## ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL ESPOROCISTO HIJO DE PROCTOECES MACULATUS (DIGENEA, FELLODISTOMATIDAE). ESTRUCTURAS VESÍCULO-MEMBRANOSAS DEL TEGUMENTO

### J. R. FERRER

Ferrer, J.R., 1988. Estudio ultraestructural del esporocisto hijo de *Proctoeces maculatus* (Digenea, Fellodistomatidae). Estructuras vesículo-membranosas del tegumento. *Misc. Zool*, 12: 1-10.

Ultrastructural study of the daughter sporocyst of Proctoeces maculatus (Digenea, Fellodistomatidae). Vesicle-membranous structures of the tegument. – The sac-like daughter sporocyst of Proctoeces maculatus, parasite of the mussel, has a tegument, the ultrastructural features of which correspond to digestive and absortive functions. The external membrane of the tegument, increased by the presence of the microvilli-like or intercrossed and anastomosed projections, depends on the body region. In both cases, these projections are overlayed by a glycocalix on the apical and lateral sides. Below them, there are numerous endocytic vesicles. Apart from these vesicles, the tegumentary matrix contains mitochondriae and flattened cisternae of endoplasmic reticulum. The tegument extends on a basal lamina, below which two muscular layers have been shown. The basal lamina and the muscle layers are crossed by cytoplasmic communications between the tegument and the parenchyma, where the endocytic vesicles are canalized. The birth pore, situated at an apex of the larva, is lined by a tegument the outer membrane of which also forms microvilli-like projections, and the matrix of which is filled by light vesicles.

Key words: Proctoeces maculatus, Daughter sporocyst, Tegument, Ultrastructure.

(Rebut: 27 II 89)

J.R. Ferrer, Unitat de Biologia Cel·lular (DBF), Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona, Avgda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Espanya.

### INTRODUCCIÓN

El esporocisto, constituye en el ciclo biológico de los digénidos, una fase multiplicativa de producción masiva de formas metacíclicas subsiguientes en el ciclo: redias, cercarias u otras generaciones de esporocistos, según las especies. Su anatomía consiste simplemente en un saco más o menos alargado, a veces en forma de tubo ramificado, con una pared de complejidad variable, que contiene las células germinativas de las que se desarrollarán las larvas que produce el esporocisto, las cuales, después de acumularse en la cavidad del mismo, son expulsadas al exterior por diferentes mecanismos.

Al ser el esporocisto una forma endoparásita del primer huésped intermediario, un molusco, y carecer de cualquier vestigio de

aparato digestivo, los nutrientes necesarios para mantener a dicha larva y a las larvas que en él se desarrollan, han de penetrar a través del tegumento. Por tanto, la microanatomía del mismo y las estructuras vesículo-membranosas que en él se encuentran, están en correspondencia con una función altamente absorbente. Estudios en este sentido han sido realizados en distintos trematodos, entre los que destacan: MEULEMAN et al. (1980), GO-BEL & PAN (1985), FOURNIER & THERON (1985) y FOURNIER et al. (1987) en Schistosoma, IRWIN et al. (1978) en Cryptocotyle lingua, ZDARSKA & SOBOLEVA (1985) en Postharmostomum gallinum y KØIE (1971) en Cercaria buccini.

El presente trabajo versa sobre los rasgos ultraestructurales del tegumento del esporocisto-hijo del digénido felodistomátido *Proc*- toeces maculatus, parásito del mejillón, con una referencia al poro de puesta, constituyendo una continuación del estudio ultraestructural realizado previamente considerando esta larva en su totalidad (FERRER, 1981).

# MATERIAL Y MÉTODOS

El esporocisto hijo de *Protoeces maculatus* tiene forma de saco de alrededor de 1 mm de longitud, aunque este valor es muy variable dada la gran contractibilidad de esta larva. En un número de varios centenares, los esporocistos en estudio parasitan el manto y la gónada del mejillón, dando a las regiones infectadas un característico color anaranjado, que destaca de las zonas circundantes. El índice de parasitismo es de alrededor del 1%.

