

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS VESÍCULAS TEGUMENTARIAS DE LA REGIÓN POSTERIOR EN LA CERCARIA INTRAESPOROCÍSTICA DE *PROCTOECES MACULATUS* (TREMATODA, DIGENEA, FELLODISTOMATIDAE)

J. R. FERRER

Ferrer, J. R., 1993-1994. Estudio ultraestructural de las vesículas tegumentarias de la región posterior en la cercaria intraesporocística de *Proctoeces maculatus* (Trematoda, Digenea, Fellodistomatidae). *Misc. Zool.*, 17: 25-34.

Ultrastructural study of tegumentary vesicles of posterior region in the intrasporocystic cercaria Proctoeces maculatus (Trematoda, Digenea, Fellodistomatidae).— In the tegument that overlaps the posterior region of the body of the cercaria of *Proctoeces maculatus* large lenticular vesicles coexist among two other kinds of vesicles. Lenticular vesicles are formed at high nuclear/cytoplasm ratio subtegumentary cells in which a rough endoplasmic reticulum (RER) with a high pleomorphic cisternae is very apparent. The Golgi complex is less important. Two or three cisternae of RER contributes in each lenticular vesicle formation, whose electron dense contents originates in these RER cisternae. In the tegument these vesicles are mainly arranged subperpendicularly to the surface, and are functionally related to the caudal adhesivity of the larva.

Key words: *Proctoeces maculatus*, Cercaria, Tegument, Lenticular vesicles, Endoplasmic reticulum.

(*Rebut: 24 V 93; Acceptació condicional: 16 IX 93; Acc. definitiva: 18 IV 94*)

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

INTRODUCCIÓN

Los trematodos como los otros platelmintos, presentan un tegumento consistente en un estrato citoplasmático anucleado que comunica, mediante prolongaciones celulares, con pericariones situados a nivel de parénquima, por debajo de las capas musculares externas. El funcionalismo es plural, desempeñando un papel estructural, absorbente y protector (DIXON, 1976).

Además de otros elementos membranosos, es un hecho bastante constante que el

tegumento presente vesículas de distinta naturaleza, lo cual ya se da típicamente en la cercaria; en efecto, cuando esta larva se está desarrollando dentro del esporocisto o redia (según las especies) en un primer estadio de desarrollo, está recubierta por la llamada epidermis embrionaria (MATRICON-GONDRAN, 1971), formada por la fusión de los blastómeros externos del embrión primigenio o bola germinativa; tras previa desaparición de los núcleos, esta epidermis se transforma en el tegumento definitivo de esta larva, que a su vez constituye la base

estructural del tegumento de la metacercaria y del adulto. Esta transformación supone un aporte vesículo-glandular hacia la epidermis, procedente de diversas células que se diferencian en el parénquima infrayacente, las cuales emiten prolongaciones citoplasmáticas hacia la misma por las que se canaliza dicho aporte. El significado de estas vesículas está en correspondencia con el papel estructural e inmunoprotector del tegumento, aunque en el caso de las cercarias, parte de la población vesiculosa tegumentaria puede intervenir en la formación del quiste de la metacercaria.

En las dos últimas décadas han aparecido numerosos trabajos que hacen referencia a la ultraestructura del tegumento y de su contenido vesiculoso en diversos digénidos y en distintas fases del ciclo biológico; destacan entre ellos los de MERCER & DIXON (1967) y THREADGOLD (1967) en la cercaria y en el adulto, respectivamente, de *Fasciola hepatica*; ERASMUS (1967) en el adulto de *Cyathocotyle bushiensis*; MATRICON-GONDRAN (1971) en la cercaria de *Bacciger bacciger*; KØIE (1971) en la cercaria de *Zoogonoides viviparus*; KØIE (1973) en la cercaria y en el adulto de *Neophasis lageniformis*; REES & DAY (1975) en la cercaria de *Cryptocotyle lingua*; FERRER (1983) en la cercaria de *Proctoeces maculatus*; DUNN et al. (1987) en distintos Paramphistomatidae adultos.

El retículo endoplasmático y el Complejo de Golgi son los orgánulos membranosos con los que, la mayoría de estos autores, relacionan la génesis y la formación de estas vesículas, generalmente a nivel de células glandulares tegumentarias, aunque la actividad sintetizadora también puede darse en el propio tegumento, como lo demuestra la presencia de dictiosomas en el adulto de *Haematholoechus medioplexus* (BOGITSH, 1971).

