4. Derr-Harf, C.; Molet, B.; Schreiber, J.; Kremer, M.—Epidemiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, *53*, 1978, 467-477.
5. Derreumaux, A. L.; Jadin, J. B.; Willaert, E.; Moret, R.—Action du chlore sur les amibes de l'eau. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, *54*, 1974, 415-428.
6. Grillot, R.; Ambroise-Thomas, P.—Les amibes libres dans les eaux de piscines de la region grenobloise. Influence du fonctionement «eté-hiver» et du procede de sterilisation. *Rev. Epidemiol. Santé Publ.*, *28*, 1980, 185-207.
7. Jadin, J. B.—De la dispersion et du cycle des amibes libres. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, *54*, 1974, 371-385.
8. Madrigal Sesma, M. J.; Santillana, I.; Zapatero Ramos, L. M.—Presencia de amebas limax en aguas naturales de Madrid. *Rev. Ibér. Parasitol., vol. extra*, 1982, 125-140.
9. Page, F. C.—*An Illustrated key to fresh water and soil amoebas*. Freshwater Biological Association. Scientific Publication. Cumbria. England, 1976.
10. Pernin, P.; Riany, A.—Etude sur la presence d'amibes libres dans les eaux des piscines lyonnaises. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, *53*, 1978, 333-344.
11. Pussard, M.; Pons, R.—Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, *13*, 1977, 557-598.

Rev. Ibér. Parasitol., *44* (4), 1984, pp. 387-397

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

HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. °; MARTÍNEZ GÓMEZ, F. °; NAVARRETE, I. °°

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

°° Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres.

(Recibido el 24 de enero de 1984)

SUMMARY

We investigated with the electron microscope the microgametogony of *Eimeria bateri* from experimentaly infected japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. The differentiation of the microgametocytes was made according to the cytoplasmic growth and the peripherical arrangement of the nuclei. In the course of the microgametogony we observed the presence of two centrioles situated between the limiting membrane and the nucleus, both connected by a centrocone. In this zone, we observed, too, a mitochondrion.

Microgrametes, originated from a protrusion of the limiting membrane, appeared near to each nucleus. The nuclei were divided in two well differentiated zones, one anterior, composed by osmiophilic chromatin, and a posterior, granular, an-electronpale part. The osmiophilic part entered the protrusion of the limiting membrane, and the less dense part of the nucleus remained in the cytoplasm of the microgametocyte as a residual nucleus.

* Trabajo realizado con cargo al Proyecto de Investigación subvencionado por la CAICYT, N.º Ref. 4689-79.

The mature microgametocytes were characterized by the presence of several microgametes with two flagella around a central residual cytoplasm.

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

RESUMEN

Se investiga la microgametogénesis de *E. bateri* al microscopio electrónico por medio de infecciones experimentales en codorniz *Coturnix coturnix japonica*. Los microgametocitos comienzan a diferenciarse por un crecimiento del citoplasma y un aumento del número de núcleos que se localizan periféricamente. Dos centriolos son hallados entre la membrana plasmática y el núcleo, conectados entre sí por un centrocono. También está presente en la zona una mitocondria. Los microgametos se originan a partir de una evaginación que aparece en las inmediaciones de los núcleos, los cuales presentan en un principio dos zonas bien definidas: una dielectrónica y compacta y otra granular de menor densidad electrónica. La porción de cromatina densa penetra en la evaginación y la granular se separa de la anterior formando parte del citoplasma. Los microgametocitos maduros se caracterizan por presentar varios microgametos alrededor de un gran residuo central.

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

MATERIAL Y METODOS

El procedimiento seguido para la realización del presente trabajo relativo a la obtención de la población de ooquistes, conservación y administración, así como las técnicas y métodos empleados tanto parasitológicos como microscópicos, han sido descritos en un trabajo anterior por Navarrete y col. (5).

Las codornices empleadas en la presente investigación corresponden a los lotes 4 y 5 (4 aves por lote) a las que se les han administrado 150.000 ooquistes esporulados por ave, que se sacrifican a las 96 horas (lote 4) y 120 horas (lote 5) después de la administración (h.p.a.).

