Revista Ibérica de Parasitología. 1981. Vol. 41. fasc. 3, pp. 351-361

ESTUDIO AL MICROSCOPIO OPTICO Y ELECTRONICO DEL QUISTE DE *SARCOCYSTIS CERVICANIS*

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. *; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F. **; NAVARRETE, I. **; ACOSTA-GARCÍA, I. **

* Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares.

** Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

(Recibido el 26-1-1981)

SUMMARY

Muscular cysts of *Sarcocystis cervicanis* from naturally infected red deer *(Cervus elaphus)* were studied using light and electron microscopy. By light microscopy it is seen as a cyst with a thin and smooth wall. By electron microscopy they appear surrounded by a wall 0,2 to 0,4 μm. thick, formed by a primary wall 32 nm. wide and amorphous ground substance 0,25 μm. in thickness. Few hair-like tortuous protrusions 1,4 μm. long by 32 nm. wide are formed from the primary wall. In the same way we studied the morphology of the bradizoite in which four rhoptries, two preconoidal rings and twenty two subpellicular microtubules are observed.

Key Words: *Sarcocystis cervicanis*; muscular cyst; ultrastructure; red deer.

RESUMEN

Se estudian al microscopio óptico y electrónico quistes musculares cardíacos de *Sarcocystis cervicanis* procedentes de ciervos *(Cervus elaphus)* infectados naturalmente. Al microscopio óptico aparecen como quistes de pared delgada y lisa. Al microscopio electrónico aparecen rodeados por una cubierta de 0,2 a 0,4 μm. de grosor, formada por una pared primaria de

32 nm. de anchura y una membrana amorfa de 0,25 μm. de espesor. De la pared primaria se originan prolongaciones tubulares de trayecto tortuoso y de 1,4 μm. de longitud por 32 nm. de anchura. El borde del quiste presenta una superficie aserrada. Igualmente se detalla la morfología de los bradizoitos que se encuentran formados por cuatro roptrias, dos anillos preconoidales y veintidós microtúbulos subpeliculares.

Palabras Clave: *Sarcocystis cervicanis;* quiste muscular; ultraestructura; ciervo.

INTRODUCCION

El empleo de la microscopia electrónica como medio para la identificación de los quistes musculares de *Sarcocystis* sp. data de 1975, fecha en la que HEYDORN y cols. establecen las posibles bases morfológicas encaminadas a la identificación específica de *Sarcocystis*. MEHLHORN y cols. (1976) estudian la morfología comparada de diversas especies de *Sarcocystis* en distintos hospedadores, dando una importancia relativa a este hecho. De igual manera TADROS y LAARMAN (1978) en un estudio comparado, resaltan las diferentes características ultraestructurales como criterio suficientemente válido para diferenciar especies distintas del género *Sarcocystis*. El presente trabajo intenta aportar las bases morfológicas encaminadas a la identificación de *S. cervicanis*.

MATERIAL Y METODOS

Corazones de ciervos *(Cervus elaphus)* infectados naturalmente son utilizados para la observación de quistes musculares mediante el empleo de los microscopios óptico y electrónico.

Las muestras se obtienen de distintas porciones de corazón que se fijan en formol y alcohol etílico absoluto y se incluyen en parafina. Los cortes obtenidos se tiñen con hematoxilina-eosina y PAS.

De igual manera se separan distintas porciones que se someten a un ligero aplastamiento con miras a comprobar la presencia de quistes por microscopia óptica en la pieza montada entre dos portaobjetos. A continuación las muestras en las que se observan en mayor número se fijan en glutaraldehido diluido al 2,5 por 100 en solución tamponada de Millönig, se refijan en tetróxido

