

LA QUETOTAXIA CERCARIANA EN LA DIFERENCIACION DE SEXOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

LUZ ARELIS PINO*, GUSTAVO MORALES*, B. ALARCON DE NOYA** & OSCAR NOYA**

* Laboratorio de Ecología de Parásitos, Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Universidad de los Andes, Trujillo, 3102-A, Venezuela ** Laboratorio de Bilharzia Experimental, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Sex identification of *Schistosoma mansoni* cercariae by chaetotaxy – The number and pattern of argentophilic papillae (chaetotaxy) of *Schistosoma mansoni* cercariae, permits the differentiation between the male and the female of this larval stage, through the following criteria:

- A greater homogeneity in the male cercariae concerning the number of ventral and dorsal papillae on the body and tail (C. V. = 4.1%), than in the female cercariae (C. V. = 18.3%) ($P < 0.001$).
- The presence in the 80% of the male cercariae of papillae on the inferior-right and left quadrant, respectively, on the ventral surface; while this criterion is only present in the 40% of the female cercariae ($P < 0.001$).
- A significant statistical difference ($P < 0.001$) between the average number of ventral body papillae in the female cercariae ($\bar{X} = 11.9 \pm 0.2$) and the male cercariae ($\bar{X} = 11.1 \pm 0.3$).
- A significant statistical difference ($P < 0.05$) for the average of the major distance between the papillae AIL-AIIL for each cercariae in relation to the sex ($\delta = 25.5 \mu\text{m}$, $\text{♀} = 27.3 \mu\text{m}$).

Key words: *Schistosoma mansoni* – cercarial chaetotaxy – sex identification

La utilidad sistemática de las terminaciones sensoriales ha sido puesta en evidencia en numerosos grupos de invertebrados. En trematodos, la misma fué sugerida por primera vez por Vercammen-Granjean (1951), al estudiar las cercarias de *Schistosoma mansoni*. En ese mismo artículo, la autora introduce el término quetotaxia por analogía de su uso en garrapatas, para describir el número y la disposición de las quetas en la superficie del cuerpo de esos artrópodos. En ese sentido, su uso puede considerarse etimológicamente inapropiado en cercarias de trematodos, pues éstas no presentan quetas en su superficie sino verdaderos cilios (Morris & Threadgold, 1967; Halton & Morris, 1969; Erasmus, 1967). Sin embargo, el término quetotaxia, referido a dichas formas larvarias, tiene el valor del uso que le han dado diversos autores (Richard, 1971; Bayssade-Dufour, 1979a; Lambert, 1972; Pino, 1983) y de la practicidad, pues con un sólo término nos referimos al número y disposición de las papilas argirófilas superficiales, sin implicaciones sobre su estructura y función.

La ya mencionada utilidad sistemática de la quetotaxia cercariana, cuya sensibilidad ha permitido la diferenciación entre cercarias de espe-

cias congénicas cuyos adultos son de taxonomía muy compleja (Pino, 1983), ha sido también eficaz en diferenciaciones infraespecíficas (Bayssade-Dufour, 1977; 1979b; Pino et al., 1986a, b). Estas razones nos motivaron a plantearnos la posibilidad de su uso en la diferenciación de sexos a nivel del estadio cercaria de *S. mansoni*, lo cual no ha sido posible lograrlo mediante estudios morfológicos tradicionales (Paraense & Malheiros, 1949).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico – Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron dos cepas de *Schistosoma mansoni*, una obtenida a partir de un humano infestado de la Isla de Guadalupe y la otra de caracoles *Biomphalaria glabrata* provenientes de un foco bilharziano existente en el río San Julián de la ciudad de Caraballeda (Municipio Vargas, Distrito Federal, Venezuela). Ambas cepas han sido mantenidas desde hace 23 y 4 años, respectivamente en el Laboratorio de Bilharziosis del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (Caracas), mediante pasajes sucesivos por ratones albinos de laboratorio (*Mus musculus*) y *B. glabrata* nacidas en el laboratorio y procedentes del ya mencionado foco de Caraballeda.

Metodos parasitológicos – El protocolo experimental para lograr la diferenciación de sexos a nivel del estadio cercaria mediante la quetotaxia cercariana (Fig. 1) consta de los siguientes pasos:

– *Obtención de miracidios*: fué realizada a partir de los huevos presentes en el hígado de los ratones, los cuales se habían sacrificado por hiperextensión del cuello, luego de la 8a a 9a semana post-infestación. La ex-

tracción y lavado de los huevos, así como la eclosión y concentración de los miracidios, se realizó según la técnica clásica (Malek, 1985).

