

ESTUDIO AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DEL CICLO  
EVOLUTIVO DE *EIMERIA BATERI* BATHIA ET AL., 1965,  
EN *COTURNIX COTURNIX JAPONICA*. I. ESQUIZOGONIA

NAVARRETE, I.\*; HERNANDEZ, S.\*\*; MARTINEZ, F.\*

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

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

(Recibido el 3-9-1981)

SUMMARY

The fine structure of endogenous stages of *E. bateri* was investigated by experimental infections of four week-old Japanese quails *Coturnix coturnix japonica*. The birds were killed 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation. Four schizonts generations as well as their locations in different parts of the intestine were described. The schizogony started by the formation of a multinucleated schizont which had an excentric intranuclear spindle. The merozoites were formed from the schizont's membrane by the budding off (ectomerogony) process.

Key Words: Schizogony, Ultrastructure, *E. bateri*, *Coturnix coturnix japonica*.

RESUMEN

Se investiga la ultraestructura de las fases asexuales del ciclo evolutivo de *Eimeria bateri* mediante administración experimental de 150.000 a 600.000

ooquistes esporulados a codornices *Coturnix coturnix japonica* de cuatro semanas de edad. Las aves se separan en cuatro lotes, que se sacrifican a las 24, 48, 72 y 96 horas post-administración. Se producen cuatro generaciones asexuales, describiéndose su localización en los distintos tramos intestinales así como su ultraestructura. La formación de los merozoitos se realiza mediante un proceso de ectomerogonía.

Palabras Clave: Esquizogonía, Ultraestructura, *E. bateri*, *Coturnix coturnix japonica*.

## INTRODUCCION

El ciclo evolutivo de *E. bateri*, parásito habitual del intestino de la codorniz japonesa *Coturnix coturnix japonica*, ha sido descrito al microscopio óptico por NORTON y PIERCE (1971). Con nuestro trabajo pretendemos aclarar, mediante el empleo de la microscopía electrónica, algunos aspectos de la fase asexual de este ciclo evolutivo, completando su conocimiento.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Parásito

Se utilizan ooquistes de *Eimeria bateri* aislados de una población de codornices fuertemente parasitadas. La obtención de una población pura del parásito se realiza de acuerdo con las técnicas tradicionales.

### 2. Conservación de los parásitos

La población obtenida se conserva en una solución al 2 por ciento de dicromato potásico, manteniéndose en el refrigerador a una temperatura constante de 4 grados centígrados.

La titulación de la suspensión se realiza según la técnica de McMaster modificada.

### 3. Animales de experimentación

Se emplean codornices japonesas *Coturnix coturnix japonica* de cuatro semanas de edad, mantenidas cuidadosamente libres de parásitos desde su nacimiento, proporcionadas por la

granja Rafui de Andújar (Jaén) y controladas mediante exámenes coprológicos diarios desde el día 15 antes del comienzo de la experiencia.

### 4. Diseño de la experiencia

Se utilizan 16 animales separados en 4 lotes cada uno de ellos compuesto por cuatro aves.

El día 0 se realiza la administración experimental de los ooquistes esporulados, con arreglo a la siguiente pauta:

- Lote 1: 600.000 ooquistes por ave
- Lote 2: 500.000 ooquistes por ave
- Lote 3: 300.000 ooquistes por ave
- Lote 4: 150.000 ooquistes por ave

Los animales de cada lote fueron sacrificados a las 24 horas post-administración (Lote 1), a las 48 horas (Lote 2), a las 72 horas (Lote 3) y a las 96 horas (Lote 4).

### 5. Métodos parasitológicos

Tras el sacrificio, se extrae el intestino delgado, y mediante raspados de mucosa intestinal y posterior observación al microscopio de interferencia de fases, se seleccionan las zonas que presentan mayor índice de parasitación que se fijan en glutaraldehído al 4 por 100 en solución tamponada de Millönig, pH 7,2. Posteriormente las piezas son refijadas en tetróxido de osmio al 2 por 100 tamponado. Se incluyen en Durcupan A.C.M. (Araldit) y Spurr.

Los ultracortes se obtienen en un ultramicrotomo LKB III a secciones de 70 nanómetros y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizan en un microscopio electrónico Philips 300.

## RESULTADOS

La multiplicación asexual de *E. bateri* consta de cuatro procesos esquizogónicos que vamos a describir a continuación.