El ciclo biológico de *P. maculatus* está determinado (MARTÍNEZ, 1972; WARDLE, 1980). Las cercarias emitidas por el mejillón invaden gusanos poliquetos nereidimorfos donde se transforman en metacercarias; los adultos se desarrollan en distintos peces lábridos, mediante ingestión por éstos de los gusanos conteniendo metacercarias.

En *P. maculatus* se suceden dos o tres generaciones de esporocistos. En el esporocisto madre (esporocisto I) se produce una generación de esporocistos (esporocistos II), los cuales empiezan a invadir al molusco bivalbo; en cada esporocisto II se producen, según la época del año, o una tercera generación de esporocistos, (esporocistos III), o esporocistos III y cercarias simultáneamente, o sólamente cercarias. La presencia masiva de esporocistos corresponde generalmente a los esporocistos III.

Para su estudio al microscopio electrónico de transmisión, los esporocistos aislados de los mejillones infestados masivamente, han sido sometidos al tratamiento convencional con el que se procede a tal efecto: doble fijación con paraformaldehído y glutaraldehído al 3,5% ambos tamponados a pH 7,2 con tampón fosfato de Sörensen; inclusión en Spurr (SPURR, 1969); contrastado de los cortes ultrafinos obtenidos con acetato de uranio y citrato de plomo, éste último preparado según la técnica de Reynolds (REYNOLDS, 1963). La observación se ha efectuado en un microscopio de marca Philips, modelo EM200, del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

Para el estudio al microscopio de barrido, el material ha sido sometido a la misma doble fijación y osmificación, y posteriormente metalizado con oro mediante la técnica del "Sputtering", tras previo tratamiento con  $CO_2$  líquido y posterior elevación de la presión y temperatura hasta el punto crítico del mismo. Las observaciones han sido efectuadas con un microscopio electrónico de barrido Cambridge Stereoscan modelo S4 del citado Servicio.

# RESULTADOS

El esporocisto sacciforme de P. maculatus presenta una superficie típicamente estriada transversalmente, cuyas estrías, en el extremo apical donde se encuentra el poro de puesta, están dispuestas concéntricamente alrededor del mismo (fig. 1). Dicha superficie aparece a menudo deformada, en el sentido de poseer depresiones en las que se conserva la estriación característica, por lo que dichas depresiones son causadas posiblemente por contracciones locales de la musculatura subtegumentaria (fig. 1, flechas). Los esporocistos III, producidos simultáneamente con cercarias, cuando coexisten con éstas en el interior de esporocistos II, se presentan con un grado de desarrollo temprano, con una longitud aproximada de 250 µm y con a lo sumo una o dos bolas germinativas en su interior; sin embargo en este estadio ya tienen diferenciada la estriación mencionada (fig. 2). Por tanto, esta topografía superficial constituye un carácter bastante precoz y perdura durante todo el período de desarrollo del esporocisto. Los resultados que a continuación se estudian corresponden al esporocisto hijo, esporocisto II o III, productor de cercarias con un grado de desarrollo compatible con la existencia de algunas decenas de cercarias en su



Figs. 1, 2. 1. Esporocisto hijo de *Proctoeces maculatus*, presentando el poro de puesta en un extremo y la superficie estriada  $(\rightarrow)$  (187x); 2. Esporisco III aislado de un esporocisto II en el que coexiste con cercarias (225x).

1. Daughter sporocyst of Proctoeces maculatus, with the birth pore at an apex. The body surface is transversally striated (arrows) (187x); 2. Sporocyst III separated from sporocyst II which coexist with cercariae (225x).

interior, coexistiendo éstas con cercarias en formación y bolas germinativas.

La membrana externa del tegumento emite una serie de eminencias con dos morfologías: unas son digitiformes a modo de microvilli, más bien gráciles, aproximadamente de las mismas dimensiones con valores medios de  $0.5 \,\mu$ m de longitud y de  $0.08 \,\mu$ m de grosor; la distribución de las eminencias sigue fielmente la estriación característica de la superficie del cuerpo (figs. 3, 4). La otra morfología es a favor de unas proyecciones citoplasmáticas entrecruzadas y anastomosadas entre sí, recordando al neodermo de los trematodos adultos, y conservándose también la estriación de la superficie (figs. 5, 6). En ambos



casos el contenido de las eminencias es finamente granuloso (fig. 7), apreciándose una ligera estriación longitudinal en el caso de los microvilli (fig. 8). Un glucocálix relativamente denso a los electrones cubre lateral y apicalmente estas proyecciones (figs. 7, 8).