– *Infección de los caracoles*: para lograr una producción unisexual de cercarias de *S. mansoni*, fué requerida la infección monomiracidial de 9 *B. glabrata* de tallas comprendidas entre 0,5 y 1 cm. de diámetro. Detalles técnicos pueden encontrarse en Malek (1962) y en Césari & Incani (1987).

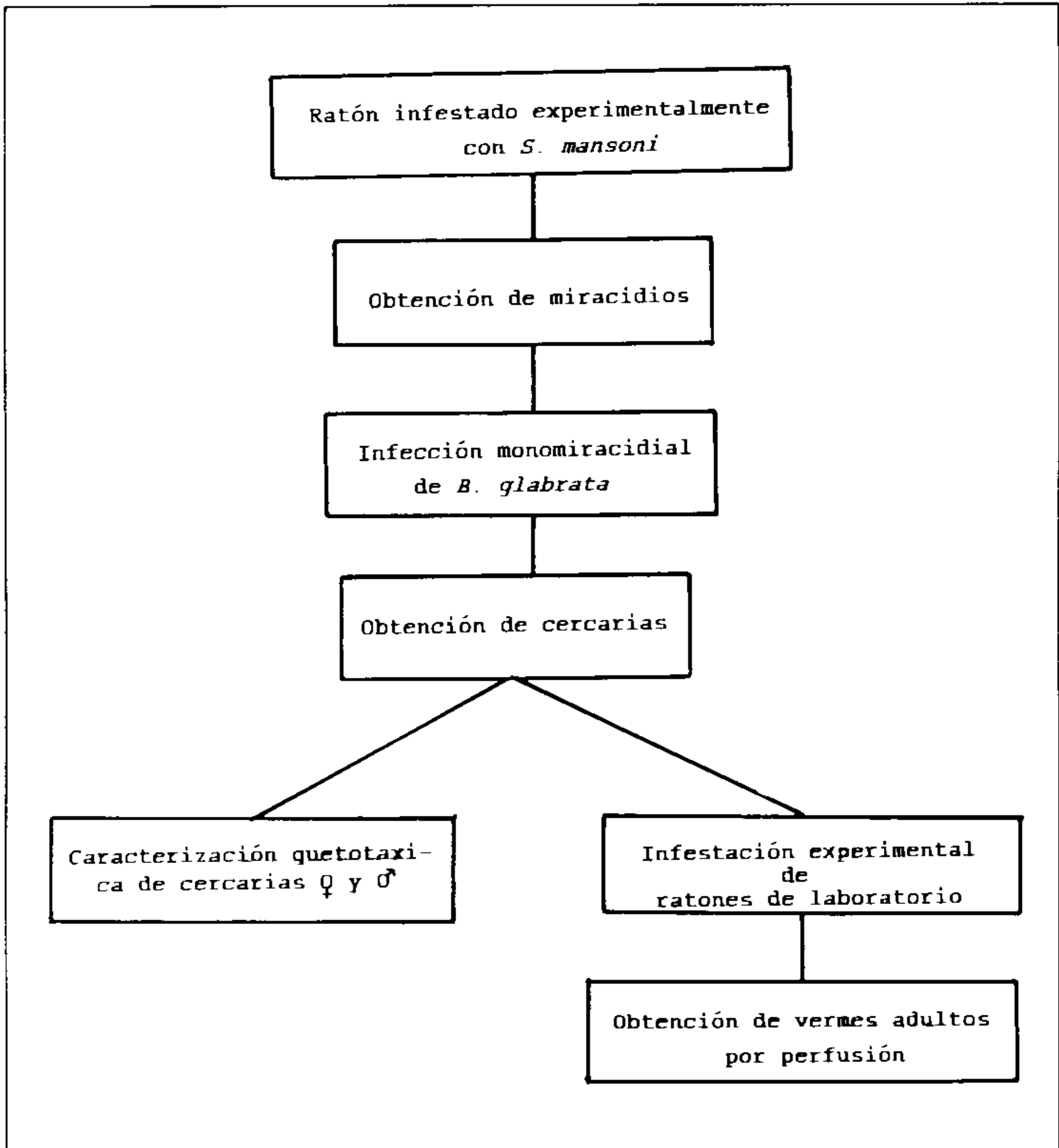


Fig. 1: secuencia de pasos contenidos en el protocolo experimental, para la diferenciación de sexos a nivel del estadio cercaria de *Schistosoma mansoni*.