A las 24 horas post-administración (h.p.a.), se observan esquizontes de primera generación en avanzado estado de evolución, así como esquizontes maduros. Su presencia se circunscribe a la porción posterior del duodeno y todo el yeyuno. Las células hospedadoras son las epiteliales de absorción que se encuentran en la base de los villi, aunque también se han podido observar, esporádicamente, en alguna glándula. Los esquizontes maduros (Fig. 1) miden aproximadamente 10 micrómetros de diámetro. Contienen alrededor de 10 merozoitos.

La ultraestructura de los merozoitos es semejante a la de los de la cuarta generación, que son los que trataremos más detalladamente, sin que establezcamos las diferencias relativas a las dimensiones del conoide, roptrias, micronemas, etc.

A las 48 horas, se observan esquizontes de segunda generación en distintos estadios evolutivos, localizándose preferentemente en primer y segundo tercios del intestino delgado. Los parásitos se sitúan en la parte basal de los villi, también en las células epiteliales de absorción y concretamente entre el borde microvillar y el núcleo. Los esquizontes maduros, de unos 10 micrómetros de diámetro, contienen de 10 a 13 merozoitos (Figura 2).

A las 72 h. p.a. encontramos esquizontes de tercera generación, situados en la misma localización respecto a los villi que apuntábamos para la generación anterior y afecta prácticamente a la totalidad del intestino delgado, a excepción de duodeno. Los esquizontes maduros (Fig. 3) miden 6-11 micrómetros de diámetro y albergan en su interior 10-17 merozoitos.

Los esquizontes de cuarta generación se observan en las aves sacrificadas a las 72 y 96 h.p.a. y ocupan la misma localización y tipo de células.

Las esquizogonias observadas se identifican como ectomerogonias, cuyo desarrollo completo y detallado vamos a describirlo en base a las observaciones de esta cuarta esquizogonia (Fig. A).

Los trofozoitos (Fig. 4) se encuentran situados en el interior de una vacuola parasitófora adielectrónica que contiene algunos elementos microtubulares. El parásito aparece recubierto por una doble pared de características similares a la de

los merozoitos. Persisten en algunas imágenes restos de conoide, micronemas y microtúbulos subpeliculares.

En imágenes más avanzadas, los esquizontes presentan núcleos periféricos muy próximos a la membrana envolvente, con acúmulos de cromatina irregularmente distribuidos por todo el volumen nuclear. Algunos de estos núcleos (Fig. 5) contienen un huso acromático intranuclear situado excéntricamente en la zona apical. Este huso está constituido por dos formaciones angulares opuestas, conectadas por haces microtubulares. Por fuera del núcleo, y próximo a la membrana plasmática, encontramos uno o dos centriolos en cada polo del huso.

Conjuntamente con la aparición de los husos intranucleares se observa el comienzo de la ectomerogonia (Fig. 8). Este proceso se manifiesta por un espesamiento dielectrónico situado inmediatamente por debajo de la membrana, sin que podamos comprobar con precisión su origen. Igualmente, y por debajo de éste, aparece otro acúmulo de sustancias electrodensas en forma de arco que se identifica como un conoide rudimentario. No se observan imágenes lo suficientemente elocuentes como para aventurar su origen, aunque en algún caso hemos encontrado un complejo de Golgi con algunas vesiculitas derivadas de él (Fig. 7). El citoplasma presenta numerosas mitocondrias irregularmente repartidas y en distintos procesos de degeneración, algunas vacuolas sin contenido situadas en la base de los núcleos, vesículas constituidas por membranas concéntricas, cuerpos con contenido granuloso en su interior rodeados por una membrana, numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso próximas a los núcleos y estructuras en forma espiral formadas por membranas y con un halo traslúcido en su interior.

A continuación comienzan a formarse leves abombamientos a modo de cúpulas (Fig. 6), apareciendo en su extremo apical dos anillos preconoidales y un conoide todavía no desarrollado plenamente. El centrocono del núcleo se orienta hacia la evaginación, que ahora presenta dos membranas a diferencia del resto del esquizonte que sólo presenta una. Dos centriolos (Fig. 9) penetran en este dedo de guante arrastrando al núcleo. Igualmente se produce la penetración de un complejo de Golgi, así como estructuras densas rodeadas por una membrana, que se sitúan próximas al conoide para transformarse más tarde en

las roptrias. Igualmente hacen su aparición algunos microne-mas. En algún caso hemos observado microporos inactivos sobre las membranas del esquizonte.

El proceso de formación de merozoitos va progresando de manera que dentro de la evaginación se introducen porciones citoplasmáticas con distintos orgánulos (Fig. 10) que permanecen en su interior hasta que se desprende totalmente del cuerpo del esquizonte. Una vez separados, los merozoitos continúan su proceso de maduración que afecta principalmente a roptrias y microne-mas.