RESULTADOS

Los microgametocitos se observan preferentemente en los tercios primero y segundo (a partir de duodeno) del intestino delgado, aunque también pueden encontrarse en menor número, en el último tercio y, más raramente, en duodeno. Las células hospedadoras son las intestinales de absorción, sobre todo aquéllas que están situadas en la parte distal de los villi, en tanto que aquéllas que están situadas en la parte basal se encuentran libres de parásitos. No se han observado microgametocitos en glándulas ni en lámina propia.

A las 96 h.p.a. se observan formas parasitarias desde escasamente diferenciadas hasta microgametocitos con núcleos periféricos y en un grado más o menos avanzado de exflagelación. En ningún caso hemos visto esta forma parasitaria en estado completamente maduro. A las 120 h.p.a. se pueden encontrar todas las formas evolutivas citadas anteriormente, incluso microgametocitos con microgametos libres en la vacuola parasitófora y en espacios intercelulares.

Los primeros estadios de la microgametogénesis son difíciles de identificar debido a su semejanza con los esquizontes. Sin embargo, a medida que aumenta el número de núcleos y se sitúan periféricamente, aparecen caracteres diferenciales suficientes para su identificación. Los microgametocitos jóvenes se caracterizan por estar rodeados por una unidad de membrana, con los núcleos irregulares y sin nucleolo, preferentemente en posición periférica, y con una cromatina densa en las zonas que contactan con la envoltura nuclear. Es frecuente observar en esta fase uno o dos centriolos (figs. 2, 3 y 5) localizados entre la membrana plasmática y el núcleo, en el que se localiza un grupo de microfilamentos dispuestos en cono, cuya base se dirige hacia el interior del núcleo y su vértice deforma la membrana nuclear para formar un saliente agudo que se orienta hacia el centriolo. Las mitocondrias se localizan preferentemente en la periferia y próximas a la membrana plasmática y a los núcleos. El hialoplasma es muy denso y compacto, con gran cantidad de ribosomas libres. El cuerpo central del parásito carece de orgánulos, a excepción del retículo endoplásmico rugoso que adopta formaciones en estratos paralelos.

En fases más avanzadas los núcleos presentan bordes irregulares y su cromatina se agrupa formando acúmulos periféricos (figs. 3 y 4). También pueden observarse núcleos acuminados en un polo, cuyo ángulo agudo, ocupado por una gran condensación cromatínica, se dirige hacia el centriolo (fig. 5). En algunas zonas de esta fase parasitaria y por debajo de la membrana del abom-

bamiento aparece una banda electrodensa (figs. 3, 5, 6 y 7) que sería el origen del perforatorium. Durante el proceso de exflagelación, que comienza en estos momentos, se observan dos flagelos rodeados por la membrana plasmática del microgametocito y cuatro microtúbulos en línea (fig. 8) de 20 nm. de diámetro, localizados por encima del núcleo y entre los cuerpos basales. Estos cuatro microtúbulos están presentes durante todo el proceso de producción de microgametos, incluso se encuentran en microgametos maduros.

Conforme va aumentando de tamaño la evaginación se va introduciendo en ella una mitocondria y un núcleo (figs. 6 y 7) el cual presenta ahora dos regiones perfectamente definidas, una apical, con un acúmulo de cromatina muy denso, y otra basal, de menor densidad electrónica. En la base de esta evaginación y sobre las membranas se observan unas invaginaciones densas cuya sección transversal recuerda la de los microporos (fig. 9), y están formados por dos anillos concéntricos. El interior, muy dielectrónico, mide 260 nm. de diámetro y el exterior, de menor densidad, presenta un diámetro de 400-500 nm.

Con posterioridad, la zona nuclear cromatínica, de gran densidad, penetra totalmente en el cuerpo del microgameto, quedando la región sin cromatina en el microgametocito (fig. 10). Los microgametos aumentan de tamaño por su eje longitudinal y permanecen unidos al gametocito por una especie de pedúnculo citoplasmático, el cual se estrangula por su base, abandonando en el cuerpo residual el resto nuclear y en la vacuola parasitófora al microgameto (fig. 11).

