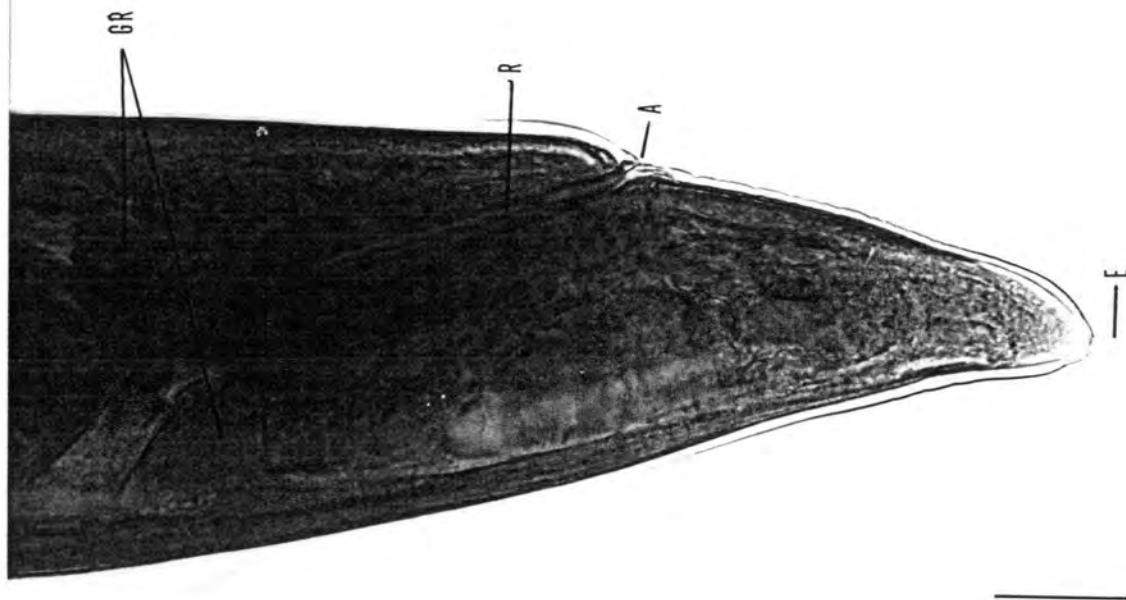


Foto 29. Extremo posterior de L3 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ . GR=Glándulas rectales. R=Recto. A=Ano. E=Espina.

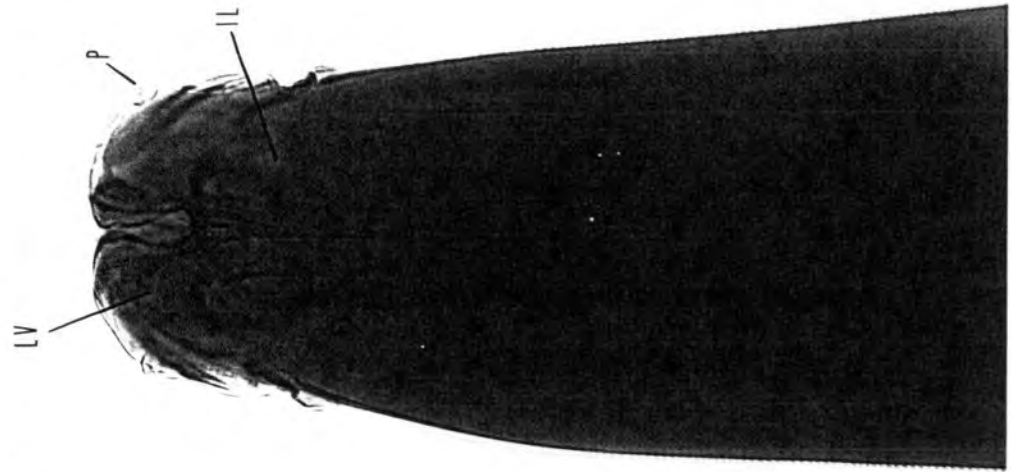


Foto 30. Extremo anterior de L4 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ . LV=Labio ventral. P=Papila. IL=Interlabio.

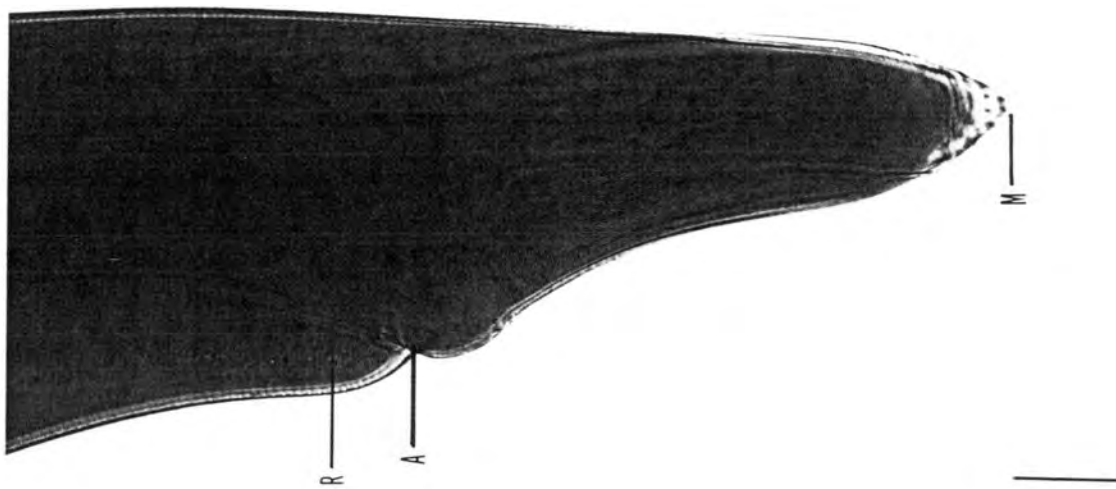


Foto 31. Extremo posterior de L4 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ . R=Recto. A=Año. M=Mucrón.

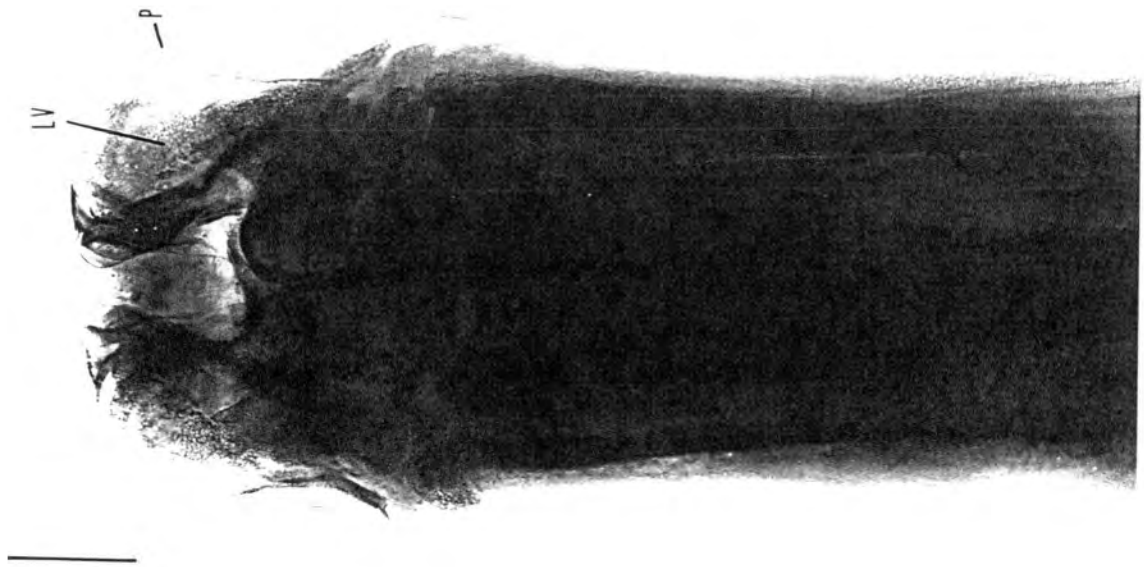


Foto 32. Extremo anterior de adulto macho de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ . LV=Labio ventral. P=Papila.

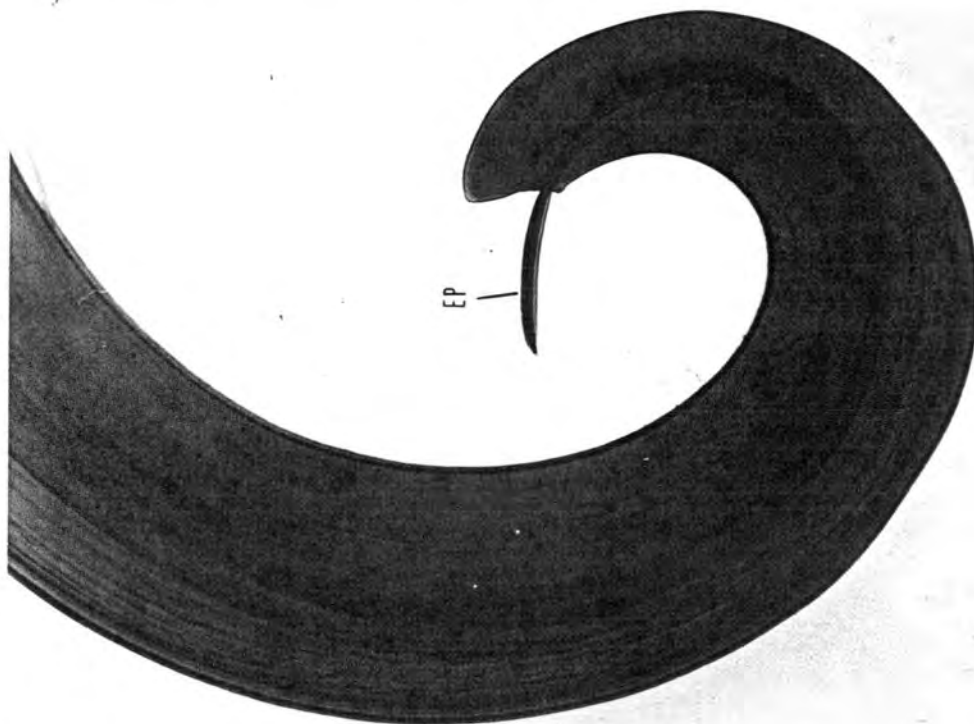


Foto 33. Extremo posterior de adulto macho de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ . EP=Espícula.



Foto 34. Detalle de la parte posterior de adulto macho de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a  $50 \mu\text{m}$ . PP=Papilas preanales.

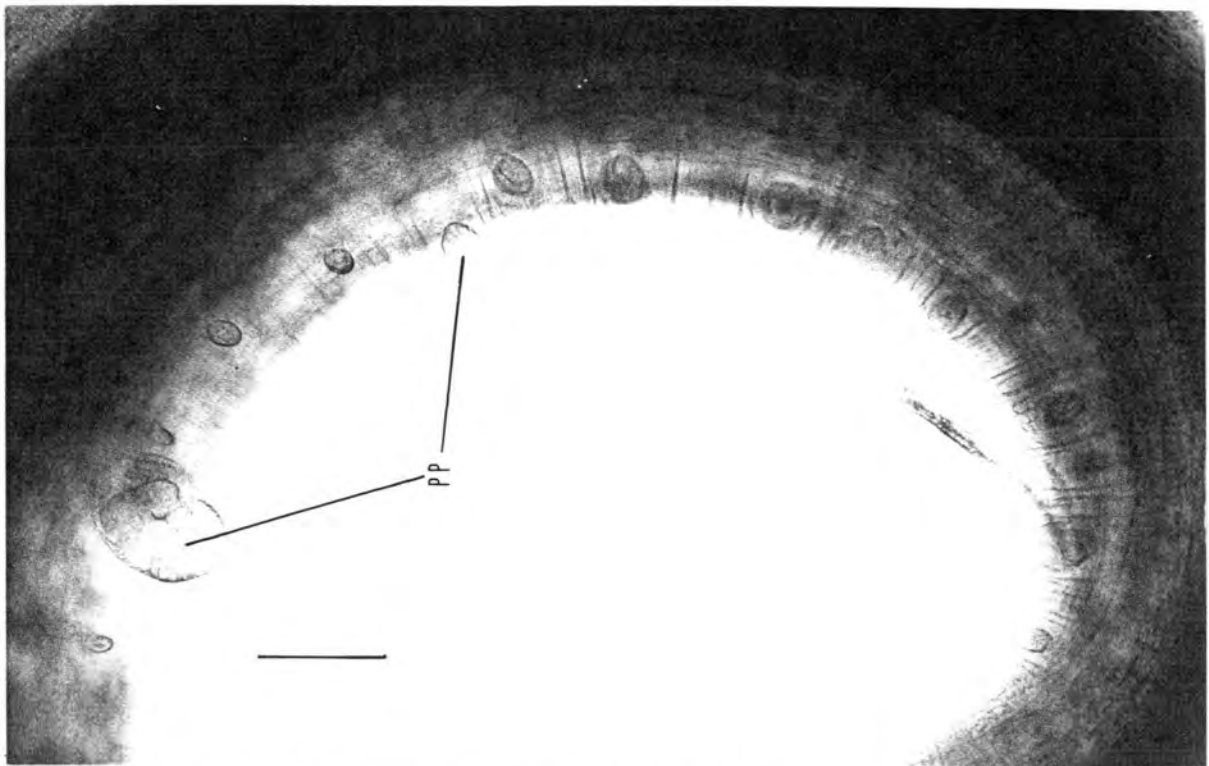


Foto 35. Detalle de la parte posterior de adulto macho de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a  $100 \mu\text{m}$ . PP=Papilas preanales.

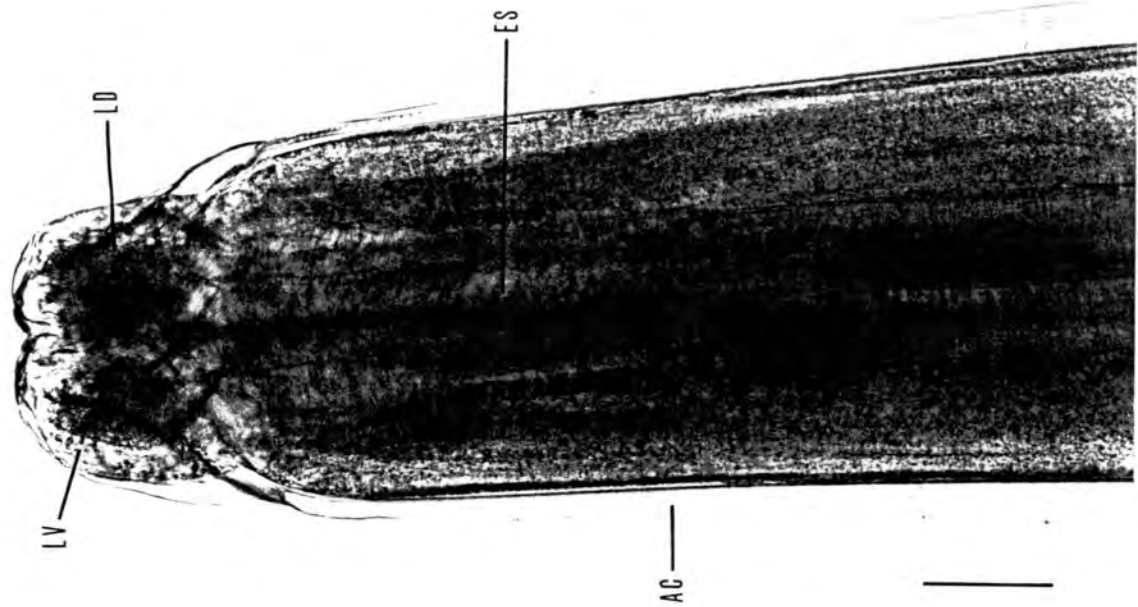


Foto 36. Extremo anterior de adulto hembra de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a  $100 \mu\text{m}$ . LV=Labio ventral. LD=Labio dorsal. ES=Esófago. AC=Ala cervical.

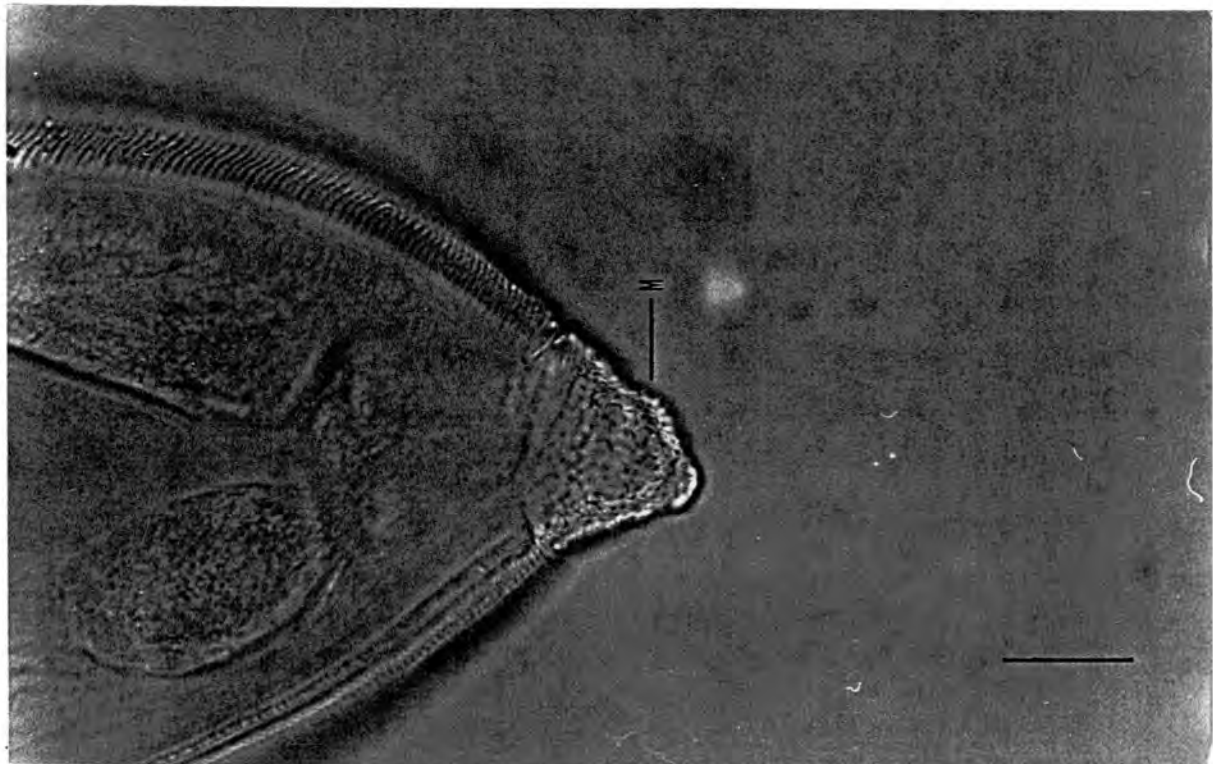


Foto 37. Extremo posterior de adulto hembra de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a  $50 \mu\text{m}$ . M=Mucrón.

### 5.2.2.-MEDIDAS DE ADULTOS Y HUEVOS DE *Hysterothylacium aduncum* OBTENIDOS *IN VITRO*.

El tamaño de la larva se ve aumentado con respecto a la L4 en el momento de la ecdisis, pero es a partir de la muda M4 cuando se puede observar a simple vista como el tamaño y grosor del parásito aumenta considerablemente, sobre todo al paso de 15-20 días tras la muda, alcanzando su tamaño máximo a partir de los 60 días. Por esta razón, el tamaño de los parásitos tras la M4 es variable, dependiendo del tiempo de supervivencia que tenga en el mantenimiento ya que a medida que el parásito se desarrolla, sus dimensiones aumentan.

A partir de los adultos, y tras las medidas realizadas se determinó que, según Petter y Cabarett (1995), nuestros parásitos se correspondían con *H. aduncum aduncum*.

En la TABLA IX se muestran las medidas medias, máximas y mínimas de L5 de *H. aduncum* obtenidas en nuestros mantenimientos.

TABLA IX. Medidas medias±ES, máximas y mínimas para L5 de <i>H. aduncum</i> (en mm).	MACHO (n=10)			HEMBRA (n=14)		
	Media±ES	Min	Max	Media±ES	Min	Max
Longitud total	40±0.28	32	52	41±0.59	30	65
Ancho máximo	0.712±0.010	0.675	0.750	0.825±0.029	0.650	0.875
Distancia anillo nervioso-boca	1.041±0.020	1.000	1.125	0.812±0.029	0.750	1.000
Longitud de esófago (E)	3.53±0.36	2.75	5.00	3.42±0.33	2.62	5.37
Longitud ciego intestinal	1.59±0.05	1.41	1.75	1.35±0.14	0.9	1.87
Longitud apéndice ventricular (AV)	0.975±0.029	0.950	1.125	1.20±0.09	0.85	1.500
Ancho alas cervicales (AC)	0.042±0.007	0.03	0.065	0.046±0.007	0.03	0.075
Relación AV/AC	23.2	31.6	17.3	26.0	28.3	20
Relación E/AC	84.0	91.6	76.9	74.3	87.3	71.6
Longitud de espículas	2.375±0.200	2.000	3.750			
Ancho máximo espículas	0.032±0.004	0.025	0.040			
Distancia ano-extremo final	0.163±0.010	0.125	0.200	0.375±0.040	0.250	0.625

Los huevos obtenidos en distintas experiencias eran infértiles ya que procedían de hembras que se desarrollaron aisladas en un pocillo, por lo que con frecuencia aparecían con contornos irregulares, y en muchos casos carecían de la cubierta exterior. A diferencia de los observados en *Anisakis simplex*, los huevos aparecían agrupados en forma de grumos mediante una sustancia cohesiva de color marrón (Foto 38).



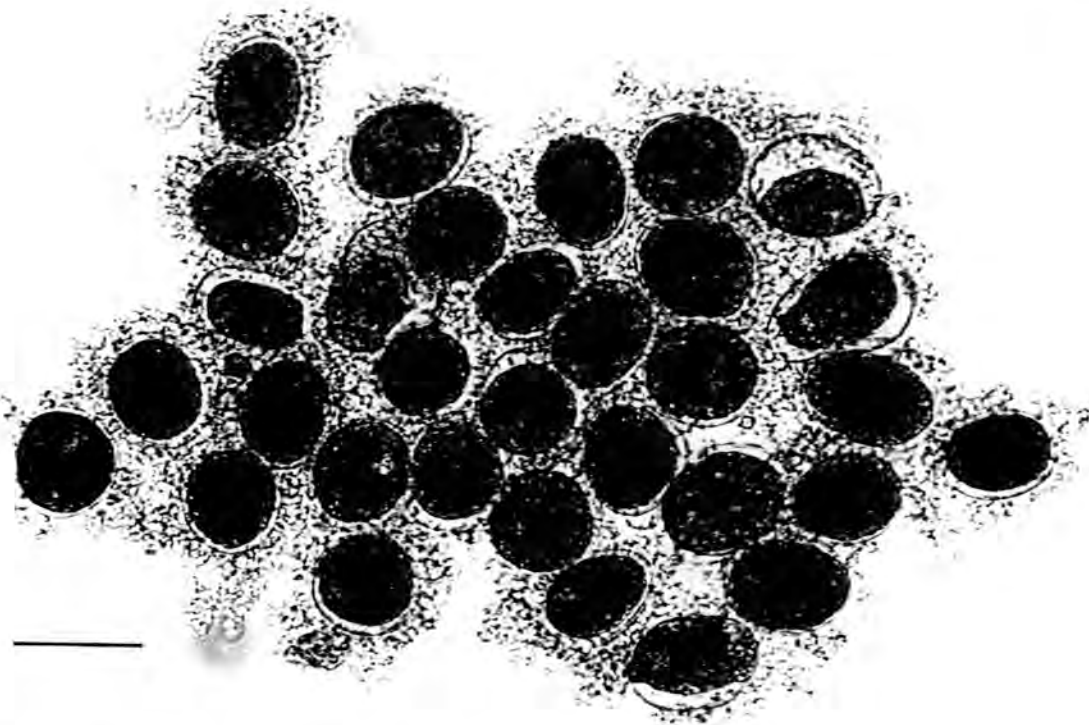


Foto 38. Huevos de *H. aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

Se midieron un total de 50 huevos seleccionados por sus contornos bien definidos y regulares. El tamaño medio  $\pm$  ES de los huevos fue de  $56.8 \pm 0.6 \times 47.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ . Los parásitos que pasaron al cuarto estadio larvario (L4) tras la tercera muda (M3), se identificaron en el mismo pocillo en donde fueron mantenidos por las características morfológicas diferenciadoras con respecto a la L3, como carencia del diente, mucrón con más espinas, cutícula con algo más de relieve en sus estriaciones, labios más evolucionados y presencia de interlabios (Petter y Maillard, 1988).

La movilidad de los parásitos a simple vista es menos vigorosa que la de *A. simplex*, aunque tras el paso a L4, aumenta durante el intervalo de 48-72 horas post-muda. En el fondo del pocillo se pueden apreciar los restos de la M3 en forma de vaina casi siempre de una sola pieza (Fotos 39, 40 y 41)

El paso a L5 se detectó por la presencia de restos de la vaina del 4º estadio larvario (M4), que en ocasiones se presentó en forma de vaina completa estriada transversalmente, lo que la diferencia de la M3 (Foto 42). En otras ocasiones, la ecdisis se produjo a lo largo de dos o tres días, desprendiéndose la vaina gradualmente y no de forma completa, sino en forma de pequeñas porciones a modo de delicada tela. Unas horas después de la muda a L4 y L5, se pudieron observar en el fondo del pocillo los restos de la muda del esófago y zona de los labios formando una estructura en forma de T (Foto 43). En ningún caso se observó la adhesión de *H. aduncum* al fondo del pocillo como ocurría con *Anisakis simplex*.

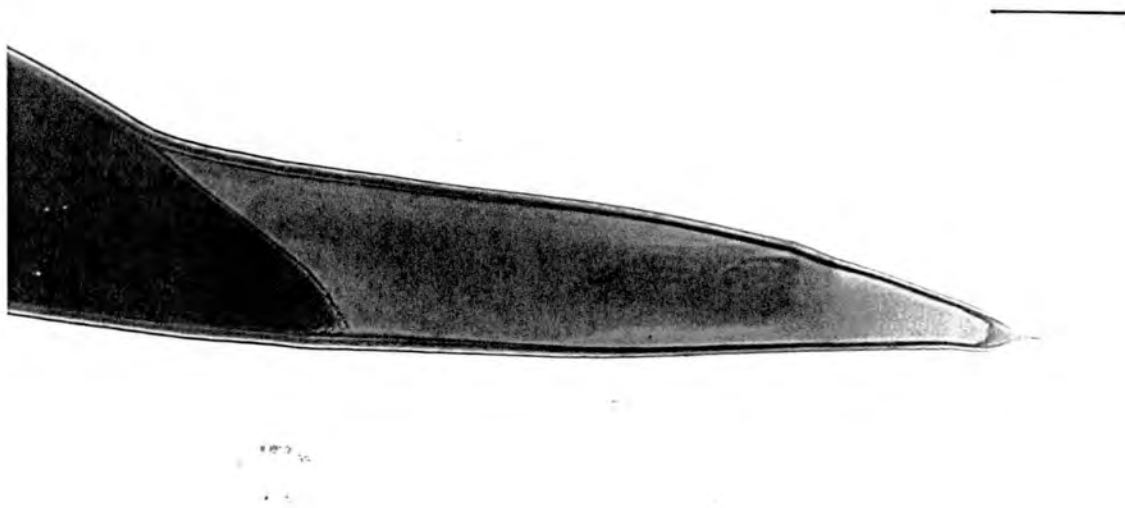


Foto 39. *Hysterothylacium aduncum*. L3 mudando a L4. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

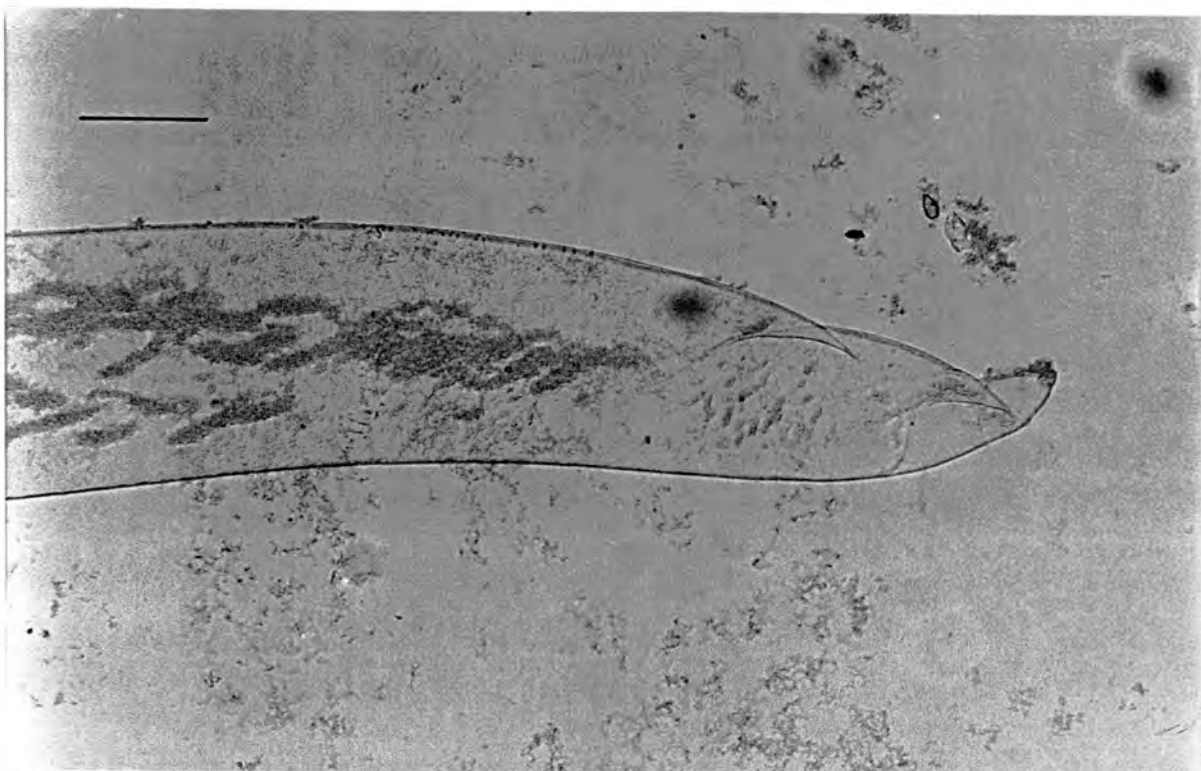


Foto 40. Restos de la cutícula de L3 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

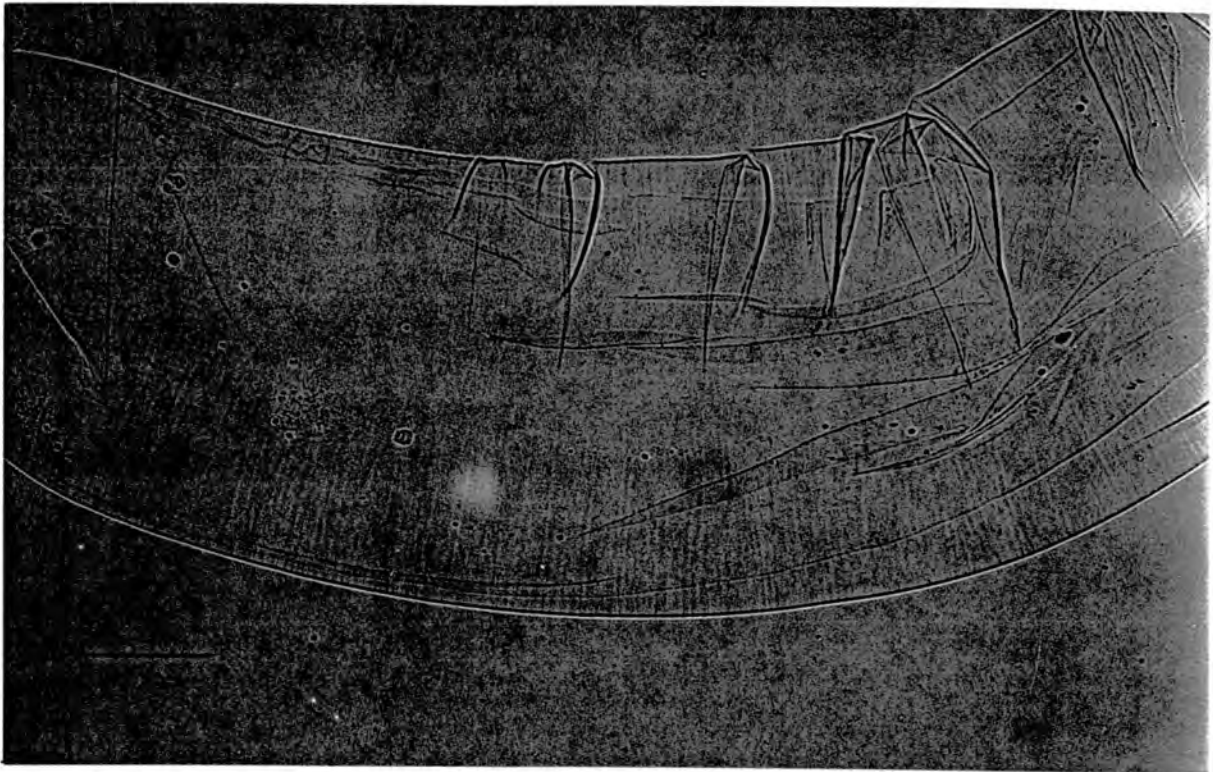


Foto 41. Restos de la cutícula de la L3 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

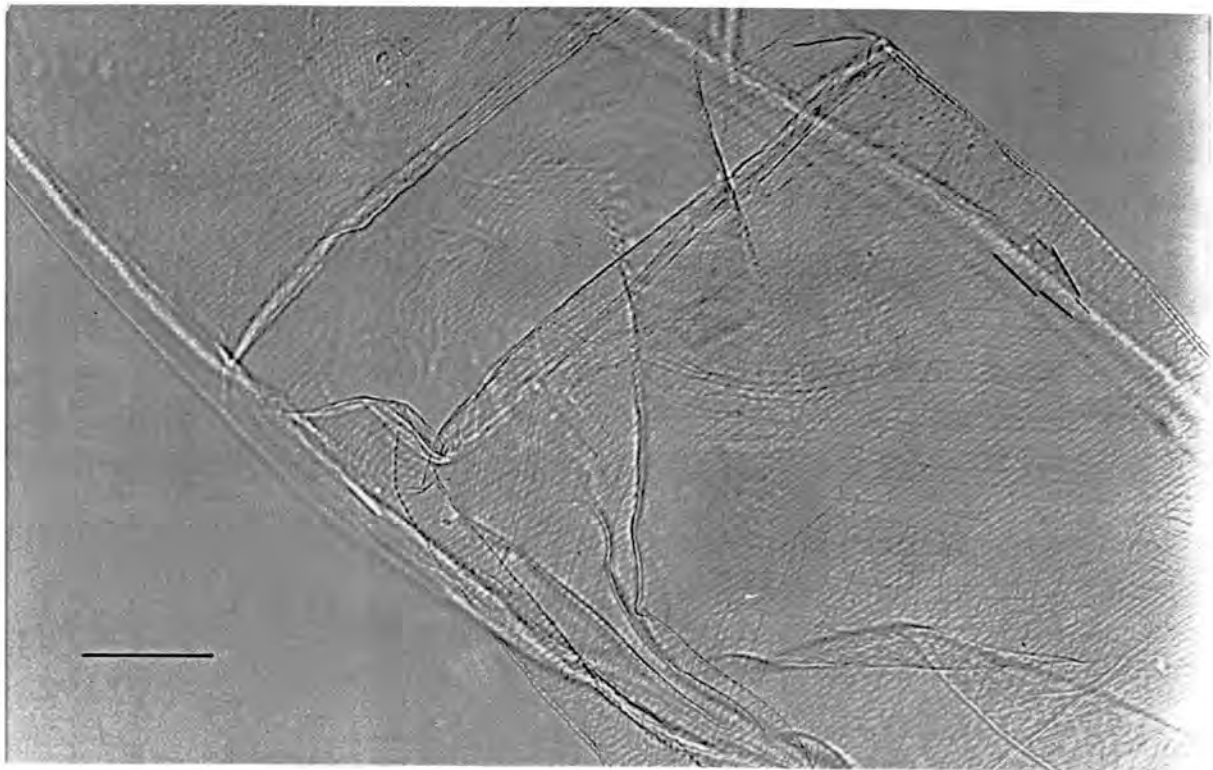


Foto 42. Restos de la cutícula de la L4 de *Hysterothylacium aduncum*. La barra equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

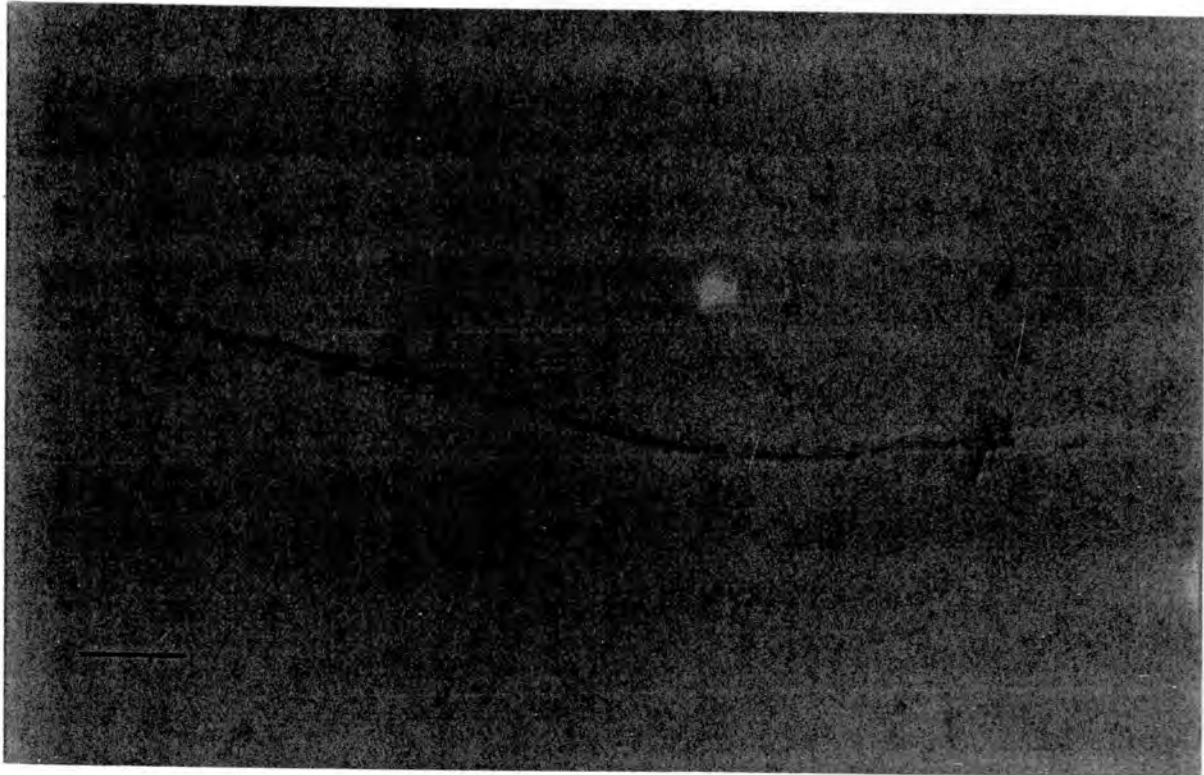


Foto 43. Restos de la muda de esófago y labios. La barra equivale a 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.3.-RESULTADOS DE LOS MANTENIMIENTOS IN VITRO DE *Hysterothylacium aduncum*.