Los esquizontes maduros de cuarta generación tienen forma elipsoidal, midiendo 11 a 13 por 8 a 12 micrómetros (Fig. 12). Contienen 15 a 20 merozoitos de 5 a 6 por 1,5 a 2 micrómetros, los cuales presentan dos anillos preconoidales (de 140 y 160 nm. de diámetro, respectivamente) y un conoide de 230 nm. de longitud con una separación anterior de 180 nm. y posterior de 250 nm. (Fig. 11).

Estos merozoitos presentan en cortes transversales a nivel del conoide, 22 microtúbulos subpeliculares (Fig. 13) de 24 a 25 nm. de diámetro. En cortes longitudinales, los merozoitos nos muestran una región anterior con microne-mas y una posterior ocupada por el núcleo que se encuentra rodeado por 2 ó 3 mitocondrias (Fig. 14).

## DISCUSION

El esquema de ciclo evolutivo descrito al microscopio electrónico por nosotros, coincide a grandes rasgos con el descrito por NORTON y PIERCE (1971) al microscopio óptico. Las pequeñas diferencias existentes afectan a la cronología y a la localización de los esquizontes de primera generación. En efecto, NORTON y PIERCE señalan como localización las glándulas de Lieberkühn, encontrándolos nosotros preferentemente en las células de absorción de la zona basal de los villi.

Las primeras imágenes que hemos observado en la cuarta esquizogonia corresponden a esquizontes mononucleados (trofozoitos), en los que se aprecia un cambio de forma muy manifiesto, que va desde la elongada primitiva del merozoito a la

elipsoide final del trofozoito, así como a una regresión de sus estructuras típicas, semejante a la descrita en *E. alabamensis* (SAMPSON y HAMMOND, 1972). *E. acervulina* (FERNANDO, 1974), *E. rufae* (HERNANDEZ, 1975) en *E. labbeana* (VARGHESE, 1977) y en *E. leporis* (HERNANDEZ et al., 1978).

Las divisiones nucleares son detectadas principalmente en el momento que los núcleos se localizan periféricamente y aparecen los husos intranucleares, los cuales han sido descritos en *E. magna* (HAMMOND et al., 1973) y en *E. brunetti* (FERGUSON et al., 1976), pudiendo aparecer otro tipo de huso de localización central como se observa en *I. lacazei* (HERNANDEZ et al., 1976), e incluso pueden darse ambos tipos como en el caso de *E. nina-kohlyakimovae* (KELLEY y HAMMOND, 1973). Su hallazgo es raro, lo que induce a pensar que se trata de estructuras que desaparecen rápidamente. DUBREMETZ (1975) indica que las mitosis son muy rápidas y que las cromátidas emigran muy deprisa hacia cada uno de sus polos. Posteriormente el complejo centriolo-centrocono arrastra cada una de las porciones nucleares, actuando incluso en la movilización e introducción del núcleo en el merozoito en formación.

Conjuntamente con la aparición de los husos hemos observado las primeras imágenes del comienzo de la ectomerogonia, que se hacen patentes por la aparición de un espesamiento dielectrónico situado inmediatamente por debajo de la membrana, sin que hallamos podido comprobar el número de membranas que lo integran. Para DUBREMETZ (1975), ésta parece estar constituida por dos unidades de membrana, originadas por aplastamiento de vesiculitas disgregadas del complejo de Golgi. Otros autores como PORCHERT y VIVIER (1971) indican que su origen se debe a la conjunción y aplastamiento de cisternas de retículo endoplásmico adosadas a la membrana del esquizonte.

El abombamiento que sigue coincide con la aparición de algunos microtúbulos adosados al espesamiento osmiófilo. DUBREMETZ (1975) es el único que ha observado la aparición de tales estructuras. Este autor, describe la organización del conoide en *E. necatrix*, cuyos microtúbulos están asociados a un anillo discontinuo de estructura periódica y constituido por once unidades, que se corresponden con la imagen de once pares de microtúbulos.

El conoide, incipiente y netamente identificable al inicio de la ectomeroogonia de *E. bateri*, es semejante al encontrado en *E. pragensis* (SENAUD y CERNA, 1968), *E. callospermophili* (ROBERTS et al., 1970), *E. acervulina* (FERNANDO, 1974) y *E. brunetti* (FERGUSON et al., 1976) sin que hasta el momento se haya precisado con exactitud su origen. Lo que si es constante es su presencia en las proximidades del complejo centriolo-centrocono. Según HELLER (1972) podría generarse a partir de un conjunto de fibrillas semejantes a microtúbulos producidos por los centriolos.