- *Obtención de cercarias:* el éxito de la infección de los caracoles puede ser evaluado a los 28 ó 30 días posteriores a la infección monomiracidial, pero como nos interesaba obtener una producción cercariana abundante que nos permitiera realizar la infestación experimental de los ratones y la impregnación de una treintena de cercarias por cada molusco, esperábamos hasta los 39 a 40 días de la mencionada infección para efectuar las emisiones cercarianas, exponiendo los caracoles infectados a la luz blanca artificial.
- *Infestación experimental de ratones de laboratorio:* con las cercarias obtenidas de cada molusco se infestaron un total de tres ratones, a razón de 100 a 150 cercarias por cada uno, siguiendo la técnica de infestación percutánea por inmersión (Césari et al., 1987).
- *Obtención de vermes adultos:* a las 7 a 9 semanas de la infestación se sacrifican los roedores con una dosis de 0,3 ml de pentobarbital sódico al 5%, para cada uno. A dicha solución se le agregan 50 unidades de heparina/1 ml de la solución del anestésico (Imbert-Establet, 1980). Mediante éste método se logra la muerte del ratón a los pocos minutos y se evita que la sangre se coagule dentro de los vasos sanguíneos, facilitando la salida de los esquistosomas. Los cuales a su vez paralizados por la acción del anestésico, se desprenden, sin dañarse, del endotelio capilar, siendo fácilmente arrastrados hacia el hígado, en el proceso de perfusión hepática (técnica de Duwall & Dewitt, 1967). Los parásitos adultos, obtenidos se colorean con Carmín clorhídrico y se determina el sexo al cual pertenecen, al microscopio óptico.
- *Impregnación de las cercarias con nitrato de plata:* tal como expresamos anteriormente, un lote de las cercarias producidas por cada caracol infectado, es destinado a la impregnación argéntica siguiendo la técnica descrita por Combes et al. (1976) con algunas modificaciones, en el procedimiento y en la concentración de la solución de nitrato de plata, la cual puede ser utilizada al 2%, en lugar del 5%, recomendado por los autores, sin disminuir la calidad de las preparaciones; detalles procedimentales pueden ser encontrados en Pino et al. (1986a y b).

en todas las cercarias impregnadas, dada la posición que las mismas tomen en el momento del montaje en la lámina portaobjeto. Por ésta razón, veremos en los resultados que el tamaño de la muestra puede variar según el caso.

La nomenclatura seguida para la denominación de las papilas en el estudio quetotáxico de las cercarias, es la propuesta por Richard (1971). A la clásica división, propuesta por esa autora, del cuerpo cercariano en dos mitades (hemisferios), mediante un eje imaginario longitudinal, nosotros agregamos otra división mediante un eje imaginario transversal, quedando el cuerpo de la cercaria dividido en cuatro cuadrantes: "A", "B", "C" y "D", respectivamente, superior-izquierdo, superior-derecho, inferior-izquierdo e inferior-derecho (Fig. 2), lo cual favorece las comparaciones entre cercarias sobre posición y número de papilas.