Adosadas a la superficie, se encuentran unas masas subesféricas anárquicamente distribuidas, sin nexo aparente de unión con los microvilli (fig. 4). Al no apreciarse en corte, estas masas pueden constituir elementos extraños al tegumento en estudio.

En la base de las eminencias son abundantes los hoyos y vesículas revestidas (figs. 8, 9, 10). En la matriz tegumentaria, coexisten vesículas desnudas, vacuolas y mitocondrias, éstas en situación generalmente basal y con escasas crestas (figs. 10). La membrana basal aparece ligeramente ondulada.

Esta membrana descansa sobre un estrato ligeramente granuloso, considerablemente denso a los electrones, de alrededor de 0,17  $\mu$ m de espesor, que constituye la lámina basal. Es destacable el hecho de que esta lámina sigue fielmente los accidentes de dicha membrana (fig. 11).

Debajo de la lámina basal se encuentra la musculatura, en la que se distinguen dos capas musculares dispuestas perpendicularmente entre sí, cortadas por tanto longitudinal y transversalmente y orientadas con respecto al cuerpo del esporocisto en direcciones longitudinal y circular; en ambos casos se aprecian los filamentos de actina y miosina, no observándose, en corte transversal, disposición geométrica alguna (fig. 11).

A lo largo de estas estructuras, lámina basal y musculatura, se observan discontinuidades o interrupciones por las que el tegumento comunica con el parénquima (fig. 12). A nivel de estas discontinuidades, la lámina basal adquiere un grosor sensiblemente mayor, y llega a formar un corto conducto por el que se canalizan las vesículas tegumentarias hacia el parénquima (fig. 12).

En la matriz tegumentaria se encuentran estructuras ovaladas o circulares, de  $0,6 \mu m$ de diámetro, con una periferia densa a los electrones y en cuyo interior destaca una densificación también circular u ovalada relativamente gruesa, inmersa en una matriz en la que abundan vesículas de contenido claro (fig. 13). Se trata de una estructura sensorial uniciliada, común en platelmintos, en la que la periferia densa corresponde a la unión entre la estructura propiamente dicha y el tegumento, y la densificación central a la raíz ciliar.

El poro de puesta (fig. 14) se encuentra en el extremo del esporocisto. El tegumento de esta región de la larva descansa sobre una potente musculatura (fig. 16) y está repleto de vesículas de contenido claro de  $0,25 \ \mu m$  de diámetro medio, algunas de las cuales extruyen hacia la luz del poro (fig. 15).

Figs. 3-8. 3. Tegumento (T) cuya membrana externa emite proyecciones digitiformes a modo de microvilli (mv) y en cuya matriz se observan vesículas y mitocondrias (mt) en posición basal (17000x); 4. La distribución de estas eminencias digitiformes sigue fielmente la estriación característica de la superficie, las masas subesféricas adosadas a la superficie (flechas), posiblemente sean elementos extraños al tegumento, al no apreciarse en corte (5500x); 5, 6. La otra morfología de las eminencias es a favor de proyecciones entrecruzadas y entrelazadas, conservándose la estriación superficial (8000x y 3000x); 7, 8. Detalle de las eminencias en el que se aprecia un contenido finamente granuloso, en la base de las mismas son patentes numerosos hoyos revestidos y vesículas revestidas (vp y flechas) (35000x y 75000x).

3. The tegument (T) the outer membrane of which forms microvilli-like projections and in whose matrix there are vesicles and mitochondriae in the base (17000x); 4. The distribution of these digitiform projections is in agreement with the striation of the body surface, subspheric masses against the surface (arrows) are possibily foreign elements of the tegument, since are not shown in section (5500x); 5, 6. The other morphology corresponds to intercrossed and anastomosed projections, surface striation is also present (8000x and 3000x); 7, 8. Detail of projections, showing a fine granular content, below them many coated pits and coated vesicles are present (vp and arrows) (35000x and 75000x).