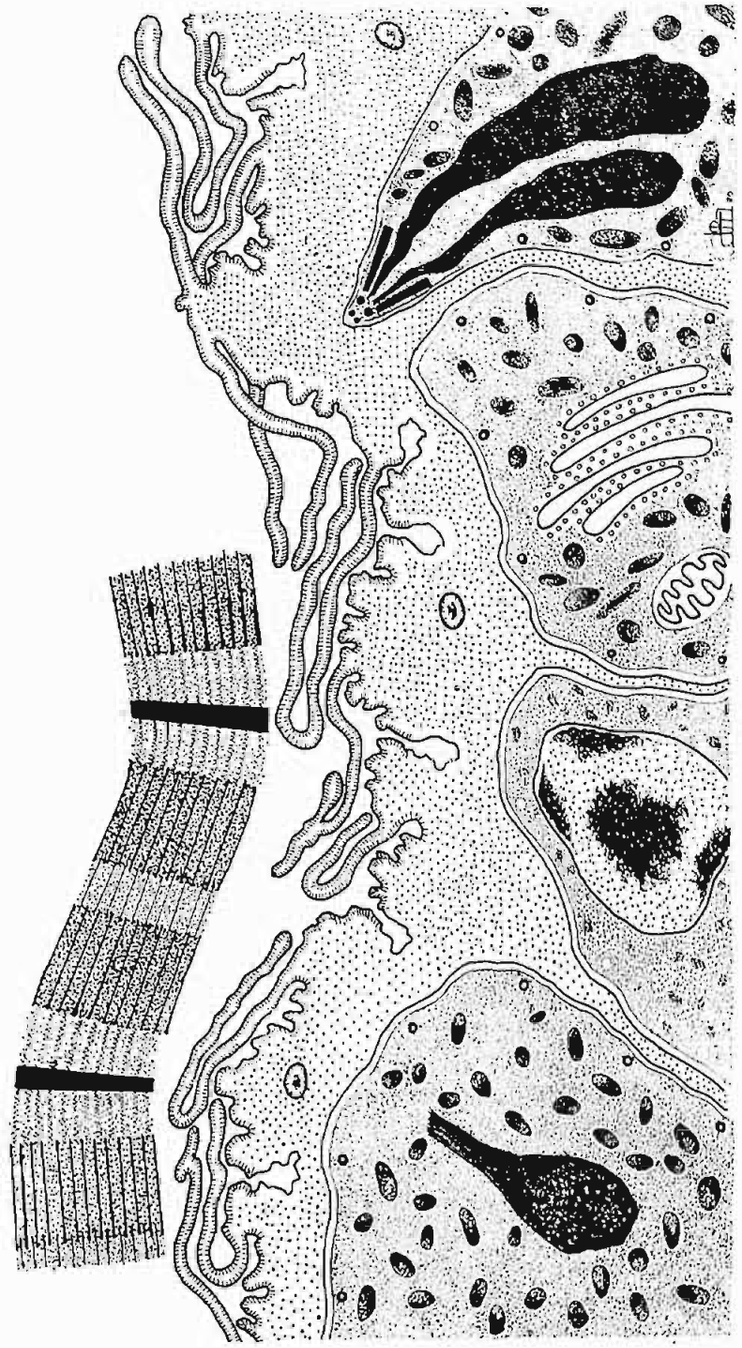


FIG. 1

Fig. 1.—Esquema ultraestructural de la pared del quiste de *Sarcocystis cervicanis*.

de osmio al 2 por 100 en la misma solución fosfato y se incluyen en resinas Spurr. Sedimentaciones de digestiones artificiales con tripsina se emplean igualmente para su inclusión en Spurr.

A continuación se obtienen secciones semifinas que se tiñen con azul de Toluidina y cortes finos que se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo.

RESULTADOS

Los quistes observados con microscopia óptica en cortes histológicos de parafina (Fig. 2), son fusiformes, presentan una pared delgada, lisa y apenas perceptible. Se encuentran adaptados a la orientación de las fibras musculares en sentido longitudinal y también se ha comprobado su presencia en las fibras de Purkinje. Resulta difícil determinar la existencia de septos, apareciendo los quistes íntegramente ocupados por gran cantidad de bradizoitos PAS positivos. Estas mismas características coinciden con las observaciones realizadas sobre quistes obtenidos por cortes semifinos de musculatura cardíaca.

Sin embargo, cuando se estudian los quistes aisladamente (por digestión artificial trípsica) (Fig. 3) se puede comprobar a grandes aumentos, la existencia, sobre la superficie, de un borde como en cepillo de aproximadamente 1 μm. de grosor que tapiza la cubierta quística.