Los esporocistos de *Proctoeces maculatus* parasitan el manto y la gónada del mejillón. El desarrollo intraesporocístico de la cercaria de este digénido conlleva el aporte de dos tipos de vesículas tegumentarias (FERRER, 1983). El presente trabajo versa sobre la morfología, el origen y la formación de un tercer tipo de vesículas que se encuentran en el tegumento que recubre el tercio posterior del cuerpo de dicha cercaria, coexistiendo con vesículas de los otros dos tipos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los lotes de mejillones *Mytilus edulis* examinados son de batea y proceden de la costa gallega. En un 1% de los ejemplares estudiados se ha encontrado una parasitosis de *P. maculatus* consistente en una infestación masiva de la gónada por un elevado número de esporocistos sacciformes, en cuyo interior se desarrollan las cercarias. Se ha trabajado preferentemente con esporocistos aislados.

Para su estudio al microscopio electrónico, el material ha sido sometido a una doble fijación con glutaraldehído-paraformaldehído al 3%, tamponado con tampón fosfato de Sørensen a pH 7,2 durante dos horas a 4°C, seguido de una postfijación con OsO₄ al 1,5% tamponado igualmente con Sørensen. El medio de inclusión ha sido preferentemente el Spurr (SPURR, 1969). Los cortes ultrafinos obtenidos con un ultramicrotomo de marca Reichert Ultracut, han sido sometidos a un contrastado con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa y a continuación con citrato de plomo, preparado según la técnica de Reynolds (REYNOLDS, 1963). La observación se ha efectuado en un microscopio electrónico de transmisión de marca Philips modelo EM200 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

RESULTADOS

En un estadio relativamente inicial del desarrollo cercarial, en el que el tegumento aún aparece desprovisto prácticamente de vesículas tegumentarias (fig. 1), se distinguen en el parénquima unas células de tipo glandular; su núcleo es grande, con uno o dos nucleolos, y cuyo nucleoplasma está ocupado prácticamente en su totalidad por eucromatina o cromatina no condensada, lo que está en correspondencia con una elevada actividad de síntesis. El citoplasma tiene escasa electrodensidad y en él destacan grupos de cisternas de retículo endoplasmático y vesículas de secreción caóticamente dispersos y cuyas secciones reflejan diversas configuraciones.