#### 5.2.3.1.-MANTENIMIENTO EN ATMÓSFERA DE AIRE Y ATMÓSFERA DE AIRE CON 5% DE CO<sub>2</sub>.

Se ha realizado una experiencia compuesta por seis lotes de larvas en los medios SS, PBS y RPMI, bajo atmósfera de aire y atmósfera húmeda de aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

En la TABLA X se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos.

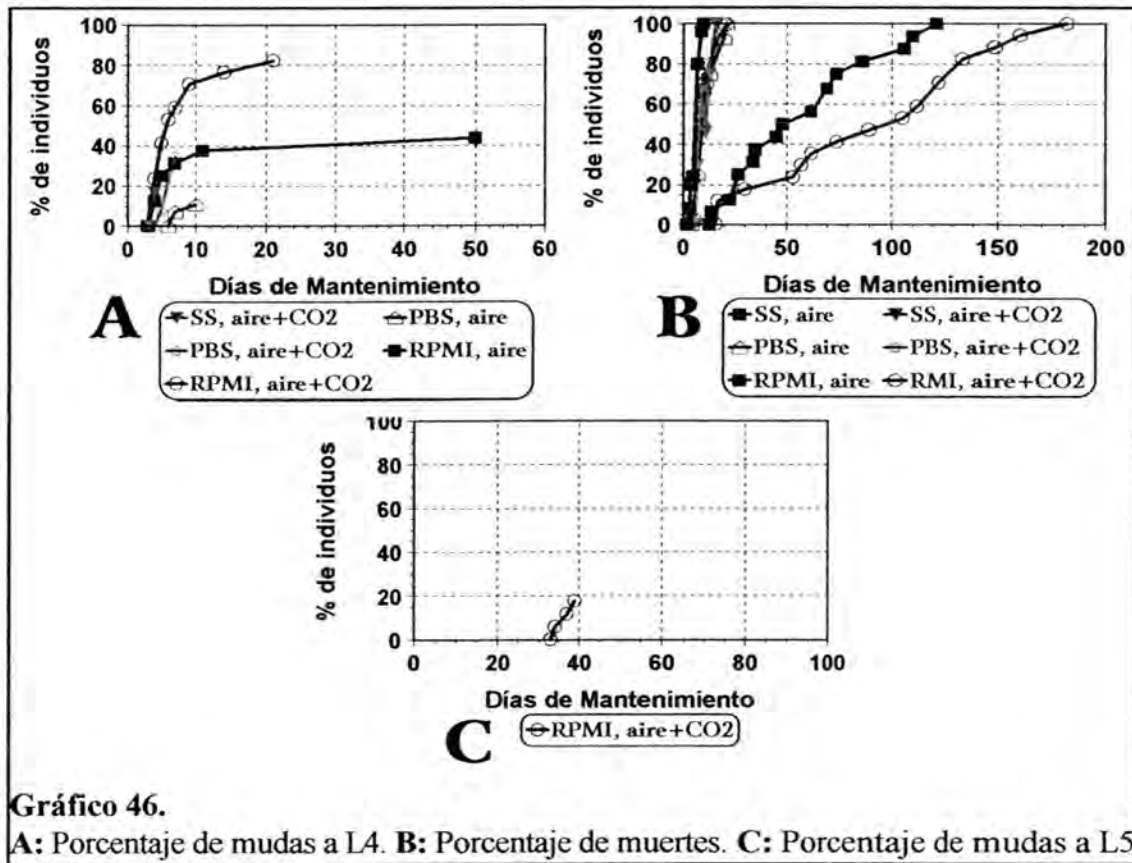
TABLA X

Medio	n	Atmósfera	Sav±ES	S50	Smax	L4	L5 <sup>(1)</sup>	Sav±ES, L5
SS	25	aire	6.6±0.3	7	10	no	no	no
SS	24	5% de CO <sub>2</sub>	10.4±0.7	9	17	1 (4.1%)	no	no
PBS	28	aire	10.9±0.8	10	21	3 (10.7%)	no	no
PBS	26	5% de CO <sub>2</sub>	10.9±0.8	10	23	9 (34.6%)	no	no
RPMI	16	aire	59.6±8.4	48	122	7 (43.7%)	no	no
RPMI	17	5% de CO <sub>2</sub>	95.5±12.2	105	182	14 (82.3%)	3(17.6%)	105.0±5.3

<sup>(1)</sup> El porcentaje de L5 va referido siempre al número inicial de individuos (n).

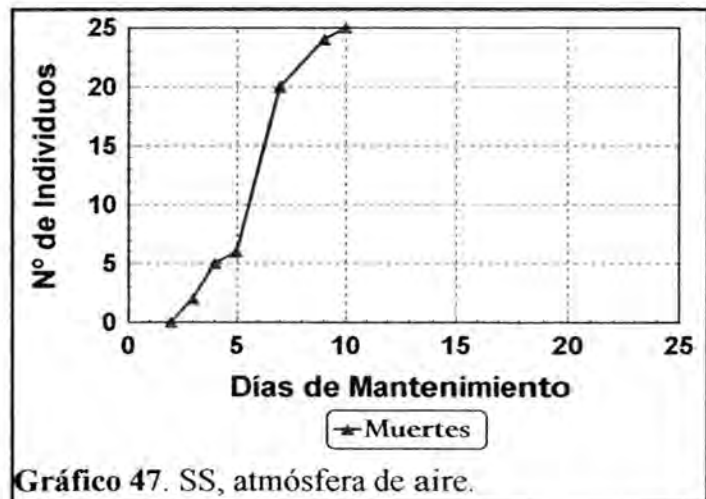
Como se puede observar, los porcentajes de muda a L4 han sido superiores en medios con CO<sub>2</sub>, pero nunca se ha alcanzado el 100% de mudas.

En el Gráfico 46 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada medio.



A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 47 se observa como en el medio SS y atmósfera de aire, ningún individuo mudó a L4 y la supervivencia máxima fue de tan sólo 10 días.



En el Gráfico 48 se observan los resultados del medio SS y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Aunque comenzaron a mudar 4 individuos (16.6%), sólo uno (4.1%) completó la ecdisis el 4º día de mantenimiento. La supervivencia máxima se prolonga hasta los 17 días de mantenimiento.

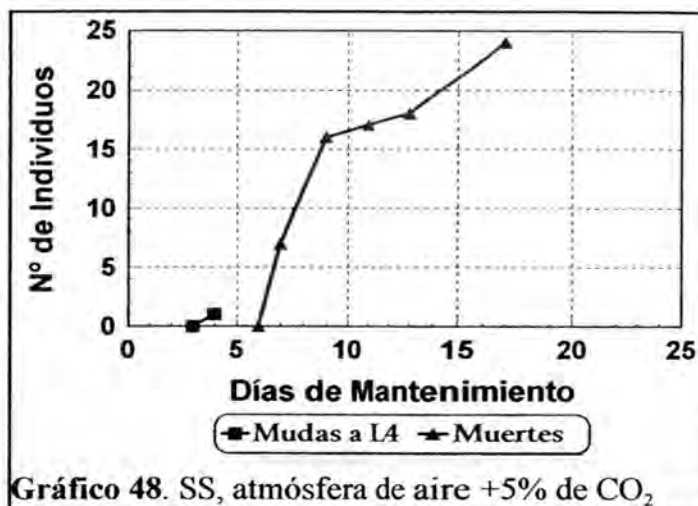


Gráfico 48. SS, atmósfera de aire +5% de CO<sub>2</sub>

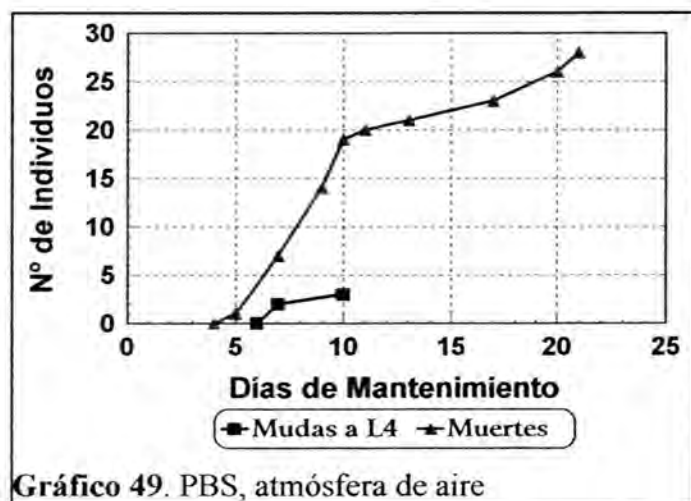


Gráfico 49. PBS, atmósfera de aire

En el Gráfico 49, observamos como con el medio PBS y bajo atmósfera de aire, 3 individuos (10.7%) mudaron a L4 entre los días 5º y 7º, aunque un total de 15 individuos (53.5%) comenzaron la muda a L4. La supervivencias son más altas con respecto a las experiencias anteriores.

En el Gráfico 50 vemos como en el mismo medio pero bajo atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, un total de 15 individuos (57.6%) comienzan a mudar a L4, de los que 9 (34.6%) concluyen la ecdisis entre los días 5º y 7º. Las supervivencias medias y máximas son muy similares comparadas con las obtenidas en el mismo medio bajo atmósfera de aire.

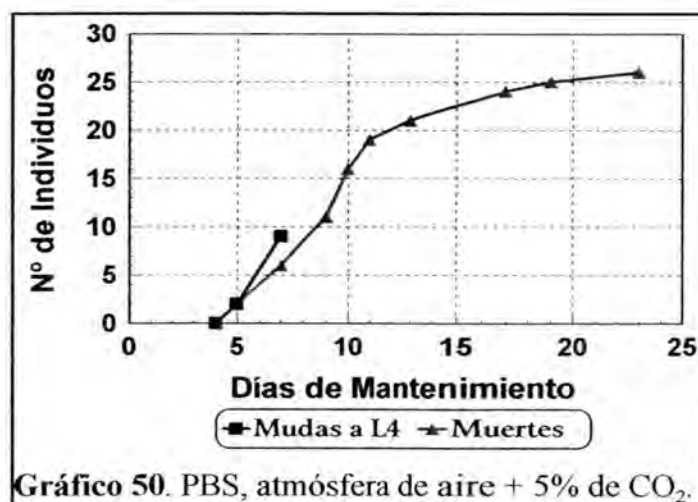


Gráfico 50. PBS, atmósfera de aire +5% de CO<sub>2</sub>

En el Gráfico 51 se puede observar como en el medio RPMI, y atmósfera de aire, 7 individuos mudan a L4 entre los días 4° y 11°. La supervivencia media y máxima es superior que los casos anteriores, pero no se obtiene ninguna L5.

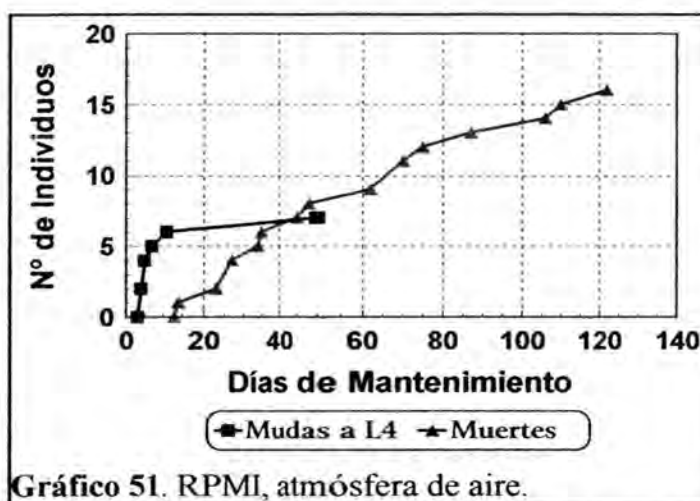


Gráfico 51. RPMI, atmósfera de aire.

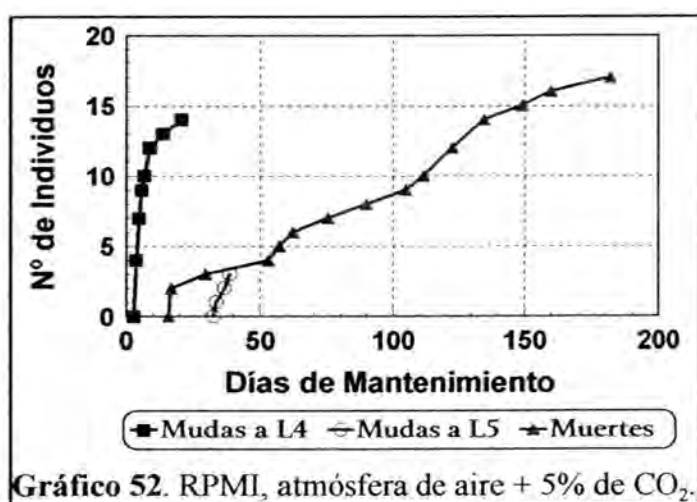


Gráfico 52. RPMI, atmósfera de aire + 5% de CO<sub>2</sub>.

En el Gráfico 52 observamos como en el medio RPMI y atmósfera de aire + 5% CO<sub>2</sub> se favorece la muda a L4, pues se obtienen 14 mudas a L4 entre los días 4° y 21°. Además, 3 individuos mudan a L5 entre los días 34° y 39°, de los que 2 fueron hembras y uno macho. Las supervivencias media y máxima son superiores con respecto a los demás lotes.

A partir de aquí, todas las experiencias se realizaron bajo atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5.2.3.2.-MANTENIMIENTO A pH CONSTANTE.

Se ha realizado una experiencia con 4 lotes de individuos en el medio RPMI a distintos pHs: 2.0, 4.0, 7.2 y 9.0.

En la TABLA XI se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos.



TABLA XI

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L4	L5 <sup>(1)</sup>	Sav±ES, L5
RPMI, pH 2.0	12	32.5±4.9	33	58	8 (66.6%)	no	no
RPMI, pH 4.0	13	113.4±16.5	102	220	13 (100%)	5 (38.4%)	118.0±12.9
RPMI, pH 7.2	12	93.5±15.7	98	170	8 (66.6%)	3 (25%)	93.0±9.5
RPMI, pH 9.0	12	26.5±3.5	29	40	9 (75%)	no	no

<sup>(1)</sup> El porcentaje de L5 va referido siempre al número inicial de individuos (n).

A pH 4.0, la Sav, S50 y Smax son mayores que en el resto de los pHs, obteniéndose cerca de un 40% de L5. Los resultados a pH 7.2 también se pueden considerar como buenos pero el resto de pHs no parecen favorecer a los parásitos.

En el Gráfico 53 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada medio.

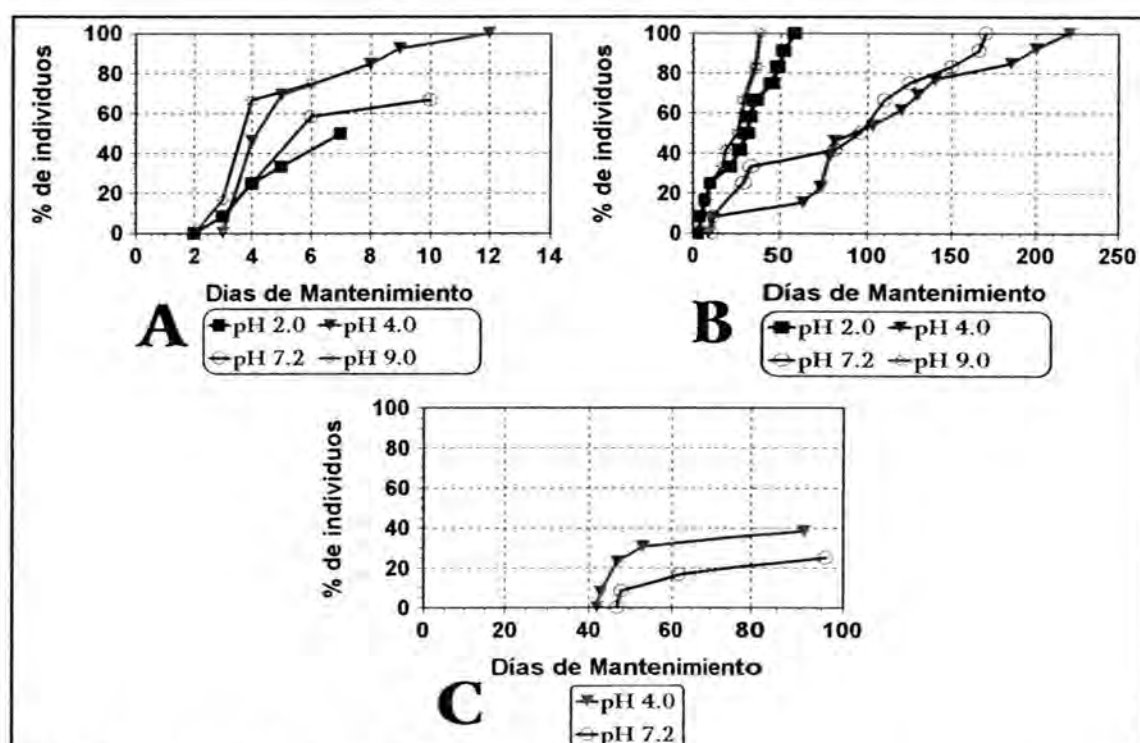


Gráfico 53. RPMI a diferentes pHs.

A: Porcentaje de mudas a L4. B: Porcentaje de muertes. C: Porcentaje de mudas a L5

A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 54 se observa como en el medio RPMI a pH 2.0, de los 8 individuos (66.6%) que comenzaron la muda a L4, solo 6 individuos (50%) completaron la ecdisis entre los días 3° y 7°. No se observan mudas a L5.

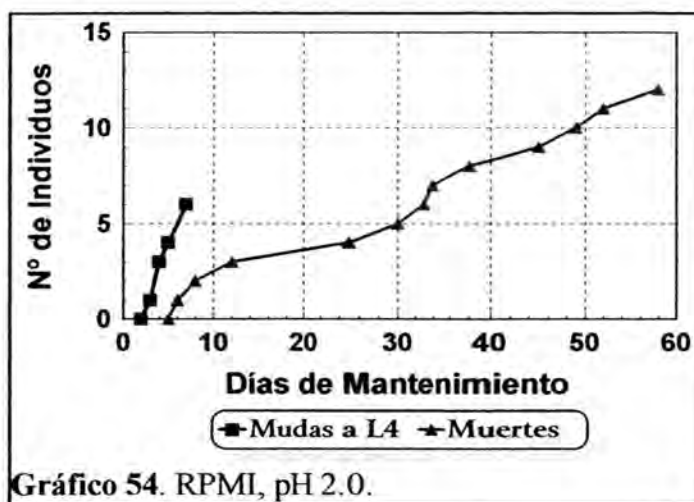


Gráfico 54. RPMI, pH 2.0.

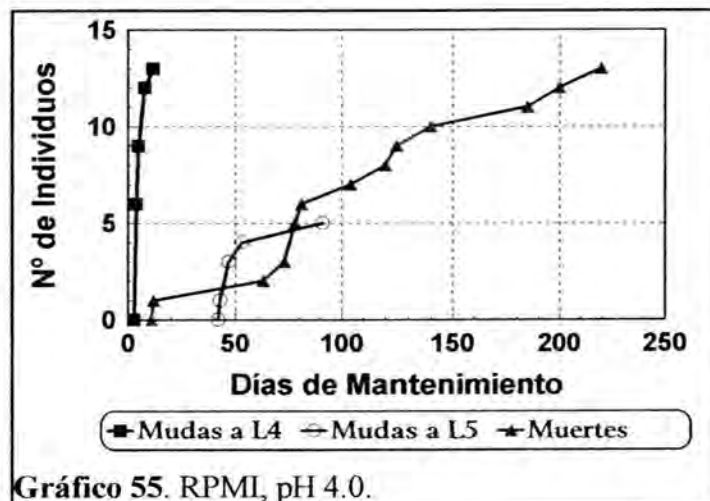


Gráfico 55. RPMI, pH 4.0.

En el Gráfico 55 se observa como a pH 4.0 todos los individuos mudaron a L4 entre el 4° y 12° día de mantenimiento. Además, 5 de los individuos (38.4%) mudaron a L5 entre los días 43° y 91°, de los que 3 fueron machos (60%) y 2 hembras (40%).

En el Gráfico 56 se observa como a pH 7.2, el comportamiento de los parásitos a pH 7.2 fue también bueno, aunque el paso a L4 sucedió en menor proporción. Un total de 8 individuos (66.6%) mudaron a L4 entre los días 3° y 10° de mantenimiento. Entre los días 48° y 96° se produjeron 3 mudas a L5 (25%), dos hembras (66.6%) y un macho (33.3%).

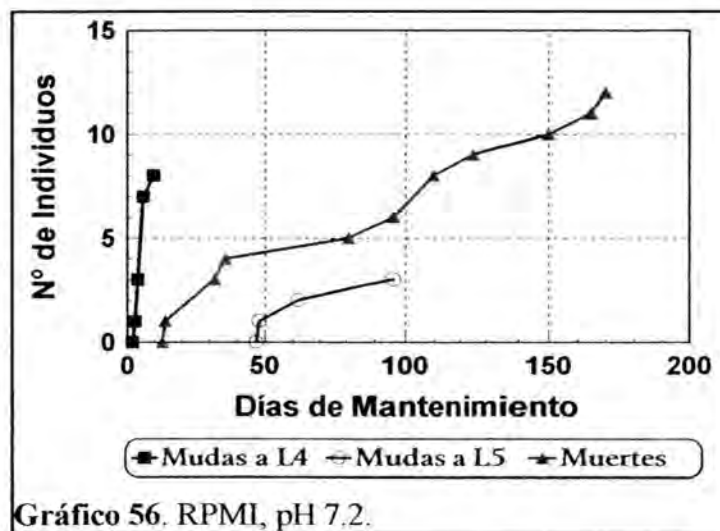


Gráfico 56. RPMI, pH 7.2.



En el Gráfico 57 se observa a pH 9.0 los valores de supervivencia son bastante bajos, y no se produjo ninguna muda a L5. Un total de 9 individuos (75%) mudaron a L4 entre los días 3° y 6° de mantenimiento.

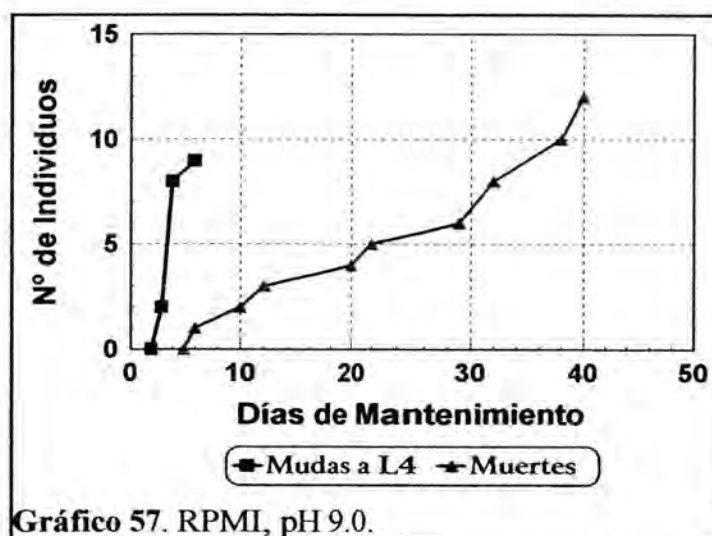


Gráfico 57. RPMI, pH 9.0.

#### 5.2.3.3.-CAMBIO DE pH EN EL PASO A L4.

Se ha experimentado con el cambio de pH en el medio RPMI, comenzando con pH 7.2 y cambiando a pH 4.0 cuando los individuos mudaron a L4. Para ello se ha realizado también una experiencia control a pH 4.0 constante durante toda la experiencia.

En la TABLA XII se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos. En ambos lotes, todos los parásitos mudaron a L4 entre los días 3° y 8°, por lo que no se representa en esta tabla ni en el gráfico resumen (Gráfico 58).

TABLA XII

Medio	n	Sav±ES	S50	Smax	L5	Sav±ES, L5
RPMI, pH 7.2 α 4.0	17	118.8±12.0	110	225	12 (70.6%)	82.5±11.1
RPMI, pH 4.0	12	135.5±17.4	138	246	9 (75%)	117.8±10.5

En ambas experiencias se obtienen buenos resultados en cuanto a porcentaje de L5, si bien a pH 4.0 constante los parámetros de supervivencia son algo mayores.

En el Gráfico 58 se muestra un resumen en el que se compara la evolución de los parásitos de cada lote.

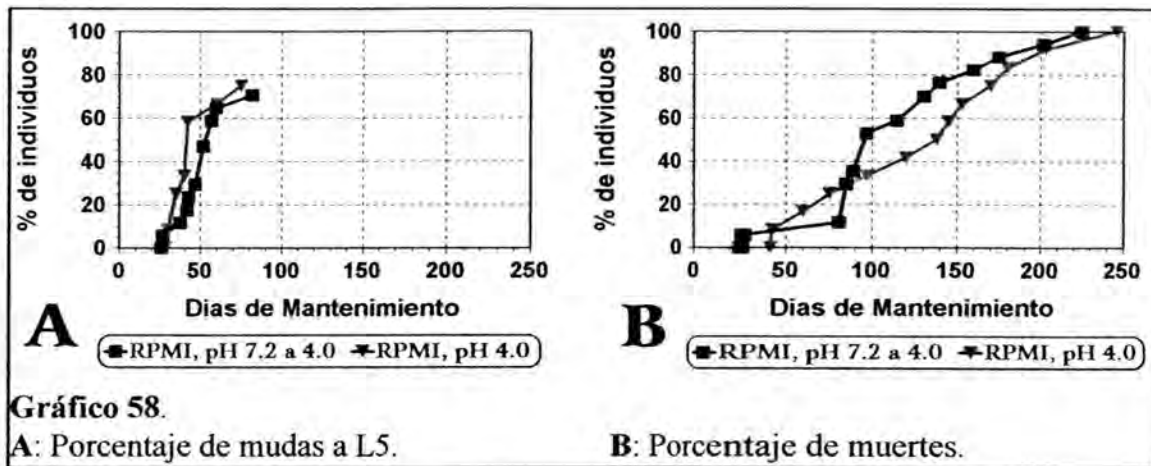


Gráfico 58.

A: Porcentaje de mudas a L5.

B: Porcentaje de muertes.

En el Gráfico 59 se muestran los resultados obtenidos cuando se inicia con el medio RPMI a un pH inicial de 7.2 y se cambia a pH 4.0 cuando mudan a L4. El paso a L4 se produjo en todos los individuos entre los días 3° y 8°. Un total de 12 individuos (70.6%) mudaron a L5 entre los días 27° y 82°, de los que 5 fueron machos (41.6%) y 7 hembras (58.3%). Se observaron 4 ovoposiciones (57.1%) entre los días 45° y 96°.

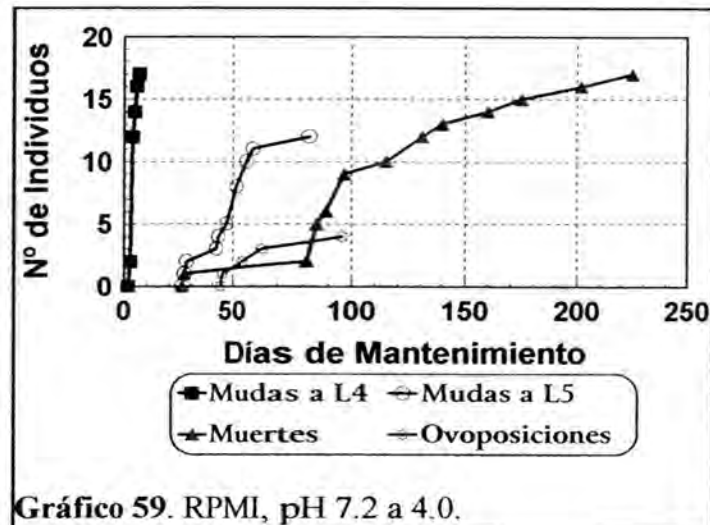


Gráfico 59. RPMI, pH 7.2 a 4.0.

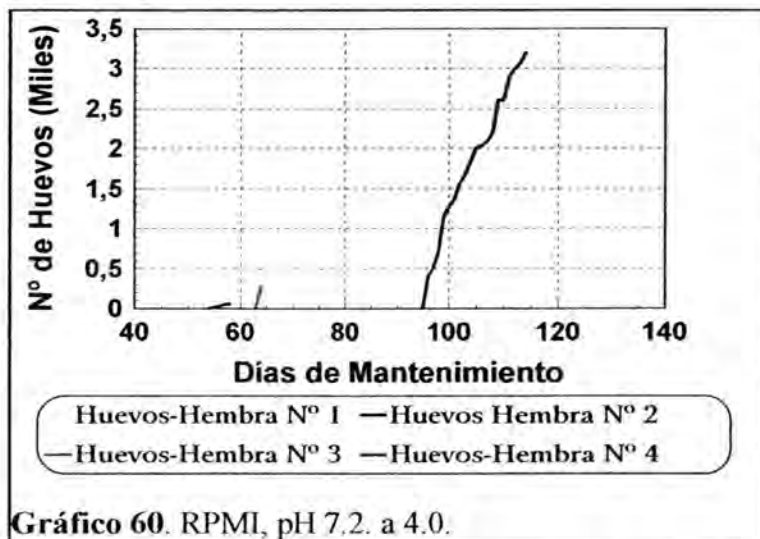
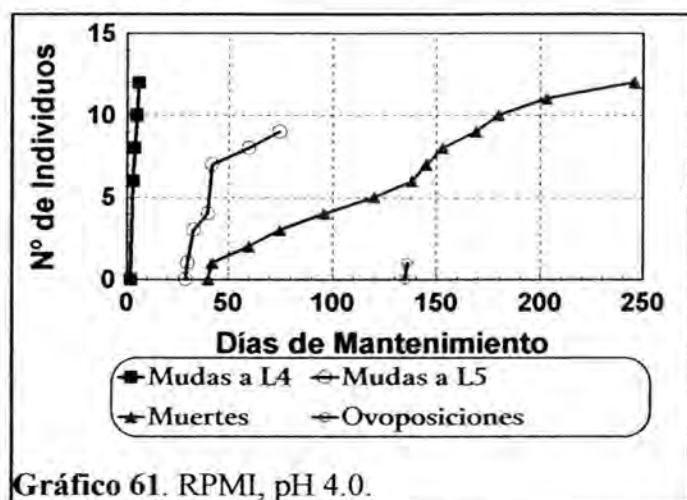


Gráfico 60. RPMI, pH 7.2 a 4.0.

Gráfico 60.

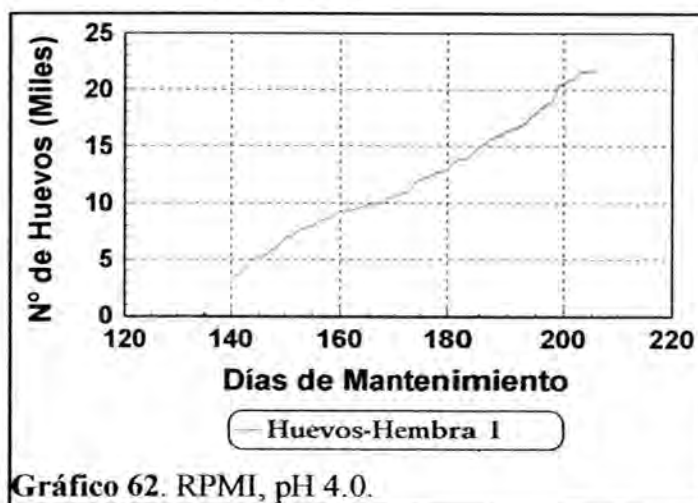
La hembra N°1 comenzó la ovoposición el día 45°, 19 días tras la muda a L5, y se contaron un total de 2095 huevos en el plazo de 7 días. El máximo número de huevos contados en un día fue de 550. El día 55°, 13 días tras la muda a L5, comenzó la ovoposición de la hembra N°2, con un total de 64 huevos en un período de 4 días.

El máximo número de huevos contados en un día fue de 33. La hembra N°3, 26 días tras la muda a L5, ovopositó sólo el día 64° un total de 280 huevos. La hembra N°4 comenzó la ovoposición el día 96°, 64 días tras la muda a L5, y se contaron 3196 huevos durante 18 días. El número máximo de huevos contados en un día fue de 452.



En el Gráfico 61 se observa la evolución de la experiencia control con el medio RPMI a pH 4.0. Todos los individuos mudaron a L4 entre los días 3° y 6° de mantenimiento. Además, 9 individuos (75%) mudaron a L5 entre los días 30° y 75°, de los que 5 fueron machos (55.5%) y 4 hembras (44.5%). Se observó la ovoposición de una hembra (25%) el día 136°, 93 días tras el paso a L5.

En el Gráfico 62 se puede observar la cinética de la ovoposición. Se produjo durante un intervalo de 70 días en el que se contaron un total de 21622 huevos. El máximo número de huevos contados en un día fue de 1200.



#### 5.2.3.4.-MANTENIMIENTO CON EL MEDIO RPMI, RPMI+P Y SUPLEMENTOS CON L-CISTEÍNA Y GLUTATION.

Una vez comprobado los buenos resultados que se producen con el medio RPMI a pH 4.0, y siguiendo la línea trazada para *Anisakis simplex*, se ha experimentado con suplemento de pepsina en una proporción del 1% (p/v). También se ha querido comprobar la influencia de la L-cisteína y el glutatión a una concentración de 4 mM en el medio RPMI, pH 4.0, con y sin pepsina.

En la TABLA XIII se muestra cómo estuvieron distribuidos los lotes, y los resultados obtenidos.

TABLA XIII

Medio	n	S <sub>av</sub> ±ES	S50	S <sub>max</sub>	L4	L5 <sup>(1)</sup>	S <sub>av</sub> ±ES, L5
RPMI+G	12	74.3±14.6	47	164	11 (91.6%)	1 (8.3%)	16.0±0.0
RPMI+C	11	70.1±8.7	61	114	11 (100%)	7 (63.6%)	40.5±11.8
RPMI	10	137.0±16.1	113	249	10 (100%)	8 (80.0%)	103.0±16.6
RPMI+P+G	21	64.5±6.3	63	143	18 (85.7%)	14 (66.6%)	37.5±7.5
RPMI+P+C	21	75.8±6.9	74	141	21 (100%)	18 (85.7%)	52.6±6.6
RPMI+P	23	160.5±12.7	150	279	23 (100%)	23 (100%)	124.5±11.9

<sup>(1)</sup> El porcentaje de L5 va referido siempre al número inicial de individuos (n).

El aporte de L-cisteína o glutatión, no mejora los resultados obtenidos con los medios RPMI y RPMI+P, en donde éste último presenta los mejores porcentajes de mudas a L4, L5 y parámetros de supervivencia (Gráfico 63).