Al microscopio electrónico (Fig. 1) el quiste se encuentra limitado externamente por una unidad de membrana debajo de la cual subyace un acumulo osmiófilo que la tapiza en todo su recorrido (Fig. 6), si bien existen algunas zonas en las que el espesamiento osmiófilo se adelgaza e incluso desaparece, como ocurre en las invaginaciones que hemos observado, a modo de fondo de saco, de mayor o menor recorrido y paredes tortuosas (Fig. 8). El complejo unidad de membrana estrato subyacente osmiófilo presenta un grosor que oscila de 27 a 35 nm. y es denominado por MEHLHORN y SCHOLTYSECK (1973) pared primaria del quiste.

Esta pared primaria, que limita al quiste externamente, presenta un borde festoneado con numerosas digitaciones de 30 a 50 nm. de altura y una anchura en su base de 32 a 36 nm. (figuras 5 y 6). En determinadas localizaciones aparecen sobresalientes

groseros (Fig. 7), de forma no definida, donde puede observarse el origen de algún túbulo delgado y tortuoso cuyo trayecto aparece plegado entre la cubierta quística y los miofilamentos de la célula hospedadora (Figs. 5, 6 y 7).

Algunos de estos túbulos pueden llegar a medir hasta 1,3 μm. de longitud, si bien es difícil determinar esta extensión con exactitud por el carácter sinuoso de la prolongación (Figs. 5 y 6); su anchura, de 25 a 30 nm., es más o menos uniforme, aunque pueden existir pequeñas dilataciones que delimitan una cámara adielectrónica de 60 nm. de anchura máxima. La estructura del túbulo es semejante a la de la pared primaria del quiste.

Por dentro de la pared primaria se encuentra una cubierta amorfa con densidad electrónica casi uniforme, de la que parten prolongaciones hacia el interior para formar los septos. La anchura de esta capa es de 0,15 μm. en su porción más delgada y 0,40 μm. en la más gruesa, siendo la anchura más constante la de 0,25 μm.

Los bradizoitos (Fig. 4), que ocupan el interior del quiste, se distribuyen de forma irregular, por lo que en una misma sección se ven zoitos cortados transversal o longitudinalmente a distintas alturas. Las medidas máximas de estos zoitos son de 13 μm. de longitud por 3 μm. de anchura. Se encuentran rodeados por un complejo de membranas, sobre las que no hemos podido observar ningún microporo. Externamente están envueltos por una unidad de membrana de 9-10 nm. de espesor, debajo de la cual se encuentra la membrana interna de 21 nm. de espesor (medición realizada a 1/5 del extremo anterior) formada por dos unidades de membrana con menor densidad electrónica que la externa, de la que se encuentra separada 19 nm. Contactando con la membrana interna se alinean 22 microtúbulos subpeliculares de 17 nm. de diámetro (Fig. 9).

En el extremo anterior se localiza el complejo apical formado por dos anillos preconoidales y por el conoide que presenta una altura de 260 nm. (Fig. 11). La sección transversal del conoide tiene un diámetro interno de 210 nm. y en su interior aparecen cuatro estructuras de gran densidad electrónica correspondientes a los conductos de las roptrías de 30 nm. de grosor (Fig. 9).

El tercio anterior del bradizoito (Fig. 10) se encuentra ocupado

exclusivamente por las secciones irregulares de los micronemas y porciones proximales de las roptrías. El número de micronemas es elevado y se sitúa alrededor de 550 a 650. Las roptrías están limitadas por una unidad de membrana y tienen un contenido electrodenso uniforme. Su forma es la bulbosa típica y su anchura máxima es de 285 nm. En las proximidades del núcleo se han encontrado secciones de las roptrías.

El tercio medio está ocupado por el retículo endoplásmico en forma de cisternas aisladas, envolviendo a los gránulos de amilopectina. En esta zona existe una gran cantidad de ribosomas libres y una sola mitocondria, generalmente alargada y grande, que presenta una matriz adielectrónica.

El tercio posterior está ocupado casi en exclusiva por el núcleo de contorno irregular y con una densidad electrónica bastante uniforme, aunque se pueden encontrar zonalmente algunos acúmulos de cromatina repartidos irregularmente. En las cercanías del núcleo se localiza un complejo de Golgi.

Por tratarse de quistes maduros no ha podido comprobarse la existencia de metrocitos.