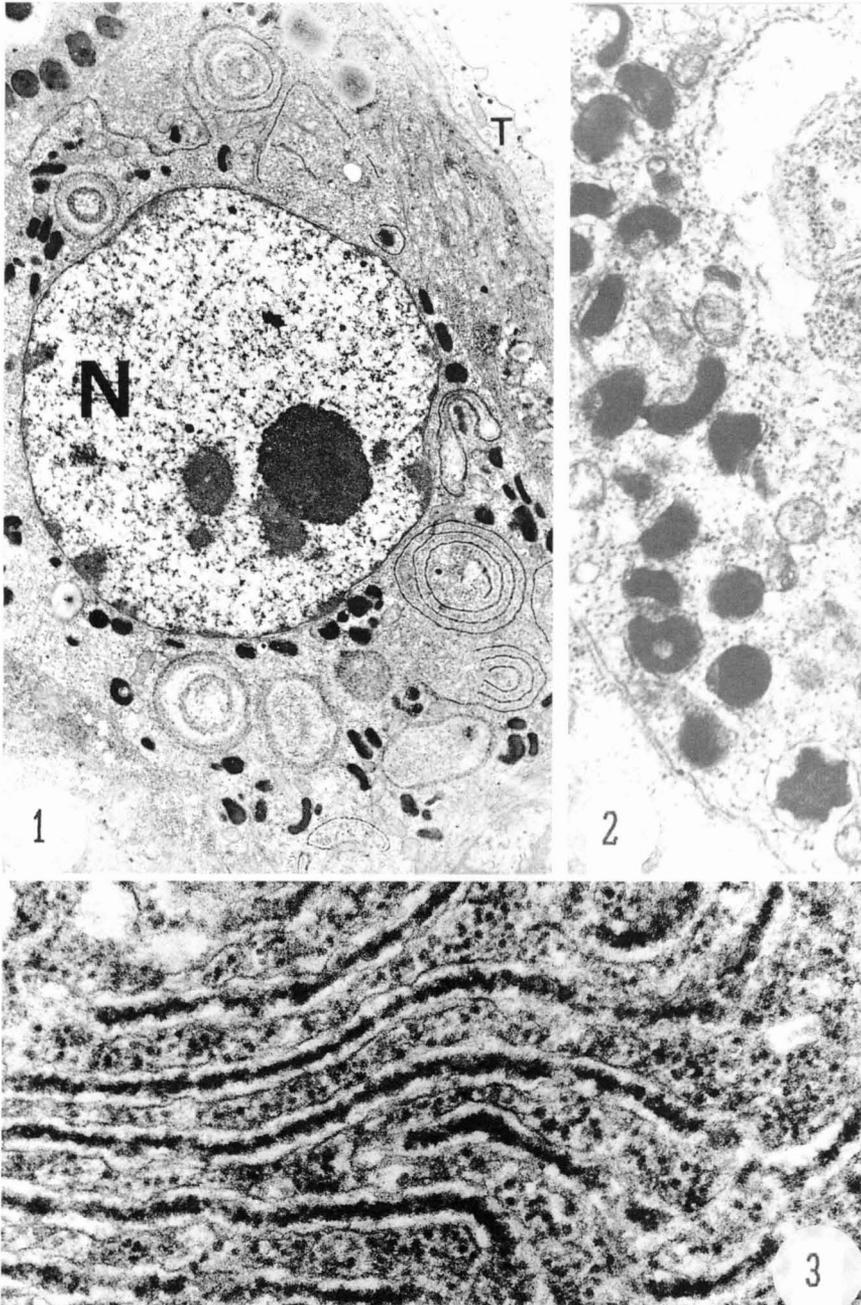
La morfología de estas vesículas aparece variada según el nivel en que son seccionadas y de la orientación del corte. Y así se observan secciones de forma redondeada, bastoniforme, en forma de coma, de semiluna o de corona circular (fig. 2). Todas estas secciones hacen pensar que se trata de vesículas que posiblemente tienen en realidad forma de lente bicóncava. En todo caso, el diámetro máximo encontrado es de $0,35 \mu\text{m}$. Al mismo tiempo, las vesículas presentan un contenido denso a los electrones y una membrana unitaria limitante, la cual no está adosada directamente a la matriz densa de la vesícula, sino que hay un espacio claro irregular entre las dos.

El retículo endoplasmático relacionado con la formación de estas vesículas, presenta unas cisternas de $0,125 \mu\text{m}$ de grosor, con un contenido granuloso de elevada electrodensidad (fig. 3). El citoplasma existente entre las cisternas es finamente granuloso, con numerosos ribosomas dispersos en el mismo o bien adosados a la membrana del retículo. Un rasgo característico de las células glandulares en estudio, es la multiplicidad de formas que presenta este retículo endoplasmático; gene-

ralmente, se trata de estructuras tridimensionales cerradas, total o parcialmente, en las que las cisternas están dispuestas concéntricamente; y así, en sección, aparecen formas redondeadas (fig. 1), cupuliformes (figs. 1, 4) o alargadas (fig. 5).