Las vesículas plurimembranasas observadas esporádicamente en las inmediaciones de los núcleos, según SHEFFIELD y MELTON (1968) constituyen un complejo de Golgi; de acuerdo con FERGUSON et al. (1976), son vacuolas lisosómicas que intervienen en el reciclaje de sustancias durante el desarrollo de los merozoitos. También por debajo o al lado de los núcleos encontramos estructuras en espiral, limitadas por membranas y con una dilatación adieletrónica que se alinea con ellas y que han sido denominadas por Mc LAREN (1969) "linear inclusions". Tales estructuras se encuentran durante distintos estadios de evolución del esquizontes, perdurando en el residuo central del esquizonte maduro. PACHECO et al. (1975), indican que posiblemente se trata de un complejo de Golgi en formación.

El merozoito se libera por cierre de la membrana externa, cuyo origen es discutido, pues según DUBREMETZ (1975) sería a partir de vesiculitas derivadas del complejo de Golgi y según KELLEY y HAMMOND (1973) a partir de cisternas aisladas de retículo endoplásmico que han perdido sus ribosomas.

En *E. bateri*, el número de microtúbulos encontrados en los merozoitos es de veintidós, al igual que en *E. rufae* (HERNANDEZ, 1975); *E. bovis* (SHEFFIELD y HAMMOND, 1966) y *E. leporis* (HERNANDEZ et al., 1978).

Las estructuras específicas, tales como conoide, microporos, roptrias y micronemas, se ajustan al esquema tradicional de los merozoitos descritos por otros autores anteriormente, salvo las diferencias de tamaño, forma y disposición de las mismas.

## REFERENCIAS

- ANWAR, M. (1976).—*Eimeria bateri* Bhatia et al., 1965 from the common grey quail in Iran. *Acta Protozoologica*, 15: 15-19.
- DUBREMETZ, J. F. (1975).—La genèse des mérozoites chez la *E. necatrix*. Etude ultrastructurale. *Journal of Protozoology*, 22: 71-84.
- FERGUSON, D. J. P., A. BRICH-ANDERSEN, W. M. HUTCHISON y J. C. SIIM (1976).—Ultrastructural studies on the endogenous development of *E. brunetti*. I. Schizogony. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Sec. B., 84: 401-413.
- FERNANDO, Mary A. (1974).—Fine structure of the schizonts and merozoites of *Eimeria acervulina* in the chicken. *Journal of Parasitology*, 60: 149-159.
- HAMMOND, D. M. y P. L. LONG, Eds. (1973).—*The coccidia*. University Park Press, Baltimore.
- HELLER, G. (1972).—Elektroenmikroskopische Untersuchungen zur Bildung und Struktur von Conoid, Roptrien und Micronemen bei *E. stiedae* (Sporozoa: Coccidia). *Protistologica*, 8: 43-51.
- HERNANDEZ, S. (1975).—Descripción del ciclo evolutivo de *E. rufae* (Apicomplexa: Eimeriidae) parásito de *Alectoris rufa* al microscopio óptico y electrónico. Publicaciones del Servicio de Reprografía, Univ. Córdoba. Córdoba.
- HERNANDEZ, S., R. CALERO, C. BECERRA, M. DOMINGUEZ, T. MORENO y F. MARTINEZ (1976).—Ultraestructura de las fases intestinales de *I. lacazei* Labbé 1833 en *C. carduelis*. *Revista Ibérica de Parasitología*, 36: 67-79.
- HERNANDEZ, S., F. MARTINEZ, T. MORENO e I. NAVARRETE (1978).—Estudio ultraestructural del ciclo evolutivo de *E. leporis* Nieschulz 1923 en la liebre (*L. capensis*). *Revista Ibérica de Parasitología*, 38: 515-526.
- KELLEY, G. L. y D. M. HAMMOND (1973).—Fine structural aspects of nuclear division and merogony of *E. ninaköhyakimovae* in cultured cells. *Journal of Parasitology*, 59: 1071-1079.
- McLAREN, D. J. (1969).—Observations on the fine structural changes associated with schizogony and gametogony in *E. tenella*. *Parasitology*, 59: 563-574.
- NORTON, C. C. y M. A. PEIRCE (1971).—The life cycle of *E. bateri* in the Japanese quail *Coturnix coturnix japonicum*. *Journal of Protozoology*, 18: 57-62.
- PACHECO, N. D. A., J. M. VETTERLINE y D. J. DORAN (1975).—Ultrastructure of cytoplasmic and nuclear changes in *E. tenella* during first-generation schizogony in cell culture. *Journal of Parasitology*, 61: 31-42.