DISCUSION

El hecho de que *S. cervicanis* aparezca como un quiste de pared lisa y delgada en las observaciones realizadas en cortes histológicos, es un fenómeno ya descrito en otras especies de *Sarcocystis*, como *S. bovicanis* (MEHLHORN y cols., 1975), si bien al ser observados al microscopio electrónico se comprueba la existencia de numerosas prolongaciones. No obstante el microscopio óptico también nos permite discernir ciertos aspectos morfológicos relativos a la pared del quiste. De hecho, mediante digestiones artificiales tripsicas, hemos podido poner de manifiesto datos relativos a la cubierta quística, como el hallazgo de un borde en cepillo, localizado sobre todo en los extremos agudos. BOCH y cols. (1978) observan procesos largos, finos y separados, en quistes de *S. bovicanis* aislados por digestión.

La pared primaria del quiste de *S. cervicanis* es básicamente semejante a la encontrada en distintas especies por otros autores (MEHLHORN y cols., 1976; TADROS y LAARMAN, 1978). La sección de

la cubierta quística presenta un borde dentado semejante a la hallada por MEHLHORN y cols. (1976) en *S. bovicanis*. Los túbulos que se observan en el quiste de *S. cervicanis* difieren de los observados en otras especies de *Sarcocystis*, aunque a grandes rasgos guardan cierta semejanza con los descritos por MEHLHORN y cols. (1976) en *S. bovicanis*. A pesar de todo se puede establecer diferencias manifiestas relativas al trayecto, a la longitud y a la anchura. Los túbulos son más tortuosos, más delgados y menos largos que los de *S. bovicanis*. Por tanto, desde el punto de vista ultraestructural, se pueden aportar bases morfológicas suficientes de cara a la identificación de esta especie, a pesar de no poderse utilizar estos criterios de una forma absoluta, de acuerdo con MEHLHORN y HEYDORN (1978), ya que existen especies de *Sarcocystis* distintas, como las halladas y descritas en cachalote, ratón y mono, en las que las estructuras de la pared quística no aportan diferencias aparentes. No obstante, para la separación de especies en un mismo hospedador intermediario si puede utilizarse este criterio en términos absolutos.

El aspecto funcional de las digitaciones y prolongaciones parece estar relacionado con la nutrición del parásito (MEHLHORN y HEYDORN, 1978). Estos fenómenos se realizan en la base de las proyecciones, merced a la formación de posibles vesículas pinocíticas derivadas de las invaginaciones de la membrana externa del quiste.

Las demás estructuras observadas en el quiste, así como la ultraestructura de los bradizoitos, concuerdan en términos generales con las de otras especies de *Sarcocystis*, salvando las diferencias relativas al tamaño, número de ellos, disposición, distribución de sus organoides y orgánulos específicos.

REFERENCIAS

BOCH, J.; LAUPHEIMER, K. E., y ERBER, M. (1978): Drei Sarkosporidienarten bei Schlachtrindern in Süddeutschland. *Berlin-Munchner Tierärztliche Wochenschrift, 91:* 426-431.

HEYDORN, A. O.; MEHLHORN, H., y GESTRICH, R. (1975): Licht und elektronenmikroskopische untersuchungen an cysten von *S. fusiformis* in der muskulatur vor Kälbern nach experimenteller infektion mit oocysten der grosen Form von *I. bigemina* des Hundes. 2. Die Feinstruktur der Cysten-

stadien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, I. Abteilund, Originale A, 233:* 123-137.

MEHLHORN, H., y HEYDORN, A. O. (1978): *The Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): Life cycle and fine structure.* In «*Advances in Parasitology*». Lumsden, Muller y Baker, eds. Academic Press. London.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A. O., y GESTRICH, R. (1975): Licht und elektronenmikroskopische untersunchungen an Cysten von *S. fusiformis* in der muskulatur von Kälbern nach experimenteller infektion mit oocysten und sporocysten der grosen form von *I. bigemina* des Hundes. 1. Zur Enststehung der cyste und der «cystenwand». *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I. Abteilung, Originale A, 232:* 392-409.

MEHLHORN, H.; HARTLEY, W. J., y HEYDORN, A. O. (1976): A comparative ultrastural study of the cyst wall of 13 *Sarcocystis* species. *Protistologica XII, 3:* 451-467.