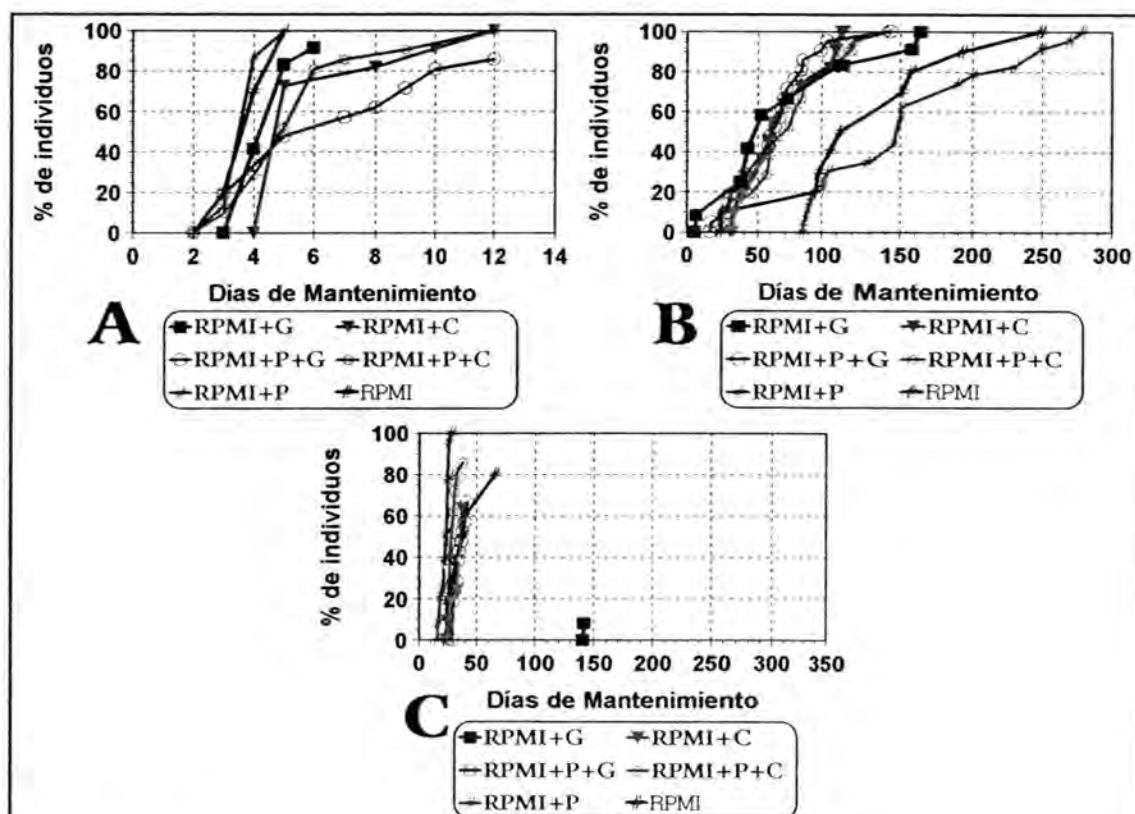


Gráfico 63.

A: Porcentaje de mudas a L4. B: Porcentaje de muertes. C: Porcentaje de mudas a L5.

A continuación, se representan los resultados de la evolución de los parásitos en cada lote.

En el Gráfico 64 se observa como en el medio RPMI+G, de los 12 individuos utilizados, 11 (91.6%) completaron la muda a L4 entre los días 4° y 6°. Sólo un individuo (8.3%) alcanzó el estadio L5, pero murió a los 16 días.

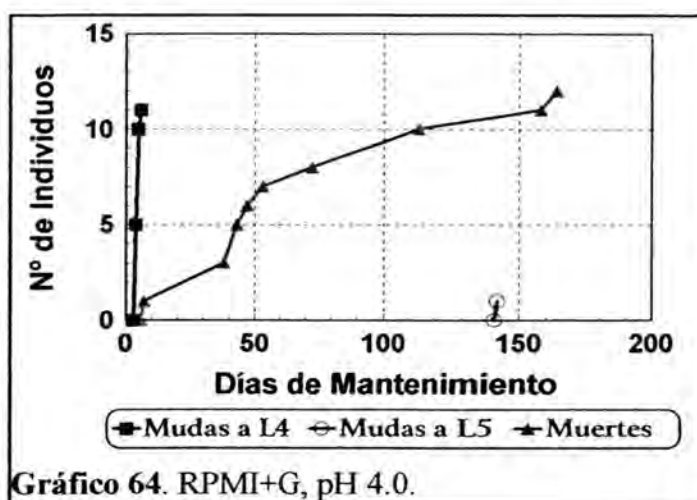


Gráfico 64. RPMI+G, pH 4.0.

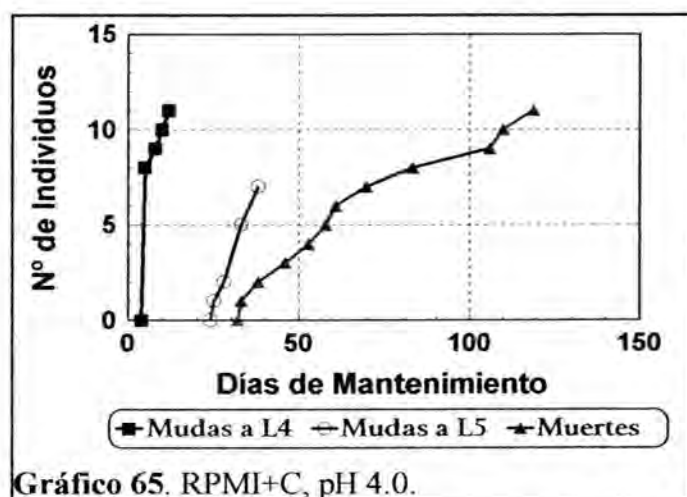


Gráfico 65. RPMI+C, pH 4.0.

En el Gráfico 65 se observa como en el medio RPMI+C, aunque las supervivencias media y máxima no son altas, todos los individuos pasan a L4 entre el 5° y 12° día de mantenimiento. Además, 7 individuos (63.6%) mudan a L5 entre los días 25° y 38°, de los que 4 fueron hembras (57.1%) y 3 machos (42.9%).

En el Gráfico 66 se observa como los resultados a pH 4.0 también fueron bastante buenos. Todos los individuos mudan a L4 entre el 3<sup>er</sup> y 5° día de mantenimiento, obteniéndose un total de 8 individuos en estado L5 (80%) entre los días 25° y 66°, de los que 4 fueron machos (50%) y 4 hembras (50%). Una de las hembras (25%) ovopositó en el día 90°, 65 días tras la muda a L5.

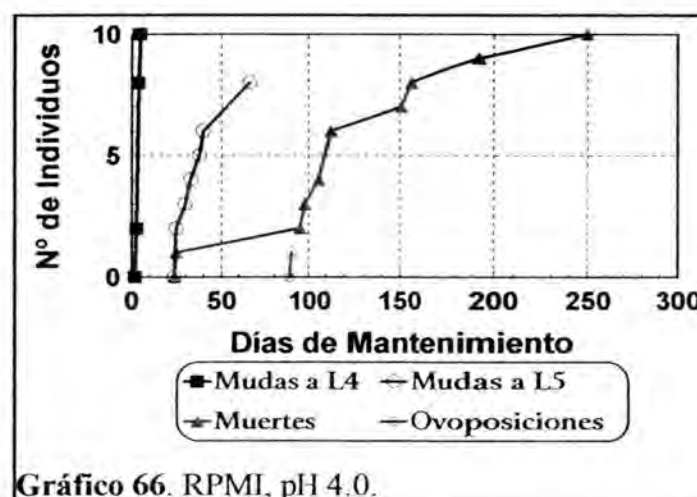


Gráfico 66. RPMI, pH 4.0.

Gráfico 67. El número de huevos totales fue de 3786, que se contaron entre los días 90° y 101° de mantenimiento. El número máximo de huevos contados en un solo día fue de 1218.

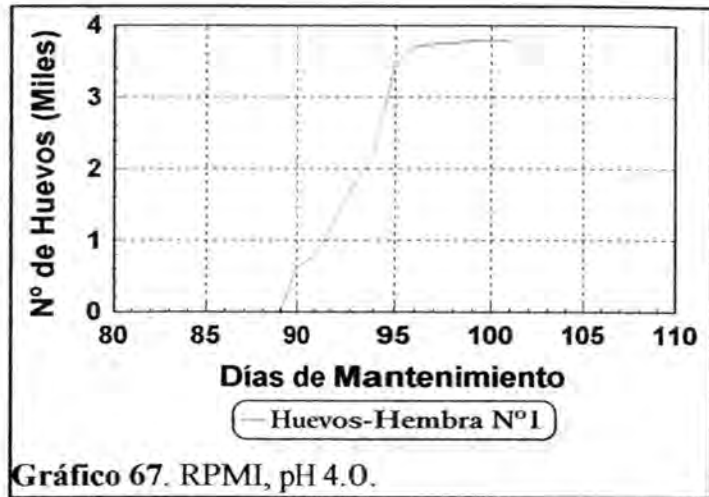


Gráfico 67. RPMI, pH 4.0.

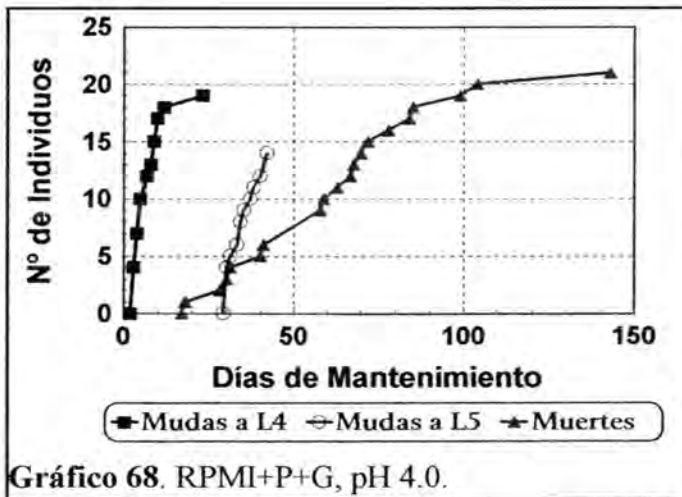


Gráfico 68. RPMI+P+G, pH 4.0.

En el Gráfico 68 se observa como en el medio RPMI+P+G, un total de 18 individuos (85.7%) mudan a L4 entre el día 3° y 12°. Se detectaron un total de 14 mudas a L5 (66.6%) entre los días 30° y 42° de mantenimiento, y de ellos 7 fueron hembras (50%) y 7 machos (50%).

En el Gráfico 69 se observa como en el medio RPMI+P+C, todos los individuos mudan a L4 entre los días 3° y 12°. Un total de 18 individuos (85.7%) mudaron a L5 entre los días 27° y 38°, de los que 10 fueron hembras (55.5%) y 8 machos (44.4%). Además se produjo la oviposición de tres hembras (30%) entre los días 44° y 97° de mantenimiento.

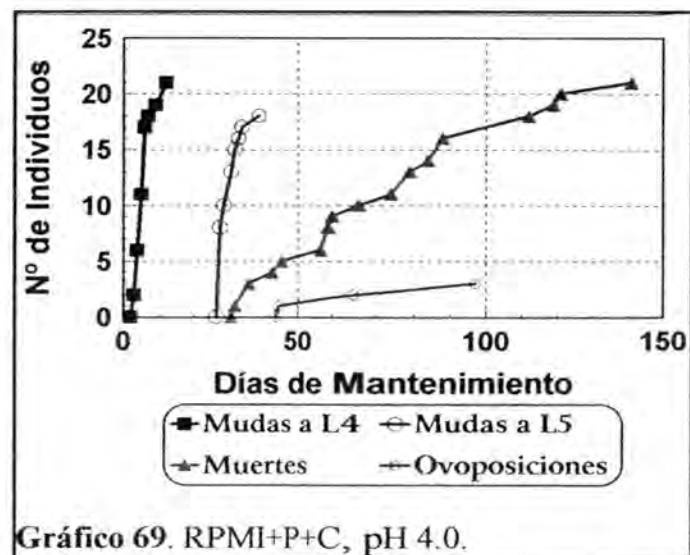


Gráfico 69. RPMI+P+C, pH 4.0.



En el Gráfico 70 se puede apreciar el número de huevos ovopositados por cada hembra. La hembra N°1, ovopositó el día 44°, 17 días tras la muda a L5, y se registraron un total de 138.512 huevos en un espacio de 75 días, tras los cuales murió. El máximo número de huevos contados en un día fue de 4376. La hembra N°2, ovopositó el día 65°, 20 días tras la muda a L5, y se registraron un total de 49343 huevos en un espacio de 56 días, tras los cuales murió. El máximo número de huevos contados en un día fue de 2766. La hembra N°3, ovopositó el día 97°, 64 días tras la muda a L5, y se registraron un total de 1390 huevos en un espacio de 17 días, tras los cuales murió. El máximo número de huevos contados en un día fue de 195.

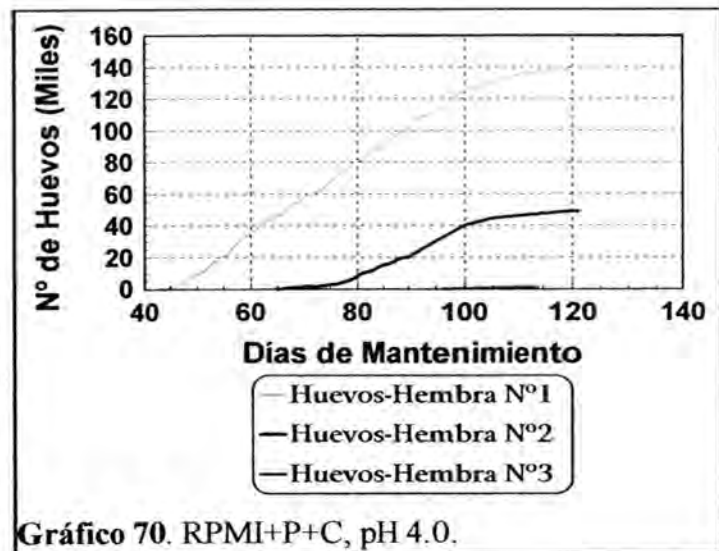


Gráfico 70. RPMI+P+C, pH 4.0.

La hembra N°3, ovopositó el día 97°, 64 días tras la muda a L5, y se registraron un total de 1390 huevos en un espacio de 17 días, tras los cuales murió. El máximo número de huevos contados en un día fue de 195.

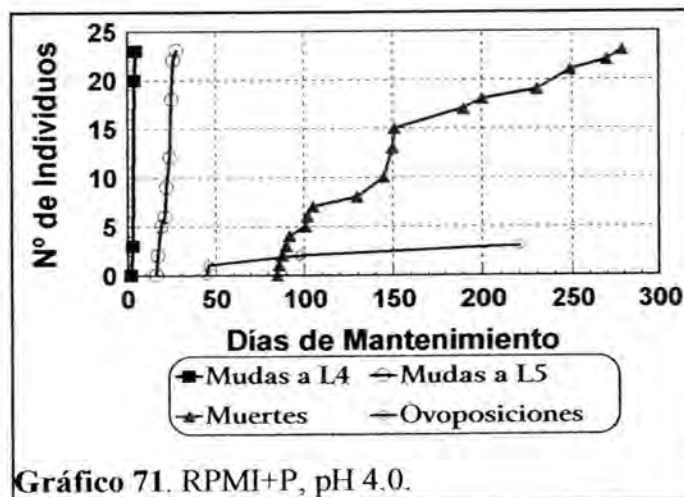


Gráfico 71. RPMI+P, pH 4.0.

En el Gráfico 71 se observa como en el medio RPMI+P, todos los individuos mudaron a L4 entre los días 3° y 5°. Además, todos los individuos mudaron a L5 entre los días 17° y 28°. Un total de 11 individuos fueron hembras (47.8%) y 12 machos (52.1%). Se produjo la ovoposición de tres hembras (27.2% de hembras), los días 46°, 98° y 220°.

En el Gráfico 72 se representa la ovoposición de la hembra N°1. Esta ovoposición comenzó el día 45°, 35 días tras la muda a L5, y se contaron un total de 52.150 huevos en el intervalo de 29 días. El máximo número de huevos contados en un día fue de 3210. La hembra N°2 ovopositó sólo el día 98°, 73 días tras la muda a L5, un total de 65 huevos. La hembra N°3 ovopositó sólo el día 220°, 192 días tras la muda a L5, un total de 761 huevos.

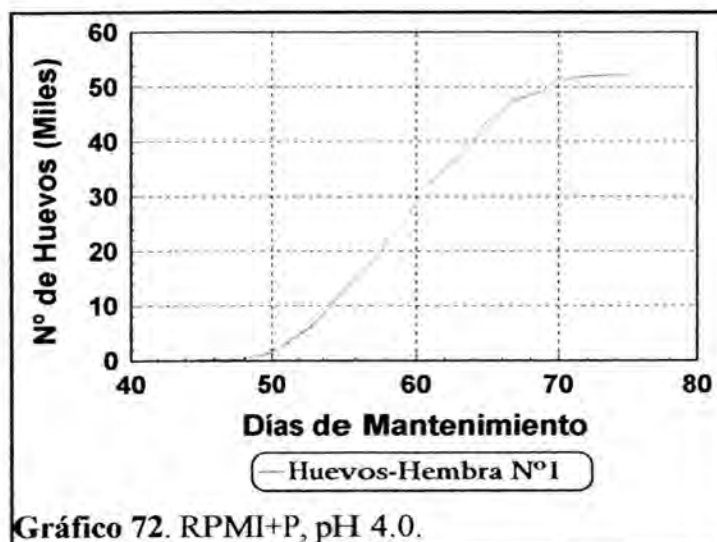


Gráfico 72. RPMI+P, pH 4.0.

#### 5.2.3.5.-TABLA RESUMEN DE LOS MANTENIMIENTOS DE *Hysterothylacium aduncum* Y ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.

A continuación se muestra una tabla con el resumen de los resultados de los mantenimientos de *Hysterothylacium aduncum* (RESUMEN 2).

RESUMEN 2. Mantenimientos de *H. aduncum* en diferentes condiciones.

Medios	n	Sav±ES	S50	Smax	L4	L5 <sup>(1)</sup> /L5 <sup>(2)</sup>	Sav±ES, L5	O	NHT
SS, atmósfera aire	25	6.6±0.3	7	10	no	no	no	no	no
SS, atmósfera 5% CO <sub>2</sub>	24	10.4±0.7	9	17	1(4.1%)	no	no	no	no
PBS, atmósfera aire, pH 7.3	28	10.9±0.8	10	21	3(10.7%)	no	no	no	no
PBS, atmósfera 5% CO <sub>2</sub> , pH 7.3	26	10.9±0.8	10	23	9(34.6%)	no	no	no	no
RPMI, atmósfera aire, pH 7.2	16	59.6±8.4	48	122	7(43.7%)	no	no	no	no
RPMI, atmósfera 5% CO <sub>2</sub> , pH 7.2	17	95.5±12.2	105	182	14(82.3%)	3 (17.6%) (21.4%)	105.0±5.3	no	no
RPMI, pH 2.0	12	32.5±4.9	33	58	8(66.6%)	no	no	no	no
RPMI, pH 4.0	13	113.4±16.5	102	220	13(100%)	5 (38.4%) (38.4%)	118.0±12.9	no	no
RPMI, pH 7.2	12	93.5±15.7	98	170	8(66.6%)	3 (25%) (37.5%)	93.0±9.5	no	no
RPMI, pH 9.0	12	26.5±3.5	29	40	9(75%)	no	no	no	no
RPMI, pH 7.2 α 4.0	17	118.8±12.0	110	225	17(100%)	12 (70.6%) (70.6%)	82.5±11.1	4(33.3%)	2095 64 280 3196
RPMI, pH 4.0	12	135.5±17.4	138	246	12(100%)	9 (75%) (75%)	117.8±10.5	1(25%)	21622
RPMI+G, pH 4.0	12	74.3±14.6	47	164	11(91.6%)	1 (8.3%) (9.1%)	16.0±0.0	no	no
RPMI+C, pH 4.0	11	70.1±8.7	61	114	11(100%)	7 (63.6%) (63.6%)	40.5±11.8	no	no
RPMI, pH 4.0	10	137±16.1	113	249	10(100%)	10 (100%) (100%)	103.0±16.6	1(25%)	3786
RPMI+P+G, pH 4.0	21	64.5±6.3	63	143	18(85.7%)	14 (66.6%) (77.7%)	37.5±7.5	no	no
RPMI+P+C, pH 4.0	21	75.8±6.9	74	141	21(100%)	18 (85.7%) (85.7%)	52.6±6.6	3(30%)	13851 2 49343 1390
RPMI+P, pH 4.0	23	160.5±12.7	150	279	23(100%)	23 (100%) (100%)	124.5±11.9	3(27.2%)	52150 65 761

<sup>(1)</sup> El porcentaje de L5 va referido siempre al número inicial de individuos (n).

<sup>(2)</sup> Porcentaje de L5 referido al número de L4.

En las siguientes tablas se indica el valor de P (calculado a partir del método estadístico de la "t" de Student) en las que se han comparado la Sav±ES de cada uno de los lotes que componen las distintas experiencias realizadas. Se considera que existe diferencia significativa entre un par de valores para P<0.05.

Medios SS, PBS y RPMI (pH 7.2) con y sin CO<sub>2</sub> al 5%.

	SS, Aire	SS, CO <sub>2</sub>	PBS, Aire	PBS, CO <sub>2</sub>	RPMI, aire
SS, CO <sub>2</sub>	$2.5 \cdot 10^{-5}$				
PBS, Aire	$2.5 \cdot 10^{-5}$	0.6, ns			
PBS, CO <sub>2</sub>	$2.5 \cdot 10^{-5}$	0.6, ns	1, ns		
RPMI, Aire	$1.2 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$2.8 \cdot 10^{-5}$	$2.8 \cdot 10^{-5}$	
RPMI, CO <sub>2</sub>	$1.1 \cdot 10^{-6}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-6}$	0.018

Medio RPMI a diferentes pHs.

	2.0	4.0	7.2
4.0	$2.3 \cdot 10^{-3}$		
7.2	$1.8 \cdot 10^{-3}$	0.39, ns	
9.0	0.32, ns	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$9.3 \cdot 10^{-3}$

Medio RPMI, cambio de pH al 5° día de mantenimiento.

	RPMI, pH 7.2 a pH 4.0 al 5° día de mantenimiento.
RPMI, pH 4.0	0.42, ns

Diferentes suplementos sobre el medio RPMI, pH 4.0.

	RPMI+G	RPMI+C	RPMI	RPMI+P+G	RPMI+P+C
RPMI+C	0.79, ns				
RPMI	$9.1 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$			
RPMI+P+G	0.53, ns	0.6, ns	$8.8 \cdot 10^{-4}$		
RPMI+P+C	0.92, ns	0.61, ns	$2.9 \cdot 10^{-3}$	0.23, ns	
RPMI+P	$3.0 \cdot 10^{-4}$	$3.1 \cdot 10^{-5}$	0.3, ns	$2.1 \cdot 10^{-5}$	$6.0 \cdot 10^{-5}$

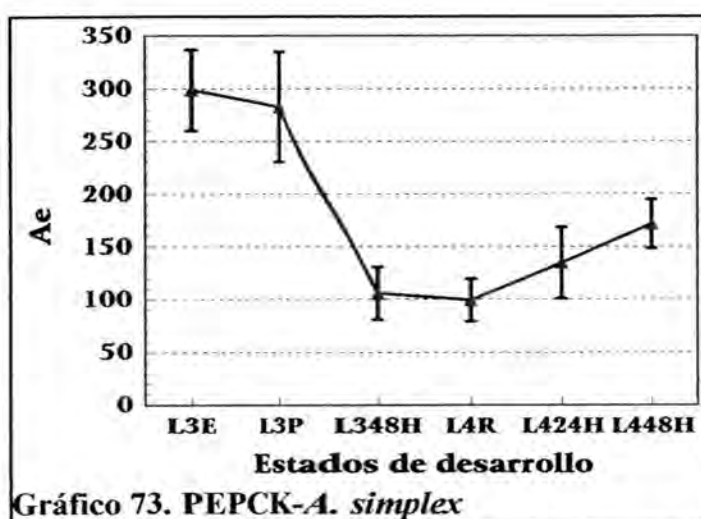
5.3.-ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ENZIMAS FIJADORAS DE CO<sub>2</sub>

A continuación se muestran las actividades específicas de cada una de las enzimas expresadas como  $A_e$  media  $\pm$  ES (en nanomoles de producto producido por minuto y mg de proteína).

5.3.1.-*Anisakis simplex*

## 5.3.1.1.-PEPCK, EC: 4.1.1.49.

En Gráfico 73 se muestra la  $A_e$  de la enzima PEPCK para *A. simplex*. Como se puede observar, existe un mínimo de actividad significativo entre los estados de desarrollo L348H y L4R con respecto a la actividad máxima de L3E. Se puede decir que el valor de las actividades detectadas corresponden únicamente a la PEPCK, pues los ensayos de la PEPCK en estas condiciones de medida (pero sin IDP) fueron negativos para todos los estados de desarrollo.

Gráfico 73. PEPCK-*A. simplex*

Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
$A_e \pm ES$ (n=4)	298.1 $\pm$ 38.4	282.3 $\pm$ 52.3	105.4 $\pm$ 25.0	99.0 $\pm$ 20.2	134.4 $\pm$ 33.7	171.2 $\pm$ 23.0

A continuación se exponen los valores de "P" (probabilidad) obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H
L3P	0.800, ns <sup>1</sup>	-			
L348H	0.005	0.020	-		
L4R	0.003	0.019	0.800, ns	-	
L424H	0.018	0.400, ns	0.500, ns	0.400, ns	-
L448H	0.029	0.090, ns	0.100, ns	0.056, ns	0.400, ns

<sup>1</sup>ns: diferencia no significativa.

## 5.3.1.2.-EM, EC: 1.1.1.39.

Toda la actividad EM detectada está ligada a NAD y no a NADP. En el Gráfico 74 se muestra la Ae de la enzima EM para *A. simplex*. La actividad enzimática detectada para la EM es en general inferior a la detectada para la PEPCK. Como vemos en el siguiente gráfico, existe un punto máximo de actividad significativo correspondiente con el estado L424H.

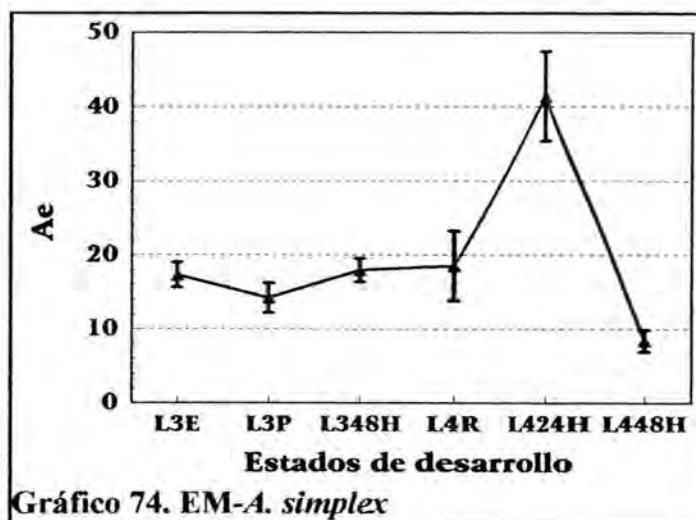


Gráfico 74. EM-A. simplex

Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
Ae ± ES (n=3)	17.3 ± 1.7	14.2 ± 2.0	17.9 ± 1.6	18.5 ± 4.7	41.4 ± 6.0	8.4 ± 1.5

A continuación se exponen los valores de "P" obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

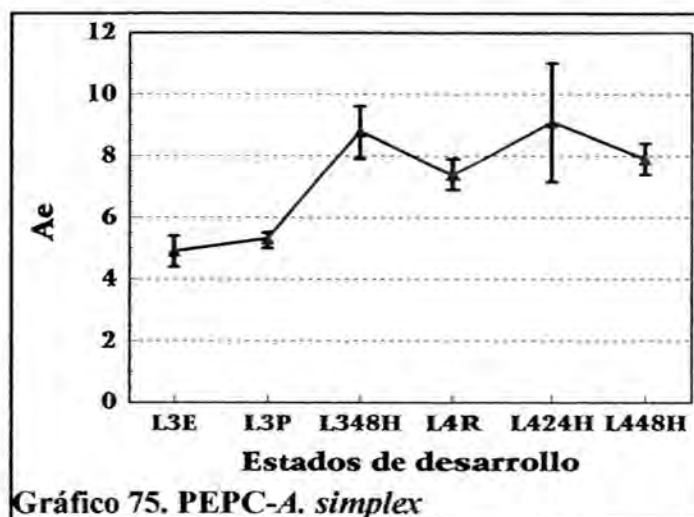
Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H
L3P	0.300, ns	-			
L348H	0.800, ns	0.200, ns	-		
L4R	0.800, ns	0.400, ns	0.900, ns	-	
L424H	0.041	0.012	0.042	0.038	-
L448H	0.200, ns	0.079, ns	0.011	0.100, ns	0.02

## 5.3.1.3.-PC, EC: 6.4.1.1.

No se detectaron niveles de actividad PC para ningún estado de desarrollo en nuestras condiciones experimentales.

## 5.3.1.4.-PEPC, EC: 4.1.1.31.

En el Gráfico 75 se muestra la Ae de la enzima PEPC para *A. simplex*. La actividad fue baja en todos los estados de desarrollo, si bien se nota un ascenso de actividad significativo de L348H, L4R y L448H, y no significativo por su elevado ES, de L424H respecto a las larvas recogidas del pescado (L3E y L3P).



Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
Ae ± ES (n=3)	4.9 ± 0.5	5.3 ± 0.2	8.8 ± 0.8	7.4 ± 0.5	9.1 ± 1.9	7.9 ± 0.5

A continuación se exponen los valores de "P" obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

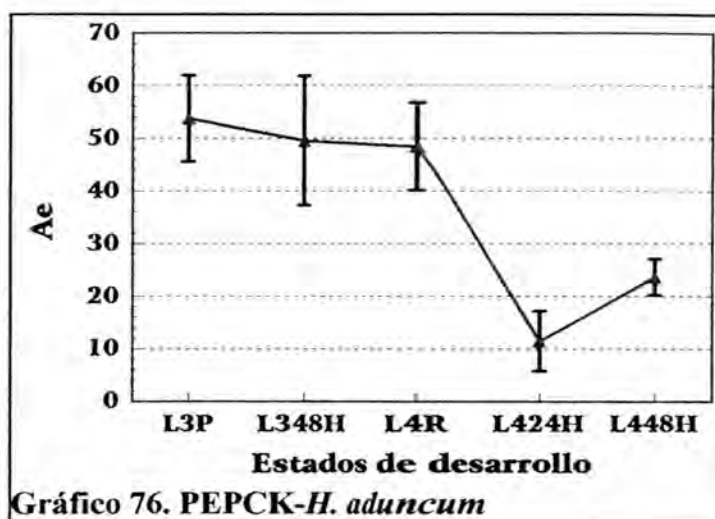
Estados de desarrollo	L3E	L3P	L348H	L4R	L424H
L3P	0.400, ns	-			
L348H	0.013	0.032	-		
L4R	0.023	0.037	0.200, ns	-	
L424H	0.100, ns	0.100, ns	0.800, ns	0.300, ns	-
L448H	0.012	0.025	0.300, ns	0.500, ns	0.500, ns

5.3.2.-*Hysterothylacium aduncum*.

## 5.3.2.1.-PEPCK, EC: 4.1.1.49.

En el Gráfico 76 se muestra la Ae de la enzima PEPC para *H. aduncum*.

Como se puede observar, la actividad máxima corresponde a la L3, desde su recogida del pez hasta que muda a L4, reduciéndose a continuación significativa y drásticamente la actividad.

Gráfico 76. PEPCK-*H. aduncum*

Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
Ae±ES (n=3)	53.7±8.2	49.5±12.3	48.4±8.5	11.4±5.7	23.6±3.4

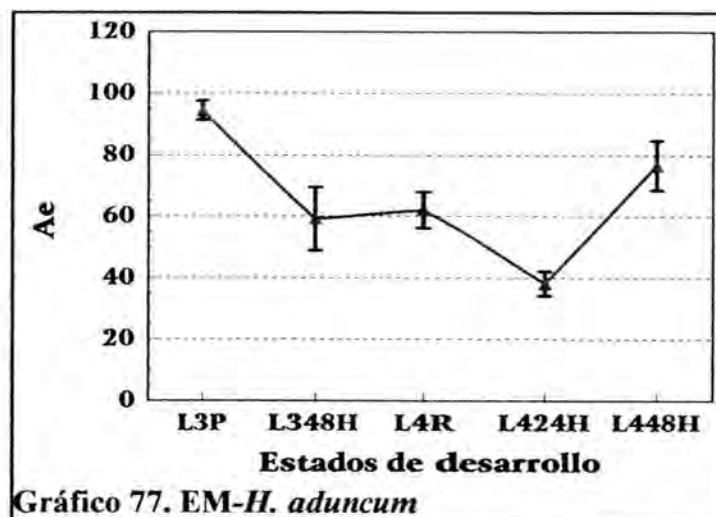
A continuación se exponen los valores de "P" obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H
L348H	0.700, ns	*		
L4R	0.600, ns	0.900, ns	*	
L424H	0.010	0.047	0.022	*
L448H	0.026	0.100, ns	0.022	0.100, ns



## 5.3.2.2.-EM, EC: 1.1.1.39.

Toda la actividad EM detectada está ligada a NAD y no a NADP. En el Gráfico 77 se muestra la Ae de la enzima EM para *H. aduncum*. En general, la actividad va descendiendo significativamente desde L3P hasta L424H en donde se sitúa el mínimo, para luego duplicarse en sólo 24 horas (L448H).



Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
Ae ± ES (n=4)	94.4 ± 3.1	59.1 ± 10.3	62.0 ± 5.9	38.1 ± 4.0	76.6 ± 8.1

A continuación se exponen los valores de "P" obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

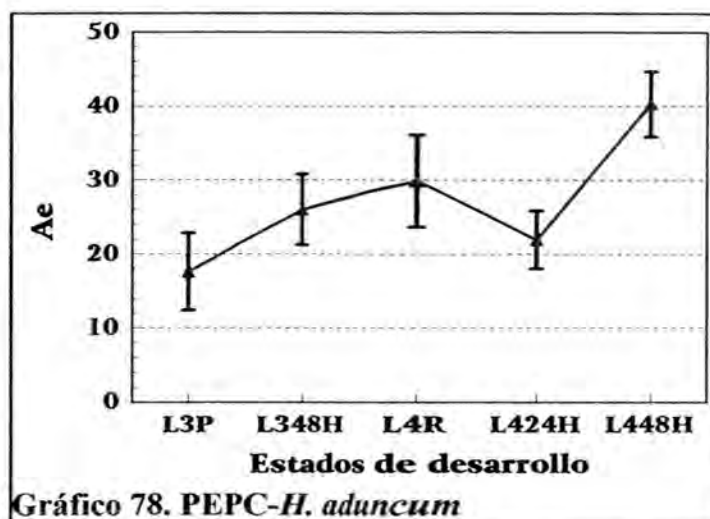
Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H
L348H	0.010	-		
L4R	0.027	0.800, ns	-	
L424H	$3 \cdot 10^{-5}$	0.092, ns	0.015	-
L448H	0.076, ns	0.200, ns	0.100, ns	0.005

## 5.3.2.3.-PC, EC: 6.4.1.1.

No se detectaron niveles de actividad PC para ningún estado de desarrollo en nuestras condiciones experimentales.

## 5.3.2.4.-PEPC, EC: 4.1.1.31.

En el Gráfico 78 se muestra la Ae de la enzima PEPC para *H. aduncum*. En general, la actividad aumenta poco a poco según avanza el desarrollo del parásito, detectándose un incremento de actividad significativo desde L424H a L448H.

Gráfico 78. PEPC-*H. aduncum*

Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H	L448H
Ae ± ES (n=3)	17.6 ± 5.2	26.05 ± 4.8	29.8 ± 6.2	21.9 ± 3.9	40.2 ± 4.4

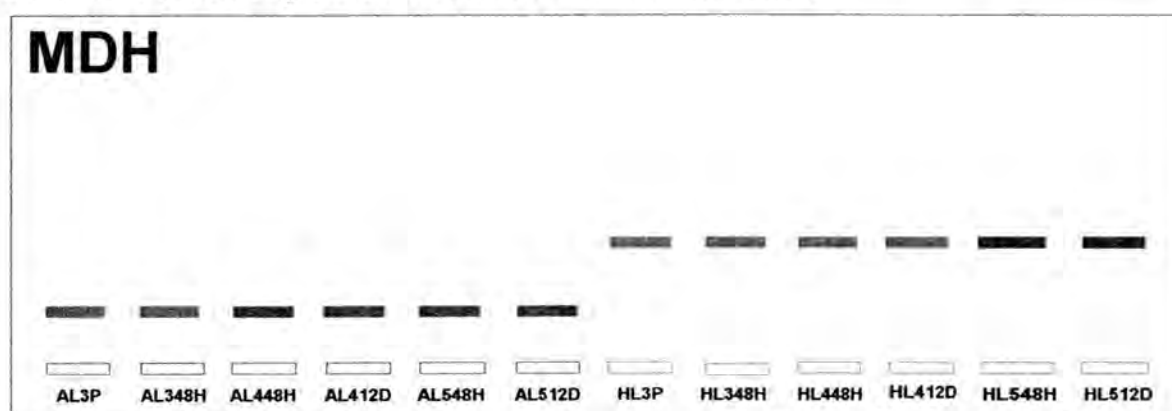
A continuación se exponen los valores de "P" obtenidos por el método estadístico de la "t" de Student, por el que se compara la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de cada estado de desarrollo (diferencia significativa para  $P < 0.05$ ).