- PORCHERT-HENNERE, E. y E. VIVIER (1971).—Ultrastructure comparée des germes infectieux (Sporozoites, Merozoites, Schizontes, Endozoites, etc.) chez les Sporozoaires. *Année Biologique*, 10: 78-113.
- ROBERTS, W. L., D. M. HAMMOND, L. C. ANDERSON y C. A. SPEER (1970).—Ultrastructural study of schizogony in *E. callospermophilii*. *Journal of Protozoology*, 17: 584-592.
- SAMPSON, J. R., D. M. HAMMOND y J. V. ERNST (1971).—Development of *E. alabamensis* from cattle in mammalian cells cultures. *Journal of Protozoology*, 18: 120-128.
- SENAUD, J. y Z. CERNA (1968).—Etude en microscopie électronique des merozoites et de la mérogonie chez *E. pragensis* (CERNA et SENAUD, 1968), coccidie parasite de l'intestin de la souris (*Mus musculus*). *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, 3: 221-242.
- SHEFFIELD, H. G. y D. M. HAMMOND (1966).—Fine structure of first generation merozoites of *E. bovis*. *Journal of Parasitology*, 52: 592-606.
- SHEFFIELD, H. G. y M. L. MELTON (1968).—The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 54: 209-226.
- VARGHESE, T. (1975).—The fine structure of the endogenous stages of *E. lab-beana*: I. The first generation merozoites. *Journal of Protozoology*, 22: 66-71.