MEHLHORN, H., y SCHOLTYSECK, E. (1973): Elektronenmikroskopische untersuchungen an cystenstadien von *S. tenella* aus der oesophagus muskulatur des Schafes. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, I. Abteilung, Originale A, 51:* 15-24.

TADROS, W., y LAARMAN, J. J. (1978): A comparative study of the ligth and electron microscopic structural of the walls of the muscle cysts of several infection of species of Sarcocystid Eimeriid Coccidia (I). *Proceeding of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 81:* 469-491.

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Nota: Todas las medidas que aparecen en las figuras están expresadas en μm.

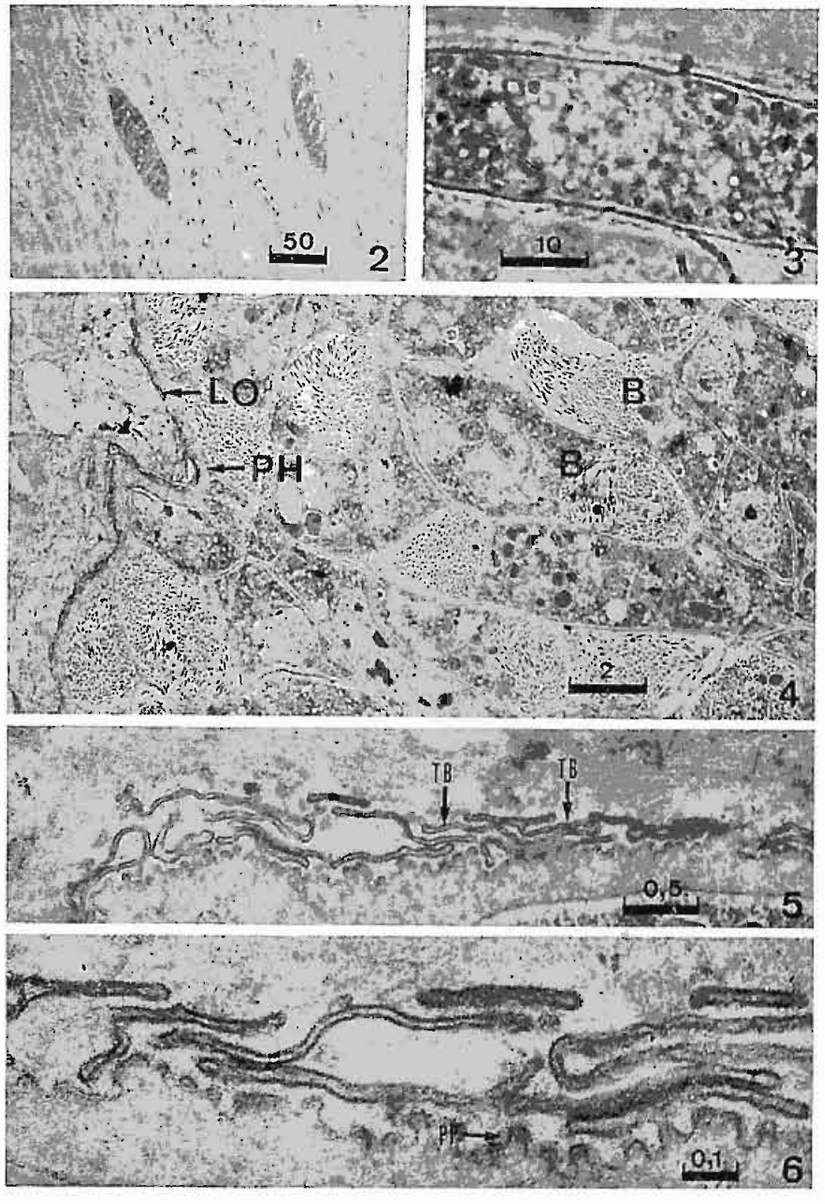
Fig. 2.—Corte longitudinal. H & E.

Fig. 3.—Quiste aislado mediante digestión artificial con tripsina. Se observa la superficie en cepillo.

Fig. 4.—Vista general de un quiste al microscopio electrónico, con su interior lleno de bradizoitos (B) cortados a distintos niveles. La pared es poco perceptible y consta de una línea osmiófila (LO) y delgada que contacta con los miofilamentos y otra homógenea menos densa (PH).