Estados de desarrollo	L3P	L348H	L4R	L424H
L348H	0.400, ns	-		
L4R	0.200, ns	0.700, ns	-	
L424H	0.500, ns	0.600, ns	0.300, ns	-
L448H	0.028	0.100, ns	0.200, ns	0.035

## 5.4.-ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS DE DESARROLLO

## 5.4.1.-MDH (NADP), EC: 1.1.1.82.

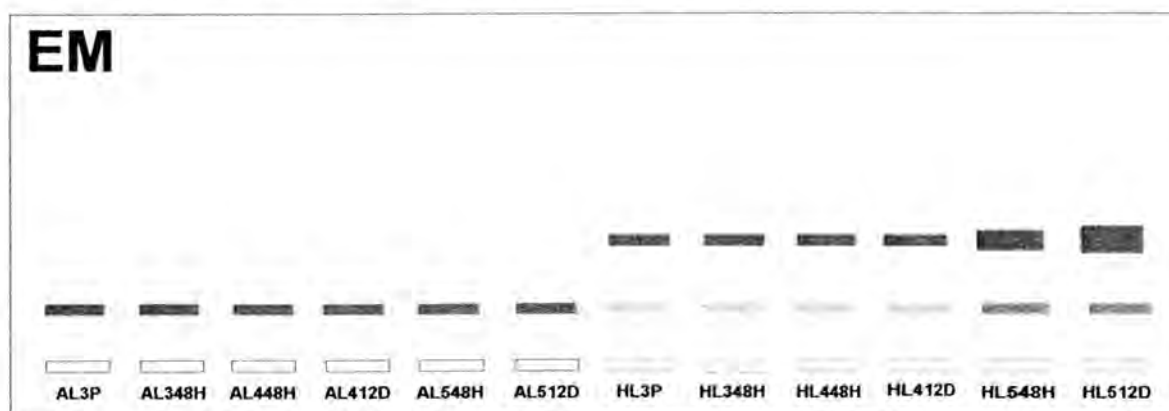
Previamente y mediante procedimiento espectrofotométrico se determinó que la actividad MDH, tanto en *A. simplex* como *H. aduncum*, es dependiente de NADP. En el Esquema 1 se puede observar el patrón de bandas para la enzima MDH obtenidas con un individuo por pocillo. Para *A. simplex*, todos los individuos presentaron una banda de igual movilidad electroforética, independientemente del estado de desarrollo. Igual ocurre para *H. aduncum*, si bien se observa que las bandas correspondientes a los estados de desarrollo L3P, L348H, L448H y L412D fueron de menor intensidad.



Esquema 1

## 5.4.2.-EM (NAD), EC: 1.1.1.39.

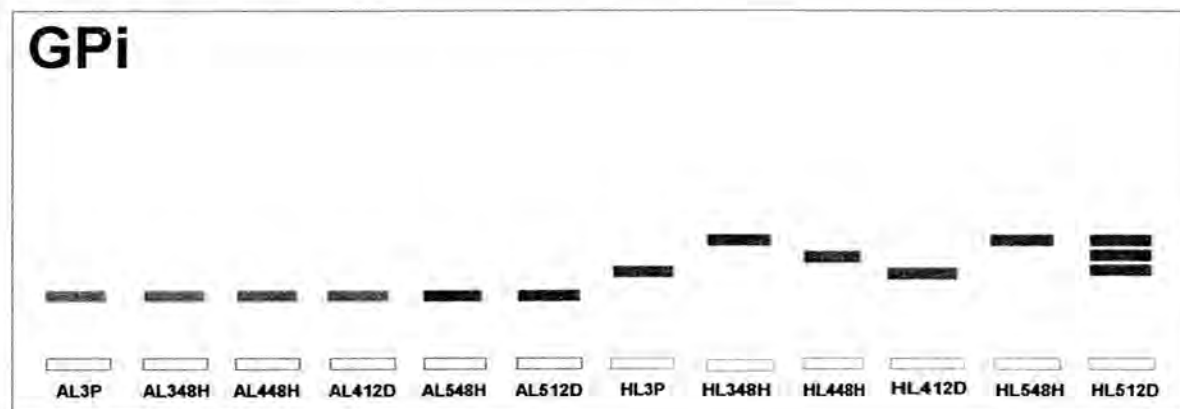
Previamente y mediante procedimiento espectrofotométrico se determinó que la actividad EM, tanto en *A. simplex* como *H. aduncum*, es dependiente de NAD. En el Esquema 2 se observa el patrón de bandas para la enzima EM empleando un sólo individuo por pocillo. Para *A. simplex*, todos los individuos presentaron una banda de igual intensidad y movilidad electroforética. Para *H. aduncum* se observan dos bandas, la inferior de menor intensidad, y la superior en el caso de L548H y L512D muy intensas. La movilidad electroforética de las dos bandas fue igual en cada uno de los individuos estudiados.



Esquema 2

## 5.4.3.-GPI, EC: 5.3.1.9.

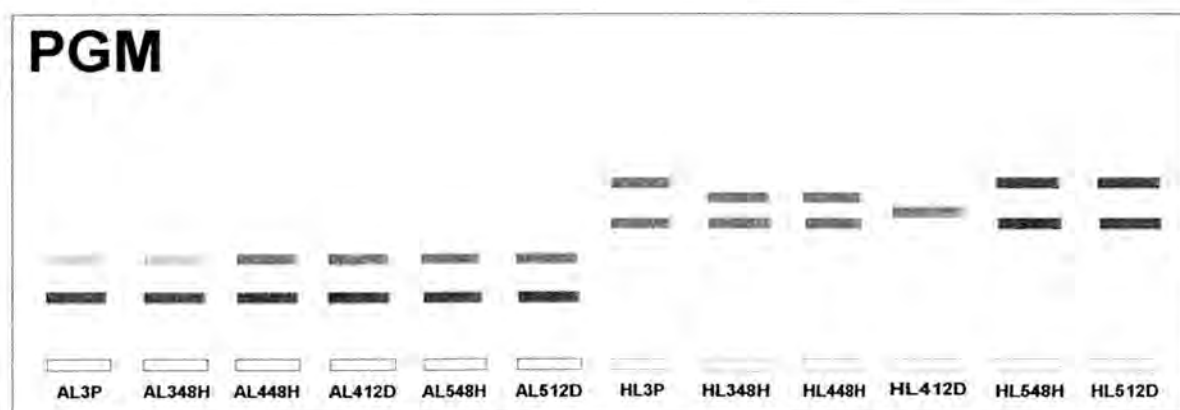
En el Esquema 3 se observa el patrón de bandas para la enzima GPI utilizando un sólo individuo por pocillo. En *A. simplex*, se presentó solo una banda por individuo, de igual movilidad electroforética, y algo más intensa en L548H y L512D. Sin embargo en *H. aduncum* se presentaron varias bandas, todas con la misma intensidad, y de movilidad electroforética variable. En uno de los individuos apareciendo tres bandas.



Esquema 3

## 5.4.4.-PGM, EC: 2.7.5.1.

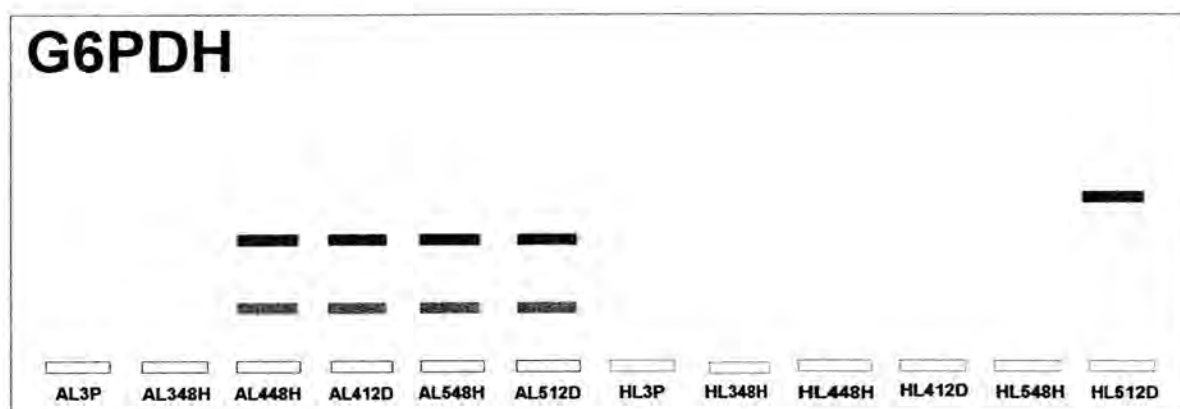
En el Esquema 4 se observa el patrón de bandas para la enzima PGM empleando un extracto de 1 individuo por pocillo. En *A. simplex* se detectaron 2 bandas para cada estado de desarrollo, la inferior siempre de mayor intensidad, y con la misma movilidad electroforética en los diferentes individuos estudiados. Sin embargo en *H. aduncum* aparecieron de una a dos bandas por individuo, pero con movilidad electroforética variable.



Esquema 4

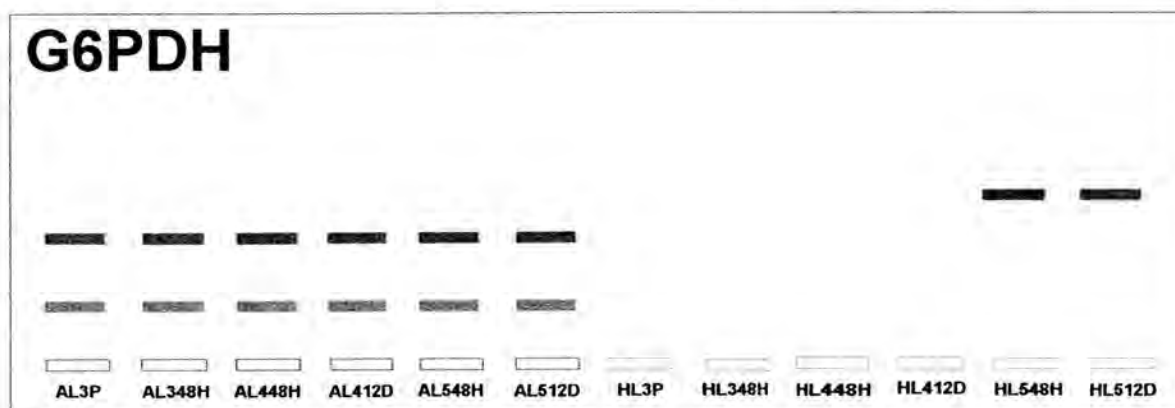
## 5.4.5.-G6PDH, EC: 1.1.1.49.

En el Esquema 5 se representa el patrón de bandas para la enzima G6PDH utilizando un solo individuo por pocillo. En *A. simplex*, se observan dos bandas de diferente intensidad e igual movilidad electroforética para cada estado de desarrollo, excepto en los estados AL3P y AL348H. En *H. aduncum*, sólo se observó una banda para L512D.



Esquema 5

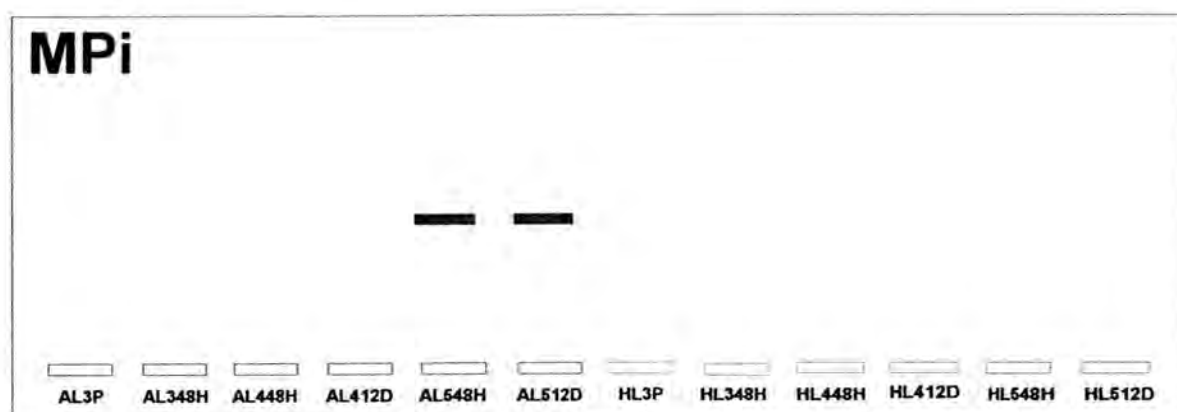
En el Esquema 6 se observa el patrón de bandas para esta misma enzima, pero con un extracto de 5 individuos por pocillo. En *A. simplex* se repiten los resultados, haciéndose visibles ahora las bandas correspondientes a los pocillos AL3P y AL348H. En *H. aduncum* aparece una banda en el pocillo HL548H y otra en HL512D, ambas de igual intensidad y movilidad electroforética..



Esquema 6

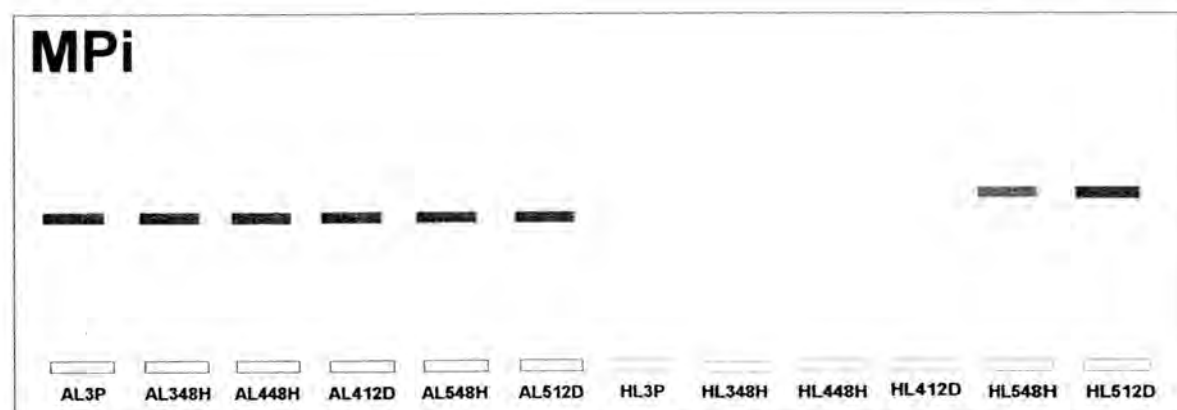
## 5.4.6.-MPi, EC: 5.3.1.8.

En el Esquema 7 se representa el patrón de bandas correspondientes a la enzima MPi realizado con un solo individuo por pocillo. Sólo se observaron dos bandas correspondientes a los pocillos AL548H y AL512D, de igual intensidad y movilidad electroforética.



Esquema 7

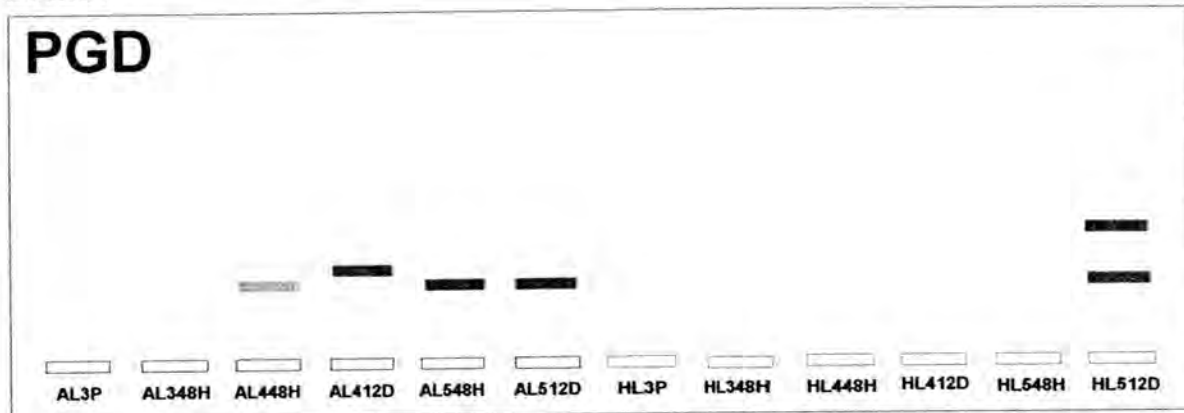
En el Esquema 8 se representa el patrón de bandas para la enzima MPi empleando un extracto de 5 individuos por pocillo. En *A. simplex*, aparece una banda de la misma intensidad y movilidad electroforética para cada uno de los estados de desarrollo. Igual ocurre en *H. aduncum*, si bien sólo aparecen bandas en los pocillos HL548H y HL512D.



Esquema 8

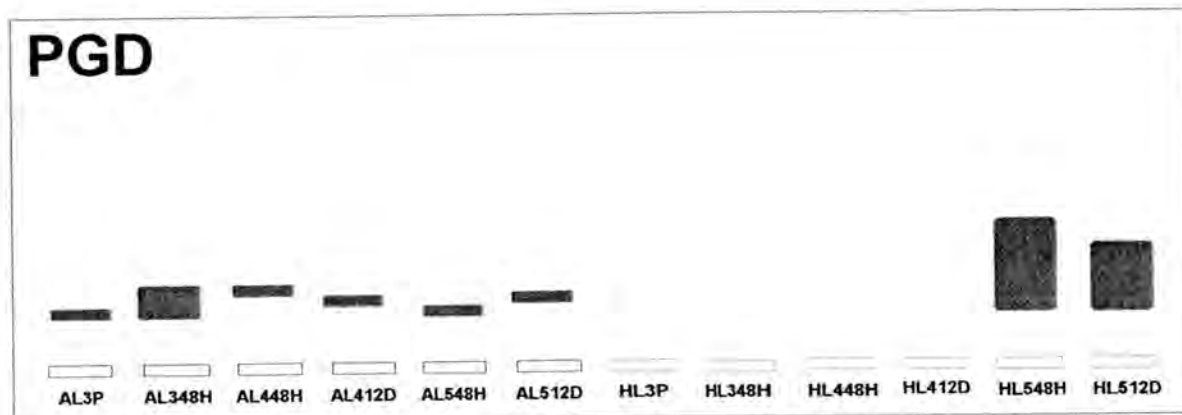
## 5.4.7.-PGD, EC: 1.1.1.44.

En el Esquema 9 se representa el patrón de bandas correspondientes a la enzima PGD realizado con un solo individuo por pocillo. Para *A. simplex* no se observan bandas en AL3P y AL348H, apareciendo una banda en los demás estados de desarrollo, de diferente movilidad electroforética entre individuos. En *H. aduncum* solo se observan dos bandas de la misma intensidad en L512D.



Esquema 9

En el Esquema 10 se representa el patrón de bandas correspondientes a la enzima PGD realizado con un extracto de 5 individuos. Para *A. simplex* aparecen bandas de la misma intensidad en todos los estados de desarrollo, pero de diferente movilidad electroforética. En AL348H se solapan varias bandas. En *H. aduncum* aparece un conjunto de bandas indiferenciadas en L548H y L512D.

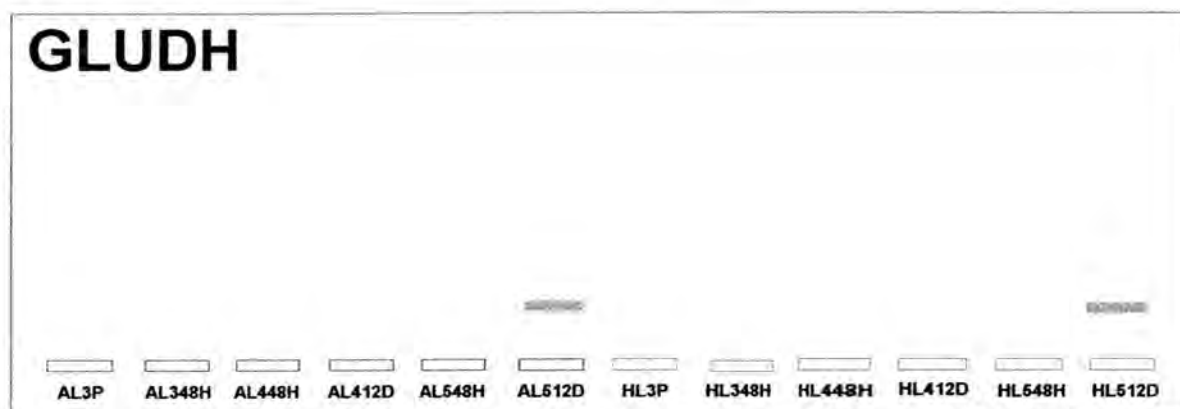


Esquema 10

## 5.4.8.-GLUDH, EC: 1.4.1.3.

En el Esquema 11 se representa el patrón de bandas para la enzima GLUDH obtenido con un extracto de 5 individuos por pocillo. Sólo se observó una banda de intensidad débil en los pocillos AL512D y HL512D.

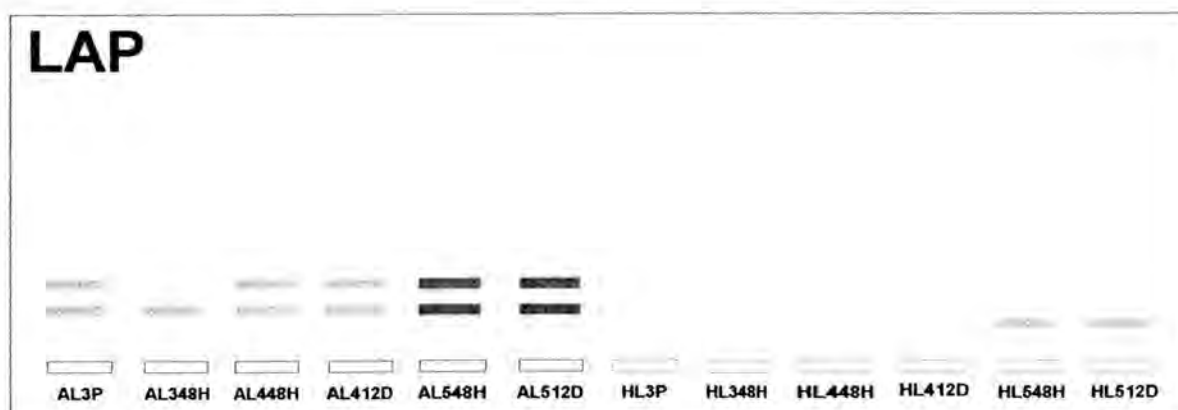
En la electroforesis realizada con un solo individuo por pocillo no se observó banda alguna.



Esquema 11

## 5.4.9.-LAP, EC: 3.4.11.1.

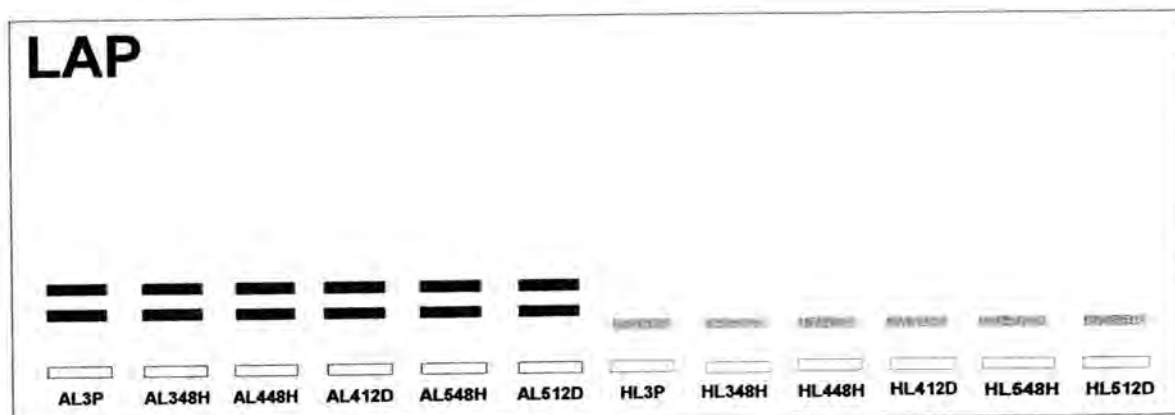
En el Esquema 12 se presenta el patrón de bandas correspondiente a la enzima LAP obtenido con un individuo por pocillo. Para *A. simplex*, en todos los estados de desarrollo aparecen dos bandas de igual movilidad electroforética (excepto en AL348H que aparece una), de más intensidad en L548H y L512D. Para *H. aduncum* sólo se observa una banda de poca intensidad en L548H y L512D, ambas con igual movilidad electroforética.



Esquema 12



En el Esquema 13 aparece el patrón de bandas correspondiente a la enzima LAP realizado con un extracto de 5 individuos por pocillo. Para *A. simplex* se observan dos bandas de igual intensidad y movilidad electroforética para cada uno de los estados de desarrollo. Para *H. aduncum* sólo aparece una banda de poca intensidad y de igual movilidad electroforética para cada uno de los estados de desarrollo.



Esquema 13

## 5.5.-ESTUDIOS CITOGENÉTICOS.

### 5.5.1.-DATOS CARIOLÓGICOS DEL MACHO DE *Anisakis simplex*. MEIOSIS.

En las primeras etapas de la meiosis, el material genético muestra escasa apetencia por los colorantes, por lo que los cromosomas aparecen débilmente teñidos. No obstante, en algunas células se puede ver que los cromosomas homólogos se aparean en toda su longitud, enfrentándose regiones homólogas (Fotos 44, 45, 46 y 47).

Prácticamente, en todas las células observadas, desde que comienza la sinapsis de los cromosomas homólogos, la disposición de éstos parece mostrar una cierta polarización hacia una zona celular, como si los extremos de los cromosomas tendieran a confluir a una región determinada. Esta región, muestra gran apetencia por el Giemsa, es de forma casi esférica y mide  $5 \mu\text{m}$  de diámetro (Fotos 45 y 48).

Las células en metafase I muestran 4 bivalentes, muy condensados e intensamente teñidos, de un tamaño que oscila entre  $8-12 \mu\text{m}$ . En esta fase se observa la disposición circular de los bivalentes encerrando en su interior un número elevado de elementos puntiformes de  $1 \mu\text{m}$  de diámetro (Foto 49 y 50).

La etapa de la meiosis más frecuentemente observada ha sido la metafase II. Los cromosomas siguen adoptando una disposición circular. El número de cromosomas en la mayoría de las células es de 4, no observándose los elementos puntiformes (Fotos 51, 52 y 53).

En la etapa de anafase II temprana, cuando empiezan las cromátidas a separarse, con frecuencia los cromosomas presentan una disposición radial en la placa ecuatorial, adquiriendo una forma característica en cruz cuando el aplastamiento es perpendicular al huso, (Fotos 54 y 55).

No se ha observado telofase II.

(En todas las fotos que siguen, la barra equivale a  $10 \mu\text{m}$ ).

*Anisakis simplex* macho: MEIOSIS



Foto 44. Profase meiótica temprana.



Foto 45. Profase.

*Anisakis simplex* macho. MEIOSIS.

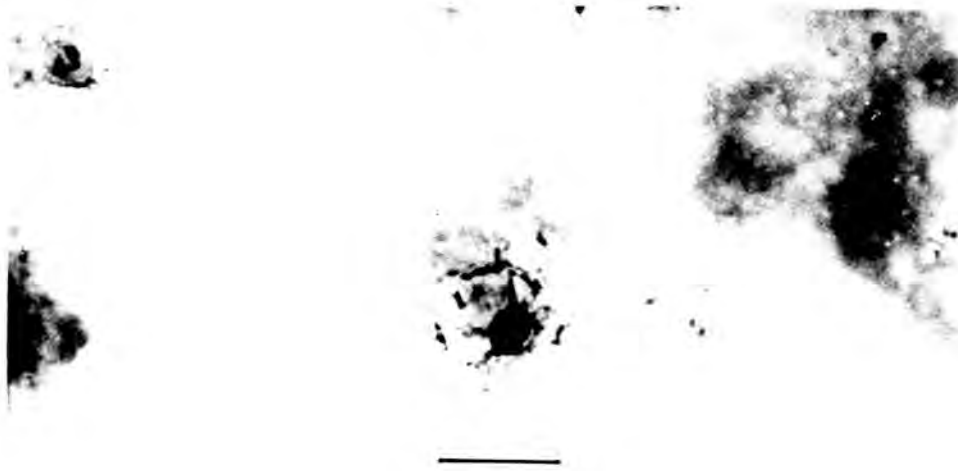


Foto 46. Zigotene tardía.



Foto 47. Diplotene temprana.

*Anisakis simplex* macho: MEIOSIS

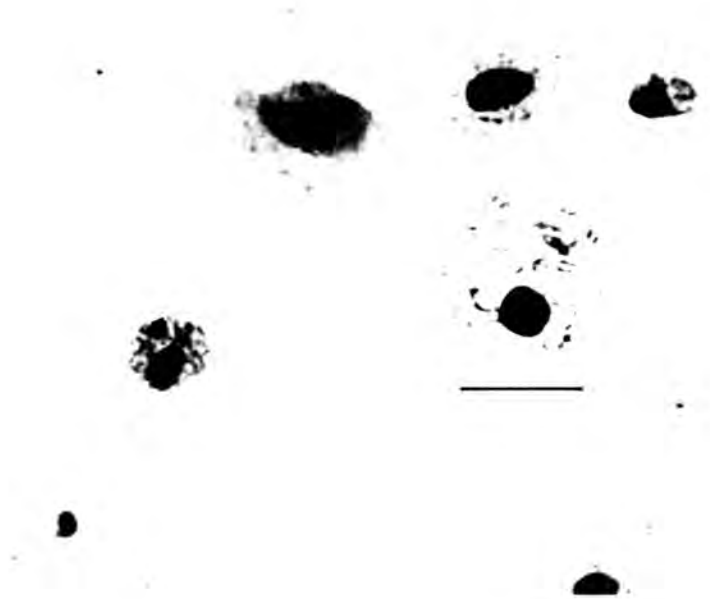


Foto 48. Diplotene.



Foto 49. Metafase I.

*Anisakis simplex* macho: MEIOSIS



Foto 50. Metafase I.

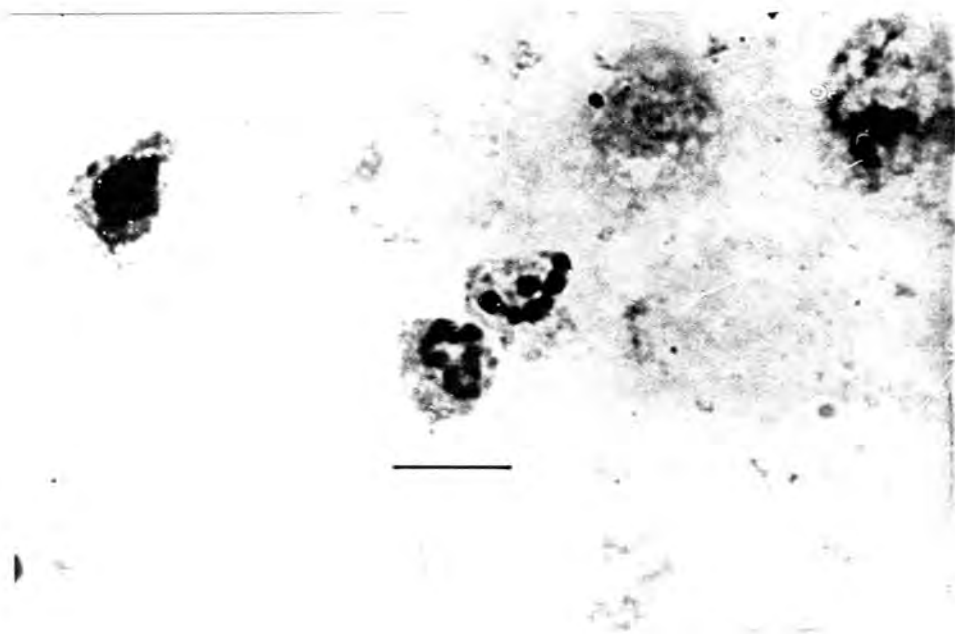


Foto 51. Metafase II.

*Anisakis simplex* macho: MEIOSIS



Foto 52. Metafase II.



Foto 53. Metafase II tardía.

*Anisakis simplex* macho: MEIOSIS

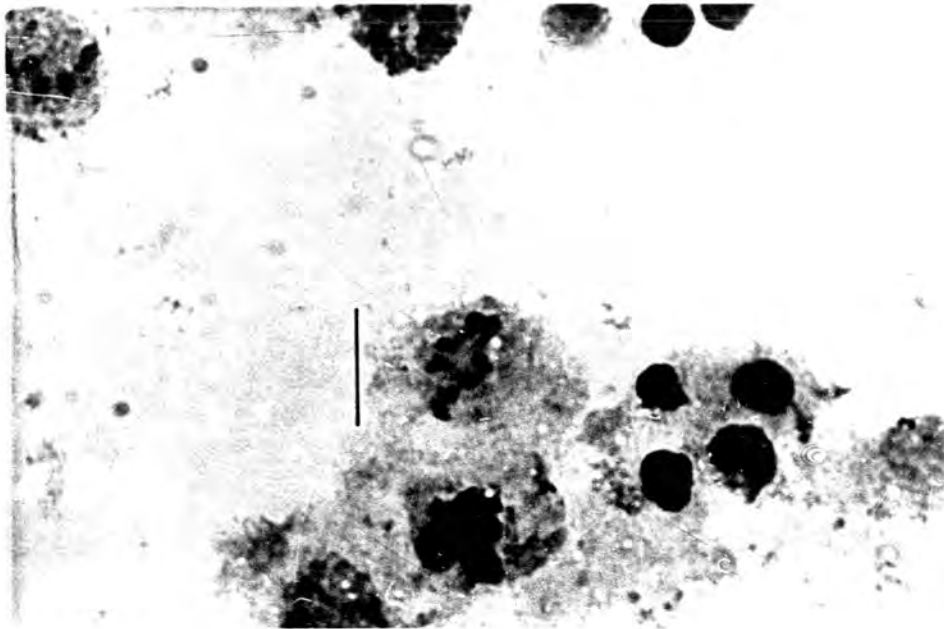


Foto 54. Principio de Anafase II.

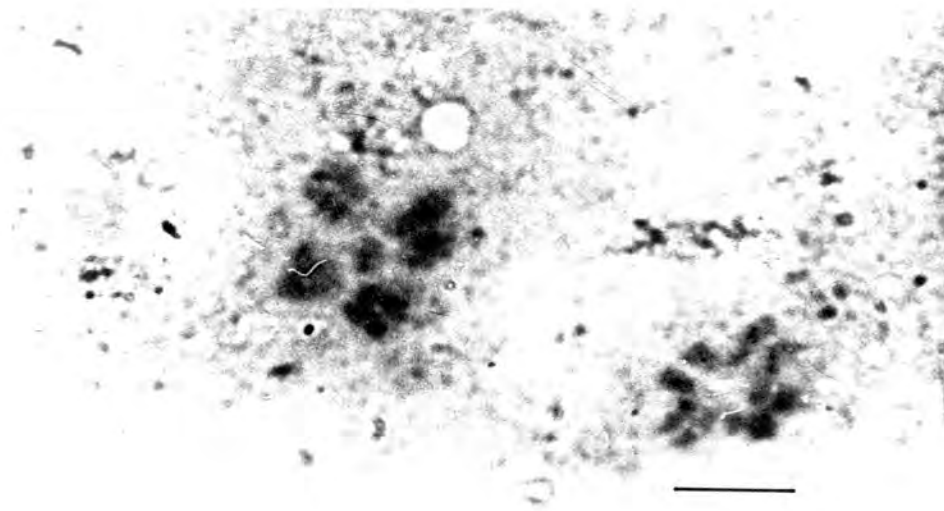


Foto 55. Principio de Anafase II.



## 5.5.2.-DATOS CARIOLÓGICOS DEL MACHO DE *Hysterothylacium aduncum*.

### 5.5.2.1.-MITOSIS.

De los 9 machos estudiados, se han observado algunas profases mitóticas y 25 placas en metafase mitótica, y de ellas sólo en 5 los cromosomas estaban bien extendidos, pudiéndose llevar a cabo el recuento cromosómico. A pesar de ello, la determinación del número de cromosomas ha resultado bastante difícil debido al tamaño, que osciló entre 4  $\mu\text{m}$  para las dos parejas de cromosomas mayores hasta 1  $\mu\text{m}$  para los 8 más pequeños. El número cromosómico diploide es  $2n=36$  (Fotos 56, 57, 58 y 59).

En todas las fotos, la barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.2.2.-MEIOSIS.

Al iniciarse la profase, los cromosomas aparecen desespirilizados con aspecto filamentosos y enmarañados, mostrando en toda su longitud una serie de cromómeros uniformemente repartidos, pudiéndose observar el nucleolo (Fotos 60 y 61).

En un número de células no muy elevado (10), se han observado los cromosomas homólogos apareados en toda su longitud. En otras células, se muestran los cromosomas homólogos unidos por ciertas zonas y separados por otras (Fotos 61 y 62).

En contadas ocasiones se han visto células en paquitene; no obstante en las pocas placas observadas se hace visible la espiralización de los cromosomas que hace que los bivalentes se acorten y queden más individualizados (Foto 63). No se han manifestado en ellos zonas heterocromáticas ni tampoco "knobs" (nudos).

En lo que respecta a la diplotene, sólo se pudieron observar algunas células en estadio temprano (Fotos 64 y 65). Este hecho contrasta con la abundancia de células en estado difuso, donde los cromosomas aparecen con una falta total de definición y apetencia por los colorantes (Fotos 66 y 67).

Las células observadas en diaquinesis también han sido escasas, encontrándose en fase tardía. Los cromosomas no se encontraban totalmente individualizados (Fotos 68 y 69).