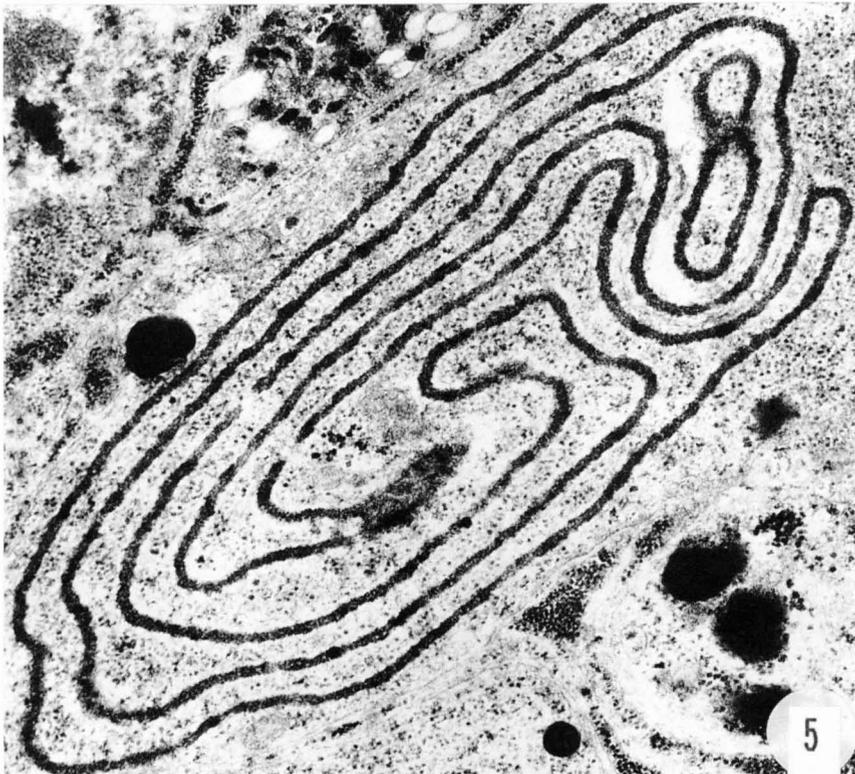
El Complejo de Golgi también está formado por dictiosomas en los que se cuentan unos cinco sáculos (fig. 4). De todos modos, en el contexto global de la célula el Complejo de Golgi es menos aparente que el retículo endoplasmático.

En la génesis de las vesículas de secreción interviene el retículo endoplasmático; no se observa, a nivel morfológico, conexión topográfica alguna entre éstas y el Complejo de Golgi. En la formación de una vesícula (fig. 6) están implicadas varias cisternas del retículo. El proceso es a favor de una deformación de las cisternas, adoptando forma de herradura; tras previa desaparición de las membranas, con la excepción de la membrana externa de la cisterna marginal, el contenido denso de los sáculos implicados se va acumulando y compactando, para ir formando sucesivamente la vesícula. La membrana externa de la cisterna marginal configura la membrana de la vesícula propiamente dicha. Sin embargo, este proceso no presenta simetría radial, sino que por el contrario se da una polaridad, según la cual hay una mayor acumulación de material denso de las cisternas en un polo de la vesícula que en el otro. Esto está en concomitancia con el hecho de que en el polo opuesto de la acumulación del material electrodenso, una cierta porción de citoplasma queda aprisionada en el seno de la vesícula en formación. Paulatinamente, el material electrodenso dispuesto asimétricamente en forma de herradura, va progresando hacia el centro de la vesícula (figs. 6, 7, 8), quedando incierto el destino del contenido citoplasmático incluido anteriormente en la vesícula en formación.



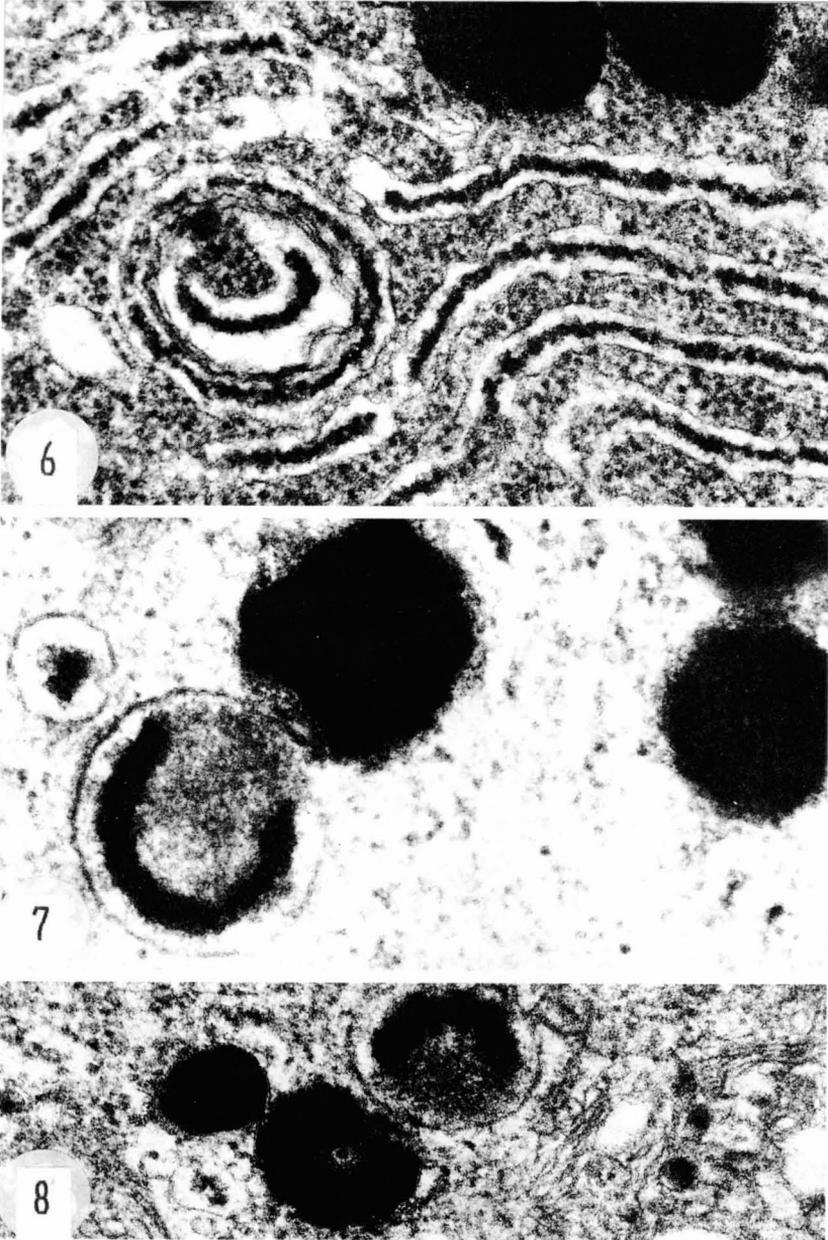
Figs. 1-3. 1. Célula glandular: N. Núcleo; T. Tegumento (10.600X). 2. Vesículas de secreción (36.000X). 3. Retículo endoplasmático (48.000X).