Figs. 9-13. 9. Detalle de los hoyos recubiertos, las flechas señalan el recubrimiento (9375x); 10. En la matriz tegumentaria (T) coexisten vesículas revestidas con vesículas desnudas y mitocondrias (mt) (24375x); 11. El tegumento (T) descansa sobre una lámina basal (lb) que sigue fielmente a la membrana basal del mismo, debajo de la lámina basal se encuentran dos capas musculares subperpendiculares entre sí (24000x); 12. Detalle de una conexión entre el tegumento (T) y el parénquima (P) por la que se vehiculan vesículas endocíticas tegumentarias (13125x); 13. Estructura sensorial uniciliada, la densificación periférica corresponde al contacto entre la estructura propiamente dicha y el tegumento, la densificación central corresponde a la raíz ciliar, (T) tegumento (46500x).

9. Detail of coated pits, arrows show the coat (9375x); 10. In the tegumentary matrix coated vesicles coexist among uncoated vesicles and mitochondriae (24375x); 11. The tegument (T) extends on a basal lamina (lb) situated paralelly to the basal membrane below which two subperpendicular muscle layers are present (24000x); 12. Detail of a connection between the tegument (T) and the parenchyma (P) through which the endocytic tegumentary vesicles are canalized (13125x); 13. Unicialiated sensory structure, the peripheral electron density corresponds to the contact between the sensory structura and the tegument, the central electron density correspond to the ciliary root (46500x).



del poro de puesta (1500x); 15. Sección del poro de puesta, el tegumento que lo tapiza presenta microvilli y la matriz tegumentaria está repleta de vesículas de contenido claro que extruyen hacia la luz (L), M. Musculatura (10125x); 16. Detalle de las vesículas tegumentarias del poro de puesta (41250x).

14. Detail of the birth pore (1500x); 15. Cross section of the birth pore, the lining tegument shows microvilli-like projections, and the tegumentary matrix is full of light vesicles which protrude into the lumen (L), M. Musculature (10125x); 16. Detail of the birth pore's tegumentary vesicles (41250x).

#### DISCUSIÓN

El carácter intestinal de la superficie del cuerpo del esporocisto implica una doble función: absorción y digestión. El carácter absorbente viene reflejado por la topografía de la superficie, caracterizada por las estriaciones y las eminencias citoplasmáticas, accidentes que tienen por objeto aumentar la superficie de absorción. Además de darse en esporocistos, este aumento de superficie se da también en otras fases endoparásitas del ciclo biológico de los digénidos: generalmente en redias, pues su aparato digestivo, aunque existente,

es exiguo, y circunstancialmente en cercarias como en la intrarrédica de *Parorchis acanthus*, cuya nutrición a través de la pared del cuerpo domina ostensiblemente sobre la nutrición intestinal (REES, 1971); entre las formas adultas, *Cyathocotyle bushiensis* presenta un órgano adhesivo altamente absorbente con el correspondiente aumento de superficie (ERASMUS, 1967).

El dimorfismo morfológico de las proyecciones citoplasmáticas obedece a variaciones regionales y no a grados de desarrollo, pues se han observado en el digénido en estudio, microvilli digitiformes tanto en esporocistos jóvenes coexistiendo con cercarias dentro del esporocisto de la generación precedente, como en esporocistos desarrollados conteniendo varias decenas de cercarias en su interior. Sin embargo, esta variación regional no se corresponde con una variación funcional del tegumento, en el sentido de que en el esporocisto de P. maculatus no se da una regionalización como la que se da en el esporocisto de Schistosoma mansoni, en el que se diferencian regiones dilatadas y regiones contraidas, siendo las primeras las que contienen las cercarias, presentándose el tegumento y las correspondientes proyecciones citoplasmáticas, distintas en ambas zonas; esta regionalización es permanente en el esporocisto maduro de este digénido (FOURNIER & THERON, 1985). El esporocisto en estudio es un saco uniforme, con existencia de cercarias en todo su volumen, y, si bien se dan constricciones, éstas son temporales, casi momentáneas, y sólamente obedecen a contracciones locales de la musculatura subtegumentaria. Por tanto, al no darse una regionalización funcional en el esporocisto en estudio, y de acuerdo con las diferentes imágenes del tegumento pertenecientes a distintas regiones, la distribución de los dos tipos de proyecciones puede considerarse aleatoria.