La metafase I es relativamente frecuente. En ella, los bivalentes alcanzan el máximo grado de condensación apareciendo como pequeños bastoncillos unidos por quiasmas terminales (Foto 70). En esta etapa, el número bivalente es 14, más 8 elementos puntiformes con tendencia a ocupar una posición central (Foto 71). En un gran número de metafases I, se observa una figura típica en cruz de un tamaño superior al resto de los bivalentes. La terminación de quiasmas de dicha figura se atrasa con respecto a los demás bivalentes, hasta tal punto que mientras algunos hemivalentes se han separado para iniciar la anafase I, la configuración de mayor tamaño puede incluso presentar aún la forma típica en cruz (Fotos 72 y 73).

El tamaño de los bivalentes osciló entre 3 y 4  $\mu\text{m}$ . Los cromosomas más pequeños presentaron un tamaño comprendido entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ .

En anáfase I, los hemivalentes emigran a los polos correspondientes para formar las dos células hijas. Durante esta etapa, el grupo de cromosomas pequeños se coloca en posición intermedia, con los centrómeros de todos ellos orientados hacia uno de los polos, emigrando posteriormente a una de las células formadas (Fotos 74, 75 y 76).

Durante la anáfase tardía I y telófase I se produce la desdiferenciación de los cromosomas (Fotos 77 y 78). El núcleo entra en una especie de profase II. En estos momentos los cromosomas aglomerados y desdiferenciados tienden a formar figuras anilladas sin contornos definidos.

De las etapas correspondientes la segunda división meiótica, la más frecuente es la metafase II. En algunas de éstas se han contado 14 cromosomas y en otras 22, de los que 8 son elementos puntiformes. También se observan dos cromosomas de mayor tamaño que el resto (Fotos 79, 80, 81 y 82).

Se han observado algunas telófases II (Fotos 83 y 84).  
En todas las fotos, la barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ .

*Hysterothylacium aduncum* macho: MITOSIS

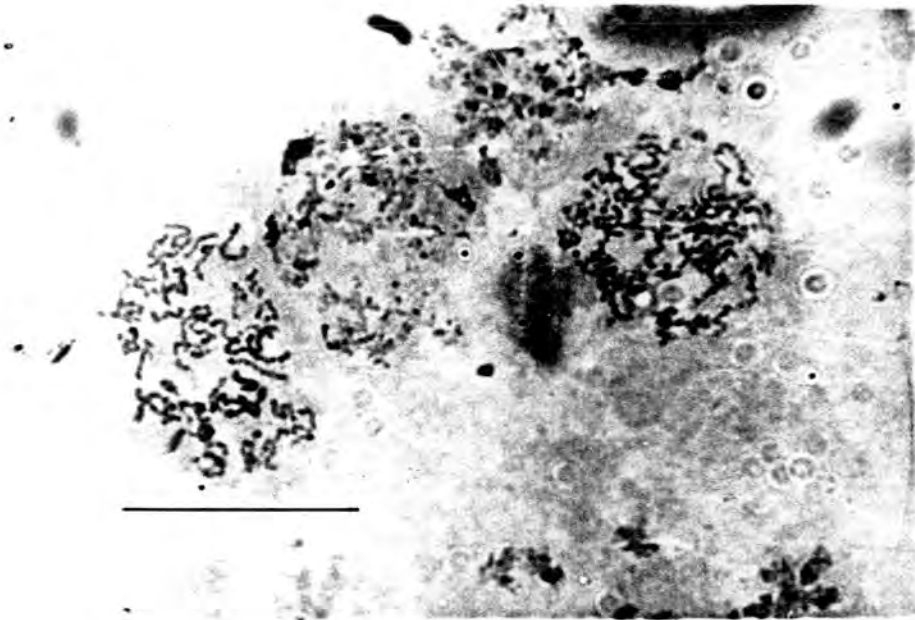


Foto 56. Profase.

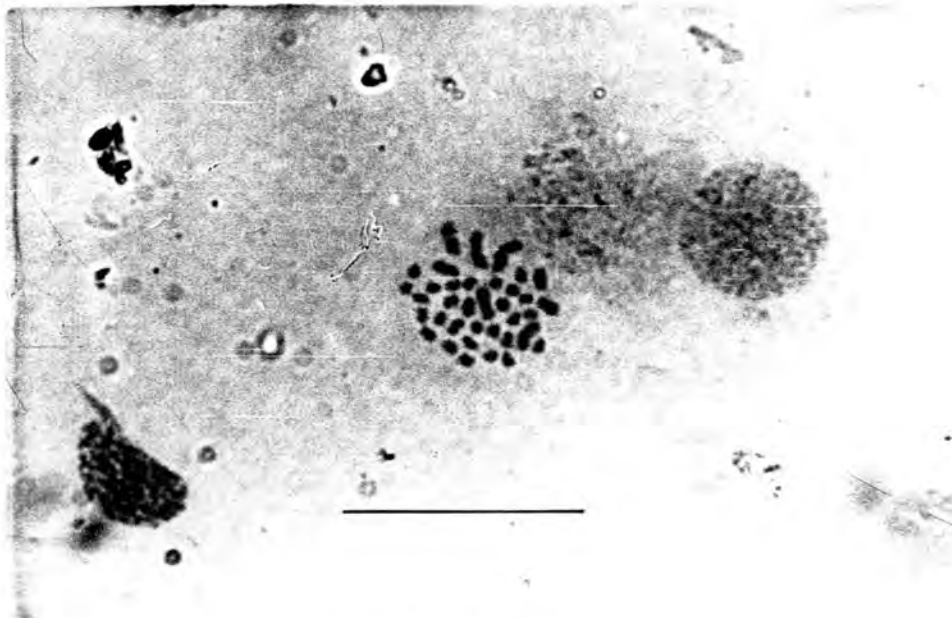


Foto 57. Metafase.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MITOSIS

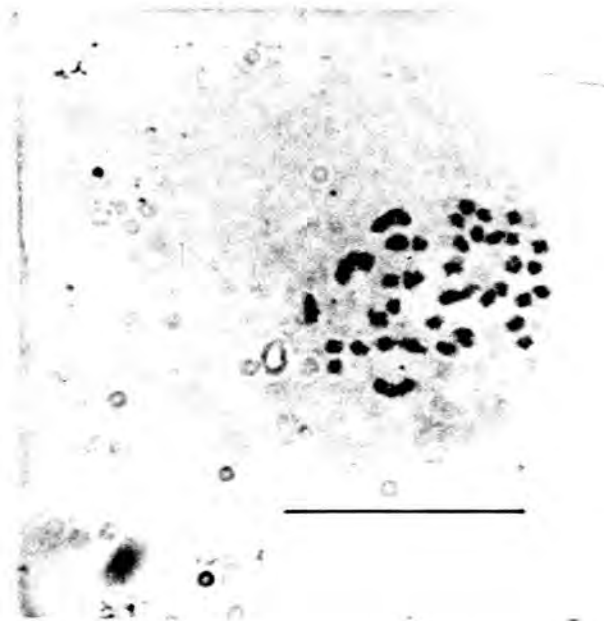


Foto 58. Metafase.



Foto 59. Metafase.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

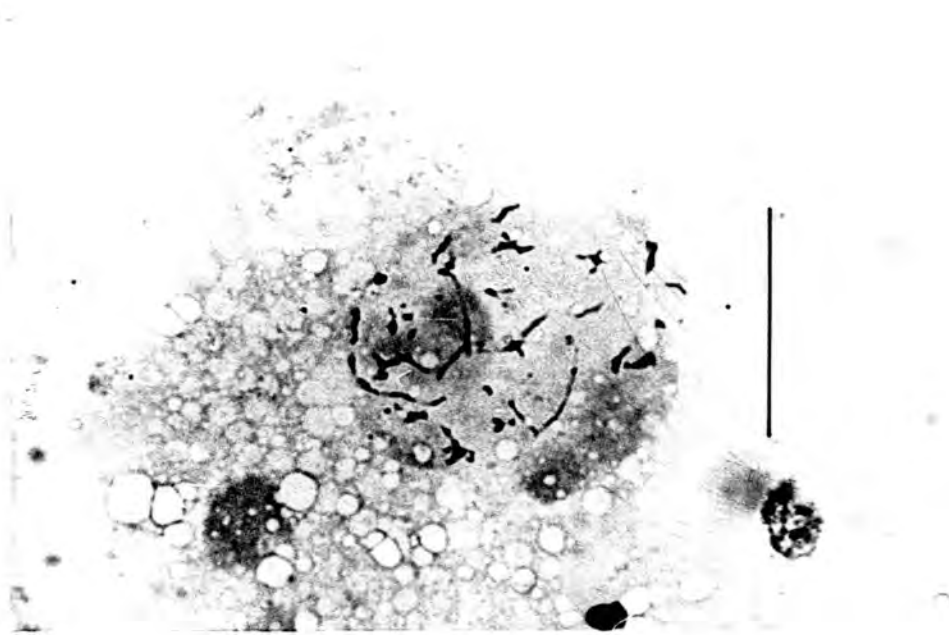


Foto 60. Leptotene.

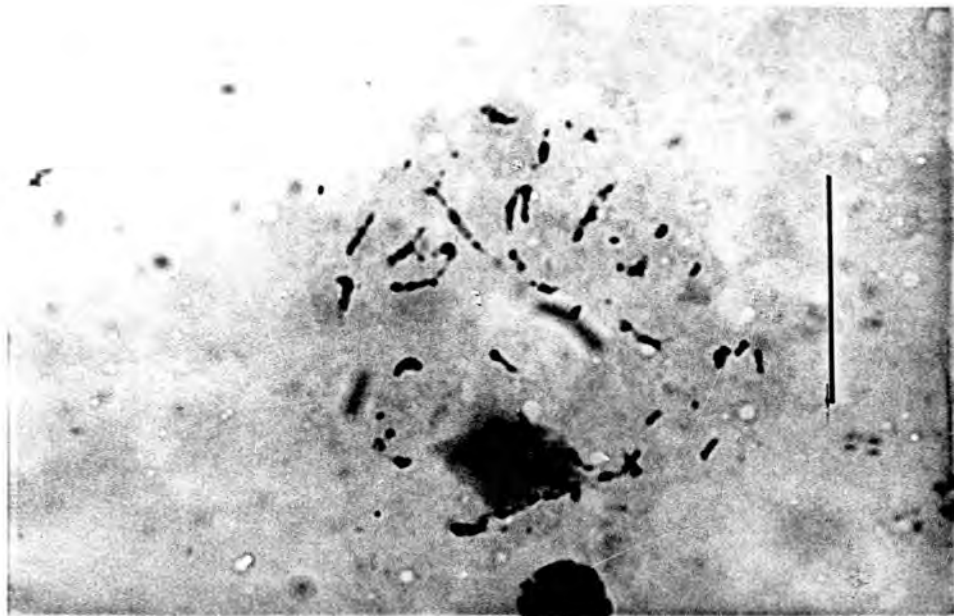


Foto 61. Leptotene.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

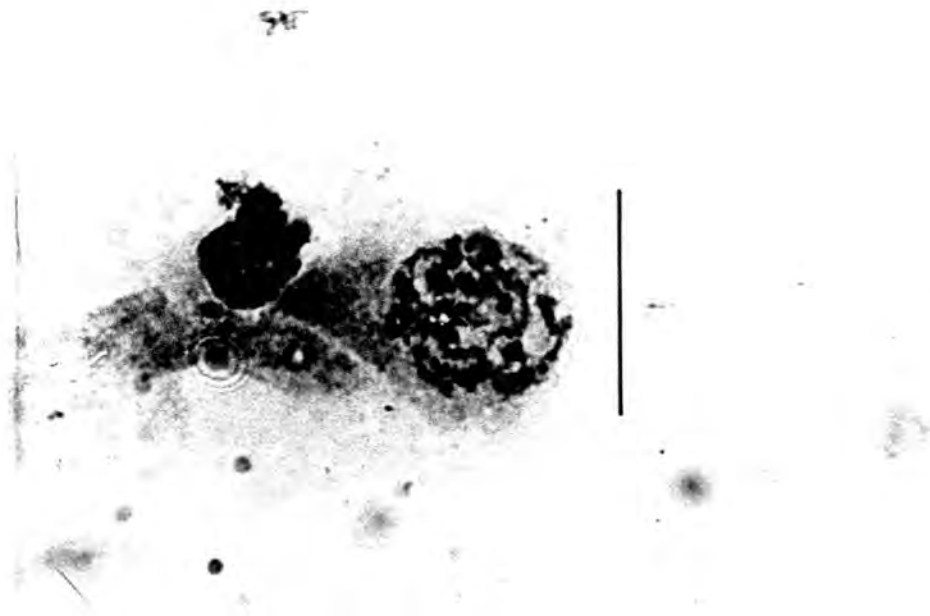


Foto 62. .Zigotene tardía

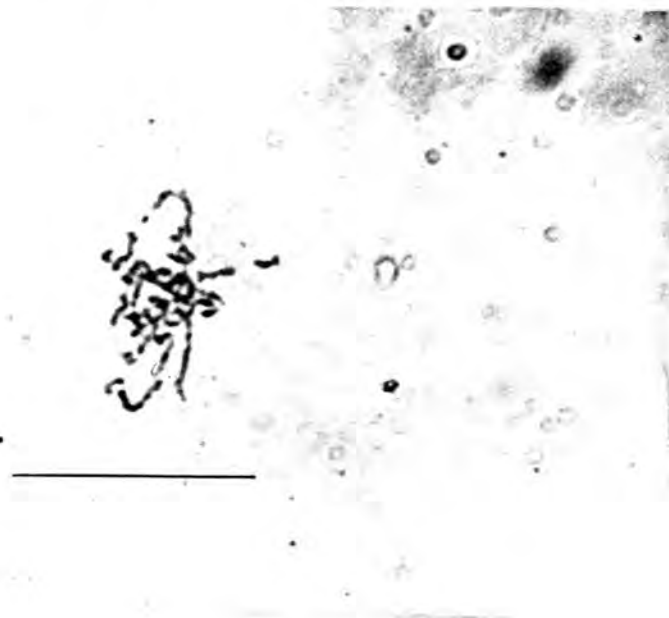


Foto 63. Paquitene.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

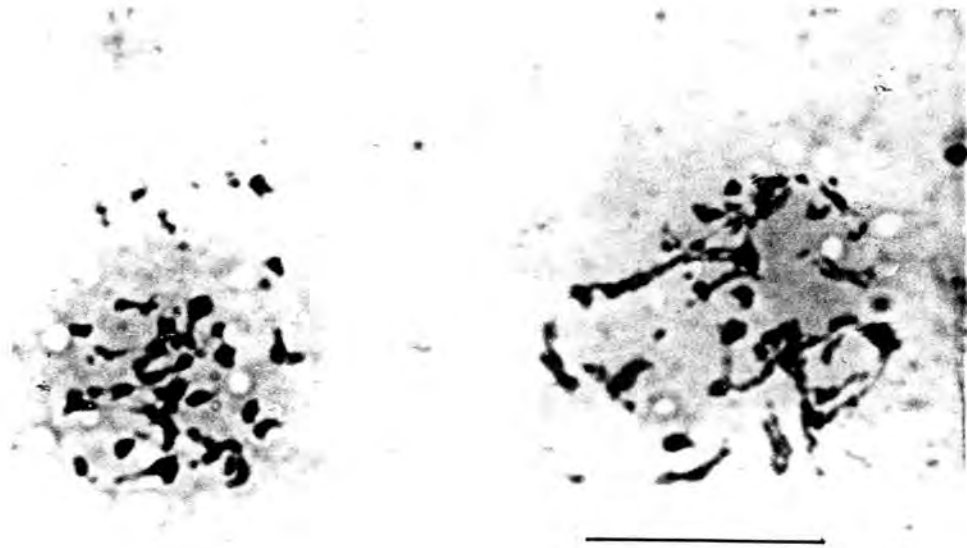


Foto 64. Diplotene.



Foto 65. Diplotene.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

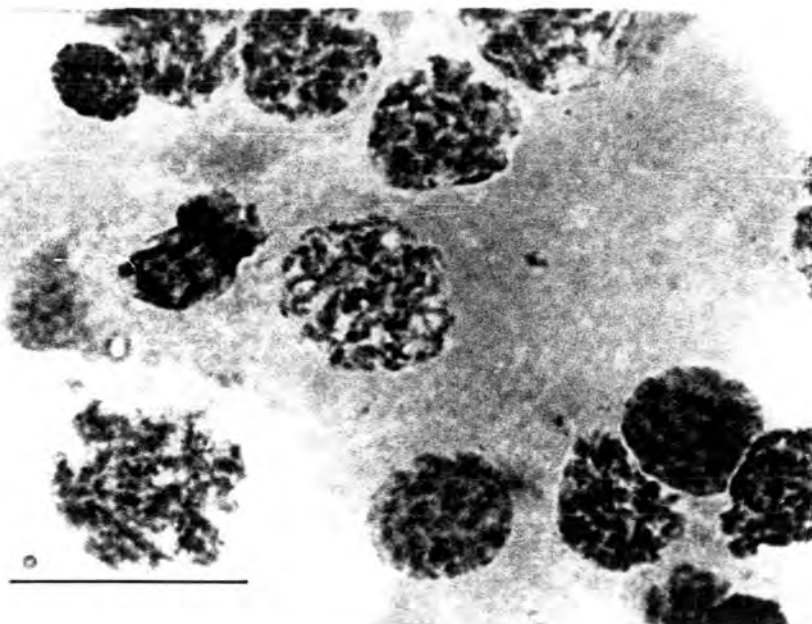


Foto 66. Estado difuso.

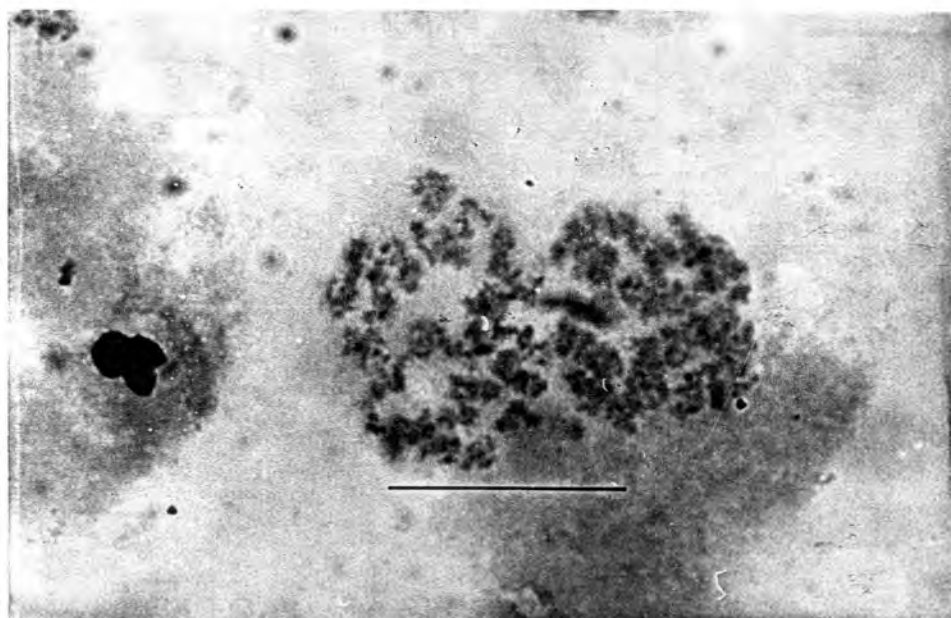


Foto 67. Estado difuso.



*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

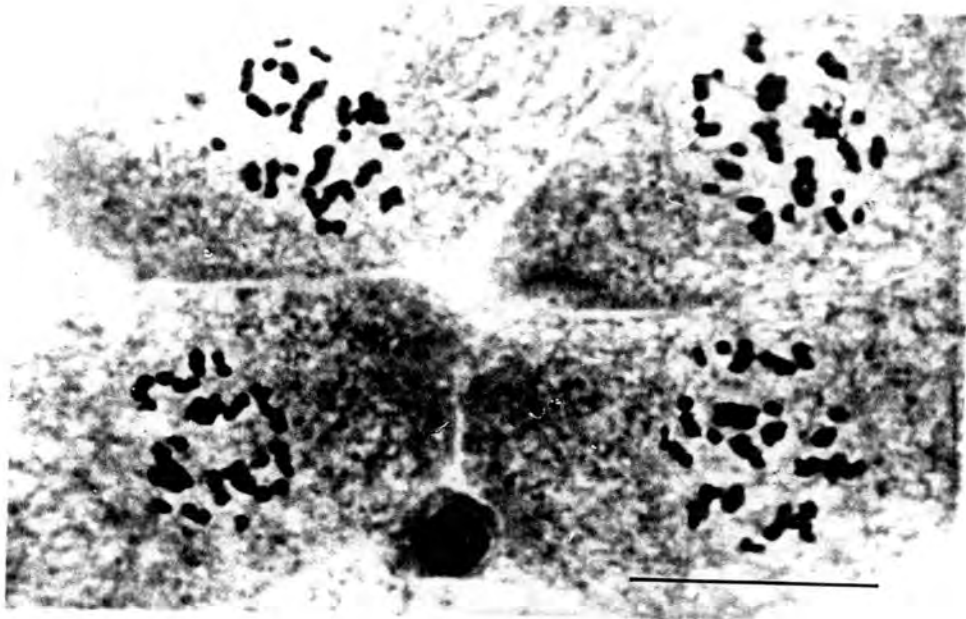


Foto 68. Diaquinesis tardía.

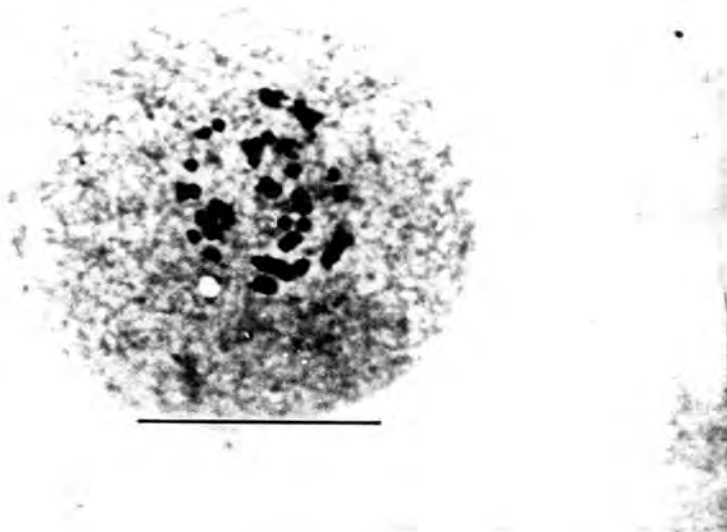


Foto 69. Diaquinesis tardía.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

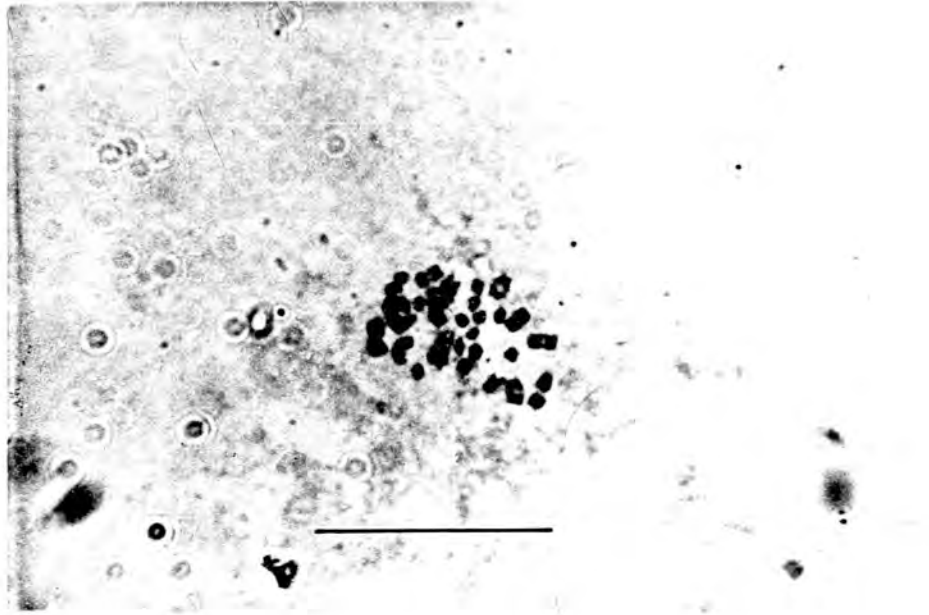


Foto 70. Metafase I.

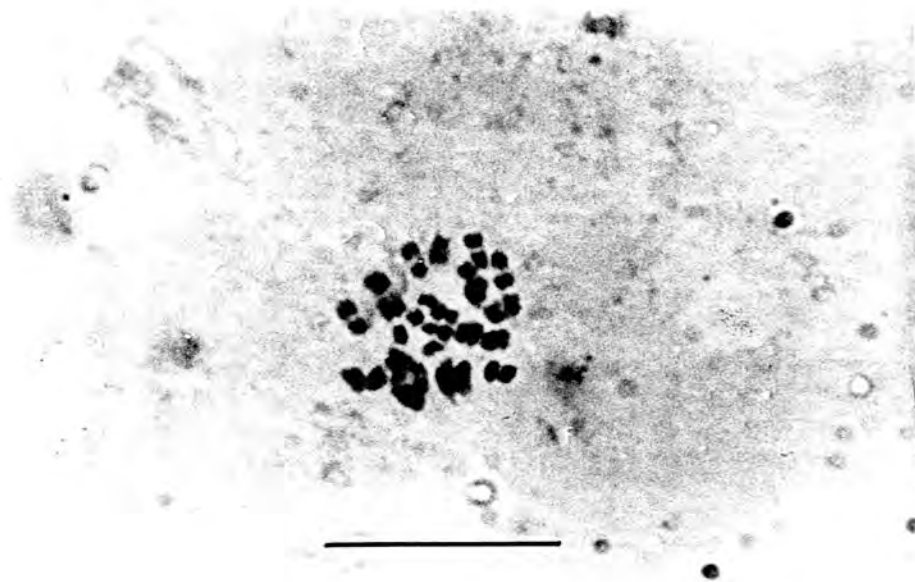


Foto 71. Metafase I.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

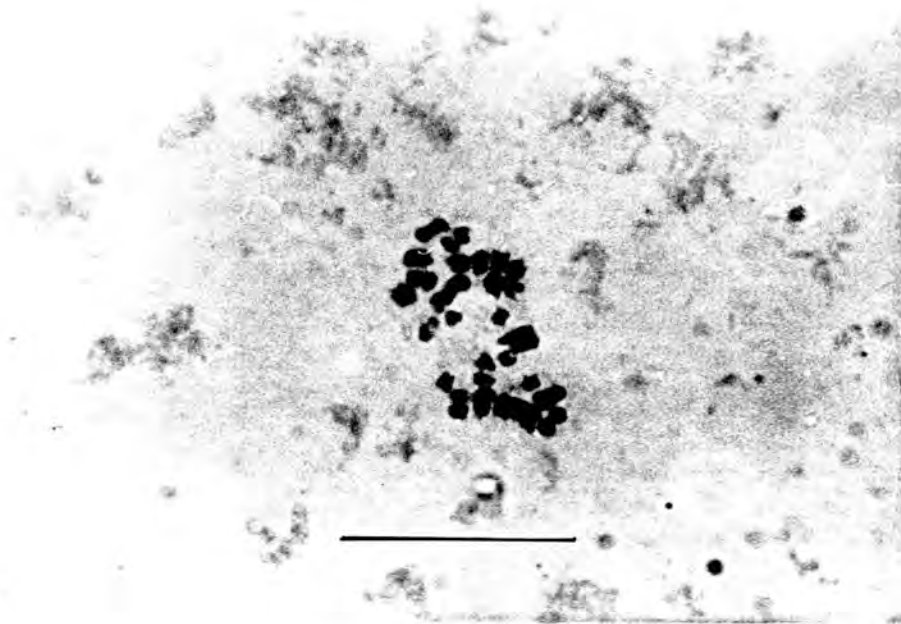


Foto 72. Metafase I.

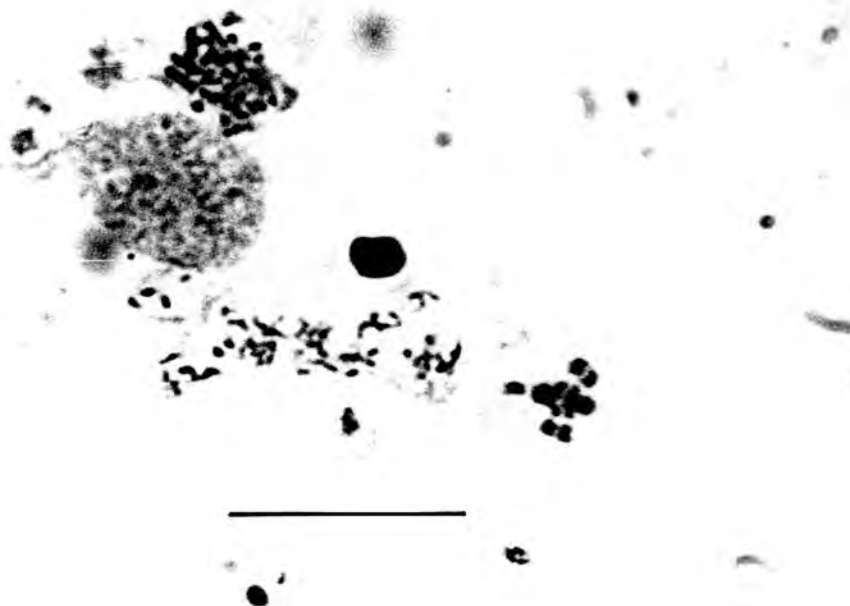


Foto 73. Metafase I.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS



Foto 74. Anafase I.



Foto 75. Anafase I.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS



Foto 76. Anafase I avanzada.



Foto 77. Anafase I-Telofase I.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

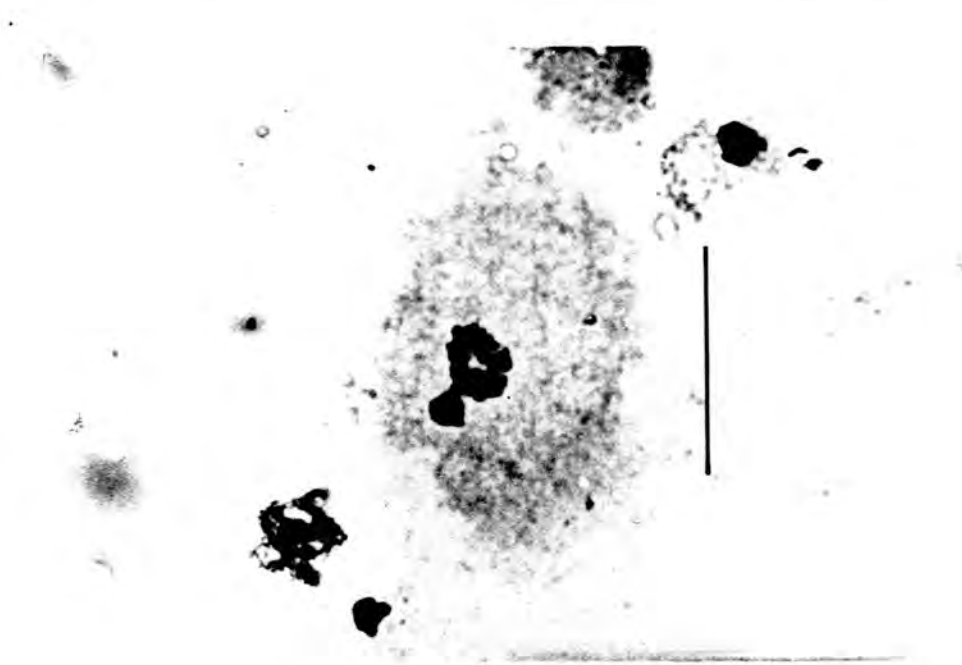


Foto 78. Anafase I-Telofase I.



Foto 79. Metafase II.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS



Foto 80. Metafase II.

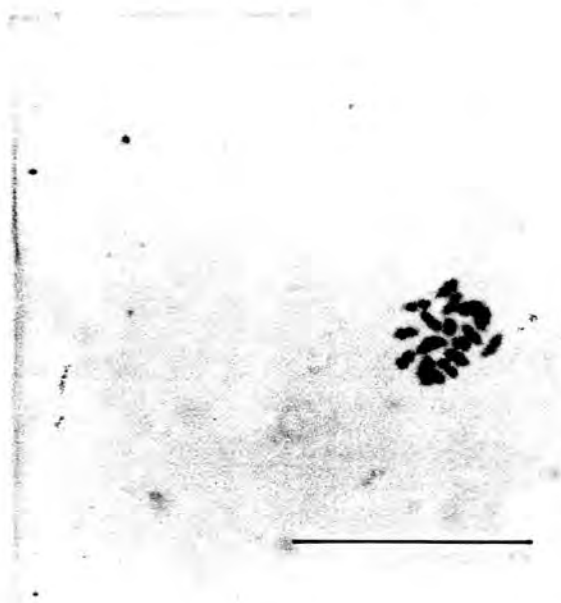


Foto 81. Metafase II.

*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS

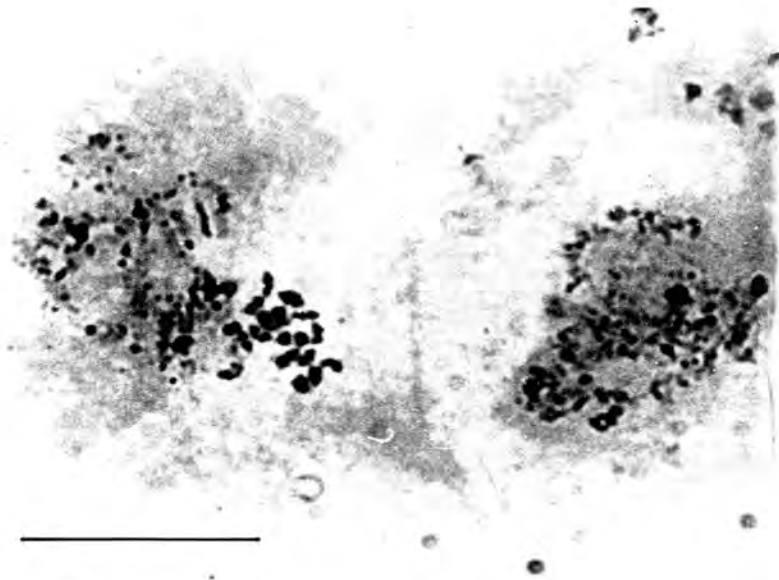


Foto 82. Metafase II.

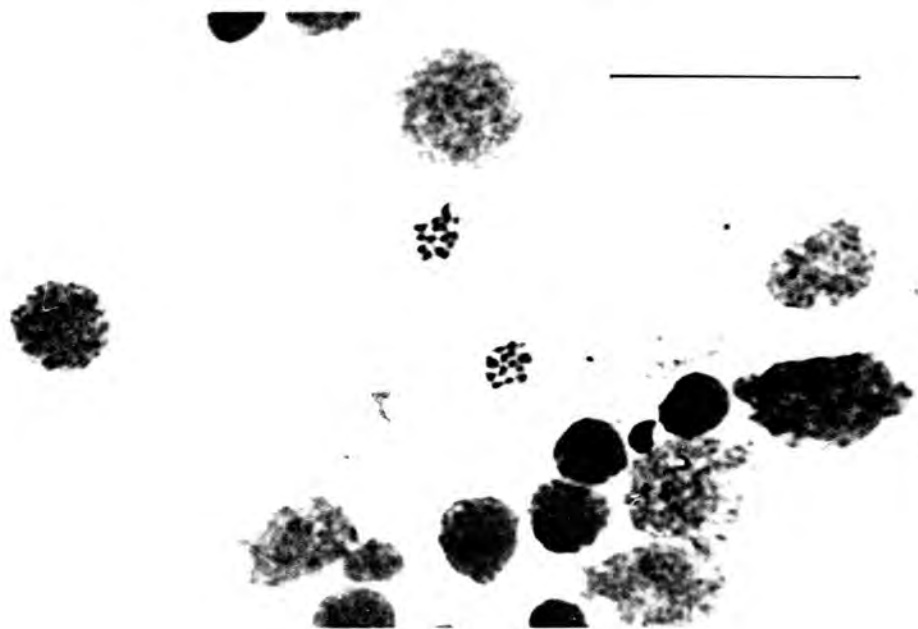


Foto 83. Telofase II.



*Hysterothylacium aduncum* macho: MEIOSIS



Foto 84. Telofase II (tetradas).

*Discusión*

## 6.-DISCUSIÓN.

### 6.1.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Anisakis simplex*.

#### 6.1.1.-INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CO<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO.

La concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico ha sido desde el principio un factor clave a tener en cuenta a la hora de poner en marcha el mantenimiento *in vitro* de anisákidos. Schulz (1974) realizó un mantenimiento de larvas de *Anisakis* bajo una presión de CO<sub>2</sub> en aire del 10% y al tercer día de mantenimiento observó las primeras mudas a L4.