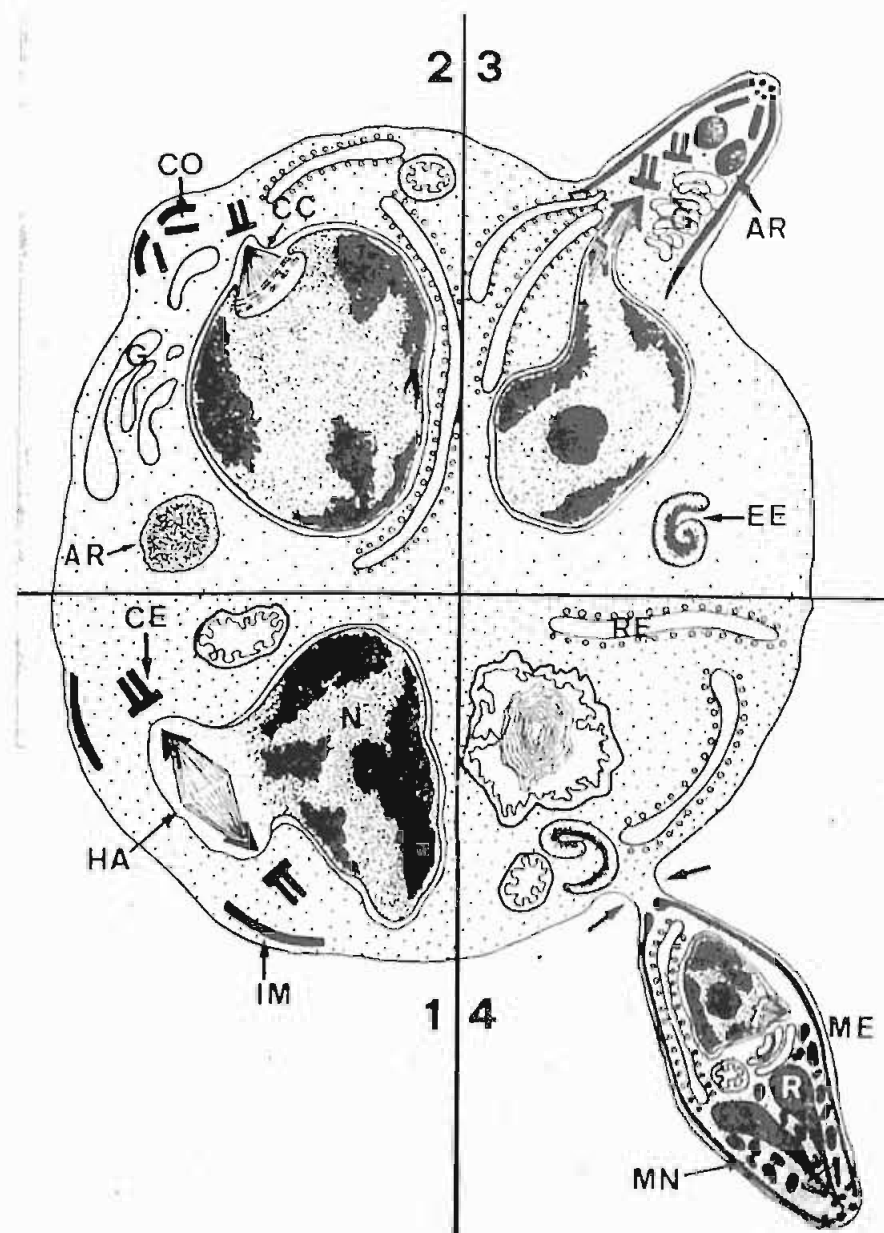
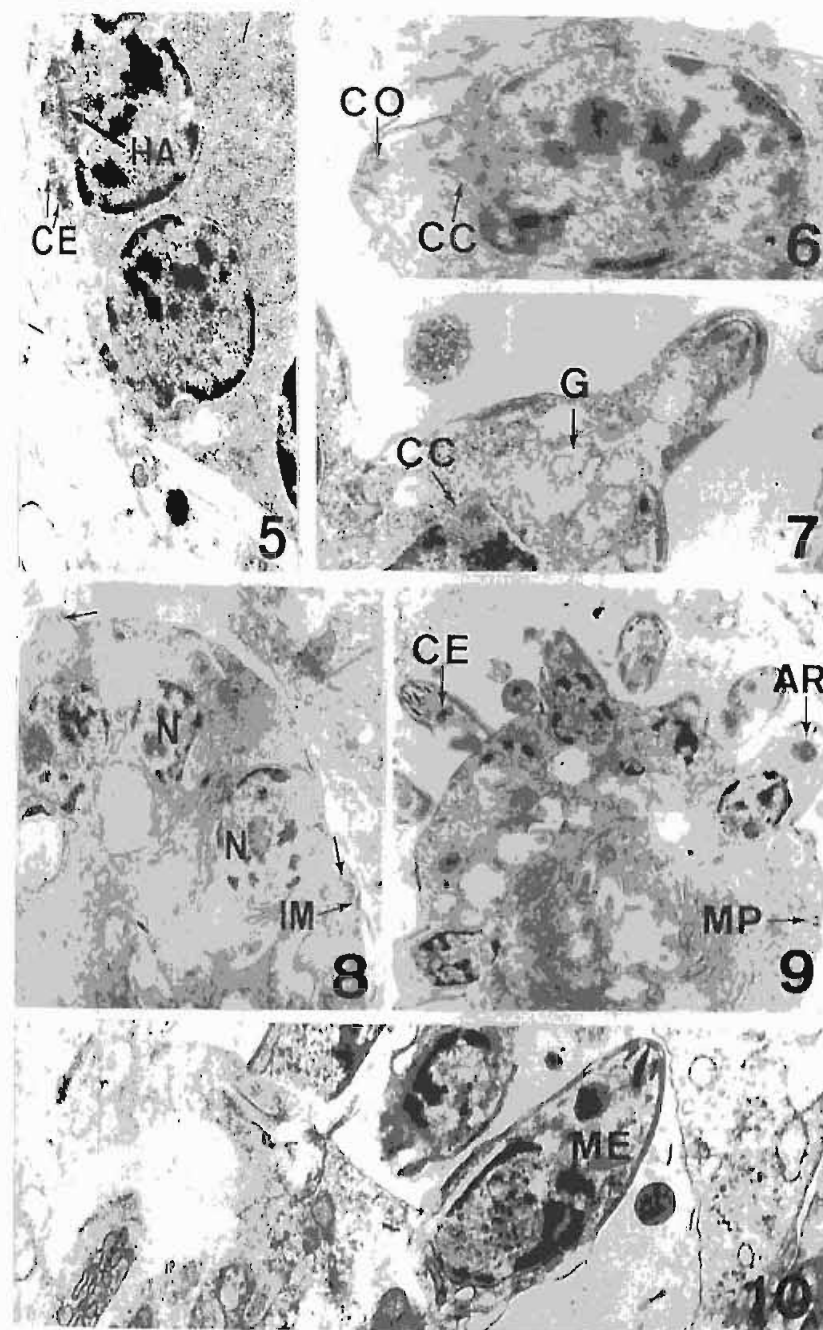