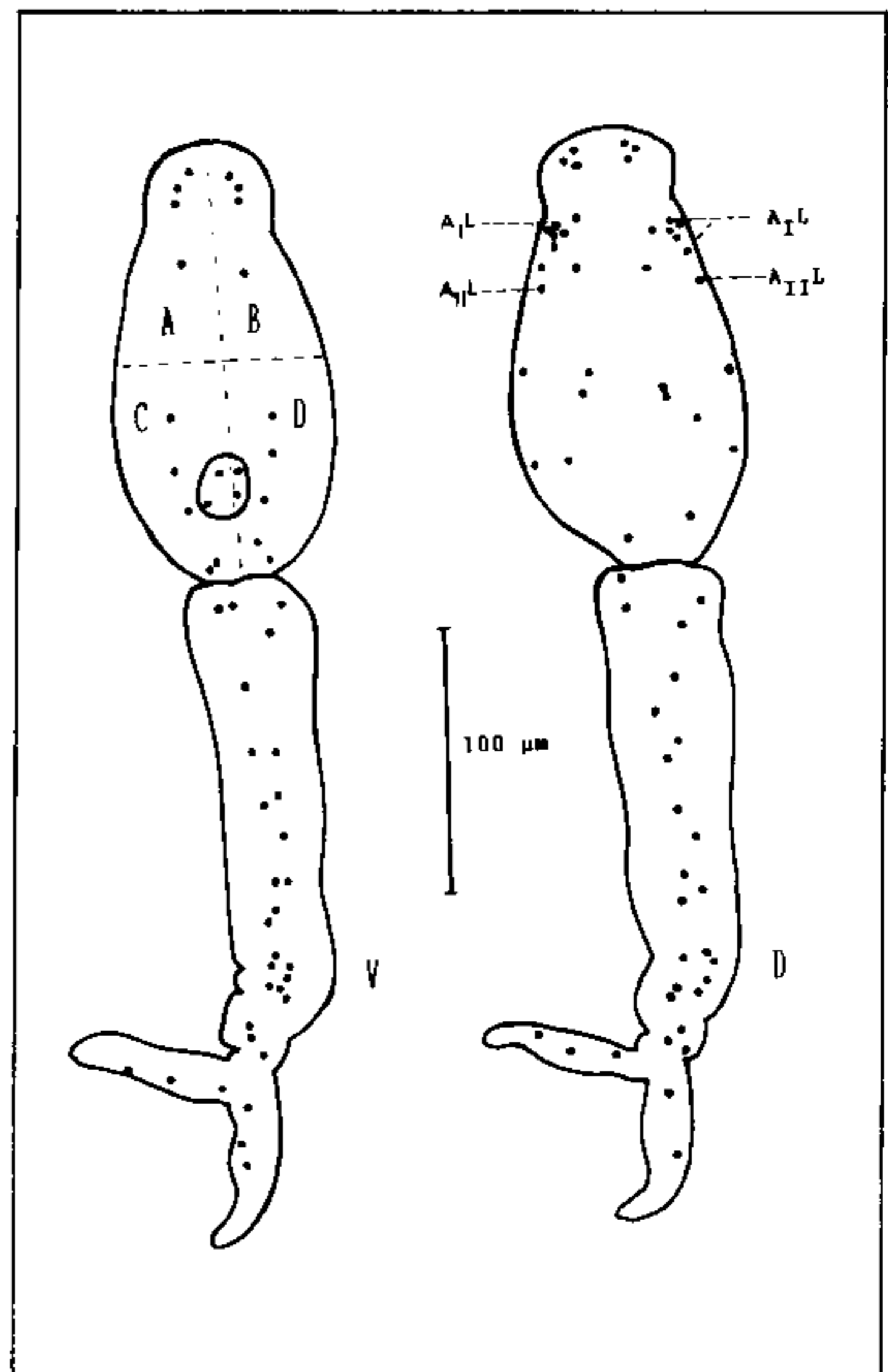


Fig. 2 quetotaxia ventral (V) y dorsal (D) de una cercaria hembra de *Schistosoma mansoni*. A, B, C, y D cuadrantes superior izquierdo, superior derecho, inferior izquierdo e inferior derecho, respectivamente.

A pesar de que las cercarias de *S. mansoni* son relativamente fáciles de estudiar debido a que son delgadas y poco pigmentadas, es posible que no sean visibles todas las axas papilares

Análisis de los datos — Luego de conocido el sexo de las cercarias mediante el estudio de los adultos, se realizaron comparaciones para los diferentes criterios quetotáxicos escogidos entre las cercarias del mismo sexo pero de diferente origen, para eliminar el posible efecto cepa, seleccionando sólo aquellos criterios que no manifestaran diferencias estadísticamente significativas intrasexo.

Los intervalos de confianza de las medias y de los porcentajes, se calcularon en forma clásica, según fórmula suministrada por Schwartz (1981).

Las pruebas de hipótesis de la diferencia entre dos medias que se utilizaron fueron las de "t de Student", en el caso de muestras de tamaño inferior a 30 y la de "z" para aquellas de un tamaño superior a dicha cifra (Duncan et al., 1977).

Para las comparaciones de porcentajes se empleó la fórmula recomendada por Rolan (1973), para muestras de tamaño inferior a 100.

Y finalmente, en las comparaciones de varianzas se utilizó el "Test de comparación de varianzas por su diferencia" (Morales & Pino, 1987).

RESULTADOS

Las Tablas I, II, III y IV nos muestran los resultados de las comparaciones previas entre cercarias del mismo sexo pero de diferente origen, de las cuales sólo resultó eliminado el criterio "Porcentaje de cercarias con 12 papilas corporales ventrales" por presentar diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cercarias hembras (Tabla III).

Entre todos los criterios analizados fueron seleccionados como utilizables en la discriminación intersexual de las formas larvarias estudiadas de *S. mansoni*:

- La homogeneidad de las varianzas del número total promedio de papilas a nivel de cuerpo y cola cercarianos, para el cual resultaron significativamente menos variables las cercarias machos que las hembras ($P < 0,001$) (Tabla V).
- El porcentaje de cercarias con cuatro papilas en los cuadrantes "C" o "D" ventrales. La Tabla VI nos muestra, que el 80% de las cercarias machos presentan cuatro papilas en

los mencionados cuadrantes de la superficie ventral, mientras que sólo el 40% de las cercarias hembras presentan dicho carácter ($P < 0,001$).