Algo más tarde, Sommerville y Davey (1976) estudiaron la influencia de la concentración de CO<sub>2</sub> sobre la muda y supervivencia de *Anisakis simplex* durante los siete primeros días de mantenimiento *in vitro*. Para ello, utilizaron solución Krebs-Ringer como medio de mantenimiento a 40%, 5% y 0% de CO<sub>2</sub> en aire. En atmósfera de aire sólo mudó un 3.3% de los individuos totales (30 individuos) durante los 7 días de mantenimiento; con atmósfera de 40% de CO<sub>2</sub> en aire 1/3 de los individuos mudaron entre el 2º y 5º día de incubación, y 1/3 de los individuos vivieron hasta el final de la experiencia. En atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, los resultados que obtienen son más satisfactorios; 2/3 de los individuos llegan a L4 entre el 2º y 5º día de incubación, y la misma proporción permanecen vivos al final de la experiencia.

Por otro lado, estos autores ensayaron el medio 199 a 37°C, aunque en este caso sólo se experimentó en atmósfera de aire y de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Los resultados obtenidos son mejores que en la solución Krebs-Ringer, pues en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire obtuvieron casi un 100% de mudas a L4 en los 3-4 primeros días de incubación y todas las larvas sobrevivieron hasta el final de la experiencia, frente a la mitad de mudas en los 4-7 primeros días de incubación, y 2/3 de supervivientes al final de la experiencia sin CO<sub>2</sub>. Con estos resultados quedaba establecido que la atmósfera ideal para el mantenimiento de *A. simplex* era de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

Posteriormente Mercer y col.(1985) confirmaron los resultados de Sommerville y Davey comparando la evolución *in vitro* de *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* y *Contracaecum* sp. Empleando el medio 199: más del 70% de larvas de *Anisakis* mudaban a L4 entre los 4-8 primeros días de mantenimiento en atmósfera de aire, y todos en los 4-10 primeros días de mantenimiento en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. En solución salina, determinaron que sólo un 10% de las larvas mudaban a L4 en atmósfera de aire.

En trabajos realizados por Iglesias y col.(1997) en nuestro Departamento, se muestra que la incubación de *A. simplex* en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% estimula la muda y prolonga la supervivencia de *A. simplex* en el medio RPMI.

El uso de soluciones salinas tamponadas (PBS) o no (SS), pone de manifiesto que el CO<sub>2</sub> por sí solo parece suficiente para inducir la muda independientemente de los nutrientes que existan en el medio, pues no se observan diferencias significativas en la muda, aunque sí en la Sav, lo que aconseja el uso de medios nutritivos (RPMI).

Coincidiendo con los resultados expuestos por Sommerville y Davey (1976) y Mercer y col. (1985), nosotros hemos comprobado que en los tres medios ensayados, la presencia de CO<sub>2</sub> es fundamental tanto para la muda a L4, como para aumentar significativamente los valores de supervivencia media y máxima (TABLA II y Graf. 1), al menos en PBS y RPMI.

#### 6.1.2.- MEDIOS DE MANTENIMIENTO y pH

Una vez establecidas las condiciones de mantenimiento óptimas referentes a la concentración de CO<sub>2</sub> (5% en aire) y temperatura (37°C), se pensó que la influencia de los nutrientes presentes en el medio puede jugar un papel importante en la evolución *in vitro* de los anisákidos, como ya nos ha indicado la experiencia anterior (TABLA II y Graf. 1).

Los medios complejos como el de Townsley y col. (1963) compuesto por extracto de hígado de buey + 5% de glucosa + 10% de embrión de pollo; el medio de Van Banning en 1971, reproducido por Grabda (1976) y Carvajal y col. (1981), compuesto por extracto de hígado digerido enriquecido con sangre; el medio API-1 utilizado por Likely y Burt (1992), son en los que se ha conseguido la maduración desde la L3.

Por el contrario, medios sencillos y definidos como el 199 y los salinos (Krebs-Ringer o ClNa al 0.9%) utilizados por Sommerville y Davey (1976) y Mercer y col. (1985), sólo han conseguido el paso a L4 y mantener la supervivencia algunos días más.

Sin embargo, sería muy interesante que se dispusiera de un medio definido en cuanto a composición de nutrientes, pues se determinarían cuáles son los requeridos por el parásito, y por otro lado el mantenimiento sería fácilmente reproducible lo que facilitaría los estudios fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos. Por esta razón, Iglesias y col. (1997) ensayaron con *A. simplex* seis medios semidefinidos: RPMI-1640 + 20% SBFI, MTL, LIT + R9, MEM de Eagle + 20% SBFI, M3 modificado (sin agar) y Grace + 10% SBFI, concluyendo que los resultados más satisfactorios se obtenían en M3 y RPMI-1640 + 20% SBFI, pero no se consiguió ningún adulto.

Todos los medios en los que se ha obtenido la maduración de *A. simplex* han sido por lo tanto complejos, y tienen una característica en común: el pH inicial toma valores ácidos, que van desde 2.0 hasta 4.5, lo cual es lógico pues el medio natural de *Anisakis* desde L3 hasta adulto, es el estómago de mamíferos marinos. Por eso se ha escogido un medio base semidefinido, fácil de preparar y que ofrezca *a priori* buenos resultados con respecto a otros medios definidos, como es el RPMI suplementado con 20% de suero bovino (Iglesias y col., 1997), y se ha modificado el pH a 2.5, 4.0, 7.2 y 9.0, completando así la gama de pHs.

De todos estos pHs, en los medios con pH 4.0 y 7.2 todos los individuos mudan a L4 entre el tercer y cuarto día, mientras que a pH 2.0 y 9.0 lo hacen el 88% y 96% respectivamente. A pH 2.0, la muda parece tener lugar sobre todo al 3<sup>er</sup> día (82% de los individuos), mientras que a pH 9.0 ocurre mayoritariamente el 4<sup>o</sup> día (70% de los individuos) aunque se retrasa hasta el 5<sup>o</sup> día en 1/4 de los

individuos. A pH 4.0 y 7.2 mudan entre el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> día. Por otro lado, el pH ácido favorece la supervivencia de los parásitos, observándose además a pH 4.0 que mudaban un 28.6% de las larvas hasta L5 entre los días 30<sup>o</sup> y 42<sup>o</sup> (Gráfico 8 y TABLA III).

Si bien Van Banning (1971), Grabda (1976) y Carvajal y col. (1981) obtuvieron adultos a pH 2.0, en nuestras condiciones de cultivo el pH más favorable coincidió con el utilizado por Likely y Burt (1991). Estos autores consiguen, a pH 4.5, adultos entre los días 30 a 35, datos muy próximos a los nuestros (entre 30 y 42 días). Sin embargo este porcentaje de mudas a L5 es aún escaso, en relación con el 42% obtenido por Carvajal y col. (1981).

Por este motivo se sometió a los parásitos a cambios de pH en una etapa crítica de su evolución, como es el paso de L3 a L4, que ocurre siempre entre el tercer y cuarto día de cultivo, tanto a pH 4.0 como pH 7.2. Por esta razón se consideró jugar con ambos pHs precisamente en el 5<sup>o</sup> día de mantenimiento, cuando todos los parásitos hubieran mudado a L4.

Según se observa en la TABLA IV y Gráfico 13, el resultado más satisfactorio corresponde con el paso de pH 7.2 a 4.0, con un 20% de adultos y parámetros de supervivencia significativamente superiores a los otros cambios de pH, y similares al medio control de pH constante e igual a 4.0. Por todo esto se puede concluir que el cambio de pH no supone ningún nuevo estímulo que permita a los parásitos una mejora de su evolución.

### 6.1.3.-LA PEPSINA Y EL pH

Si tenemos en cuenta el hábitat natural de las larvas (L3 y L4) y los adultos de *A. simplex*, esto es, el estómago de mamíferos marinos, existe un elemento común que se encuentra siempre presente: la pepsina. Por eso, se ha añadido al medio RPMI jugando además con el factor pH para ver cuál es la asociación más beneficiosa.

En la TABLA V y Graf. 19 observamos cómo la adición de pepsina, en una proporción del 1%, al medio a pH 7.2 no afecta de forma significativa a los parámetros de supervivencia del parásito. El añadir la pepsina al 5<sup>o</sup> día de mantenimiento, a este pH, no supuso ninguna ventaja. El siguiente paso fue la combinación de la pepsina (en proporción del 1%) con pH 4.0, y en este caso los resultados mejoraron sustancialmente, pues el porcentaje de adultos obtenidos llega en algunos casos al 100%. Además, cuando se añade pepsina al principio o al 5<sup>o</sup> día de mantenimiento, la primera muerte se produce mucho más tarde (más de 3 semanas) que en los demás casos (TABLA VI y Graf. 23).

Por otro lado, se ha demostrado que las proteasas juegan un papel importante en el proceso de ecdisis de algunos parásitos, pues intervienen en los procesos de digestión de la cutícula vieja, permitiendo que sea expulsada. De esta forma, se ha comprobado que el tercer estadio larvario de *Onchocerca volvulus*, requiere para el proceso de muda a L4 de una cisteín-proteasa (Lustigman y col., 1996).

La pepsina es una proteasa ácida del jugo gástrico capaz de digerir proteínas en ambiente altamente ácido siendo su pH óptimo de 2.0. Esto explicaría su poca o ninguna eficacia a pH 7.2, por lo que a pHs ácidos como 4.0 sí podría actuar degradando las proteínas del suero presentes en el medio, permitiendo al parásito una mejor asimilación proteica, y/o liberar determinados péptidos que supongan algún estímulo para el parásito. Por otro lado, se podría facilitar una muda óptima, mediante la "limpieza" (hidrólisis) de residuos que quedaran sobre la nueva cutícula. El porcentaje de adultos obtenidos a pH 4.0 con pepsina ha sido todo un éxito, superándose con mucho los resultados obtenidos por Carvajal y col. (1981) en un medio de mantenimiento mucho más complejo.

Igualmente, se ha comprobado si la pepsina es requerida durante todo el período de mantenimiento, o si la necesita en una determinada etapa de su desarrollo *in vitro*. Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que la adición de pepsina favorece al desarrollo de los parásitos cuanto antes se añada al medio de mantenimiento, aunque parece no ser necesaria en los primeros días de desarrollo *in vitro* de la L3 (TABLA VI y Graf. 23). En una prueba preliminar realizada en nuestro laboratorio, en la que la pepsina se suprime del medio en lugar de adicionarlo al mismo, los días 5º, 14º y 21º de la experiencia, se pone de manifiesto una reducción notable de la capacidad de formación de L5 cuanto antes es eliminada la pepsina. Según estos resultados parece ser que la pepsina se requiere, si no por la L3, sí por la L4 desde que ésta se forma y posiblemente también por la L5, ya que éstas tienen una mayor supervivencia en medios con pepsina (Sav, L5: 48-56 días) que en el control sin ella (Sav, L5: 31 días).

Van Banning (1971) consiguió el paso a L5 de *Anisakis* entre los 30 días y 102 días de mantenimiento. En nuestras experiencias también hemos constatado que el paso a L5 no se produce con la misma sincronía que el paso a L4 (siempre entre el 3º y 4º día), posiblemente porque la última muda depende del grado de desarrollo de cada individuo. El intervalo en el que se ha observado el paso a L5, en nuestras experiencias, ha sido entre los días 20 y 60. Aunque el paso a L5 es todavía asincrónico, se consigue acortar los márgenes aportados por Van Banning (1971), y se está cerca de los resultados aportados por Grabda (1976) quien obtiene las primeras L5 tras 12-14 días de mantenimiento de la L4.

Sin embargo, el suplemento con un 5% de pepsina perjudica el desarrollo de los parásitos con respecto a una experiencia control (RPMI + P), observándose una reducción notable de todos los parámetros considerados, posiblemente porque a esta concentración pudiera ser nociva para el parásito (TABLA VII y Graf. 30).

#### 6.1.4.-SUPLEMENTOS AL MEDIO RPMI + P.

La glutatión peroxidasa cataliza reacciones en las que los hidropéroxidos (ROOH) se reducen por la acción del glutatión reducido (GSH), que se oxida a glutatión disulfuro (GSSG), a la vez que los hidropéroxidos se reducen (ROH). Esta enzima se ha detectado en diferentes parásitos (Docampo, 1995).

La cisteína, de manera similar, también puede intervenir en procesos de oxidorreducción, oxidándose a cistina.

Likely y Burt (1992) afirman que en el mantenimiento de *Contracaecum* sp. en el medio complejo (API-1) debe ser suplementado con L-cisteína en cantidades de 5 mM, y que cantidades superiores a 8 mM pueden resultar perjudiciales para el parásito.

Por este motivo, el medio RPMI se suplementó con 4 mM de L-cisteína, y de la misma forma, en experiencias paralelas se suplementó con 4 mM de glutation, para comprobar si estas sustancias pueden mejorar el desarrollo de los parásitos en este ambiente reductor/antioxidante.

Sin embargo, lejos de aportar beneficio alguno, tanto la adición de L-cisteína como de glutation, empeoraron los resultados con respecto al medio control, inhibiendo la formación de L5. Cuando el medio se adicionaba con pepsina se reducía además la Sav de los parásitos (TABLA VII y Graf. 30).

#### 6.1.5.-SUPLEMENTO DEL MEDIO RPMI CON 5% DE SANGRE, Ó 40% DE SUERO

Los medios complejos utilizados por Townsley y col. (1963), Van Banning (1971), Schultz (1974), Grabda (1976) y Carvajal y col. (1981), coinciden en el extracto de hígado bovino, incluso suplementado con sangre humana en el caso de este último autor, y un pH de 2.0.

En nuestras experiencias, la suplementación del medio RPMI a pH 2.0 con sangre o pepsina, no tuvieron ningún éxito. La sangre tampoco favoreció el desarrollo de los parásitos a pH 4.0. De nuevo se vuelve a comprobar que el pH 2.0 no es el adecuado para el desarrollo de los parásitos, con o sin pepsina (TABLA VIII y Graf. 38). La suplementación del medio RPMI con 40% de suero, con y sin pepsina, no mejoró los resultados de la experiencia control, que mostró resultados similares que en otras experiencias (TABLA VI, VII, VIII). Aunque la sangre y suero contienen factores de crecimiento, la proporción del 20% de suero en el medio resulta más que suficiente para el desarrollo de los parásitos, y proporciones mayores resultan inhibitorias, en nuestras condiciones de mantenimiento.

#### 6.1.6.-ADHERENCIA DE ALGUNOS INDIVIDUOS AL FONDO DEL POCILLO.

Numerosos helmintos gastrointestinales son capaces de secretar proteasas de diversos tipos. *Ascaris suum* por ejemplo, secreta una aminopeptidasa durante el paso de L3 a L4 *in vitro*, detectándose en ese momento el pico máximo de secreción, lo que sugiere que la proteasa desempeña alguna función en el complejo proceso de la muda (Rhoads y col., 1997; Rhoads y Fetterer, 1998). En este sentido, Rhoads y col. (1998) han experimentado con distintos inhibidores de proteasas, llegando a la conclusión de que una cisteín proteasa podría estar implicada.

En el caso de los anisákidos, se ha comprobado la liberación de serín y metaloproteasas por *A. simplex*, y otras proteasas aún no bien caracterizadas por *Pseudoterranova decipiens* (Sakanari, 1990).

Las aminopeptidasas liberadas por *P. decipiens* y otros nematodos (*Haemonchus contortus*, *Brugia pahangi*) han sido relacionadas con procesos de muda. En *Onchocerca volvulus*, Lustigman y col. (1996) han demostrado la implicación de una cisteín proteasa en la muda de L3 a L4. Asimismo, se ha sugerido que la metaloproteasa liberada por *A. simplex* pudiera estar implicada en la M3 en el hospedador definitivo.

Por otra parte, estudios histoquímicos y con anticuerpos fluorescentes, permiten sugerir que las larvas de *Anisakis* embebidas en tejidos animales y humanos secretan, a través de su poro excretor, productos de excreción/secreción que forman una "caperuza" alrededor de la sección anterior del helminto. Aunque estas sustancias no han sido identificadas en *Anisakis*, Marujama y Nawa (1998) han detectado un comportamiento similar en otro nematodo, *Strongiloides venezuelensis*, el cual, al menos *in vitro*, secreta sustancias adhesivas mucinosas de naturaleza glucoproteica, con la que se adhieren firmemente a la base del frasco de mantenimiento. Estos autores sugieren que estas sustancias podrían estar implicadas en la unión del parásito a la mucosa intestinal del hospedador para la invasión de la capa epitelial.

Existen algunos trabajos en los que se hace referencia a la adhesión de parásitos al recipiente en donde se mantienen, o bien la presencia de un capuchón en la cabeza del parásito. Sommerville y Davey (1976) mencionan que algunos ejemplares de *A. simplex* en estado L4 tenían la cabeza incrustada en un depósito de color marrón, lo que probablemente les impediría ingerir alimento.

Iglesias y col. (1997) observan que manteniendo *A. simplex* en el medio RPMI a pH 7.2, algunos individuos se adherían al fondo del pocillo en donde se mantenían mediante una sustancia de color marrón. En muchos casos, los gusanos se adherían y despegaban en varias ocasiones tanto en el tercer como en el cuarto estadio larvario. En alguna ocasión ocurría en cuarto estadio larvario y no se despegaban incluso después de haber muerto, pero la mayoría de las veces lo hacían por sí solos, o bien eran desprendidos por nosotros en el momento de efectuar el cambio de medio de mantenimiento.

Una vez sueltos, un capuchón de color marrón (residuo de la sustancia con la que se adherían en el pocillo) les obstruía la boca, lo que les impediría ingerir alimento pues su movilidad disminuía, coincidiendo en este aspecto con Sommerville y Davey (1976).

En nuestras experiencias, también hemos observado que individuos del tercer y cuarto estadio larvario se adherían al fondo del pocillo.

La adhesión al fondo del pocillo sólo se ha observado en medios con pH 7.2, posiblemente porque a otros pHs, la sustancia adhesiva pierde capacidad de adhesión. Esto explicaría la presencia de restos de "capuchones", tanto en la región cefálica del parásito como libres en pocillo, pero la ausencia de individuos adheridos al pocillo.



### 6.1.7.-OVOPOSICIONES

Se ha conseguido que 2 hembras maduras realizaran la ovoposición, todas ellas en el medio RPMI+P a pH 4.0, lo que confirma la idoneidad de este medio para el desarrollo de los parásitos (Graf. 25; Graf 42). Se sabe que los miembros del orden Ascaridoidea son capaces de producir un gran número de huevos (Van Banning, 1971). Este hecho ha sido constatado en el caso de *Anisakis simplex*. En el mantenimiento *in vitro* se ha llegado a contabilizar más de 190.000 huevos procedentes de una sola hembra (Graf. 43), lo que da idea del potencial reproductor de estos parásitos, sobre todo si se tiene en cuenta que las condiciones de mantenimiento *in vitro* no son tan idóneas como las condiciones de vida natural del parásito. El tamaño de los huevos fértiles conseguidos en el mantenimiento de Van Banning (1971) fue de 40 x 50  $\mu\text{m}$ , mientras que los obtenidos por Grabda (1976) fueron de 39-42 x 41-43  $\mu\text{m}$ . Los huevos infértiles que hemos obtenido en nuestras experiencias han mostrado un tamaño cercano a los de Van Banning:  $44.4 \pm 0.5 \times 50.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Sin embargo, las ovoposiciones se observaron en el intervalo de 51-55 días tras la muda a L5, más tarde si se compara con los 4-9 días de Grabda (1976).

### 6.1.8.-TAMAÑO DE ADULTOS.

El tamaño de los adultos de los parásitos puede dar, en cierta forma, idea del grado de desarrollo que han alcanzado. Van Banning (1971) es el primer investigador que aporta las medidas de la longitud total de machos y hembras de *A. simplex*: 3.5-7.0 cm en machos y 4.5-15.0 cm en hembras. Posteriormente, Grabda (1976) realiza el estudio morfológico de adultos de *A. simplex* gracias al mantenimiento *in vitro* y proporciona algunas medidas más. Entre ellas destaca la longitud total de los machos, 5.7-7.2 cm, y de las hembras: 5.6-10.4 cm.

El estudio morfológico de los adultos que hemos obtenido ha sido más detallado que el de los anteriores autores, pues se consideran un total de 11 parámetros. La longitud total de los parásitos está dentro del rango de Van Banning (1971) y de Grabda (1976), siendo para los machos 3.8-6.5 cm y para las hembras 4.5-8.0 cm (TABLA I).

### 6.2.-MANTENIMIENTO *IN VITRO* DE *Hysterothylacium aduncum*.

Hasta ahora, el mantenimiento de *H. aduncum* se ha desarrollado únicamente *in vivo* por diversos autores (Yoshinaga y col., 1987; Koie, 1993; Balbuena y col., 1998). Sin embargo, esta técnica es compleja pues requiere el mantenimiento de los hospedadores necesarios en peceras, la manipulación e infección de los mismos, etc. Por ello, para facilitar el estudio de estos parásitos, hemos creído conveniente la puesta a punto de unas condiciones óptimas de mantenimiento *in vitro*.

### 6.2.1.-INFLUENCIA DEL CO<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO.

En el caso de *Hysterothylacium aduncum*, el CO<sub>2</sub> atmosférico estimula la ecdisis a L4, pues ésta se realiza con mayor sincronía y porcentaje que en los medios sin CO<sub>2</sub>. No se observan diferencias en cuanto a supervivencias entre los medios SS y PBS, pero sí con el medio RPMI en donde además se producen algunas L5, siempre en presencia de CO<sub>2</sub>. Aunque el CO<sub>2</sub> beneficia el desarrollo de los parásitos, hay que mencionar que al contrario que *A. simplex*, *H. aduncum* puede desarrollarse también en ausencia de éste, pero las condiciones no son óptimas (TABLA X y Graf. 46)

Puesto que en el trabajo de Adroher y col. (1991) también se concluye que la presencia de CO<sub>2</sub> en una proporción del 5% estimula la ecdisis a L4 de *H. aduncum* en el medio RPMI, se ha seguido manteniendo la presencia de CO<sub>2</sub>, pues es la base de los demás medios de cultivo desarrollados.

### 6.2.2.-MANTENIMIENTO A pH CONSTANTE

De entre todos los pHs ensayados, los pHs 2.0 y 9.0 no han favorecido el desarrollo del parásito en comparación con los pHs 4.0 y 7.2 (TABLA XI y Graf. 53). Sin embargo la muda de los individuos a L4 no se produce de manera tan sincrónica como ocurría en *A. simplex*.

Este fenómeno podría explicarse por la existencia de pequeñas diferencias de tamaño existentes entre ellos. Aunque todos son de tamaño superior a 5 mm intentándose que todos fueran similares, pero estos parásitos aparecen en el hospedador con gran variedad de tallas, por lo que algunos individuos necesitarían de más tiempo para desarrollarse hasta L4. Este hecho ya se ha constatado anteriormente en trabajos realizados en nuestro Departamento (Gálvez y col., 1993), y no sólo con *H. aduncum*, sino también con *A. simplex* (Iglesias y col., 1997).

La muda a L5 se ha producido a pH 7.2 y 4.0, pero en este último mudan antes y la supervivencia máxima es mayor, por lo que se puede concluir que el pH 4.0 es más favorable para el desarrollo de estos parásitos. El cambio de pH 7.2 a 4.0 cuando los individuos mudaron a L4 no ofrece ningún estímulo adicional a los parásitos (TABLA XII y Graf. 58).

### 6.2.3.-MANTENIMIENTO CON EL MEDIO RPMI, RPMI+P, Y SUPLEMENTOS CON L-CISTEÍNA Y GLUTATION.

Los resultados obtenidos con el medio RPMI y RPMI+P son muy buenos. La pepsina contribuye al aumento de la supervivencia media y máxima, obteniéndose no sólo un 100% de mudas a L5, sino también un acortamiento del período de muda (entre 3 y 8 días) lo que conlleva un mayor sincronismo. Además, todos los individuos mudan antes del primer mes de mantenimiento. Sin pepsina, la muda a L5 se produce a los 2-3 meses de mantenimiento (TABLA XIII y Graf. 63).

Al igual que se ha hecho con *A. simplex*, se ha comprobado el efecto de la L-cisteína (de acuerdo con el trabajo de Likely y Burt, 1989) y el glutatión a una concentración de 4 mM. Ninguno de estos suplementos han contribuido a mejorar los parámetros de supervivencia y porcentajes de muda a L5. El glutatión además, ha rebajado notablemente los porcentajes de muda a L4 y L5 (TABLA XIII y Graf. 63) .

El efecto que tienen ambos suplementos, sin embargo, no ha impedido que algunos individuos mudaran a L5, por lo que este parásito parece adaptarse mejor a diferentes condiciones de mantenimiento que *A. simplex* (TABLA VII y Graf. 30).

#### 6.2.4.-OVOPOSICIONES.

*Hysterothylacium aduncum* ha ovopositado en diferentes medios de mantenimiento: RPMI, pH 4.0 (Graf. 54, 56 y 61), RPMI+P, pH 4.0 (Graf. 66) y RPMI+P+C, pH 4.0 (Graf. 64). Este hecho demuestra que el parásito es capaz de alcanzar el estado adulto y ovopositar en varios medios de mantenimiento, todos ellos con la característica de tener un pH 4.0. La ovoposición ocurre de manera asincrónica, independientemente del medio de mantenimiento empleado, oscilando de los 13 días (Graf. 59) a los 192 días, tras la muda a L5. En los medios con pepsina se ha detectado, en general, una mayor cantidad de huevos (hasta 138000/hembra en el medio RPMI+P+C), lo que podría sugerir que la pepsina estimula de manera positiva el potencial ovopositor de las hembras, o su completo desarrollo o maduración.

#### 6.2.5.-TAMAÑO DE ADULTOS.

El tamaño de los individuos adultos obtenidos *in vitro* es muy considerable (TABLA IX), e indica que las condiciones de mantenimiento *in vitro* utilizadas, son muy favorables para el desarrollo del parásito, e incluso comparables con las condiciones *in vivo*. Así por ejemplo, la longitud total de los machos osciló entre 32 y 52 mm, y en las hembras entre 41 y 65 mm, mientras que en los adultos aislados de jurel (*Trachurus trachurus*) por Peter y Cabaret (1995) es de 29 a 36 mm en machos, y 46 mm en una hembra.

Yoshinaga y col. (1987) consiguieron infestar con L3 de *H. aduncum* a la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), en donde evolucionó hasta adulto. Tras dos meses post-infestación, el tamaño que alcanzaron los adultos osciló entre 24-43 mm en los machos, y 36-51 mm en las hembras.

Por otro lado Andersen (1993), realizando un estudio de parasitación del bacalao (*Gadus morhua*) por *H. aduncum*, encontró ejemplares de adultos en intestino cuya longitud total oscilaba entre 11 y 85 mm. Si bien esta última medida es excepcional (85 mm), no se especifica la talla media ni diferencia entre machos y hembras, por lo que no podemos establecer una comparación, pero las longitudes más abundantes son de 15-17 mm hasta 40-72 mm.

### 6.3.-ENZIMAS FIJADORAS DE CO<sub>2</sub>.

Los adultos de *Ascaris suum*, viven en el ambiente microaerobio del lumen intestinal del cerdo. La principal ruta metabólica en el metabolismo de estos helmintos, implica la fijación de CO<sub>2</sub> transformando el fosfoenol piruvato en oxalacetato, el cual es reducido hasta malato. El malato, en la mitocondria, sufre una dismutación que conducirá a la formación de una mezcla de productos finales: acetato, succinato, propionato, 2 metil butirato y 2 metil valerato. Este metabolismo es típicamente anaerobio y la mitocondria es incapaz de llevar a cabo el ciclo de Krebs. Sin embargo, en las fases larvarias, las mitocondrias sí son capaces de obtener energía aeróbica a través de este ciclo.

Se ha observado que durante el desarrollo desde la L2 hasta adulto, se produce un cambio gradual desde un metabolismo típicamente aerobio y sensible a CN<sup>-</sup>, hasta un metabolismo anaerobio e insensible al CN<sup>-</sup> (Saz y col., 1968; Komuniecki y Vanover, 1987; Vanover-Dettling y Komuniecki, 1989).

Es interesante el hecho de que mientras que *Ascaris*, como otros nematodos, mantiene constante su número de células durante el crecimiento, tras la muda de L3 a L4, se produce un gran incremento de la división de las células musculares, que parece paralela al desarrollo de la ruta anaerobia (Komuniecki y Vanover, 1987). Asimismo, se ha observado que muchos de los enzimas claves incluidas en este metabolismo anaerobio se expresan como isoenzimas específicas de fase de vida (Johnson y col., 1992; Duran y col., 1993; Komuniecki y Harris, 1995).

La principal enzima fijadora de CO<sub>2</sub>, la PEPCK, se ha purificado y determinado su actividad en adultos de *A. suum* por diversos autores (Wilkes y col., 1981; Van der Bossche y Borgers, 1973; Rohrer y col., 1986).

Vanover-Dettling y Komuniecki (1989) determinaron la actividad de esta enzima en varios estados evolutivos del parásito: L2 procedente de huevos embrionados de 27 días, L3 aisladas de pulmón de conejo, L4 de 10 días de mantenimiento *in vitro* en el medio RPMI, adultos jóvenes de 30 días de mantenimiento *in vitro*, y adultos de 60 días de mantenimiento *in vitro*. Estos autores observaron una mayor actividad en L4 (~160% de la L3) y una reducida actividad en L2 (~17% de L3). Las L3, adultos jóvenes y maduros presentaron una actividad similar.

En esta ruta es vital la actividad de la PEPCK, que con la acción conjunta de la MDH forma malato a partir del PEP procedente de la glucólisis. Esta ruta es típica de los helmintos gastrointestinales.

En *Ascaris*, la muda a L4 ocurre en presencia de una pCO<sub>2</sub> elevada. Además, *in vivo*, ocurre normalmente después de que la larva entre en el intestino donde la pCO<sub>2</sub> es elevada (Vanover-Dettling y Komuniecki, 1989). Igualmente, estos autores han observado que la formación de ácidos grasos de cadena ramificada, productos finales del metabolismo anaerobio, sólo se producen en presencia de pCO<sub>2</sub> elevadas (5% ó más). Por todo ello, observamos que la fijación de CO<sub>2</sub> forma parte esencial del metabolismo anaerobio de *Ascaris* y, en general, de helmintos anaerobios gastrointestinales.

En nuestro trabajo, se ha determinado la actividad de la PEPCK y de otras enzimas fijadoras de  $\text{CO}_2$ , siguiendo a los parásitos desde que son aislados del pez hasta que llevan 2 días de mantenimiento *in vitro* tras la muda a L4. De esta forma se ha abarcado el período ante y post muda a L4.

Hay que tener en cuenta que los estudios metabólicos de los helmintos parásitos presentan un especial número de problemas debido, primero, al hecho de que el hábitat de un parásito es el tejido de otro animal y, segundo, la pequeña talla de la mayoría de los helmintos. Los parásitos están en un estado de equilibrio dinámico con su hospedador, por lo que el estudio de parásitos mantenidos *in vitro* altera este equilibrio, a pesar de que los medios de mantenimiento mimeticen las condiciones del hábitat natural del parásito.

Por otro lado, los experimentos *in vivo* son difíciles de interpretar, pues el investigador nunca está completamente seguro de que un determinado tratamiento afecte al parásito directamente, o al hospedador, o bien a ambos a la vez (Barrett, 1981). Además, las determinaciones enzimáticas realizadas en este trabajo hay que tenerlas en cuenta siempre bajo el marco de las condiciones en las que se ha mantenido el parásito *in vitro*. Hay que recordar que para las determinaciones de actividad, no se ha utilizado la enzima purificada, sino un extracto proteico en el que se contiene las enzimas estudiadas, y que la actividad enzimática se ha medido en condiciones óptimas, previamente determinadas.

En *Anisakis simplex*, la actividad máxima PEPCK se detectó en individuos en estado L3 recién aislados del pez, siendo el nivel de actividad en mantenimiento claramente inferior, sobre todo en el día ante y postmuda a L4 (Gráfico 73). En *Hysterothylacium aduncum* el descenso se produjo un día después de la M3 (Gráfico 76). Es interesante observar como la actividad varía durante el desarrollo del parásito, por lo que resulta de suma importancia saber que tiempo de evolución tiene exactamente el parásito, sobre todo en períodos críticos como el paso de un estadio larvario a otro. Este hecho no ha sido tomado en cuenta por investigadores como Vanover-Dettling y Komuniecki (1989).

La EM de *Ascaris suum* se ha estudiado en diversos trabajos como parte integrante del catabolismo de los carbohidratos, pues parece ser un elemento clave en la regulación de la reacción de dismutación intramitocondrial (Landsperger y Harris, 1976). Pero esta reacción, intramitocondrial y NAD(H) dependiente, puede ocurrir en sentido inverso, es decir, la EM actúa como fijadora de  $\text{CO}_2$  transformando piruvato en malato que puede ser utilizado para obtener energía, o bien seguir la ruta gluconeogénica. En *A. simplex*, la actividad es muy escasa en comparación con la PEPCK, pero se aprecia un notable incremento de actividad un día después de mudar a L4 (Gráfico 74). Esto podría sugerir que la EM está utilizando el piruvato existente para obtener energía a través del ciclo de Krebs, ya que en este estado de desarrollo, al menos en otros ascáridos como *A. suum*, esta vía metabólica aún es operativa, o bien, utilizar el malato para la síntesis de glucosa. En contraste, la EM de *H. aduncum* presenta una actividad superior a la PEPCK en cualquiera de los estados de desarrollo (Gráfico 77), siguiendo al igual que ésta el mismo patrón, descendiendo hasta L424H para suplicar su actividad 24 horas después.

Este hecho hace pensar que, en este parásito, los procesos de carboxilación se producen no sólo por la PEPCK, sino también y principalmente por la EM, mediante la cual se provee de malato a la mitocondria para la obtención de energía, lo que podría sugerir la existencia de una actividad PK notable y de una EM extramitocondrial NAD dependiente, lo que es posible ya que hemos detectado 2 isoenzimas en los estudios electroforéticos (Esquema 2).

En mamíferos, la PC y la PEPCK son dos enzimas implicadas en la gluconeogénesis. La PC convierte intramitocondrialmente el piruvato en OAA, el cual, por la acción de la MDH pasa a malato, que sale de la mitocondria, y se regenera a OAA por la MDH citoplasmática. El OAA se descarboxila mediante la PEPCK dando lugar a PEP, que por la ruta inversa a la glucólisis formará glucosa y/o glucógeno.

La enzima PC sin embargo parece poco frecuente en los helmintos, habiéndose determinado muy bajos niveles de actividad sólo en *Moniezia expansa* y *Echinococcus granulosus*, y no ha sido detectada en *Ascaris* (Barrett, 1981), por lo que su importancia es aún desconocida. En este trabajo tampoco se han observado niveles de actividad de esta enzima bajo nuestras condiciones de medida, ni en *Anisakis simplex*, ni en *Hysterothylacium aduncum*.

La enzima PEPC se presenta como una alternativa de la PEPCK para la carboxilación del PEP y obtener oxalacetato. En el caso de parásitos como *Molinema desseate* representa una verdadera alternativa (Loisseau y col., 1993), así como en *Fasciola hepática* y *Ascaris suum* en donde la mayor parte se encuentra en el citosol (Annabaeva y Soprunov, 1975). En *A. simplex*, la actividad detectada ha sido mínima pero ha estado presente (Gráfico 75), mientras que en *H. aduncum* la actividad es baja pero va aumentando con el desarrollo del parásito, detectándose un descenso de actividad en el estado L424H (Gráfico 78), al igual que ocurre en la EM y PEPCK, por lo que parece que, en este punto, la fijación de CO<sub>2</sub> es mínima, para duplicarse tan sólo 24 horas después.

#### 6.4.-ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS DE DESARROLLO.

En este trabajo se ha realizado la electroforesis de algunas enzimas que se han considerado interesantes por varios aspectos. A diferencia de los estudios de este tipo realizados hasta la fecha con anisákidos, se ha considerado el estado de desarrollo del parásito, abarcando el período comprendido entre la larva recién extraída del hospedador y la L5 de 12 días de mantenimiento *in vitro*. Esta variante aporta una ventaja: determinadas enzimas que por su escasez, o por su falta de actividad en un estado de desarrollo determinado, no se pueden detectar mediante esta técnica, pueden ponerse de manifiesto en otro estado de desarrollo. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en 4 de los 43 loci estudiados en el nematodo *Echinocephalus overstreeti*, en donde no mostraron actividad como larvas, pero sí como adultos. Por el contrario, 2 loci no mostraron actividad como adultos pero sí como larvas (Andrews y col., 1988).

Mediante el mantenimiento *in vitro* con un medio apropiado podemos conseguir en pocos días un determinado estado de desarrollo, por lo que la determinación de esa isoenzima puede ser considerada para el estudio de poblaciones.

En primer lugar, la MDH de *A. simplex* ha sido un locus estudiado por varios autores, pero todos coinciden en utilizar como cofactor enzimático NAD. Nosotros hemos determinado mediante espectrofotometría que la actividad MDH, tanto en *Anisakis simplex* como *Hysterothylacium aduncum* es NADP-dependiente, mientras que la EM es NAD-dependiente en dirección carboxilante. De esta forma, los resultados de Cain y Kaleysa (1980) en *Anisakis* sp. no se corresponderían con la MDH y ME, sino viceversa.

Asimismo, Paggi y col. (1985), Mattiucci y col. (1986) y Nascetti y col. (1986), estudiaron entre otros loci la MDH (posiblemente EM, según nuestras determinaciones) en L3 y adultos de *A. simplex*, determinando que no había variabilidad entre parásitos de diferentes poblaciones, por lo que en principio no tiene valor en el estudio de poblaciones. Sin embargo, más tarde Mattiucci y col. (1997) emplean la MDH-1 junto con otros 4 loci más para poder diferenciar entre una nueva especie gemela de *A. simplex*, denominada provisionalmente como *A. simplex* C, procedente de mares australes y de las costas del Pacífico canadiense.