En todo caso, este aumento de superficie que representa la existencia de eminencias, significa un aumento de la membrana externa del tegumento a través de la cual pasan los nutrientes de bajo peso molecular con la ayuda de moléculas transportadoras existentes en la misma, paso que directa o indirectamente necesita el aporte de energía; queda justificada con ello la presencia de mitocondrias en el citoplasma tegumentario.

La absorción de moléculas de alto peso molecular y de partículas está corroborada ultraestructuralmente por la presencia del elevado número de vesículas de endocitosis existentes en el tegumento. Entre la población vesicular, se distinguen vesículas revestidas y vesículas desnudas; el material incorporado por las vesículas es vehiculado hacia el parénquima a través de las conexiones existentes entre éste y el tegumento, para la nutrición del esporocisto y de las cercarias que se desarrollan en su interior.

Las eminencias descritas están recubiertas externamente por un glucocálix, el cual es más ostensible en el extremo de las mismas. Este glucocálix, presente en el tegumento de todas las formas endoparásitas de digénidos, excepto en las hemáticas, está formado por restos oligosacarídicos de los glucoconjugados de membrana, es decir de los glucolípidos y de las glucoproteinas. Algunas de éstas se ha comprobado que tienen naturaleza enzimática digestiva en enterocitos de vertebrados (SEMENZA, 1986); al mismo tiempo, se ha detectado una acción enzimática digestiva en esporocistos hijo de Cercaria linearis y C. stunkardi, parásitos de Gibbula umbilicalis (THOMAS & PASCOE, 1973). Por tanto, el glucocálix existente en el esporocisto en estudio se puede relacionar con la función digestiva, además de otras funciones tales como reconocimiento celular y antigenicidad, propias de esta formación.

La estructura sensorial descrita, corresponde a una sección transversal, a nivel de bulbo, de una terminación nerviosa bulbar uniciliada; en dicho bulbo, comúnmente hay profusión de vesículas de contenido claro. De acuerdo con el comportamiento in vivo del esporocisto en estudio, cuyo movimiento sólamente se limita a contracciones y dilataciones locales, sin experimentar ningún tipo de desplazamiento dirigido, no es frecuente encontrar estructuras sensoriales. No obstante, estructuras bulbares uniciliadas que con mucha más profusión se describen en otras fases del ciclo biológico de los trematodos, también se han señalado en esporocistos; concretamente en *Bacciger bacciger* de la familia Fellodistomatidae (MATRICON-GONDRAN, 1971).

La existencia de un poro de puesta en uno de los extremos de la larva marca una polaridad de la misma. Sin embargo, en cuanto a la morfología externa, no hay estructura alguna asociada al poro, como por ejemplo el botón terminal existente en el esporocisto hijo de Opisthioglyphe ranae en cuyo centro se encuentra la abertura (BUSTA & NASINCOVA, 1988). El tegumento que tapiza el poro es una invaginación del tegumento que recubre el resto del cuerpo, presentándose los microvilli característicos, hecho que también se da en Schistosoma mansoni (FOURNIER & THERON, 1985) y en Sch. japonicum (FOURNIER et al., 1987). No obstante, la presencia de vesículas de contenido claro constituye una característica diferencial del tegumento del poro. La extrusión de las mismas a la luz puede estar en correspondencia con una lubrificación de la pared del mismo. En este sentido, cabe recordar el modo de salida de la cercaria observado in vivo: después de la salida del acetábulo, órgano adhesivo de mayor consistencia y volúmen de la larva, el resto del cuerpo es prácticamente lanzado al exterior; al mismo tiempo, se observa una evaginación del poro durante la salida de la cercaria. No es descartable una compresión de la larva por parte de la musculatura subtegumentaria del poro; esta compresión, alternada con los movimientos de la cercaria, puede constituir uno de los determinantes de la expulsión. Ulteriores secciones del poro durante su evaginación y salida de la cercaria, aportarán datos de los cambios ultraestructurales en el tegumento del poro durante la puesta.