1. Glandular cell: N. Nucleus; T. Tegument (10 600X). 2. Secretory vesicles (36 000X). 3. Endoplasmic reticulum (48 000X)



Figs. 4-5. Polimorfismo del retículo endoplasmático: 4. Formas redondeadas; 5. Formas alargadas. G. Dictiosomas del Complejo de Golgi. (52.000X).

Polymorphism of endoplasmic reticulum: 4. Rounded in shape; 5. Elongated in shape. G. Dictyosomes of Golgi Complex. (52 000X).



Figs. 6-8. 6. Inicio de la formación de una vesícula de secreción (73.500X); 7. Membrana externa de la cisterna marginal, que configura la membrana de la vesícula propiamente dicha (90.000X); 8. La densificación del contenido de las vesículas tiene lugar asimétrica y centrípetamente (70.000X).

6. *The genesis of a secretory vesicle begins by accumulation of dense material of two endoplasmic reticulum cisternae (73 500X)*; 7. *Outer membrane of marginal cisterna, which becomes that of the vesicle (90 000X)*; 8. *Densification of the vesicle contents happens in assymetric and centripetal manner (70 000X).*

La célula glandular y las vesículas en estudio son de naturaleza tegumentaria, tanto por cuanto estas vesículas aparecen en el tegumento del tercio posterior del cuerpo de la cercaria intraesporocística, coexistiendo con las otras vesículas tegumentarias (fig. 9). De un modo semejante a lo que ocurre con estas vesículas, las que se estudian en el presente trabajo, también son canalizadas hacia el tegumento mediante prolongaciones citoplasmáticas de las propias células glandulares (FERRER, 1983). El momento en que ello ocurre, es bastante precoz con respecto al desarrollo de la cercaria, ya que estas células glandulares ya están diferenciadas y son también funcionales en un momento temprano de la formación del tegumento (fig. 1).

La disposición de las vesículas en la matriz tegumentaria es preferentemente aquella en la que el plano que contiene a la vesícula es perpendicular a la superficie del cuerpo, habida cuenta de su supuesta forma de lente bicóncava (figs. 10, 11). Las características concernientes a tamaño, densidad electrónica y membrana unitaria limitante, se conservan en las vesículas en el seno del tegumento, no observándose exocitosis alguna.