Aunque en los individuos empleados de *A. simplex* e *H. aduncum* no se ha manifestado variabilidad alguna (Esquema 1), la MDH se encuentra presente en la L3 con suficiente actividad como para tenerla en cuenta a lo hora de estudios de poblaciones.

Tanto en *A. simplex* como en *H. aduncum* hemos detectado actividad EM en todos los estados de desarrollo, pero en *H. aduncum* se observan dos bandas, siendo la N°1 la de mayor actividad, lo que sugiere la presencia de dos isoenzimas (Esquema 2).

Ahora bien, es curioso observar en los geles como las bandas de la MDH y ME coinciden exactamente en movilidad electroforética (a excepción de la banda N°2 en la MDH de *A. simplex*, que está ausente en *H. aduncum*), por lo que se podría pensar que fuera una sola enzima, y que dependiendo del cofactor presente,  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , actuara transformando el malato en piruvato u oxalacetato, respectivamente. La presencia de dos isoenzimas EM en *H. aduncum* podría explicar quizá la elevada actividad fijadora de  $\text{CO}_2$  con respecto a la actividad PEPCK.

Las enzimas GPI y PGM han mostrado en *A. simplex* actividad en todos los estados de desarrollo estudiados (Esquemas 3 y 4), sin embargo según Mattiucci y col. (1997) no presentan interés en el estudio de poblaciones, pues no se encuentra variabilidad suficiente entre las diversas especies gemelas de *Anisakis simplex* hasta ahora descritas. Cosa bien distinta ocurrió en *H. aduncum*, en donde a pesar de los pocos individuos estudiados, se presentó un gran polimorfismo en ambas enzimas.

Martín Sánchez y col. (1998) estudiaron estos *loci* y determinaron que podrían existir especies gemelas dentro del complejo *H. aduncum*, ya que parecen marcar diferencias entre parásitos procedentes del Cantábrico y Mediterráneo, por lo que se presentan como *loci* interesantes para estudio de poblaciones.

La G6PDH es una enzima que no se ha contemplado a la hora de establecer diferencias entre poblaciones (Paggi y col., 1985; Mattiucci y col., 1986; Nascetti, 1986; Mattiucci y col., 1997), posiblemente porque con el estudio de L3 no se presenta actividad detectable mediante electroforesis (Esquema 5). Sin embargo, se puede detectar con un extracto de 5 individuos (Esquema 6), pero este sistema no permite el estudio individual de los parásitos. En este caso, se presenta como una buena alternativa el mantenimiento *in vitro* de los parásitos hasta L448H en *A. simplex*, y L512D en *H. aduncum*.

De igual manera, la MPi tampoco se ha tenido en cuenta en el estudio de poblaciones, posiblemente por su escasa actividad, sobre todo en *H. aduncum* en donde no es posible detectarla, aunque se utilicen para ello individuos adultos (Esquema 7). Sólo se ha podido detectar en extractos de 10 individuos a partir de L548H (Esquema 8). Esta enzima por tanto no presenta interés alguno en este tipo de estudios en *H. aduncum*, pero sí en *A. simplex*, si previamente se mantienen los parásitos hasta por lo menos L548H (Esquema 7).

Según Mattiucci y col. (1997), el *locus* PGD se presenta como polimórfico lo que *a priori* puede resultar interesante. Pero estos autores no especifican si los resultados que obtienen proceden de L3, L4, o de adultos. En nuestro trabajo y con la técnica empleada por Martín Sánchez y col. (1994), no hemos detectado actividad en el tercer estadio larvario de *A. simplex*, por lo que esta técnica sólo sería válida empleando larvas de al menos L448H (Esquema 9). En *H. aduncum*, la actividad PGD es tan escasa en los 4 primeros estados de desarrollo considerados, que no se detecta ni con un extracto de 10 individuos (Esquema 10), pero se puede emplear en un estudio de poblaciones si previamente se mantienen los parásitos *in vitro* hasta L5.

Por su parte, la enzima GLUDH no presenta ninguna utilidad pues la actividad es muy escasa (Esquema 11). En contraste, la enzima LAP es de suma importancia (junto con SOD, ADK-2) para la diferenciación de las especies gemelas *A. simplex sensu stricto* (de localización principalmente Atlántica) y *A. pegreffii* (de localización principalmente Mediterránea) (Nascetti y col., 1986). En nuestro caso, los parásitos se han aislado de hospedadores procedentes del Atlántico, por lo que en principio podemos suponer que estamos trabajando con *A. simplex sensu stricto*. Pero la determinación de la LAP-1 se nos presenta como una herramienta para confirmar esta suposición. Aunque no hemos realizado un estudio de la población de parásitos que hemos utilizado en nuestras experiencias, hemos contrastado el patrón de bandas de nuestros parásitos (Esquema 12), con el de parásitos procedentes del Mediterráneo realizados en nuestro Departamento (datos no publicados), llegando a la conclusión de que los parásitos objeto de nuestro estudio pertenecen a *A. simplex sensu stricto*.



En el caso de *H. aduncum*, es necesario mantenerlo *in vitro* hasta por lo menos L548H para obtener el patrón de bandas (Esquema 12), y sólo así determinar su utilidad en estudios de población. La actividad en las muestras correspondientes a los 4 primeros estados de desarrollo estudiados es escasa, y se necesita de un extracto de 10 individuos para poder detectarla (Esquema 13).

## 6.5.-ESTUDIOS CITOGENÉTICOS.

### 6.5.1.-CITOGENÉTICA EN *Anisakis simplex*.

No existe ningún antecedente bibliográfico que haga mención a *A. simplex*, por lo que los datos citogenéticos que se dan en este trabajo son nuevos para la especie. Son muchas las dificultades que ofrece este anisákido a la hora del estudio de la meiosis, que estriban no sólo en el pequeño tamaño de un elevado número de cromosomas, sino también en la poca afinidad que presentan estos elementos puntiformes al colorante Giemsa.

En las etapas tempranas de la profase, llama la atención un cuerpo de grandes dimensiones e intensamente teñido, que hemos relacionado con el nucleolo. Salvo lo comentado anteriormente, las etapas tempranas siguen un comportamiento normal en lo que se refiere al apareamiento de los homólogos. Sin embargo, en metafase I, sorprende el gran tamaño de 4 elementos cromosómicos que se tiñen intensamente. Estos bivalentes carecen de algún signo de diferenciación. Tampoco se observan los quiasmas terminales mediante los cuales se supone que estarían unidos los cromosomas de un mismo bivalente. Estos contrastan con el pequeño tamaño de, al menos, 10 elementos puntiformes y la heteropignosis negativa que manifiestan. Nosotros hemos atribuido a estos elementos el carácter de cromosomas X, basándonos en los siguientes hechos:

- 1.-La localización central de los mismos, y el que estén rodeados por los 4 elementos mayores. Existen antecedentes en nematodos, donde el cromosoma X se ubica también en el centro de la placa (Valero y col., 1982a).
- 2.-La heteropignosis negativa.
- 3.-La existencia de cromosomas sexuales múltiples en otro nematodos (Mutafova, 1975 y 1995).

Por otra parte, resulta también llamativo en metafase II, que sólo se observen 4 elementos grandes, aproximadamente iguales, de aspecto bilobulado y sin ningún signo de diferenciación longitudinal. Al igual que ocurre en metafase I, estos elementos se tiñen intensamente. La posible explicación a este hecho es que todos los elementos pequeños, durante la anafase I, pasen a uno de los núcleos y, por tanto, todas las metafases II observadas hayan coincidido con núcleos que carecían de dichos cromosomas. Pero también existe la posibilidad de que estos cromosomas pierdan de tal manera la apetencia por el Giemsa que sea imposible diferenciarlos. Efectivamente, en algunas placas en metafase II se han observado algunos elementos muy débilmente teñidos que pudieran corresponder a los cromosomas puntiformes antes aludidos.

Finalmente indicar, que es inusual en nematodos el gran tamaño de los cuatro elementos cromosómicos que presenta esta especie, así como su coloración y morfología. También destacar el comportamiento de los cromosomas pequeños que hacen que esta especie se aparte claramente de lo observado en otros nematodos estudiados.

#### 6.5.2.-CITOGENÉTICA DE *Hysterothylacium aduncum*.

Los únicos datos citogenéticos que se disponen de esta especie fueron aportados por Walton (1940) bajo el nombre de *Contraecum clavatum*, nombre específico considerado sinónimo a *H. aduncum* hasta 1980 (Deardorff y Overstreet, 1980). Sin embargo, dichos datos no coinciden con los observados en nuestro material, ya que este autor establece un número cromosómico  $n=12$ , en desacuerdo absoluto con nuestras observaciones.

Distintas especies de la superfamilia Ascaridoidea han sido objeto de estudio, presentando un número cromosómico muy variable entre  $2n=2$  en *Parascaris equorum* (citado por Walton, 1959) hasta  $2n=43$  para el macho de *Ascaris suum* (Mutafova, 1975). Esta misma autora, en 1995 determina el número diploide en machos de otros Ascaridoidea tales como *Baylisascaris transfuga* con  $2n=34$ , *Toxocara canis* y *T. cati* con  $2n=21$ , y *Toxascaris leonina* con  $2n=36$ . En especies más próximas a *Hysterothylacium*, también se ha encontrado un número variable. Así, en la revisión de Walton (1959), se da el número cromosómico haploide de algunas especies de *Contraecum*, pero sin especificar el sexo, entre ellos *C. incurvum* con  $n=21$ , *C. spiculigerum* con  $n=5$  y *C. clavatum* con  $n=12$ .

En las divisiones mitóticas encontradas en *H. aduncum*, el número cromosómico diploide es de  $2n=36$ , por lo que difiere ostensiblemente de los datos aportados por Walton (1940). Pensamos que la gran confusión taxonómica existente durante muchos años en especies de este género, haya podido inducir a un error en la clasificación específica.

La realización del cariotipo nos ha resultado prácticamente imposible por varias circunstancias: pequeño tamaño de los cromosomas, elevado número de los mismos y falta de acentuación centromérica. Este último aspecto ha sido puesto de manifiesto anteriormente en otros nematodos (Valero y Pretel, 1979; Pretel y col., 1982; Valero y col., 1982a).

En cuanto al análisis del ciclo meiótico, en principio podría decirse que sigue un comportamiento normal y clásico, común a la mayoría de los organismos, con un apareamiento de bivalentes durante la profase temprana. Sin embargo, hay que señalar que en este nematodo, la observación de las primeras etapas de la meiosis han sido escasas, y en consecuencia debemos pensar que transcurren con gran rapidez. A planteamiento análogo han llegado otros autores en diversos nematodos (Valero y col., 1983a).

En *H. aduncum* sólo se han observado escasas paquitenes, algunas diplotenes tempranas, y ninguna diaquinesis, salvo diaquinesis tardías o metafases-I tempranas.

Sin embargo, este hecho contrasta con la abundancia de núcleos, en donde los bivalentes forman una masa confusa de fibras engrosadas que han perdido su apetencia por el colorante. Este estado meiótico, se ha relacionado con el "estado difuso" que tiene lugar en la profase de la primera división, y que se ha demostrado tanto en plantas como en animales (Lacadena, 1996). Sin embargo, la opinión de los diversos autores difiere en cuanto a la localización dentro de la profase meiótica, aunque parece haber mayor tendencia a situarlo entre paquitene y diplotene o bien tras la diplotene (Ohno y col., 1961; Ohno y col., 1962).

Tampoco se ha podido dilucidar su significado genético; algunos autores lo relacionan con el sobrecruzamiento (Barry, 1966), mientras que otros lo consideran un estado similar al de los cromosomas plumosos (Lu y Raju, 1970). Cardoso y col. (1984) indican la falta de actividad transcripcional en el denominado estado difuso. La existencia de dicho estado se ha indicado en otros nematodos (Pretel y col., 1982; Cutillas y col., 1987).

En relación con la morfología de los cromosomas observados en metafase I, hay que resaltar que con frecuencia se ha observado una configuración peculiar en forma de cruz, visualizándose en ellas dos zonas menos condensadas cerca de los extremos opuestos. Para explicar esta figura, hemos de suponer que se trata de un tetravalente, lo que implicaría la aceptación de una translocación recíproca simétrica en la que se encuentran implicados dos cromosomas no homólogos. Sin embargo, en los organismos heterocigotos para dicha translocación, esta imagen se corresponde con etapas más tempranas de la meiosis (paquitene, diplotene), mientras que en metafase I, como consecuencia de la coorientación de los centrómeros dos a dos, en la placa ecuatorial, la imagen sería diferente. Por otro lado, se podría pensar que se trata de un bivalente de mayor tamaño, que retrasa el proceso de terminación de quiasmas. Desconocemos el sentido genético de esta figura.

En metafase II se han observado placas con  $n=14$ , y  $n=14$  más 8 elementos puntiformes. Esta circunstancia y el hecho de que en anafase I se observe el retraso de un grupo de cromosomas en la incorporación al nuevo núcleo, nos hace atribuir a estos cromosomas la categoría de X y, por tanto, la no disyunción de los cromosomas X en la primera división daría lugar a dos núcleos hijos, uno con y otro sin 8X. Mutafova (1974), apoyándose en observaciones análogas en *Ascaris suum*, determina que en los machos de esta especie, el determinismo del sexo viene dado por 5 univalentes de pequeño tamaño. Los cromosomas sexuales múltiples también se han estudiado en machos de otros Ascaridoidea tales como *Toxascaris leonina* (4X), *Baylisascaris transfuga* (3X) y *Toxocara canis* y *T. cati* (2X) (Mutafova, 1995).

Según Lacadena (1996), para comprender el origen de los diferentes sistemas compuestos, se debe comparar la especie implicada con otras afines a ella que tengan un mecanismo de determinismo cromosómico más simple. No obstante, la interpretación más sencilla sería mediante translocaciones entre los cromosomas X con los autosomas en un sistema primitivo XO.

*Conclusiones*

## 7.-CONCLUSIONES.

1.-Las L3 aisladas de *Trachurus trachurus* se corresponden con la especie *Hysterothylacium aduncum aduncum*, como demuestra el estudio morfométrico de los adultos obtenidos por mantenimiento *in vitro* de éstas. Las L3 aisladas de *Micromesistius poutassou*, se corresponden con la especie *Anisakis simplex sensu stricto*, como demuestra el estudio morfométrico de los adultos obtenidos por mantenimiento *in vitro* de éstas, y el estudio electroforético de isoenzimas de L3, L4 y adultos.

2.-El mantenimiento llevado a cabo en una atmósfera enriquecida con 5% de CO<sub>2</sub>, supone una mejora de la supervivencia y un notable estímulo para la muda a L4, tanto en *A. simplex s.s.* como en *H. α. aduncum*, en nuestras condiciones experimentales.

3.-Las experiencias realizadas a diferentes pHs demuestran que *A. simplex s.s.* presenta mejores parámetros de supervivencia y de muda a L4 a pH 4.0. Además, este pH permite la muda a L5, no conseguida a ningún otro pH ensayado. Sin embargo, en *H. α. aduncum* se obtienen L5 tanto a pH 4.0 como a pH 7.2, no así a otros pHs más ácidos o básicos. A pH 4.0, los parámetros medidos son ligeramente mejores que los medidos a pH 7.2.

4.-La adición de 1% p/v de pepsina al medio de mantenimiento para *A. simplex s.s.* es necesaria para un desarrollo óptimo de la L4 y su posterior muda, así como para una mayor supervivencia de los adultos, como pone de manifiesto la mejora significativa de todos los parámetros de supervivencia y de desarrollo medidos.

5.-La adición de pepsina al medio de mantenimiento para *H. α. aduncum* lleva a una mejora no significativa de los parámetros de supervivencia medidos.

6.-La adición de glutatión o cisteína al medio de mantenimiento, conduce siempre a una reducción significativa de los parámetros de supervivencia y muda de ambos parásitos.

7.-Se ha demostrado por vez primera la presencia en L3 y L4 de *A. simplex s.s.* así como de *H. α. aduncum*, de enzimas implicadas en la fijación de CO<sub>2</sub>, como son fosfoenolpiruvato carboxikinasa, enzima málica carboxilante y fosfoenolpiruvato carboxilasa. Sin embargo, no se ha detectado en ningún caso actividad piruvato carboxilasa.

8.-La enzima málica en dirección carboxilante para *A. simplex s.s.* e *H. α. aduncum* es NAD-dependiente, no habiéndose detectado, bajo nuestras condiciones experimentales, actividad NADP-dependiente.

9.-No existen diferencias significativas en la actividad de ninguna de las enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> medidas, entre las L3 de *A. simplex* s.s. libres en la cavidad general del hospedador, y las L3 encapsuladas en distintos órganos del pez.

10.-Aunque la presencia de CO<sub>2</sub> representa un notable estímulo para la muda a L4 de *A. simplex* s.s., sin embargo, la actividad de las enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> medidas en conjunto durante este periodo es mínima, incrementándose significativamente a partir de las 24 horas post-muda. El enzima que más contribuye a la fijación de CO<sub>2</sub> en este periodo es la PEPCK, que lo hace en un porcentaje comprendido entre el 73% y el 92%.

11.-La actividad de las enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> medidas en conjunto durante la muda de L3 a L4 de *H. α. aduncum* es estable en todo el periodo, excepto por la existencia de un mínimo significativo a las 24 horas post-muda. La contribución porcentual de las enzimas a esta fijación de CO<sub>2</sub> muestra que, la mitad del CO<sub>2</sub> fijado, lo es por la EM. Sin embargo, en este caso observamos un comportamiento diferencial entre las L3 y L4 de este nematodo, pues mientras que en la L3 de *H. α. aduncum*, la 2ª enzima fijadora de CO<sub>2</sub> es la PEPCK, en la L4 es la PEPC, ambas con 1/3 de la actividad total fijadora de CO<sub>2</sub>.

12.-En *A. simplex* s.s., el estudio electroforético las enzimas LAP, MDH, EM, GPi y PGM se muestra como una herramienta útil para el estudio de poblaciones, independientemente del estado de desarrollo del parásito, desde L3 hasta adulto. Sin embargo, la electroforesis de las enzimas G6PDH y PGD, sólo tiene interés en individuos de, al menos, 4º estadio larvario, y la MPi, en adultos. El estudio de la GLUDH no tiene interés.

13.-En *H. α. aduncum*, el estudio electroforético de las enzimas MDH, EM, GPi y PGM se muestra como una herramienta útil para el estudio de poblaciones, independientemente del estado de desarrollo del parásito, desde L3 hasta adulto. Sin embargo, la electroforesis de las enzimas G6PDH, PGD y LAP sólo tiene interés en individuos adultos. El estudio de la MPi y GLUDH no tiene interés.

14.-El estudio citogenético de los machos de *A. simplex* s.s. es 2n=4, y el determinismo del sexo viene dado por un sistema de cromosomas sexuales múltiples.

15.-El estudio citogenético de los machos de *H. α. aduncum* ha mostrado que el número diploide es 2n=36, y que el determinismo del sexo viene dado por un sistema de cromosomas sexuales múltiples.



*Bibliografía*

## 8.-BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, A.M.; MURRELL, K.D. y CROSS, J.H. (1997). Parasites of fish and risks to public health. Rev. Sci. Tech., 16: 652-660.

ADAMSON, M.L. (1984). L'haplodiploidie des oxyurida. Incidence de ce phénomène dans le cycle évolutif. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 59: 387-413.

ADROHER, F.J.; VALERO, A.; WOLFF, M. y RUÍZ-VALERO, J. (1991). Mantenimiento y ecdisis *in vitro* de *Hysterothylacium aduncum*. I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidentales Europeas de Parasitología, p. 124. Valencia. España.

ADROHER, F. J.; VALERO, A.; RUÍZ-VALERO, J. y IGLESIAS, L. (1996). Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). Parasitol. Res., 82: 253-256.

ANDERSEN, K. (1993). *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1862) infection in cod from the Oslofjord: seasonal occurrence of third- and fourth-stage larvae as well as adult worms. Parasitol. Res., 79: 67-72.

ANDERSON, R.C. (1992). Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CAB International, Wallingford.

ANDREWS, R.H.; BEVERIDGE, I.; ADAMS, M y BAVERSTOCK, P.R. (1988). Identification of life cycle stages of the nematode *Echinocephalus overstreeti* by allozyme electrophoresis. J. Helminthol., 62: 153-157.

ANNABAEVA, G.D. y SOPRUNOV, F.F. (1975). Das phosphopyruvat-carboxilase-system in den geweiben von *Ascaris suum* und *Fasciola hepatica*. Angew. Parasitol., 16: 170-176.

ARDUSSO LOVERA, D.D.; QUIRCE GANCEDO, S.; DÍEZ GÓMEZ, M.L.; CUEVAS AGUSTÍN, M.; EIRAS MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ CANO, M.; SANZ ANTÓN, S. y LOSADA COSMES, E. (1996). Hipersensibilidad inmediata al parásito del pescado *Anisakis simplex*. Estudio de reactividad cruzada. Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clín., 2: 280-286.

ARENAL VERA, J.J.; MARCOS RODRÍGUEZ, J.L.; BORREGO PINTADO, M.H.; BOWAKIN DIB, W.; CASTRO LORENZO, J. y BLANCO ÁLVAREZ, J.I. (1991). Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. Rev. Esp. Enf. Digest., 79: 355-358.



- ARMENTIA, A.; LOMBARDELO, M.; CALLEJO, A.; SANTOS, J.M.M.; GIL, F.J.M.; VEGA, J.; ARRANZ, M.L. y MARTÍNEZ, C. (1998). Occupational asthma by *Anisakis simplex*. J. Allergy Clin. Immunol., 102: 831-834.
- AUDICANA, M.; FERNÁNDEZ DE CORRES, L.; MUÑOZ, D.; DEL POZO, M.D.; FERNÁNDEZ, E. y GARCÍA, M. (1995). *Anisakis simplex*: una nueva fuente de antígenos alimentarios. Estudio de sensibilización a otros parásitos del orden Ascaridoidea. Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin., 10: 326-331.
- ASAMI, K. y TOMITA, T. (1967). Pathogenesis of anisakiasis. Reports of the researches by the grants of Japanese Ministry of Education (Med. & Pharm.), p. 321. (Citado por Oshima, 1972).
- BALBUENA, J.A.; KARLSBAKK, E.; SAKSVIK, M.; KVENSETH, A.M. y NYLUND, A. (1998). New data on the development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). J. Parasitol., 84: 615-617.
- BANU, M.J.; DHANDAYUTHAPANI, S. y NELLAIAPPAN, K. (1991). Intermediary carbohydrate metabolism in the adult filarial worm *Setaria digitata*. Int. J. Parasitol., 21: 795-799.
- BARRETT, J. (1981). Biochemistry of parasitic helminths. Macmillan Publishers, Ltd. London.
- BARRY, E.G. (1966). Cytological considerations bearing of the time of crossing-over in *Neurospora*. Genetics, 54: 321.
- BEHM, C.A. y BRYANT, C. (1975). Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: the role of phosphoenolpyruvate carboxikinase. Int. J. Parasitol., 5: 347-354.
- BERLAND, B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia, 2: 1-50.
- BIJKERK, H. (1968). Haringwormziekte (Anisakiasis). Ned. Tijdschr. Geneesk., 112: 987.
- BOUREE, P.; JUTTE, P. y KLOETI, G. (1987). Anisakiase: diagnostic et extraction par endoscopie gastrique. Presse Med., 16: 1484-1485.
- BOUREE, P.; PAUGAM, A. y PETITHORY, J.C. (1995). Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 18: 75-84.
- BOVERI, T. (1887). Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. Anat. Anz., 2: 288-293.

- BRATTEY, J. y BISHOP, C.A. (1992). Larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridoidea) infection in the musculature of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from Newfoundland and Labrador. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49: 2635-2647.
- BRATTEY, J. y CLARK, K.J. (1992). Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). Can. J. Zool., 70: 274-279.
- BROWN, D.A. y COOK, R.A. (1981). Role of metal cofactors in enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of *Escherichia coli* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate specific malic enzyme, depending on whether magnesium ion or manganese ion serves as divalent cation. Biochemistry, 20: 2503-2512.
- BULLINI, L.; NASCETTI, G.; PAGGI, L.; ORECCHIA, P.; MATTIUCHI, S. y BERLAND, B. (1986). Genetic variation of ascaridoid worms with different life cycles. Evolution, 40: 437-440.
- BUZZELL, G. y SOMMERVILLE, R.I. (1985). The structure of the esophagus in the third-stage infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). Trans. Am. Microsc. Soc., 104: 86-94.
- CAIN, G.D. y KALEYSA RAJ, R. (1980). *Anisakis*, *Phocanema*, *Contracaecum*, and *Sulcascaaris* spp.: Electrophoresis and thermostability of alcohol and malate dehydrogenases from larvae. Exp. Parasitol. 49: 56-67.
- CARDOSO, H.; PECELI, A.; DUTRA, A. y MAZZELLA, M.C. (1984). The timing and RNA transcription of the diffuse stage of meiotic prophase in the male cricket. Chromosoma, 90: 349-354..
- CARVAJAL, J.; BARROS, C.; SANTANDER, G. y ALCALDE, C. (1981). *In vitro* culture of larval anisakid parasites of the Chilean hake *Merluccius gayi*. J. Parasitol., 67: 958-959.
- CARVAJAL, J. (1984). Anisakiasis. En: Parasitología clínica, 2ª edición, pp. 183-186 Publicaciones Técnicas Mediterraneo Ltda., Santiago de Chile.
- CARVAJAL, J. y GONZÁLEZ, L. (1990). Presencia de *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) en salmón Coho de Chiloé cultivado en jaulas. Rev. Chil. Hist. Nat., 63: 165-168.
- CARVAJAL, J.; GONZÁLEZ, L. y TOLEDO, G. (1995). New record of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802)(Nematoda:Anisakidae) in salmonids cultured in sea farms from southern Chile. Res. Rev. Parasitol., 55: 195-197.

- CARVALHO-VARELA, M. y CUNHA-FERREIRA, V. (1982). Larva migrans visceral por *Anisakis* u outros ascarídeos: helmintozoonoses potenciais por consumo de peixes marinhos em Portugal. Rev. Port. Cienc. Vet., 79: 299-309.
- CATALDI DE FLOMBAUM, M.A.; CANNATA, J.J.B.; CAZZULO, J.J. y SEGURA, E.L. (1977). CO<sub>2</sub>-Fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., 58B: 67-69.
- CAZZULO, J.J.; JUAN, S.M. y SEGURA, E. (1977). The malic enzyme from *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol., 99: 237-241.
- CAZZULO, J.J.; VALLE, E.; DOCAMPO, R. y CANNATA, J.J.B. (1980). Intracellular distribution of dioxide-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. J. Gen. Microbiol., 117: 271-274.
- CHANDRA, C.V. y KHAN, R.A. (1988). Nematode infestation of fillets from Atlantic cod, *Gadus morhua*, off Eastern Canada. J. Parasitol., 74: 1038-1040.
- CHENG, T.C. 1976. The natural history of anisakiasis in animals. J. Milk Food Technol., 39: 32-46.
- CHENOWETH, J.F.; Mc GLADDERY, S.E.; SINDERMAN, C.J.; SAWYER, T.K. y BIERR, J.W. (1986). An investigation into the usefulness of parasites as tags for herring (*Clupea harengus*) stocks in the western north Atlantic, with emphasis on use of the larval nematode *Anisakis simplex*. J. Nw. Atl. Fish. Sci., 7: 25-33.
- CHIN, D.A. y TAYLOR, D.P. (1969). Gametogenesis and chromosome complement in *Cylindrocorpus longistoma* and *C. curzii*. Nematologica, 15: 525-529.
- CLAVEL, A.; DELGADO, B.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CARBONELL, E.; CASTILLO, J.; RAMÍREZ, J.; QUÍLEZ, J.; GÓMEZ-LUS, R. y KAGEI, N. (1993). A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. Jpn. J. Parasitol., 42: 445-448.
- COCHETON, J.J.; GOMBEAUD, TH. y FERROIR J.P. (1984). Anisakiase duodenale aigüe. Extraction endoscopique. Presse Med., 13: 744.
- COCHETON, J.J.; CABOU, I. y LECOMTE I. (1991). Anisakiase et infections par les Anisakidés. Ann. Med. Interne, 142: 121-130.
- CORNISH, R.A.; WILKES, J. y METTRICK, D.F. (1981). A study of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). Mol. Biochem. Parasitol., 2: 151-166.

- CUÉLLAR, M.C.; FONTANILLAS, J.C. y PÉREZ-FUENTES. (1991). Biología y epidemiología de la anisakidosis larvaria. Enfermedad del arenque. Cienc. Vet., 4: 57-61.
- CUENTE, E.; AUDICANA, M.T.; GARCÍA, M.; ANDA, M.; CORRES, L.F.; JIMÉNEZ, C. y VESGA, J.C. (1998). Rheumatic manifestation in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. Clin. Exp. Rheumatol., 16: 303-304.
- CUTILLAS, C.; VALERO, A.; ARIZA, C y GUEVARA, D.C. (1985a). Estudio cariológico de *Subulura brumpti* López-Neyra. Rev. Iber. Parasitol., 45: 175-176.
- CUTILLAS, C.; VALERO, A.; GONZÁLEZ-CASTRO, J. y GUEVARA, D.C. (1985b). The spermatogenesis of *Dictyocaulus filaria* (Nematoda, Trichostrongyloidea). J. Parasitol., 71: 500-503.
- CUTILLAS, C.; GUEVARA, D.C.; VALERO, A. y ARIZA, C. (1987). *Protostrongylus rufescens*. A cytogenetic study. J. Helminthol., 61: 72-76.
- DAVEY, K.G. (1965). Molting in a parasitic nematode, *Phocanema decipiens*. I. Cytological events. Can. J. Zool., 43: 997-1003.
- DAVEY, K.G. y KAN, S.P. (1967). An endocrine basis for ecdysis in a parasitic nematode. Nature, 214: 737-738.
- DAVEY, K.G. y KAN S.P. (1968). Molting in a parasitic nematode, *Phocanema decipiens*. IV. Ecdysis and its control. Can. J. Zool., 46: 893-898.
- DAVEY, J.T. (1971). A revision of the genus *Anisakis* Dujardin 1845 (Nematoda: Ascaridata). J. Helminthol., 45: 51-72.
- DAVEY, K.G. (1995). Water, water compartments and water regulation in some nematodes parasitic in vertebrates. J. Nematol., 27: 433-440.
- DEARDOFF, T.L. y OVERSTREET, R.M. (1980). *Contracaecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the northern gulf of México. J. Parasitol., 66: 853-856.
- DEARDOFF, T.L. y OVERSTREET, R.M. (1980). Review of *Hysterothylacium* and *Iheringascaris* (both previously = *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from the northern gulf of Mexico. Proc. Biol. Soc. Washintong, 93: 1035-1079.
- DEARDORFF, T.L.; FUKUMURA, T. y RAYBOURNE, R.B. (1986). Invasive anisakiasis. A case report from Hawaii. Gastroenterology, 90: 1047-1050.

- DEHESA SANTISTEBAN, F.L.; PEREIRA BUENO, J.; CILUAGA ARRATE, J.M.; ESCONDRILLAS WENCEL, T.M. y UBARRI DEL OLMO. (1989). Presencia de larvas de anisákidos en peces de consumo comercializados en Mercabilbao. V Simposio Nacional de Laboratorios e Institutos Municipales de Salud Pública, pp: 5-8. Zaragoza. España.
- DESOWITZ, R.S.; RAYBOURNE, R.B.; ISHIKURA, H. y KLIKS, M.M. (1985). The radio allergosorbent test (RAST) for the serological diagnosis of human anisakiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75: 256-259.
- DOCAMPO, R. (1995). Antioxidant mechanisms. En: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites, pp: 147-160. Eds. J.J. Marr y M. Müller. Academic Press, London.
- DOLLFUS, R.P. (1953). Aperçu général sur l'histoire naturelle des parasites animaux de la Morue atlanto-arctique *Gadus callaria* L. (= *Morhua* L.). Enc. Biol., XLIII, p: 423. París.
- DURAN, E.; KOMUNIECKI, R. y KOMUNIRECKI, P. (1993). Characterization of cDNA clones for the 2-methyl branched chain enoyl CoA reductase: an enzyme involved in branched-chain fatty acid synthesis in anaerobic mitochondria of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. J. Biol. Chem., 268: 22391-22396.
- EIRAS, J.C. (1993). Elementos de ictioparasitología. Fundação Eng. António de Almeida. Porto.
- ESTRADA RODRÍGUEZ, J.L. y GONZALO REQUES, F. (1997). Sensitization to *Anisakis simplex*: an unusual presentation. Allergol. Immunopathol., 25: 95-97.
- EUZEBY, J. (1973). Un type de zoonose helminthique méconnu: Les ascaridoses larvaires de l'homme d'origine pisciaire: *Larva migrans* éosinophiliques du tractus gastro-intestinal. ("Maladie du ver du hareng"). Rev. Med. Vet., 124: 43-68.
- FAGERHOLM, H.P. (1982). Parasites of fish in Finland. VI. Nematodes. Acta Acad. Obo., Sér. B, 40: 1-128.
- FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; QUIRCE, S.; MARAÑÓN, F.; DÍEZ GÓMEZ, M.L.; GIJÓN BOTELLA, H. y LÓPEZ-ROMÁN, R. (1998). Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. J. Allergy Clin. Immunol., 101: 554-555.
- FIORAVANTI, C.F. (1982). Mitochondrial malate dehydrogenase, decarboxylating ("malic" enzyme) and transhydrogenase activities of adult *Hymenolepis microstoma* (Cestoda). J. Parasitol., 68: 213-220.

- FONTAINE, R.E. (1985). Anisakiasis from the American perspective. JAMA, 253: 1024-2025.
- FRAJ LÁZARO, J.; REMACHA TOMEY, B.; COLÁS SANZ, A.; ORTEGA FERNÁNDEZ DE RETAMA, A. y LEZAUN ALFONSO, A. (1998). *Anisakis*, anisakiasis and IgE-mediated immunity to *Anisakis simplex*. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 8: 61-63.
- FREDERICKSEN, D. W. y SPECIAN, R. D. (1981). The value of cuticular fine structure in the identification of juvenile anisakine nematodes. J. Parasitol., 67: 647-655.
- FUJINO, T.; OOIWA, T. y ISHII, Y. (1984). Études cliniques, épidémiologiques et morphologiques de 150 cas d'anisakiase gastrique aigüe dans la Préfecture de Fukuoka. Jpn. J. Parasitol., 33: 73-92.
- GÁLVEZ, L.; SÁEZ, M.J.; IGLESIAS, L.; BENÍTEZ, R.; VALERO, A. y ADROHER, F.J. (1993). Observaciones sobre el desarrollo *in vitro* de *Hysterothylacium aduncum*. VIII Congreso Nacional, I Congreso Portugués de Parasitología y III Congreso Ibérico de Parasitología. Acta Parasitol. Portug., 1: 346. Lisboa, Portugal.
- GEORGE-NASCIMENTO, M. y LLANOS A. (1995). Micro-evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric host from the Southeastern Pacific Ocean. Int. J. Parasitol., 25: 1163-1171.
- GIBSON, D.I. (1970). Aspects of the development of "herringworm" (*Anisakis* sp. larva) in experimentally infected rats. Nytt. Mag. Zool., 18: 175-187.
- GOLDFAIN, D. y POTET, F. (1984). Anisakiase gastrique. Diagnostic et traitement endoscopique. Press. Med., 13: 2586.
- GONZALES, J.C y MALMANN, M.C. (1970). Chromosomes of nematodes of sheep and cattle in Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Med. Vet. S. Paulo, 6: 132-139.
- GONZÁLEZ, L. y CARVAJAL, J. (1994). Parásitos en los cultivos marinos de salmónidos en el sur de Chile. Inv. Pesq., pp:1-10.
- GONZÁLEZ, L. (1998). Experimental infection of mice with *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae) larvae from marine-farmed trout in Chile. Arch. Med. Vet., 30: 139-142.
- GOODRICH, H.B. (1914). The maturation divisions in *Ascaris incurva*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., 27: 147-150.
- GOODRICH, H.B. (1916). The germ cells in *Ascaris incurva*. J. Exp. Zool., 21: 61-69.

- GOSWAMI, U. (1976). Chromosomal studies during cleavage divisions in ten species of nematodes. Res. Bull. Panjab Univ., 27: 119-120.
- GOSWAMI, U. (1978). Some cytogenetical aspects of genus *Trichuris* (Nematoda). Curr. Sci., 47: 368-371.
- GOTO, C.; KASUYA, S.; KOGA, K.; OHTOMO, H. y KAGEI, N. (1990). Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or (6)-shogaol and (6)-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. Parasitol. Res., 76: 653-656.
- GRABDA, J. (1976). Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: *Anisakidae*) cultured in vitro. Acta Ichthyol. Piscat., 6: 119-139.
- HARTWICH, G. (1957). Zur systematik der nematoden-superfamilie Ascaridoidea. Zool. Jahrbücher, 3: 1171-1212.
- HARTWICH, G. (1974). Keys to genera of the Ascaridoidea. N° 2. En: CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates, p: 15. Eds: Anderson, R.C.; Chabaud., A.G. y Willmott, S. CAB, Slough.
- HATSUSHIKA, R. (1979). An experimental study on development and hatching of the eggs of *Anisakis physeteris* (Nematoda: Ascaridata). Kawasaki Med. J., 5: 1-7.
- HIRAI, H.; SAKAGUCHI, Y. y TADA, I. (1985). Chromosomes of *Onchocerca volvulus* and *O. gutturosa*. Z. Parasitenkd., 71: 135-139.
- HOJGAARD, D.P. (1998). Impact of temperature, salinity, and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. Sarsia, 83: 21-28.
- HOMEDES, J. (1933). Estudio cromosómico de los *Ascaris suilla* y *Ascaris vitulorum* Goëze. Trab. Inst. Biol. Anim., 1: 17-24.
- HOTEZ, P.; CAPPELLO, M.; HAWDON, J.; BECKERS, C. y SAKANARI, J. (1994). Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. J. Infect. Dis., 170: 918-926.
- HSU, R.Y. y LARDY, H.A. (1969). Malic enzyme. Methods Enzymol., 13: 230-235.
- HUANG, W. y BUSSIERAS, J. (1988). Anisakidés et anisakidoses humaines. Première partie: Données bibliographiques. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 63: 119-132.