## BIBLIOGRAFÍA

BUSTA, J., NASINCOVA, V., 1988. Scanning electron microscopy of the egg, sporocyst, cercaria, metacercaria and adult of *Opisthioglyphe ranae* (Frölich, 1791) (Trematoda: Plagiorchiidae). *Folia Parasitologica*, 35: 97-103.

- ERASMUS, D.A., 1967. The host-parasite interface of *Cyathocotyle bushiensis* (Khan, 1962) (Trematoda: Strigeoidea). II. Electron microscope studies of the tegument. J. Parasitol., 53(4): 704-714.
- FERRER, J.R., 1981. Estructura y ultraestructura del esporocisto de un trematodo parásito del mejillón Mytilus edulis L. Bol. R. Soc. Española Hist. Nat., 79: 5-14.
- FOURNIER, A. & THERON, A., 1985. Sectorisation morpho-anatomique et fonctionelle du sporocyste-fils de Schistosoma mansoni. Z. Parasitenkd., 71: 325-336.
- FOURNIER, A., XIA, M. & COMBES, C., 1987. Étude ultrastructurale du sporocyste-fils de *Schistosoma japonicum:* comparison avec le sporocystefils des autres Schistosomes. An. Sc. Nat., Zool. Biol. Anim., Ser. 13, 8: 5-10.
- GOBEL E. & PAN, J.P., 1985. Ultratructure of the daughter sporocyst and developing cercaria of *Schistosoma japonicum* in experimentally infected snails, *Oncomelania hupensis hupensis*. Z. *Parasitenkd.*, 71: 227-240.
- IRWIN, S.W.B., THREADGOLD, L.T. & HOWARD, N.M., 1978. Cryptocotyle lingua (Creplin) (Digenea: Heterophydae): observations on the morphology of the redia, with special reference to the birth papilla and release of cercariae. Parasitology, 76: 193-199.
- KØIE, M., 1971. On the histochemistry and ultrastructure of the daughter sporocyst of *Cercaria bucci*ni Lebour, 1911. Ophelia, 9 (1): 145-163.
- MARTÍNEZ, J.C., 1972. Recherches sur quelques stades larvaires de Digénes parasites de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Thése Doctorale, Université des Sciences et Techniques de Lanquedoc.
- MATRICON-GONDRAN, M., 1971. Origine et differentiation du tégument d'un Trématode Digénétique: étude ultrastructurale chez Cercaria pectinata (larve de Bacciger bacciger, Fellodistomatidés). Z. Zellforsch, 120: 488-524.
- MEULEMAN, A., HOLZMANN, P.J. & PEET, R.C., 1980. The development of daughter sporocyst inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. Z. Parasitenkd., 61: 201-212.
- REES, G., 1971. The ultrastructure of the epidermis of the redia and cercaria of *Parorchis acanthus*, (Nicoll). A study by scanning and transmision electron microscopy. *Parasitology*, 62: 479-488.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-212.
- SEMENZA, G., 1986. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocites and renal tubuli. Ann. Rev. Cell Biol., 2: 255-313.
- SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruc. Res., 26: 36-43.

THOMAS, J.S. & PASCOE, D., 1973. The digestion of exogenous carbohidrate by the daughter sporocysts of *Cercaria linearis* (Lespes, 1857) and *Cercaria stunkardi* (Palombi, 1936) in vitro. Z. Parasitenkd., 43: 17-23.

WARDLE, W.J., 1980. On the life-cycle stages of Proctoeces maculatus (Digenea Fellodistomatidae) in mussels and fishes from Galvestone Bay, Texas. Bull. Mar. Sci., 30: 737-743.

ZDARSKA, Z. & SOBOLEVA, T.N., 1985. Electron microscope observations of the sporocyst of *Postharmostomum gallinum* (Witenberg, 1923) (Brachylaimidae). *Folia Parasitologica*, 32: 227-230.