- El número total promedio de papilas corporales ventrales, el cual como vemos en la Tabla VII, presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$), entre las cercarias de los dos sexos.
- Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para la mayor distancia promedio entre las papilas "AIL" — "AIIIL" de cada cercaria en relación al sexo: $\delta = 25,5 \mu\text{m}$ $\varphi = 27,3 \mu\text{m}$.

TABLA I

Comparación intrasexo entre los promedios de las mayores distancias AIL-AIIL de cada cercaria (\bar{X}), pertenecientes respectivamente a las cepas Gudalupe (A) y Caraballeda (B) de *Schistosoma mansoni*

Cercarias	Cepa	n	\bar{X}	s	E
Hembras	A	20	27,90	3,99	t_c
	B	33	26,90	5,24	0,73 (NS)
Machos	A	51	25,66	4,69	Z
	B	32	25,16	5,21	0,51 (NS)

n = número de cercarias.
s = desviación estandar.
E = estadístico de prueba.
NS = no significativo.

TABLA II

Comparación intrasexo entre las medias aritméticas del número total de papilas corporales ventrales (\bar{X}), entre cercarias pertenecientes a las cepas Gudalupe (A) y Caraballeda (B) de *Schistosoma mansoni*

Cercarias	Cepa	n	\bar{X}	s	E
Hembras	A	20	11,90	0,55	t_c
	B	33	11,60	0,86	1,39 (NS)
Machos	A	38	10,95	1,84	Z
	B	33	11,36	0,78	1,86 (NS)

n = número de cercarias estudiadas.
s = desviación estandar.
E = estadístico de prueba.
NS = no significativo.

TABLA III

Comparación intrasexo entre los porcentajes de cercarias de *Schistosoma mansoni* que presentan 12 papilas corporales ventrales, pertenecientes a las cepas Guadalupe (A) y Caraballeda (B)

Cercarias	Cepa	n	P (%)	Z
Hembras	A	20	85,00	2,07 (P < 0,05)
	B	33	57,57	
Machos	A	38	39,47	1,60 (NS)
	B	33	54,55	

n = número de cercarias estudiadas.
P = porcentaje de casos observados.
Z = estadístico de prueba.

TABLA IV

Comparación intrasexo entre los porcentajes de cercarias de *Schistosoma mansoni* que presentan cuatro papilas en los cuadrantes "C" ó "D" ventrales (P), pertenecientes a las cepas Guadalupe (A) y Caraballeda (B)

Cercarias	Cepa	n	P (%)	Z
Hembras	A	40	15,00	1,51 (NS)
	B	65	27,69	
Machos	A	75	50,66	1,60 (NS)
	B	67	37,31	

n = número de cercarias estudiadas.
Z = estadístico de prueba.
NS = no significativo.

TABLA V

Comparación de varianzas por su diferencia para el número total promedio de papilas dorsales y ventrales a nivel de cuerpo y cola (\bar{X}), entre cercarias machos y hembras de *Schistosoma mansoni*

Cercarias	\bar{X}	s^2	CV (%)	n	Z
Hembras	77,03	199,76	18,29	56	***
Machos	76,75	9,92	4,10	52	5,02

s^2 = varianza
CV = coeficiente de variación
n = número de cercarias estudiadas
Z = estadístico de prueba
*** = P < 0,001

TABLA VI

Comparación entre los porcentajes de cercarias hembras y machos de *Schistosoma mansoni* que presentan cuatro papilas en los cuadrantes "C" ó "D" ventrales (P)

Cercarias	n	P	Z
Hembras	75	40%	7,8 (P < 0,001)
Machos	72	80%	

n = número de cercarias estudiadas.
Z = estadístico de prueba.

TABLA VII

Comparación entre las medias aritméticas del número total de papilas ventrales (\bar{X}), presentes en cercarias hembras y machos de *Schistosoma mansoni*

Cercarias	n	$\bar{X} \pm IC$	s	Z
Hembras	75	11,9 \pm 0,2	0,74	5,32 (P < 0,001)
Machos	71	11,1 \pm 0,3	0,94	

n = número de cercarias estudiadas
s = desviación estandar
IC = intervalo de confianza
Z = estadístico de prueba

TABLA VIII

Comparación entre los promedios de las mayores distancias AIL-AIIL de cada cercaria (\bar{X}), entre hembras y machos de esta forma larvaria de *Schistosoma mansoni*

Cercarias	n	$\bar{X} \pm IC$ (μm)	s	Z
Hembras	53	27,3 \pm 0,33	4,7	2,24 (P < 0,05)
Machos	83	25,5 \pm 0,26	4,8	

n = número de cercarias estudiadas
IC = intervalo de confianza
s = desviación estandar
Z = estadístico de prueba