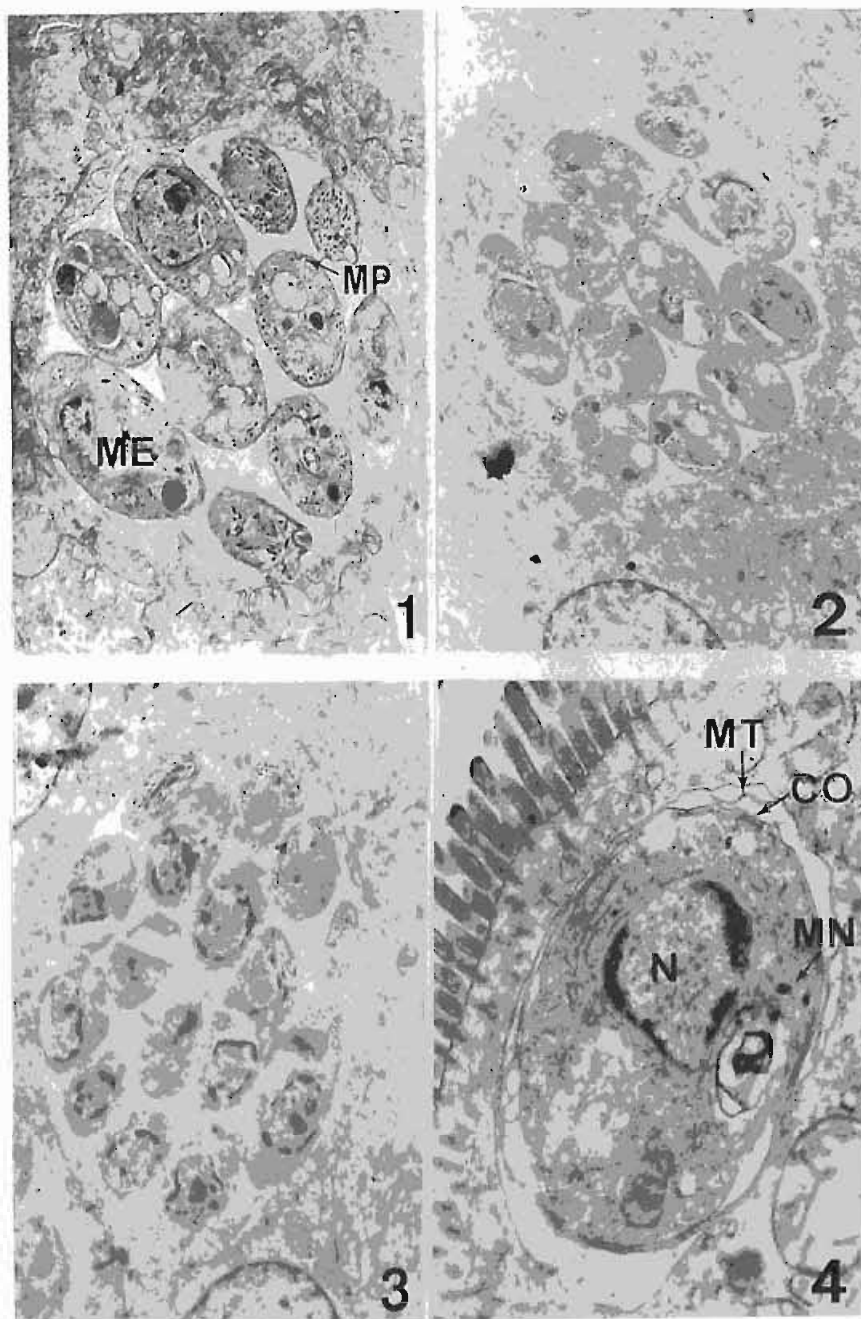
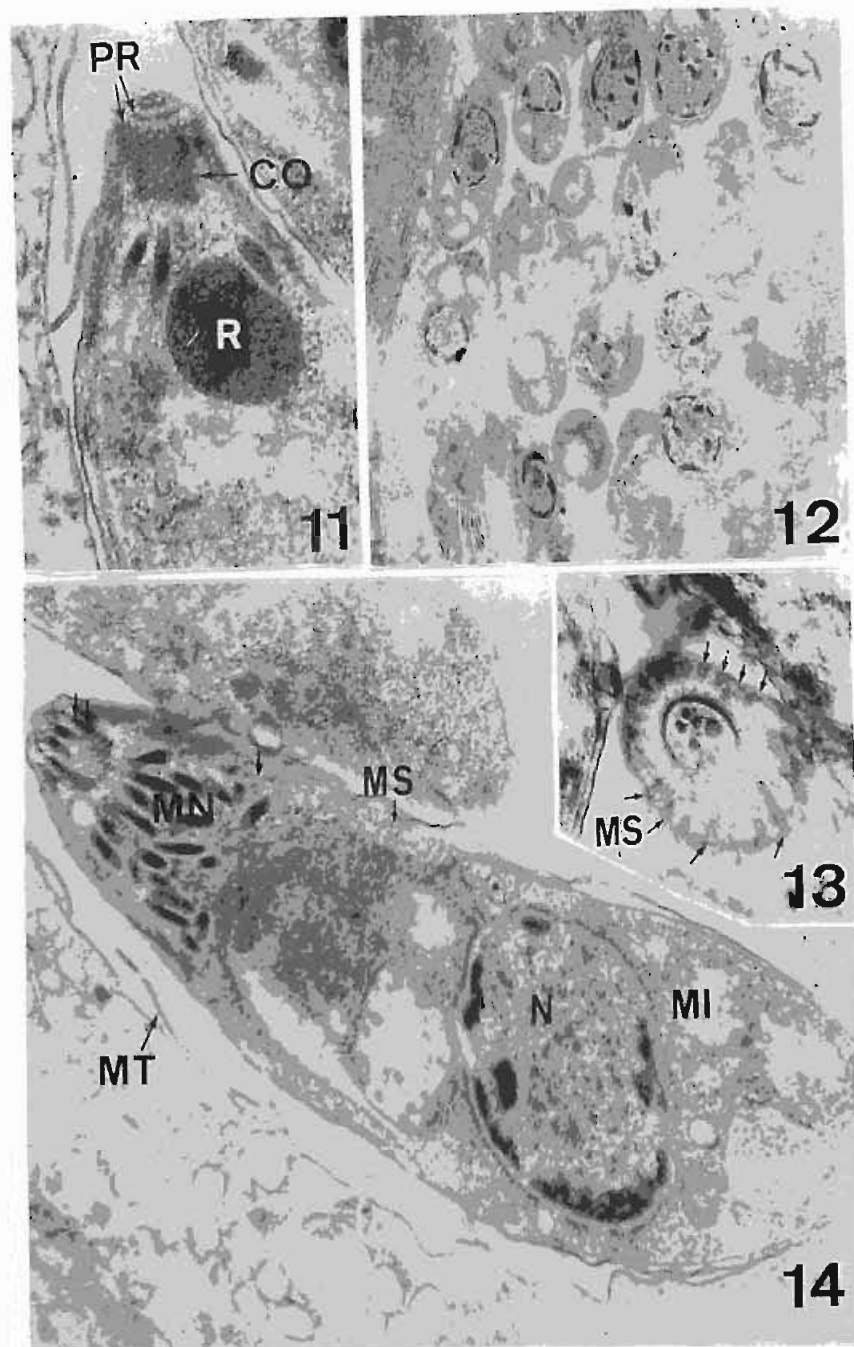