DISCUSIÓN

Varios trabajos demuestran la existencia de vesículas en forma de lente bicóncava en el tegumento de los trematodos, forma que generalmente está en concomitancia con su disposición subperpendicular a la membrana externa del mismo. Así ZDARSKA et. al. (1990) señala en el tegumento del adulto de *Brachylaimus aequans* la existencia de vesículas bicóncavas que ocupan toda la matriz tegumentaria, pero que especialmente se acumulan en la zona submembranal externa y se disponen perpendicularmente a la superficie. Entre otros platelmintos, el cestodo

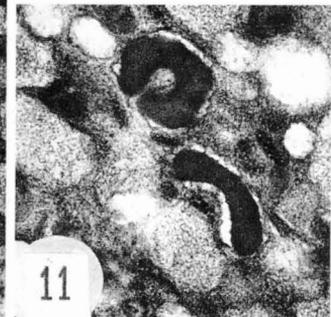
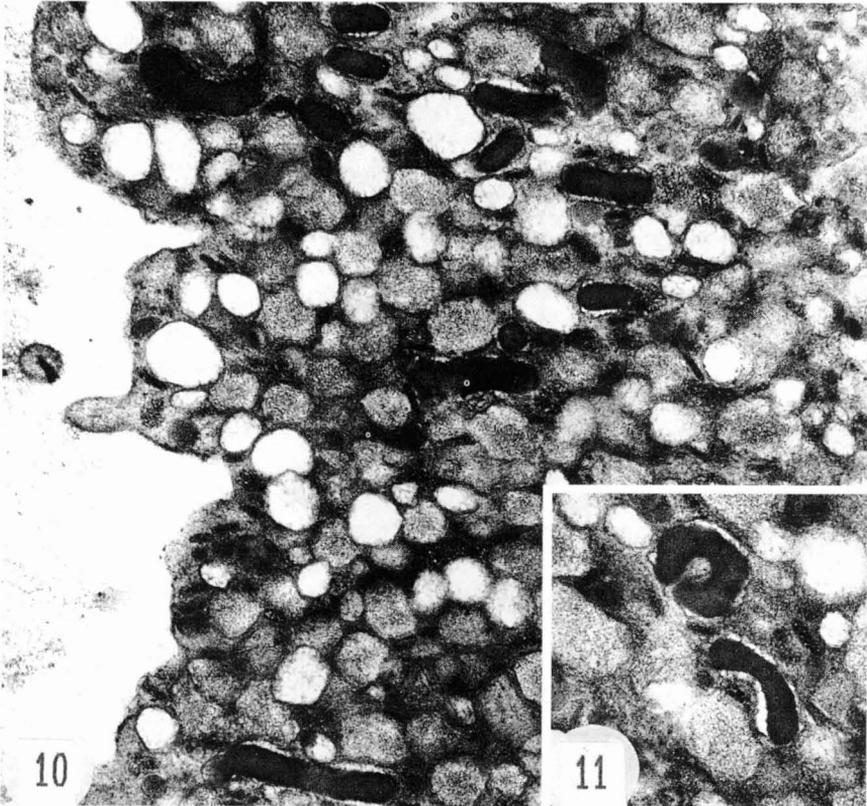
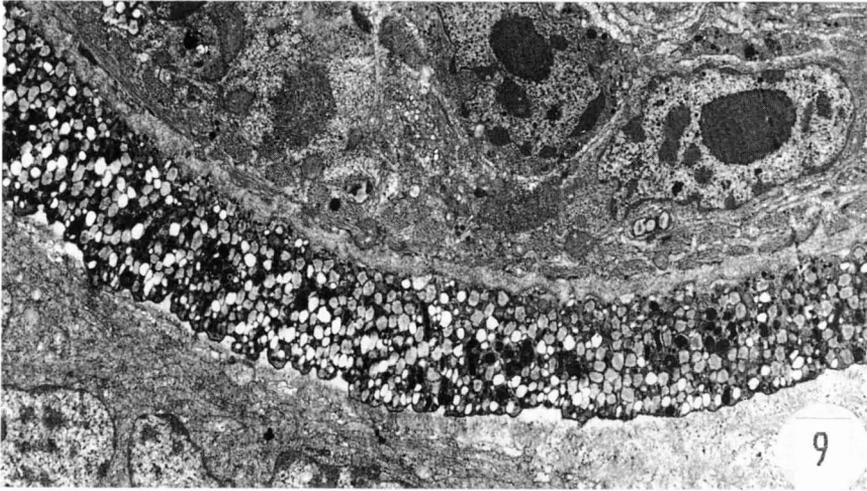
Himenolepis diminuta presenta un tegumento repleto de vesículas discoidales formando pilas de unas cuatro o cinco unidades, tal como lo demuestran las réplicas de criofractura obtenidas por SHIVERS et al. (1986). La orientación de estas vesículas es, sin embargo, caótica, mostrando tendencia a una acumulación de vesículas en la matriz de los microtricos o prolongaciones digitiformes de la membrana externa del tegumento, que se da típicamente en estos platelmintos, no observándose exocitosis alguna.