DISCUSION

Ha sido ampliamente demostrado que la especificidad parasitaria en los trematodos no es una característica de la especie del parásito sino de sus diferentes estadios (Combes, 1982). El hecho de que dicha especificidad sea estenoxena con respecto a los moluscos hospedadores intermediarios y eurixena respecto a los otros hospedadores que participan en el ciclo, refuerza la hipótesis de muchos autores, de que los

trematodos han sido primitivamente parásitos de moluscos que conquistaron posteriormente a los hospedadores vertebrados (Wright, 1971; Pearson, 1972). Todo esto explica la importancia que tienen en sistemática de trematodos, los criterios establecidos a nivel de los estadios intramolusco, entre los cuales se ubica la quetotaxia cercariana. Esta metodología ha sido utilizada con éxito, tanto en la definición o redefinición específica como de taxones más elevados, tal como lo demuestran los trabajos Richard (1971), Bayssade-Dufour (1979a) y Pino (1983).

Es generalmente admitido, que las diferenciaciones infraespecíficas requieren de un tratamiento estadístico de los datos de observación (Géry, 1962; Macko, 1983). En efecto, a pesar de que la quetotaxia ha sido utilizada de manera descriptiva cuando se trata de definiciones de niveles taxonómicos superiores al específico, a la hora de realizar discriminaciones entre cepas, como en el caso de *Schistosoma mansoni* (Bayssade-Dufour, 1977, 1979b; Pino et al., 1986 a, b) ha sido necesario recurrir al análisis estadístico de la valiosa información cuantitativa-cualitativa aportada por la quetotaxia. En dicho trematodo ese tipo de análisis se ve favorecido debido a que en general el número de cercarias emitidas por molusco infectado es suficientemente grande, como consecuencia de los procesos de reconversión de generaciones cercarianas y de esporoquistes (Théron, 1982; Théron & Jourdane, 1979).

Mediante un estudio muy detallado del tegumento de la cercaria de *S. mansoni*, Short & Carttret (1973), además de aportar información precisa sobre número, disposición y estructura de los receptores sensoriales tegumentarios, tratan de detectar diferencias entre cercarias hembras y machos de *S. mansoni* mediante la quetotaxia. Este último objetivo no es logrado en el trabajo de los mencionados autores, debido en nuestra opinión, a que no realizan un tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Nosotros utilizando la estadística como herramienta complementaria de la quetotaxia, logramos establecer entre las cercarias de ambos sexos del mencionado parásito, un total de cuatro criterios diferenciales. El primero de los cuales, vinculado a la homogeneidad de los valores, ya que a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre las medias del número total de papilas ventrales y dorsales, situadas sobre el cuerpo y cola cercarianos,

detectamos una notable diferencia entre sus respectivas varianzas ($Z = 5,02, P < 0,001$). Otro criterio estuvo relacionado con la frecuencia del carácter "cuatro papilas en los cuadrantes C ó D ventrales" el cual es de indudable utilidad debido a que resultó ampliamente dominante en las cercarias machos ($\sigma = 80\%$; $\text{♀} = 40\%$). Los dos criterios restantes fueron establecidos en base a medias aritméticas: el número promedio de papilas corporales ventrales y la mayor distancia entre las papilas AIL y AIII para cada cercaria.

Mediante otras técnicas más sofisticadas se ha logrado también la discriminación intersexual de las cercarias de *S. mansoni*:

- La técnica de la Banda "C", la cual permite detectar una heterocromatina en el cromosoma "W" del núcleo en interfase de las hembras, que no está presente en el de los machos. Este dimorfismo sexual fué demostrado en los núcleos de miracidios, esporoquistes y adultos, pero no permitió la diferenciación de sexos en *S. haematobium*, *S. japonicum*, ni en *Schistosomatium douthitti* (Liberatos & Short, 1983).
- La otra técnica, emplea marcadores clonales de ADN en genes ribosomales, y ha permitido la discriminación no sólo entre sexos, sino también entre cepas del género *Schistosoma* (Mc Cutchan et al., 1984).

La aplicabilidad de una u otra técnica para la diferenciación de sexos en cercarias de *S. mansoni*, dependerá de los recursos de cada laboratorio en cuanto a equipos, personal especializado, etc. En lo que respecta a la quetotaxia cercariana representa una alternativa, indudablemente más económica y simple; en tanto que las técnicas de biología molecular, a pesar de su precisión, se ven limitadas debido a la complejidad de su metodología y a sus requerimientos de equipos sofisticados; por lo cual se hace necesario, tal como lo plantean Rollinson et al., (1986), para que tengan un uso más difundido y rutinario que simplifiquen sus procedimientos mediante el desarrollo de nuevas técnicas que permitan el análisis rápido de pequeñas cantidades de material biológico y el uso de un equipo más simplificado.