FIG. A





# EXPLICACION DE LAS FIGURAS

- Fig. A: Esquema detallado del proceso de ectomerogonia en *E. bateri*.  
Fig. 1: Esquizonte de primera generación. X 7.500  
Fig. 2: Esquizonte de segunda generación. X 6.000  
Fig. 3: Esquizonte de tercera generación. X 9.600  
Fig. 4: Trofozoito de cuarta generación. X 25.400  
Fig. 5: Esquizonte de cuarta generación con núcleos periféricos y husos acromáticos. X 21.400  
Fig. 6: Detalle de la fase inicial de la ectomerogonia. X 36.500  
Fig. 7: Evaginación manifiesta de un esquizonte de cuarta generación en la que se observa un complejo de Golgi introduciéndose en ella. X 28.000  
Fig. 8: Esquizonte de cuarta generación con conoides en formación (flechas). X 20.500  
Fig. 9: Ectomerogonia con evaginaciones en distintos estadios de maduración. X 16.450  
Fig. 10: Merozoito próximo a su liberación. X 28.000  
Fig. 11: Corte longitudinal superficial del conoide. X 37.000  
Fig. 12: Esquizonte maduro de cuarta generación. X 10.800  
Fig. 13: Corte transversal del conoide con 22 microtúbulos subpelliculares. X 43.000  
Fig. 14: Detalle de un merozoito cortado longitudinalmente. X 28.700

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LAS FIGURAS

- AR: Roptrias en formación.  
CC: Centrocono.  
CE: Centriolo.  
CO: Conoide  
EE: Estructuras en espiral.  
G : Complejo de Golgi.  
HA: Huso acromático intranuclear excéntrico.  
IM: Membrana interna compleja.  
ME: Merozoito.  
MI: Mitochondria.  
MN: Micronema.  
MP: Microporo.  
MS: Microtúbulo subpellicular.  
MT: Microtúbulo intravacuolar.  
N : Núcleo.  
PR: Anillos preconoidales.  
R : Roptrias.  
RE: Reticulo endoplásmico.