- HUANG, W. (1988). Anisakidés et anisakidoses humaines. Deuxième partie: Enquête sur les Anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 63: 197-208.
- HUBERT, B.; BACOU, J. y BELVEZE, H. (1989). Epidemiology of human anisakiasis: incidence and sources in France. Am. J. Trop. Med. Hyg., 40: 301-303.
- HURST, R.J. (1984). Identification and description of larval *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Anisakidae: Nematoda) from New Zealand waters. N. Z. J. Mar. Freshw. Res., 18: 177-186.
- HURST, R.J. (1984). Marine invertebrate hosts of New Zealand Anisakidae (Nematoda). N. Z. J. Mar. Freshw. Res., 18: 187-196.
- HUSS, H.H.; ROEPSTORFF, A.; KARL, H. y BLOEMSMA, B. (1992). Handling and processing of herring infected with *Anisakis simplex*. III World Congress on Foodborne Infections and Intoxications. Berlín. Alemania.
- IGLESIAS, L.; VALERO, A. y ADROHER, F.J. (1997). Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). Folia Parasitol., 44: 297-301.
- IGLESIAS, L.; VALERO, A.; LÓPEZ-CUELLO, MM.; BENÍTEZ, R. y ADROHER, F.J. (1998). *Floridosentis elongatus* y *Contracaecum* sp., parásitos de lisas (*Mugil incilis*) de Cartagena de Indias, Colombia. I Virtual Congress about Pharmacy. Comunicación N° C40. Granada. España.
- IGLESIAS, L.; GÓMEZ DEL PRADO, M.C.; ADROHER, F.J. y VALERO, A. (1998). *Floridosentis elongatus* y *Contracaecum* sp., parásitos de *Mugil cephalus* de Baja California Sur, México. I Virtual Congress about Pharmacy. Comunicación N° C68. Granada. España.
- IGLESIAS, R.; LEIRO, J.; IGLESIAS, P.; BALTAR, P.; SANTAMARINA, M.T. y UBEIRA, F.M. (1995). Valoración de la aplicabilidad de tres anticuerpos monoclonales para el serodiagnóstico de la anisakidosis humana mediante un sistema de ELISA-captura. IV Congreso Ibérico de Parasitología, pp: 168-169. Santiago de Compostela. España.
- IOLI, A.; LEONALDI, R.; GANGEMI, C.; LO GIUDICE, L.; BOTTARI, M. y PETITHORY, J.C. (1998). Apropos of 1 case of anisakiasis contracted in Sicily. Bull. Soc. Pathol. Exot., 91: 232-234.
- JACKSON, G.J.; BIER, J.W.; PAYNE, W.L. y McCLURE, F.D. (1981). Recovery of parasitic nematodes from fish by digestion or elution. Appl. Environ. Microbiol., 41: 912-914.



- JANATI, A. y DALMASSO, A. (1981). Further observations on chromosomal processes during oogenesis of *Meloidogyne hapla* (Nematoda). Rev. Nematol., 4: 221-226.
- JOHNSON, K. R.; KOMUNIECKI, R.; SUN, Y. y WHEELOCK, M.J. (1992). Characterization of cDNA clones for the alpha subunit of pyruvate dehydrogenase from *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol., 51: 37-47.
- KASUYA, S.; HAMANO, H. y IZUMI, S. (1989). Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. ACI News, 1: 13-14.
- KATES, S.; WRIGHT, A.K. y WRIGHT, R. (1973). A case of human infection with the cod nematode *Phocanema* sp. Am. J. Trop. Med. Hyg., 22: 606-608.
- KOBAYASHI, A.; KUMATA, M. y ISHIZAKI, Y. (1968). Skin tests with somatic and ES (Excretions and Secretions) antigens from *Anisakis* Larvae. I. Survey of normal populations on the skin sensitivity to the different antigens. Jpn. J. Parasitol., 17: 407-413. (En japonés, abstrac en inglés), citado por Oshima, 1972.
- KOBAYASHI, A.; TSUJI, M. y WILBUR, D. (1985). Probable pulmonary anisakiasis accompanying pleural effusion. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34: 310-313.
- KOIE, M. (1993). Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Can. J. Zool., 71: 1289-1296.
- KOIE, M. (1993). Nematode parasites in teleosteost from 0 to 1540 m depth off the Faroe islands (the North Atlantic). Ophelia, 38: 217-243.
- KOIE, M.; BERLAND, B. y BURT, M.D.B. (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52: 134-139.
- KÖHLER, P.; GISLER, J.; BACHMANN, R. y WILD, P. (1983). The localization of fumarase and malic enzyme in muscle mitochondria of *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol., 9: 329-336.
- KOMUNIECKI, R. Y VANOVER, L. (1987). Biochemicals changes during the aerobic-anaerobic transition in *Ascaris suum* larvae. Mol. Biochem. Parasitol., 22: 241-248.
- KOMUNIECKI, R. y HARRIS, B.G. (1995). Carbohydrate and energy metabolism in helminths. En: Biochemistry and Molecular Biology of parasites, pp: 49-66. Eds. J. I. Marr y M. Müller. Academic Press, London.
- LACADENA, J.R. (1996). Citogenética. Ed. Complutense, S.A. Madrid.

- LANDSPERGER, W.J. y HARRIS, B.G. (1976). NAD<sup>+</sup>-Malic Enzyme. Regulatory properties of the enzyme from *Ascaris suum*. J. Biol. Chem., 251: 3599-3602.
- LANDSPERGER, W.J.; FODGE, D.W. y HARRIS, B.G. (1978). Kinetic and isotope partitioning studies on the NAD<sup>+</sup>-Malic Enzyme from *Ascaris suum*. J. Biol. Chem., 253: 1868-1873.
- LEE, W.H. y CHYU, I. (1970). Experiments on the resistance and infectivity of *Anisakis* larvae. J. Cathol. Med. Coll., 18: 229-237.
- LIKELY, C.G. y BURT, D.B. (1989). Cultivation of *Pseudoterranova decipiens* (sealworm) from third-stage to eggs-laying adults in vitro. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46: 1095-1096.
- LIKELY, C.G. y BURT, D.B. (1992). In vitro cultivation of *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Anisakidae) from third-stage larvae to egg-laying adults. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49: 247-248.
- LITTLE, M.D. y MacPHAIL, J.C. (1972). Large nematode larva from the abdominal cavity of a man in Massachusetts. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21: 948-950.
- LOISEAU, P.M.; GAYRAL, P. y PETER, F. (1993). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). Parasitology, 106: 55-61.
- LÓPEZ-GIMÉNEZ y CASTELL-MONSALVE. (1994). Estudio de la tasa de parasitación por nematodos del género *Anisakis* en el pescado fresco de venta más frecuente en Castilla-La Mancha. Alimentaria, 31: 37-42.
- LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA, A.; BARROS, C.; MANZARBETTIA, F. y OÑATE, J.M. (1991). Anisakiasis en España. Descripción de tres casos. Enf. Infec. Microbiol. Clin., 3: 158-161.
- LOUREDO MÉNDEZ, A.; ACEDO DE LA ROSA, F.; ARRIBAS DE PAZ, V.; SANZ ORTEGA, E. y BERNARDO QUIRÓS, L. (1997). Anisakiosis del colon como causa de abdomen agudo. Rev. Esp. Enf. Digest., 89: 403-405.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- LU, B.C. y RAJU, N.B. (1970). Meiosis in coprinus. II. Chromosome pairing and the lampbrush diplotene stage of meiotic prophase. Chromosoma, 29: 305-316.

- LUSTIGMAN, S.; McKERROW, J.H.; SHAH, K.; LUI, J.; HUIJMA, T.; HOUNGH, M. y BROTMAN, B. (1996). Cloning of a cysteine protease for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. J. Biol. Chem., 271: 30181-30189.
- MALLICK, S.; HARRIS, B.G. y COOK, P.F. (1991). Kinetic mechanism of NAD: malic enzyme from *Ascaris suum* in the direction of reductive carboxylation. J. Biol. Chem., 266: 2732-2738.
- MAPES, C.J. (1969). The development of *Haemonchus contortus* in vitro. I. The effect of pH and pCO<sub>2</sub> on the rate of development to the fourth-stage larva. Parasitology, 59: 215-231.
- MARCOGLIESE, D.J. (1996). Larval parasitic nematodes infecting marine crustaceans in Eastern Canada. 3. *Hysterothylacium aduncum*. J. Helminthol. Soc. Wash., 63: 12-18.
- MARCUS, H. (1906). Ei uns Samenreife bei *Ascaris canis* Werner (*Ascaris mystax*). Arch. Mikrosk. Anat., 68: 441-490.
- MARTÍN SÁNCHEZ, J.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; SANCHIZ MARÍN, M.C. y ACEDO SÁNCHEZ, C. (1994). Isoenzymatic characterization of the etiologic agent of canine leishmaniasis in the Granada region of southern Spain. Am. J. Trop. Med. Hyg., 50: 758-763.
- MARTÍN SÁNCHEZ, J.; PANIAGUA, I. y VALERO, A. (1998). Contribution to the knowledge of *Hysterothylacium aduncum* through electrophoresis of the enzymes glucose phosphate isomerase and phosphoglucomuase. Parasitol. Res., 84: 160-163.
- MARUYAMA, H. y NAWA, Y. (1997). *Strongyloides venezuelensis*: Adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. Exp. Parasitol., 85: 10-15.
- MASAFUMI, S.; TAKAFUMI, K.; HIROMI, I., SATOSHI, U.; YOSHIRO, O. y YUICHIRO, S. (1992). Intestinal anisakiasis: US diagnosis. Radiology, 185: 789-793.
- MATSUI, T.; IIDA, M.; MURAKAMI, M.; KIMURA, Y.; YAO, Y. y TSUJI, M. (1985). Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. Radiology, 157: 299-302.
- MATSUMOTO, T.; IIDA, M.; KIMURA, Y.; TANAKA, K.; KITADA, T. y FUJISHIMA, M. (1992). Anisakiasis of the colon: radiologic and endoscopic features in six patients. Radiology, 183: 97-99.

- MATSUURA, T.; SUN, S. y SUGANE, K. (1992). The identity of *Anisakis* type II larvae with *Anisakis physeteris* confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA. J. Helminthol., 66: 33-37.
- MATTIUCCI, S.; NASCETTI, G.; BULLINI, L.; ORECCHIA, P. y PAGGI, L. (1986). Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). Parasitology, 93: 383-387.
- MATTIUCCI, S.; NASCETTI, G.; CIACHI, R.; PAGGI, L.; ARDUINO, P.; MARGOLIS, L.; BRATTEY, J.; WEBB, S.; D'AMELIO, S.; ORECCHIA, P. y BULLINI, L. (1997). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). J. Parasitol., 83: 401-416.
- MATTIUCCI, S.; PAGGI, L.; NASCETTI, G.; ISHIKURA, H.; KIKUCHI, K.; SATO, N.; CIANCHI, R. y BULLINI, L. (1998). Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). Syst. Parasitol., 40: 81-82.
- McKELVEY, J.R. y FIORAVANTI, C.F. (1984). Coupling of "malic" enzyme and NADPH: NAD transhydrogenase in the energetics of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). Comp. Biochem. Physiol., 77: 737-742.
- McKELVEY, J.R. y FIORAVANTI, C.F. (1985). Intramitochondrial localization of fumarate reductase, NADPH:NAD transhydrogenase, "malic" enzyme and fumarase in adult *Hymenolepis diminuta*. Mol. Biochem. Parasitol., 17: 253-263.
- MEASURES, L.N. y HONG, H. (1995). The number of moults in the egg of sealworm, *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea): an ultrastructural study. Can. J. Aquat. Sci., 52: 156-160.
- MERCADO, R.; TORRES, P. y MAIRA, J. (1997). Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). Rev. Saude Publica, 31: 178-181.
- MERCER, J.G.; MUNN, A.E.; SMITH, J.W. y REES, H.H. (1986). Cuticle production and ecdysis in larvae marine ascaridoid nematodes in vitro. Parasitology, 92: 711-720.
- MINAMOTO, T.; SAWAGUCHI, K.; OGINO, T. y MAI, M. (1991). Anisakiasis of the colon: report of two cases on the diagnostic and therapeutic value of colonoscopy. Endoscopy, 23: 50-52.
- MONTIGNY, S.; PREVOT, S. y BASSET, D. (1991). Anisakiase gastrique: guérison par extraction endoscopique retardée. Presse Med., 20: 180-181.

- MONTORO, A.; PERTEGUER M.J.; CHIVATO, T.; LAGUNA, R. y CUÉLLAR, C. (1997). Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. Allergy, 52: 985-991.
- MUTAFOVA, T.K. (1972). On the morphology of chromosomes in *Ascaridia galli* gonad cells (Schrank 1788). Dokl. Bolg. Akaol. Nauk., 25: 381-383.
- MUTAFOVA, T.K. (1975). Morphology and behaviour of sex chromosomes during meiosis in *Ascaris suum*. Z. Parasitenkd., 46: 291-295.
- MUTAFOVA, T.K. (1976). Comparative cytological studies of mitotic and male meiotic karyotype of *Ascaridia dissimilis* (Vigueras, 1931) and *Ascaridia galli* (Schrank, 1788). Z. Parasitenkd., 48: 239-245.
- MUTAFOVA, T.; DIMITROVA, I. y KOMANDAREV, S. (1980). Comparative kariological study of *Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis* y *T. nelsoni*. Khelmitologiya, 9: 51-56.
- MUTAFOVA, T.K. (1995). Meiosis and some aspects of cytological mechanism of chromosomal sex determination in nematode species. Int. J. Parasitol., 25: 453-462.
- NAKATA, H.; TAKEDA, K. y NAKAYAMA, T. (1980). Radiological diagnosis of acute gastric anisakiasis. Radiology, 135: 49-53.
- NASCETTI, G.; PAGGI, L.; ORECCHIA, P.; SMITH, J.W.; MATTIUCHI, S. y BULLINI. (1986). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and north-east Atlantic. Int. J. Parasitol., 16: 633-640.
- NASCETTI, G.; CIANCHI, R.; MATTIUCI, S.; D'AMELIO, S.; ORECCHIA, P.; PAGGI, L.; BRATTEY, J.; BERLAND, B.; SMITH, J.W. y BULLINI, L. (1993). Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic Boreal region: reproductive isolation and host preferences. Int. J. Parasitol., 23: 105-120.
- NORRIS, D.E. y OVERSTREET, R.M. (1976). The public health implications of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. J. Milk. Food Technol., 39: 47-54.
- OCHOA, S. (1955). "Malic"-Enzyme. Methods Enzymol., 1: 739-753.
- OHNO, S.; MAKINO, S.; KLAPAN, W.B. y KINOSITA, R. (1961). Female germ cells of man. Exptl. Cell. Res., 24: 106-110.
- OHNO, S.; KLINGER, H.P. y ATKIN, N.B. (1962). Human oögenesis. Cytogenetics, 1: 42-51.

ORECCHIA, P.; PAGGI, L.; MATTIUCCI, S.; SMITH, J.W.; NASCETTI, G. y BULLINI, L. (1986). Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). J. Helminthol., 60: 331-339.

ORECCHIA, P.; MATTIUCCI, S.; D'AMELIO, S.; PAGGI, L.; PLÖTZ, J.; CIANCHI, R.; NASCETTI, G.; ARDUINO, P. y BULLINI, L. (1994). Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. Int. J. Parasitol., 24: 367-377.

OLMO, M.; COZAR, A.; MARTÍNEZ, J.M. y UREÑA, C. (1998). Anisakiasis at the ileal level. Rev. Esp. Enferm. Dig., 90: 120-123.

OSHIMA, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. Prog. Med. Parasitol. Japan, 4: 301-393.

OSHIMA, T.; OYA, S. y WAKAI, R. (1982). In vitro cultivation of *Anisakis* type I and type II larvae collected from fishes caught in Japanese coastal waters and their identification. Jpn. J. Parasitol., 31: 131-134.

OSHIMA, T. (1987). Anisakiasis. Is the sushi bar guilty?. Parasitol. Today, 3: 44-48.  
OSHIMA, T. y KLIKIS, M. (1986). Effects of marine mammal parasites on human health. Int. J. of Parasitol., 17: 415-421.

OTSURU, M.; SHIRAKI, T.; HATSUKANO, T. y KENMOTSU, M. (1968). Morphological observations on Anisakinae larvae found in marine fishes around the Northern Sea of Japan. Jpn. J. Parasitol., 17: 267. (En japonés), citado por Oshima, 1972.

OVERSTREET, R.M. y MEYER, G.W. (1981). Hemorrhagic lesions in stomach of rhesus monkey caused by a piscine ascaroid nematode. J. Parasitol., 67: 226-235.

PAGGI, L.; NASCETTI, G.; ORECCHIA, P.; MATTIUCCI, S. y BULLINI, L. (1985). Biochemical taxonomy of ascaridoid nematodes. Parassitologia, 27: 105-112.

PAGGI, L.; NASCETTI, G.; CIANCHI, R.; ORECCHIA, P.; MATTIUCCI, S.; D'AMELIO, S.; BERLAND, B.; BRATTEY, J.; SMITH, J.W. y BULLINI, L. (1991). Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents seas. Int. J. Parasitol., 21: 195-212.

PAGGI, L.; MATTIUCCI, S.; ISHIKURA, H.; KIKUCHI, K.; SATO, N.; NASCETTI, G.; CIANCHI, R. y BULLINI, L. (1998). Molecular genetics in anisakids nematodes from the pacific boreal region. En: Host response to international parasitic zoonoses, pp: 83-107. Eds. Ishikura, H.; Aikawa, M.; Itakura, H. y Kikuchi, K. Springer-Verlang, Tokio.

- PAGGI, L.; NASCETTI, G.; WEBB, S.C.; MATTIUCCI, S.; CIANCHI, R. y BULLINI, L. (1998). A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae). Allozyme and morphological evidence. Syst. Parasitol., 40: 161-174.
- PARK, S.H.; KIICK, D.M.; HARRIS, B.G. y COOK, P.F. (1984). Kinetic mechanism in the direction of oxidative decarboxilation for NAD-malic enzyme from *Ascaris suum*. Biochemistry, 23: 5446-5453.
- PASTEELS, J. (1948). Recherches sur le cycle germinal chez l'*Ascaris*. Etude cytochimique des acides nucléiques dans l'oogénèse, la spermatogénèse et le développement chez *Parascaris equorum* Gøerze. Arch. Biol., 59: 420-445.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J. y BRITTON-DAVIDIAN, J. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et Documentation (Lavoisier), París.
- PEREIRA BUENO, J.; DEHESA SANTISTEBAN, F.L. y CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1989). Anisákidos en teleósteos de interés comercial. I Congreso Ibérico de Parasitología, p. 220, Cáceres. España.
- PERTEGUER, M.J.; RAPOSO, R. y CUÉLLAR, C. (1996). *In vitro* study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. Int. J. Parasitol., 26: 105-108.
- PETITHORY, J.C.; LAPIERRE, J.; ROUSSEAU, M. y CLIQUE, M.T. (1986). Diagnostic sérologique de l'anisakiase (granulome éosinophile digestif) par précipitation en milieu gélifié (Ouchterlony, électrosynérèse, immunoélectrophorèse). Méd. malad. infect., 3: 157-162.
- PETITHORY, J.C. y MARTY, B. (1988). L'anisakiase en France. Lett. Infectol., 3: 96-99.
- PETITHORY, J.C.; PAUGAM, B.; BUYET-ROUSSET, P. y PAUGAM, A. (1990). *Anisakis simplex*, a co-factor of gastric cancer?. Lancet, 20: 1002.
- PETITHORY, J.C., ROUSSEAU, M. y SIODLAK, F. (1991). Données séroépidémiologiques sur l'anisakiase: conséquences prophylactiques pour les produits de la pêche. Bull. Acad. Natle. Méd., 175: 273-279.
- PETTER, A.J. (1969). Enquête sur les nematodes des sardines pêchées dans la région nantaise. Rapport possible avec granulomes eosinophiles observés chez l'homme dans la région. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 44: 25-36.

- PETTER, A.J. y CABARET, J. (1995). Ascaridoid nematodes of teleostean fishes from the eastern north Atlantic and seas of the north of Europe. Parasite, 2: 217-230.
- PETTER, A.J. y MAILLARD, C. (1988). Larves d'Ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., 4 sér., 10 sec. A N°2: 347-369.
- PICARD, R.; HARDY, M. y KERNEIS, J.P. (1954). Les granulomes éosiniphiliques du tube digestif. Arch. Mal. Appar. Dig., 43: 920-937.
- PIPPY, J.H.C. y VAN BANNING, P. (1975). Identification of *Anisakis* larva (I) as *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe 1878) (Nematoda: Ascaridata). J. Fish. Res. Board Can., 32: 29-32.
- POZO, M.D.; MONEO, I.; FERNÁNDEZ CORRES, L.; AUDICANA, M.T.; MUÑOZ, D.; FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, J.A. y GARCÍA, M. (1995). Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. J. Allergy. Clin. Immunol., 97: 977-984.
- PRETEL, A.; VALERO, A.; ROMERO, J. y CUTILLAS, C. (1982). Estudio citogenético de *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803). Rev. Iber. Parasitol., 42: 177-184.
- PRETEL, A. y VALERO, A. (1984a). Estudio citogenético en *Nematodirus abnormalis* (Nematoda). Rev. Iber. Parasitol., 44: 315-321.
- PRETEL, A. y VALERO, A. (1984b). Estudio citogenético de *Graphidium strigosum* (Dujardin, 1845) Nematoda. Rev. Iber. Parasitol., 44: 75-81.
- PUNT, A. (1941). Recherches sur quelques nématodes parasites de poissons de la Mer du Nord. Mem. Mus. Hist. Nat. Belg., 98: 1-110.
- RAUSCH, R.L.; SCOTT, E.M. y RAUSCH, V.R. (1967). Helminths in Eskimos in Western Alaska with particular reference to *Diphylobothrium* infection and anemia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61: 351-357.
- RHOADS, M.L.; FETTERER, R.H. y URBAN, J.F. (1997). Secretion of an aminopeptidase during transition of third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. J. Parasitol., 83: 780-784.
- RHOADS, M.L.; FETTERER, R.H. y URBAN, J.F. (1998). Effect of protease class-specific inhibitors on in vitro development of the third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. J. Parasitol., 84: 686-690.
- RHOADS, M.L. y FETTERER, R.H. (1998). Purification and characterisation of a secreted aminopeptidase from adult *Ascaris suum*. Int. J. Parasitol., 28: 1681-1690.



RODRÍGUEZ, M. y CUEVAS, M. (1997). Anafilaxia por hipersensibilidad a *Anisakis*: un cuadro de pseudoalergia alimentaria. Med. Clín., 109: 359.

ROGERS, W.P. (1962). The nature of the Parasitism. Academic Press, New York. EEUU.

ROGERS, W.P. (1970). The function of leucine aminopeptidase in exsheathing fluid. J. Parasitol. 56: 138-143.

ROGERS, W.P. y SOMMERVILLE, R.I. (1960). The physiology of the second ecdysis of parasitic nematodes. Parasitology, 50: 329-348.

ROGERS, W.P. y SOMMERVILLE, R.I. (1963). The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. Adv. Parasitol., 1: 109-177.

ROHRER, S.P.; SAZ, H.J. y NOWAK, T. (1986). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the parasitic helminth *Ascaris suum*. J. Biol. Chem., 261: 13049-13055.

ROMEO RAMÍREZ, J.A.; MARTÍNEZ-CONDE LÓPEZ, A.E.; OLIVARES GALDEANO, U.; SANCHA PÉREZ, A.; LÓPEZ DE LA TORRE RAMÍREZ DE LA PISCINA, J.; BARROS, J. y ECHÁVARRI IÑIGO, J. (1997). Anisakiasis gástrica diagnosticada por endoscopia. Gastroenterol. Hepatol., 20: 306-308.

RUÍZ-VALERO, J.; VALERO A.; ADROHER F.J. y ORTEGA J.E. (1992). Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. *In memoriam al Profesor Doctor D.F. de P. Martínez Gómez*, pp: 335-349. Universidad de Córdoba.

SAKAGUCHI, Y.; KIHARA, S. y TADA, I. (1980). The chromosomes and gametogenesis of *Dirofilaria immitis*. Jpn. J. Parasitol., 29: 377-381.

SAKAGUCHI, Y.; TADA, I.; ASH, L.R. y AOKI, Y. (1983). Karyotypes of *Brugia pahangi* and *B. malayi* (Nematoda: Filarioidea). J. Parasitol., 69: 1090-1093.

SAKANARI, J.A.; LOINAZ, H.M.; DEARDOFF, T.L.; RAYBOURNE, R.B.; MCKERROW, J.H. y FRIERSN, J.G. (1988). A case diagnosed by morphologic and immunologic methods. Am. J. Clin. Pathol., 90: 107-113.

SAKANARI, J.A. (1990). *Anisakis* -from the platter to the microfuge. Parasitol. Today, 6: 323-326.

SANMARTÍN, M.L.; QUINTEIRO, P. y UBEIRA, F.M. (1989). Nematode parasites of commercially important fish in NW Spain. Dis. Aquat. Org., 7: 75-77.

SANMARTÍN, M.L.; QUINTERO, P.; SANTAMARÍA, M.T.; IGLESIAS, R. y LEIRO, J. (1994). Nematodos parásitos de peces de costas gallegas. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.

SAZ, H.J.; LESCURE, O.L. y BUEDING, E. (1968). Biochemical observation of *Ascaris suum* lung-stage larvae. J. Parasitol., 54: 457-461.

SERRA, J.A. y PICCIOCHI, P.G.C. (1960). A correct account of gonial mitosis and early meiosis in the horse ascaris. Rev. Port. Zool. Biol. Geral, 2: 249-276.

SCHAUM y MÜLLER. (1967). Die heterocheilidiasis eine infektion des menschen mit larven von fish-ascariden. Dtsch. Med. Wochenschr, 92: 2230-2233. (Citado por Weerasooriya y col., 1986).

SCHULZ, H.P. (1974). *Anisakis* larvae from the herring: *in vitro* development and morphology. Third International Congress of Parasitology, p: 1627. Munich. Alemania.

SHIRAHAMA, M.; KOGA, T.; ISHIBASHI, H.; UCHIDA, S.; OHTA, Y.; y SHIMODA, Y. (1992). Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. Radiology, 185: 789-793.

SILES, M.; CUÉLLAR, C. y PERTEGUER, M.J. (1997). Genomic identification of *Anisakis simplex* isolates. J. Helminthol., 71: 73-75.

SILVERMAN, P.H. (1965). *In vitro* cultivation procedures for parasitic helminths. Adv. Parasitol., 3: 159-222.

SMITH, J.M. (1983). Larval *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) and larval *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Ascaridoidea) in euphasiids (Crustacea: Malacostraca) in the North-East Atlantic and northern North Sea. J. Helminthol., 57: 167-177.

SMITH, J.W. (1984). The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. Int. J. Parasitol., 14: 491-495.

SMITH, J. W. (1988). An electronic method for estimating the vaginal and uterine egg content of nematodes, with special reference to ascaridoids. Can. J. Zool., 66: 2253-2254.

SMITH, J.W. y WOOTTEN, R. (1975). Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea Arenagus* L. Int. J. Parasitol., 5: 133-136.

SMITH, J.W. y WOOTTEN, R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. Adv. Parasitol., 16: 93-163.

- SOLEIM, O. (1984). A synopsis of the genera *Thynnascaris* and *Contracaecum* (Nematoda, Ascaridoidea) with an emendation of the generic definitions. Acta Parasitol. Pol., 29: 85-96.
- SOMMERVILLE, R.I. (1966). The development of *Haemonchus contortus* to the fourth stage *in vitro*. J. Parasitol., 52: 127-136.
- SOMMERVILLE, R.I. (1970). *In vitro* culture of parasitic nematodes and the nature of the infectious process. J. Parasitol., 58: 116-125.
- SOMMERVILLE, R.I. y DAVEY, K.G. (1976). Stimuli for cuticle formation and ecdysis *in vitro* of the infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridoidea). J. Parasitol., 6: 433-439.
- SPAKULOVA, M.; KRALOVA, I. y CUTILLAS, C. (1994). Studies on the karyotype and gametogenesis in *Trichuris muris*. J. Helminthol., 68: 67-72.
- SUGANE, K.; LIU, Q. y MATSUURA, T. (1989). Restriction fragment length polymorphisms of Anisakidae larvae. J. Helminthol., 63: 269-274.
- SUGIMACHI, K.; INOKUCHI, K.; OOIWA, T.; FUJINO, T. y ISHII, Y. (1985). Acute gastric anisakiasis. JAMA, 253: 1012-1013.
- SUZUKI, H.; OHNUMA, H.; KARASAWA, Y.; OHBAYASHI, M.; KOYAMA, T.; KUMADA, M. y YOKOGAWA, M. (1972). *Terranova* (Nematoda: Anisakidae) infection in man. Clinical features of five cases of *Terranova* larva infection. Jpn. J. Parasit., 21: 252-256.
- SUZUKI, T.; SATO, Y.; KAMASHITA, T.; SEKIKAWA, H. y OTSURU, M. (1974). Anisakiasis: preparation of a stable antigen for indirect Fluorescent Antibody Test. Exp. Parasitol., 35: 418-424.
- SZOSTAKOWSKA, B. y MYLAK, P. (1996). Electrophoretic studies on *Hysterothylacium auctum* complex (Family Anisakidae) from the Baltic sea fish. Parassitologia, 38: 51.
- TKACHUK, L. (1996). About occurrence of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda) in the *Sprattus sprattus phalericus* (Clupeidae) from the Black Sea. Parassitologia, 38: 52.
- TOSHIYUKI, M.; MITSUO, I.; MANABU, M.; MASATOSHI, F.; YSUNEYOSHI, Y. y MAROYASA, T. (1985). Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. Radiology, 157: 299-302.

- TOWNSLEY, P.H.; WRIGHT H.G.; SCOTT, M.A. y HUGHES M.L. (1963). The *in vitro* maturation of the parasitic nematode *Terranova decipiens*, from cod muscle. J. Fish. Res. Board Can., 20: 743-747.
- UNNIKRISHNAN, L.S. y RAJ, R.K. (1995). Transhydrogenase activities and malate dismutation linked to fumarate reductase system in the filarial parasite *Setaria digitata*. Int. J. Parasitol., 25: 779-785.
- VALERO, A. y PRETEL, A. (1979). Estudios cariológicos en *Marshallagia marshalli* Ransom, 1907 (Nematoda-Trichostrongylidae). Rev. Iber. Parasitol., 39: 119-122.
- VALERO, A.; PRETEL, A.; ROMERO, J. y GUEVARA, D.C. (1982a). Estudios cariológicos de *Ostertagia circumcincta*, *O. trifurcata* y *O. occidentalis*. Rev. Iber. Parasitol., 42: 45-52.
- VALERO, A.; ROMERO, J.; PRETEL, A. y GUEVARA, D.C. (1982b). Estudios cariológicos de *Gongylonema pulchrum* Molin, 1857. Rev. Iber. Parasitol., 42: 33-43.
- VALERO, A.; PRETEL, A.; ROMERO, J. y GONZÁLEZ-CASTRO, J. (1982c). Estudio citogenético de *Heterakis spumosa* Schneider, 1866. Ars Pharm., 23: 443-448.
- VALERO, A.; PRETEL, A. y ROMERO, J. (1983a). Estudio citogenético comparativo de *Trichuris suis* (Schränk, 1788) y *Trichuris ovis* (Abildgaard, 1795) (Nematoda). Rev. Iber. Parasitol., 43: 51-59.
- VALERO, A.; HUELI, L.E.; BENAVIDES, I. y REYES, A. (1983b). Estudio de la meiosis espermatogonial de *Bunostomum trigonocephalum* y *Oesophagostomum columbianum*. III Congreso Nacional de Parasitología, p: 74. Barcelona. España.
- VALERO, A.; MIRA-GUTIERREZ, J.; PÉREZ-CANO, R.; SANZ-DOMÍNGUEZ, J.; GERALDÍA-LOMA, M.; GARCÍA-HERRUZO, J.; GARCÍA-MARTOS P. y ADROHER, F.J. (1992). Descripción de un caso de anisakiosis humana. IX Reunión Científica de Parasitólogos Españoles: Homenaje al Prof. Dr. Miguel Cordero del Campillo. p. 69. León. España.
- VAN BANNING, P. (1971). Some notes on a successful rearing of the herring-worm, *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). J. Cons. Int. Explor. Mer, 34: 84-88.
- VAN DEN BOSSCHE, H. y BORGERS, M. (1973). Subcellular distribution of digestive enzymes in *Ascaris suum* intestine. Int. J. Parasitol., 3: 59-65.
- VANOVER-DETTING, L y KOMUNIECKI, P.R. (1989). Effect of gas on carbohydrate metabolism in *Ascaris suum* larvae. Mol. Biochem. Parasitol., 36: 29-40.

- VAN THIEL, P.H.; KUIPERS, F.C. y POSKAM, R. (1960). A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. Trop. Geogr. Med., 2: 97-113.
- VAN THIEL, P.H. (1962). Anisakiasis. Parasitology, 52: 16-17.
- VAN THIEL, P.H. (1966). The final host of the herringworm *Anisakis marina*. Trop. Geogr. Med., 18: 310-328.
- VAN THIEL, P.H. (1976). The present state of *Anisakis* and its causative worms. Trop. Geogr. Med., 28: 75-85.
- VARGAS, A.M. (1978). Acidosis láctica y gluconeogénesis renal durante el ejercicio. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- VASSILEV, I. y MUTAFOVA, T. (1974). Comparative studies on the karyotype of *Ascaris suum* y "*Ascaris ovis*". Z. Parasitenkd., 43: 115-121.
- VERMEIL, C.; PETTER, A.; MORIN, O.; BODIC, M.F.L.E.; GUEGAN, J. y KEMEIS, J.P. (1975). Les granulomes éosinophiles signalés en Bretagne représentent ils une forme d'anisakiase? Les larves de *Thynnascaris aduncum* ne permettent pas d'obtenir expérimentalement ces granulomes. Bull. Soc. Path. Exot., 68: 79-83.
- VIU, M.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; QUILEZ, J. y LÓPEZ-BERNAD, F. (1996). Occurrence of anisakid larvae (Nematoda: Ascaridida) in fresh market fish from Zaragoza (Spain). Res. Rev. Parasitol., 56: 25-28.
- WALTON, A.C. (1916). *Ascaris canis* (Werner) and *Ascaris felis* (Göeze). A taxonomic and a cytological comparison. Biol. Bull., 31: 364-371.
- WALTON, A.C. (1924). Studies on nematode gametogenesis. Z. Zell., 1: 167-239.
- WALTON, A.C. (1940). Gametogenesis. In Chitwood and Chitwood's. An introduction to nematology. Sec. II, Part. 1: 205-215 (Citado por Walton, 1959).
- WALTON, A.C. (1959). Some parasites and their chromosomes. J. Parasitol., 45: 1-20.
- WATT, I.A.; McLEAN, N.R.; GIRDWOOD, R.W.A.; KISSEN, L.H. y FYFE, A.H.B. (1979). Eosinophilic gastroenteritis associated with a larval anisakine nematode. Lancet, 893-894.
- WEERASOORIYA, M.V.; FUJINO, T.; ISHII, Y. y KAGEL, N. (1986). The value of external morphology in the identification of larval anisakid nematodes: a scanning electron microscope study. Z. Parasitenkd., 72: 765-778.

WHITE, M.J.D. (1973). Animal cytology and evolution. 3<sup>a</sup> edn. Cambridge University Press., Cambridge.

WILKES, J.; CORNISH, R.A. y METTRICK, D.F. (1982). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxikynase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). J. Parasitol., 67: 832-840.

WOOTTEN, R y SMITH, W. (1974). Obsevational and experimental studies on the acquisition of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda:Ascaridida) by trout in fresh water. Int. J. Parasitol., 5: 373-378.

YAGI, K.; NAGASAWA, K.; ISHIKURA, H.; NAKAGAWA, A.; SATO, N.; KIKUCHI, K. y ISHIKURA, H. (1996). Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. Jpn. J. Parasitol., 45: 12-23.

YASURAOKA, K.; KOYAMA, T. y KATO, K. (1967). Studies on the in vitro axenic development of *Anisakis* larvae (1). Jpn. J. Parasitol., 16: 290-291. (Citado por Sommerville y Davey, 1976).

YOCOGAMA, M. y YOSHIMURA, H. (1967). Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16: 723-728.

YOSHIMURA, H., AKAO, N.; KONDA, K. y OHNISHI, Y. (1979). Clinicopathological studies on larval anisakiasis, with special reference to the report of extragastrointestinal anisakiasis. Jap. J. Parasitol., 28: 347-354.

YOSHINAGA, T.; KAZUO, O. y WAKABAYASHI, H. (1987). Experimental life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. Fish Pathol., 22: 243-251.

ZAFFAGNINI, F. (1972). Partenogenesi costante in *Strongyloides papillosus* (Nematoda, Rhabdiasoidea). Parassitologia, 14: 209-214.