En todo caso, los estudios de diferenciación de sexos tienen interés por sí mismos, desde el punto de vista básico ó fundamental pero también tienen una importancia aplicada, ya que pueden ser de utilidad en:

- El sexaje inmediato de cercarias de *S. mansoni* recién emitidas, obviándose el uso de animales de laboratorio y la espera del lapso de tiempo correspondiente.
- La determinación de posibles diferencias entre cercarias hembras y machos en cuanto a: infestividad o agresividad (capacidad de invasión al hospedador vertebrado), amplitud y duración de la producción cercariana, horas de máxima emisión, ritmos de emergencia, período prepatente intramolusco, diferencias entre tallas de hospedadores intermediarios que alberguen predominantemente a cercarias de uno y otro sexo, etc.

El avance del conocimiento en muchos de los aspectos mencionados, podría tener aplicación en el desarrollo de estrategias racionales de control de la esquistosomiasis.

RESUMEN

Utilidad del análisis estadístico de la quetotaxia cercariana, en la diferenciación de sexos de *Schistosoma mansoni* - El número de papilas argirófilas superficiales y su modelo de disposición en el tegumento de las cercarias (quetotaxia) de *Schistosoma mansoni* nos permitió diferenciar los sexos a nivel del mencionado estadio larvario, mediante los siguientes criterios:

- Mayor homogeneidad en las cercarias machos, en cuanto al número total de papilas ventrales y dorsales a nivel de cuerpo y cola cercarianos (C. V. = 4,1%), que en las cercarias hembras (C. V. = 18,3%) ($P < 0,001$).
- Presencia en el 80% de las cercarias machos de cuatro papilas en los cuadrantes "C" ó "D" (inferior-izquierdo e inferior-derecho, respectivamente) ventrales, mientras que dicho caracter sólo está presente en el 40% de las cercarias hembras ($P < 0,001$).
- Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre el número total promedio de papilas corporales ventrales de las cercarias hembras ($\bar{X} = 11,9 \pm 0,2$) y el de las cercarias machos ($\bar{X} = 11,1 \pm 0,3$).
- Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para la mayor distancia promedio entre las papilas AIL y AIII, de cada cercaria, en relación con el sexo ($\sigma = 25,5 \mu\text{m} \pm 0,33$; $\varphi = 27,3 \mu\text{m} \pm 0,26$).

Palabras claves: *Schistosoma mansoni* - quetotaxia cercariana - diferenciación sexual

REFERENCIAS

- BAYSSADE-DUFOUR, CH., 1977. Differences au niveau des sensilles entre les cercaires africaines et américaines de *Schistosoma mansoni* agent de la bilharziose intestinale humaine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 284, sér. D: 191-193.
- BAYSSADE-DUFOUR, CH., 1979a. L'appareil sensoriel des cercaires et la systematique des trematodes digénétiques. *Mém. Mus. natn. Hist. nat. sér. A. Zool.*, 113.
- BAYSSADE-DUFOUR, CH., 1979b. Variations du système sensoriel de la cercaire de *Schistosoma mansoni*. Intérêt éventuel en épidemiologie. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 54: 593-614.
- CESARI, I. & INCANI, R., 1987. Infección de los caracoles. p. 16-18. En I. Césari y B. Alarcon de Noya, Eds. *Esquistosomiasis mansoni, diagnóstico y control. Manual de campo y de laboratorio*. Centro de Estudios Avanzados, I. V. I. C., Caracas.
- CESARI, I.; INCANI, R. & ALARCON DE NOYA, B., 1987. Infección del hospedador mamífero. p. 23-26. En I. Césari y B. Alarcon de Noya, Eds. *Esquistosomiasis mansoni, diagnóstico y control. Manual de campo y de laboratorio*. Centro de Estudios Avanzados, I. V. I. C., Caracas.
- COMBES, C., 1982. La specificité des schistosomes. *Mém. Mus. natn. Hist. nat. sér. A. Zool.*, 123.
- COMBES, C.; BAYSSADE-DUFOUR, CH. & CASSONE, J., 1976. Sur l'impregnation et le montage des cercaires pour l'étude chétotaxique. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 51: 399-400.
- CHARDY, P., 1980. L'espèce et la taxonomie numérique. p. 65-97. En Ch. Bocquet, J. Genermont y M. Lamotte, Eds. *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*. 3. Société Zoologique de France, Paris.
- DUNCAN, R.; KNAPP, R. & MILLER, M., 1977. *Bioestadística*. Edit. Interamericana, México.
- DUWALL, R. & DEWITT, W., 1967. An improved perfusion technique from recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 16: 483-486.
- ERASMUS, D. A., 1967. The host-parasite interfase of *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (Trematoda, Strigeoidea). II. Electron microscope studies of the tegument. *J. Parasitol.*, 53: 703-714.
- GERY, J., 1962. Le problème de la sous-espèce et de sa définition statistique. (A propos du coefficient de Mayr-Linsley-Usinger). *Vie et milieu*, 13: 521-540.
- HALTON, D. & MORRIS, G., 1969. Occurrence of cholinesterase and ciliated sensory structures in a fish gill-fluke, *Diclidophora merlangi* (Trematoda: Monogenea). *Z. Parasitenk.*, 33: 21-30.
- IMBERT-ESTABLET, D., 1980. *Etude du développement de Schistosoma mansoni chez divers rongeurs; approche expérimentale du rôle possible de Rattus rattus et Rattus norvegicus dans les foyers naturels*. Tesis Doct. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France.
- LAMBERT, A., 1972. *Etude de quelques plathelminthes parasites de Ciprinidae en Languedoc-Rousillon*. Tesis Doct. Université de Montpellier, France.
- LIBERATOS, J. & SHORT, R., 1983. Identification of sex of schistosome larval stages. *J. Parasitol.*, 69: 1084-1089.