Fig. 5.—Detalle de la pared donde puede observarse el trayecto de los túbulos (TB) que la componen.

Fig. 6.—Detalle de los túbulos y pared primaria (PP).



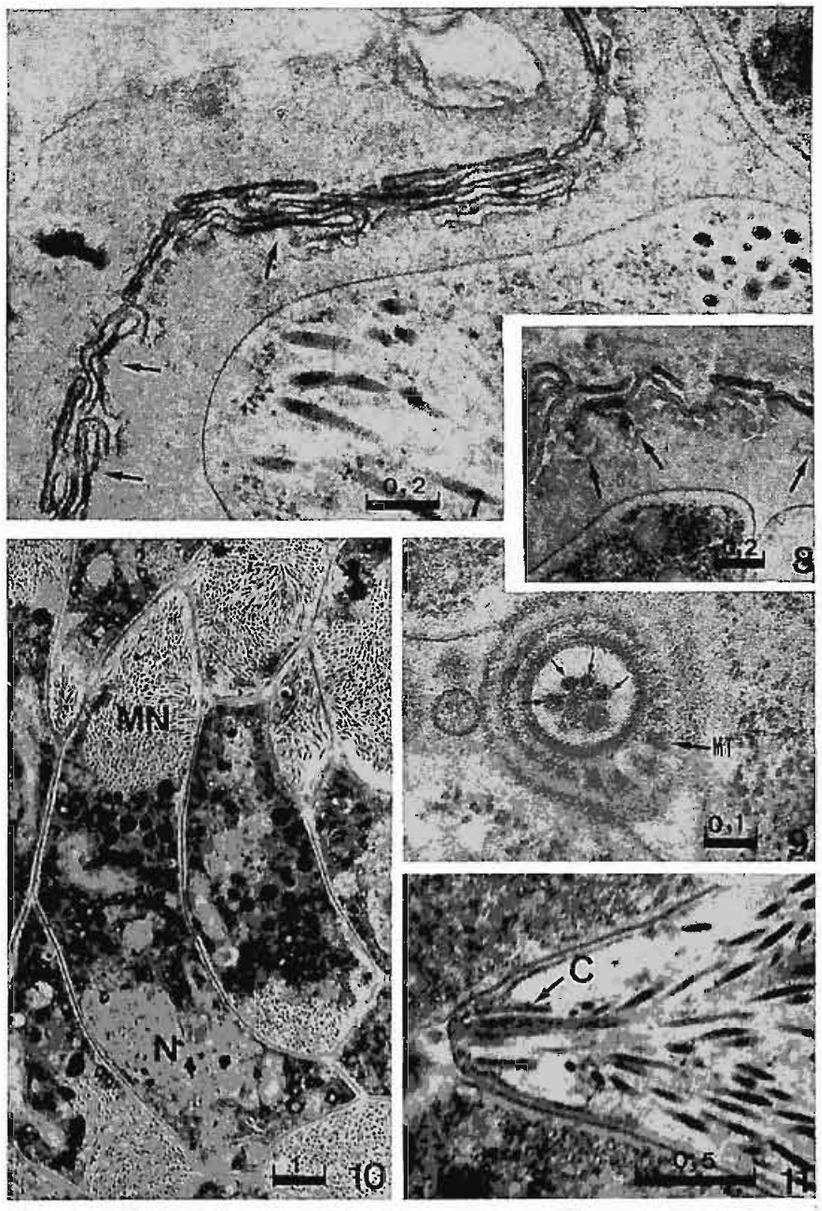


Fig. 7.—Pared quística con numerosos abultamientos groseros (flechas) donde se originan algunos túbulos.

Fig. 8.—Invaginaciones en la pared (flechas) más o menos profundas y tortuosas.

Fig. 9.—Corte transversal de un conoide en el que se observan cuatro estructuras osmiófilas correspondientes a los conductos de las roptrias (flechas). También se observan los microtúbulos subpeliculares cortados (MT).

Fig. 10.—Sección longitudinal de un bradizoito, con una región anterior ocupada exclusivamente por micronemas (MN), una media con los distintos orgánulos e inclusiones y otra posterior ocupada por el núcleo (N).

Fig. 11.—Corte longitudinal del conoide (C), con dos anillos preconoidales.