Llama la atención en la célula glandular en estudio, la escasa abundancia de dictiosomas en relación con la importancia del retículo endoplasmático. Ello puede implicar que en la génesis de las vesículas sólo inter venga este último orgánulo membranoso, hecho no muy frecuente en las células secretoras, o en células con una alta actividad sintetizadora, dependiendo de la naturaleza del producto de síntesis. En este aspecto, cabe pensar en lo que se observa en ciertos procesos de oogénesis, y, concretamente, en la vitelogénesis endógena de la mayoría de los crustáceos. Así, en el caso de la langosta, KESSEL (1968) señala una formación de las plaquetas vitelinas a expensas exclusivamente del retículo endoplasmático, y, particularmente, de cisternas de este orgánulo derivadas directamente de la membrana externa de la envoltura nuclear; dichas cisternas llevan ribosomas adosados en la cara citoplasmática de su membrana, que son los responsables de la síntesis y acumulación del contenido de las plaquetas vitelinas; por gemación a partir de estas cisternas y tras previa fusión de membranas, se originan unas vesículas que, mediante la acumulación y compactación del mencionado producto de síntesis, se transforman en las definitivas plaquetas vitelinas.

La implicación del retículo endoplasmático en la formación de las vesículas es clara.

Este proceso de génesis es parecido al que se da en la vitelogénesis endógena del copépodo *Acanthocyclops robustus* descrita por

GARCÍA VALERO (1988); en este crustáceo, las plaquetas vitelinas derivan de sáculos del retículo endoplasmático rugoso que, después



de curvarse hasta fusionar sus membranas adoptando una forma toroidal, el material denso del mismo, así como el citoplasma secuestrado en el interior de la estructura que queda después del encorvamiento y fusión, forman parte de la plaqueta vitelina como dos fases diferenciadas topográfica y morfológicamente.

La orientación de las vesículas estudiadas, en el seno de la matriz tegumentaria, de acuerdo con su forma, recuerda la disposición típica de los rabditos de los turbelarios, que son orgánulos membranosos bastoniformes que se encuentran en el tegumento de estos platelmintos, y que, mediante exocitosis liberan su contenido al exterior, constituyéndose un mucus que recubre la superficie del cuerpo; el origen de estas formaciones es golgiano, dándose una paulatina fusión de vesículas procedentes de los dictiosomas y conformándose el rabadito (WILLIAMS & INGERFELD, 1988). KØIE (1971) encuentra en el tegumento de la cercaria de *Zoogonoides viviparus* vesículas de forma, tamaño y orientación parecidas, comparándolas con los rabditos de los turbelarios en cuanto a funcionalismo, aunque no observa exocitosis ni transformación del contenido de estos orgánulos en mucus, descartando también cualquier posible función enzimática.

A la luz de estos datos, las vesículas estudiadas posiblemente representan acúmulos de un mucus adhesivo que, por exocitosis, es liberado al exterior de un modo parecido a la de los rabditos. Habitualmente, sin embargo,

resulta difícil observar exocitosis de vesículas tegumentarias en los digénidos, lo que no significa que no existan sino que, por el contrario, tienen lugar con gran rapidez, lo que supone la dificultad de que el instante preciso de la fijación coincida con alguna exocitosis en el área abarcada por el corte ultrafino observado. En cualquier caso, todo ello se puede relacionar con el comportamiento de la cercaria de *Proctoeces maculatus* in vivo, que a veces se adhiere al sustrato por la región posterior, en cuyo tegumento se concentran dichas vesículas. Esta adhesividad posterior es común en cercarias de ciertas familias de digénidos, como los Bucephalidae, las cuales presentan dos largos apéndices posteriores así como una región también posterior altamente adhesiva, lo que se traduce al microscopio electrónico en la presencia, en el tegumento de estas zonas, de grandes gránulos electrodensos y de forma más o menos esférica (Ferrer, datos inéditos). La hipótesis de la adhesividad del contenido de estas vesículas quedará testificada por diversas pruebas citoquímicas que darán luz a la naturaleza del mismo.