- MACKO, J. K., 1983. On the subspecies in parasites with respect to helminths. *Folia Parasitologica*, 30: 107-116.
- MALEK, E. A., 1962. *Laboratory guide and notes for medical malacology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- MALEK, E. A., 1985. *Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in Tropical America: A manual*. Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 478.
- MC CUTCHAN, T.; SIMPSON, A.; MULLINS, J.; SHER, A.; NASH, T.; LEWIS, F. & RICHARDS, CH., 1984. Differentiation of schistosomes by species, strain and sex by using cloned DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 889-893.
- MORALES, G. & PINO, L. A., 1987. *Parasitología Cuantitativa*. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, Caracas.
- MORRIS, G. & THREADGOLD, L., 1967. A presumed sensory structure associated with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 53: 537-539.
- PARAENSE, W. L. & MALHEIROS, J., 1949. The sex of *Schistosoma mansoni* in the infestations produced by cercariae from a single snail. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 47: 51-62.
- PEARSON, J. C., 1972. *A phylogeny of life cycle patterns of the Digenea*. Advances in Parasitology, 10, Academic Press, London.
- PINO, L. A., 1983. *Chétotaxies cercariennes de six espèces de trematodes Paramphistomata, parasites d'animaux domestiques. Intérêt pratique et systématique*. Tesis Doct. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), France.
- PINO, L. A.; FREIRE DE FERNSTEIN, N. & MORALES, G., 1986a. Quetotaxia cercariana de *Schistosoma mansoni* proveniente de *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infectadas. *Acta Científica Venezolana*, 37: 56-59.
- PINO, L. A.; MORALES, G. & FREIRE DE FERNSTEIN, N., 1986b. Comparación de la quetotaxia entre dos grupos de cercarias de una cepa de origen humano de *Schistosoma mansoni* luego de un primer pasaje por dos especies de moluscos congénéricas. *Acta Científica Venezolana*, 37: 60-62.
- RICHARD, J., 1971. La chétotaxie des cercaires. Valeur systématique et phylétique. *Mém. Mus. natn. Hist. nat. Sér. A. Zool.*, 68.
- ROLAN, R., 1973. *Laboratory and field investigations in general ecology*. Mac Millan, New York.
- ROLLINSON, D.; WALKER, T. & SIMPSON, A., 1986. New approaches to schistosome identification. *Parasitol. Today*, 2: 24-25.
- SCHWARTZ, D., 1981. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Flammarion, Paris.
- SHORT, R. & CARTTRET, M., 1973. Argentophilic "papillae" of *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Parasitol.*, 59: 1041-1059.
- THERON, A., 1982. *Le compartiment cercaire dans le cycle de Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Ecologie de la transmission bilharzienne en Guadeloupe*. Tesis Doct. Université de Perpignan, France.
- THERON, A. & JOURDANE, J., 1979. Sequence de reconversion des sporocystes producteurs de cercaires en vue de la production de nouvelles générations de sporocystes. *Z. Parasitenkd.*, 61: 63-71.
- VERCAMMEN-GRANJEAN, P., 1951. Sur la chaetotaxie de la larve infestante de *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 26: 412-414.
- WRIGHT, C. A., 1971. *Flukes and snails. Science of Biology*, Ser. No. 4. Allen et Unwin ed., London.