REFERENCIAS

- BOGITSH, B. J., 1971. Golgi complexes in the tegument of *Haematoloechus medioplexus*. *Journal Parasitology*, 57(6): 1373-1374.
- DIXON, K. E., 1976. The biological significance of the tegument in digenetic trematodes. *Rice University Studies*, 62 (4): 69-80.

Figs. 9-11. 9. Región posterior de la cercaria intraesporocística de *P. maculatus* (6.300X); 10. Junto con las vesículas claras dominantes coexisten las vesículas lenticulares específicas de esta región del cuerpo, con una sección bastoniforme y con una disposición preferentemente subperpendicular a la superficie del cuerpo del digénido (39.00X); 11. Secciones vesiculares en forma de coma o vibrio (42.000X).

9. *Posterior region of intrasporocystic cercaria of Proctoeces maculatus* (6 300X); *The light vesicles coexist together with lenticular shaped vesicles which are specific to this body region and are orientated subperpendicularly to body surface* (39 000X); 11. *Specific vesicles which sections are "comma" or "vibrio" in shape* (42 000X).

- DUNN, T. S., HANNA, R. E. B. & NIZAMI, W. A., 1987. Ultrastructural and cytochemical observations on the tegument of three species of paramphistomes (Platyhelminthes: Digenea) from Indian buffalo, *Bubalus bubalis*. *International Journal for Parasitology*, 17(6): 1153-1161.
- ERASMUS, D. A., 1967. The host-parasite interface of *Cyathocotyle bushiensis* (Khan 1962) (Trematoda Strigeoidea). II. Electron microscope studies of the tegument. *Journal of Parasitology*, 53: 703-714.
- FERRER, J. R., 1983. Estudio ultraestructural del desarrollo del tegumento en la cercaria de un trematodo parásito del mejillón: *Proctoeces maculatus* (Trematoda Digenea Fellodistomatidae). *Revista Ibérica de Parasitología*, 43(3): 229-248.
- GARCÍA VALERO, J., 1988. La gametogènesi a *Acanthocyclops robustus* G.O. Sars (Crustacea Copepoda). Estudi ultraestructural. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.
- KESSEL, R. G., 1968. Mechanisms of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 89: 17-38.
- KØIE, M., 1971. On the histochemistry and ultrastructure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Zoogonoides viviparus* in the first intermediate host. *Ophelia*, 9(1): 165-206.
- 1973. The host-parasite interface and associated structures of the cercaria and adult of *Neophasis lageniformis*. *Ophelia*, 12(1): 205-209.
- MATRICON-GONDRAN, M., 1971. Origin and differentiation of the tegument in digenetic trematodes: an ultrastructural study of *Cercaria pectinata* (larva of *Baccigiger baccigger*, Fellodistomatidae). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 120(4): 488-524.
- MERCER, E. H. & DIXON, K. E., 1967. The fine structure of the cystogenic cells of the cercaria of *Fasciola hepatica* L. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 77: 331-344.
- REES, F. G. & DAY, M. F., 1975. The origin and development of the epidermis and associated structures in the cercaria of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) (Digenea: Heterophyidae) from *Littorina littorea* (L.). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 192(1108): 299-321.
- REYNOLDS, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17: 208-212.
- SHIVERS, R. R., SIDDIQUI, A. A. & PODESTA, R. B., 1986. Integument of the tapeworm scolex. I. Freeze-fracture of the syncytial layer, microvilli and discoid bodies. *Tissue & Cell*, 18(6): 869-885.
- SPURR, A. R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 31-43.
- THREADGOLD, L. T., 1967. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. III. Further observations on the tegument and associated structures. *Parasitology*, 57(4): 633-637.
- WILLIAMS, J. B. & INGERFELD, M., 1988. Cells in the parenchyma of *Temnocephala*: Rhabdite secreting cells of *Temnocephala novaezealandiae* (Temnocephalidae: Platyhelminthes). *International Journal for Parasitology*, 18(5): 651-659.
- ZDARSKA, Z., SOBOLEVA, T. N., VALKOUNOVA, J. & STERBA, J., 1990. Ultrastructure of the general body tegument of the trematode *Brachylaimus aequans*. *Helminthologia*, 27: 3-9.