DISCUSION

El proceso de la microgametogénesis se adapta en líneas generales a los descritos para otras especies de *Eimeria,* y se caracteriza por una fase de crecimiento del citoplasma con aumento del número de núcleos y otra de diferenciación con producción y liberación de microgametos.

En las células masculinas con más de un núcleo, fase primera de la microgametogénesis, es difícil de diferenciar de otras formas multinucleadas, como los esquizontes, ya que comparten numerosas estructuras, tales como los centroconos, husos acromáticos intranucleares y centriolos.

Algunos autores como Snigerevskaya (9) aportan datos diferenciales a nivel del núcleo, referidos a la distribución de la cromatina nuclear, que en los microgametocitos forma grandes acúmulos en la periferia para luego situarse en un polo; otros como Mehlhorn (4), que aparte de la distribución cromatínica, añaden la de la presencia constante de husos acromáticos excéntricos y la desaparición de los nucleolos durante el proceso.

Las estructuras encontradas en *E. bateri* que sirven de base para la diferenciación de esquizontes, estudiados con anterioridad por Navarrete y col. (5), y microgametocitos se basan en los detalles observados en éstos, tales como núcleos de contorno irregular y de distinto tamaño; ausencia de nucleolo; distribución periférica de la cromatina; mitocondrias numerosas, pequeñas, tubulares y periféricas que concuerda en líneas generales con los descritos por Scholtyseck y col. (6), Ferguson y col. (1) en *E. brunetti* y Scholtyseck y col. (7) en *E. ferrisi* entre otros, añadiendo para el caso concreto de *E. bateri* la presencia de un citoplasma muy denso con retículo endoplásmico rugoso formando estratos paralelos en el centro del parásito. En algunos microgametocitos aparecen acúmulos de amilopectina y gotas de grasa, como los hallados por Scholtyseck y col. (7) en *E. ferrisi.* Dichas inclusiones paraplasmáticas no han sido encontradas por nosotros.

La segunda fase o de diferenciación, caracterizada por el proceso de exflagelación, se produce exclusivamente sobre la membrana citoplasmática, siendo rara la observación de microgametos originados sobre invaginaciones más o menos profundas de las membranas. Es decir, que la mayoría de los microgametocitos observados se rigen por un proceso de formación monocéntrico con producción de escaso número de microgametos como los observados en *E. falciformis* por Scholtyseck y col. (8), en *E. acervulina* por Fernando (2), en *E. ferrisi* por Scholtyseck y col. (7), entre otras especies, en contraposición con aquellos que originan numerosos gametos masculinos en masas separadas de citoplasma, denominadas por Scholtyseck y col. (6) citómeros y microgametocitos policéntricos por Fernando (2).

Durante esta fase de diferenciación son constantes lo abombamientos producidos sobre la membrana, con aparición de una banda densa (inicio del perforatorium) por encima del centriolo y de una mitocondria en sus proximidades, estructuras que son

también constantes en la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento.

Sin embargo, hemos observado cuatro microtúbulos situados entre los dos centriolos y entre el núcleo y la membrana plasmática que permanecen durante toda la fase de maduración y liberación, y persisten en el microgameto maduro. Son estructuras que varían en número y disposición de unas especies a otras. Han sido observadas por Scholtyseck y col. (6) en *E. máxima*, por Fernando (2) en *E. acervulina*, por Scholtyseck y col. (7) en *E. ferrisi*, por Ferguson y col. (1) en *E. brunetti* y por Kheysin (3) en *E. intestinalis*. Scholtyseck y col. (6) les asignan una función como de flagelo rudimentario o adicional. Nosotros, basándonos en algunas de las características de los microtúbulos (como contener ATP en su interior y poseer una glan flexibilidad), pensamos que pudieran ser los directores y responsables de todo el movimiento que se produce en esta zona y que, además, intervendrían en el reforzamiento y soporte del cuerpo del microgameto.

La condensación cromatínica, la polarización de dicha condensación, la separación en dos zonas y su introducción en el microgameto de la parte compacta como portadora del material genético y la liberación en el cuerpo residual del resto nuclear, se adapta en líneas generales a los observados en otras especies de *Eimeria*, a excepción de *E. perforans* (Scholtyseck y col., 6), en la que todo el núcleo penetra en el cuerpo del microgameto.

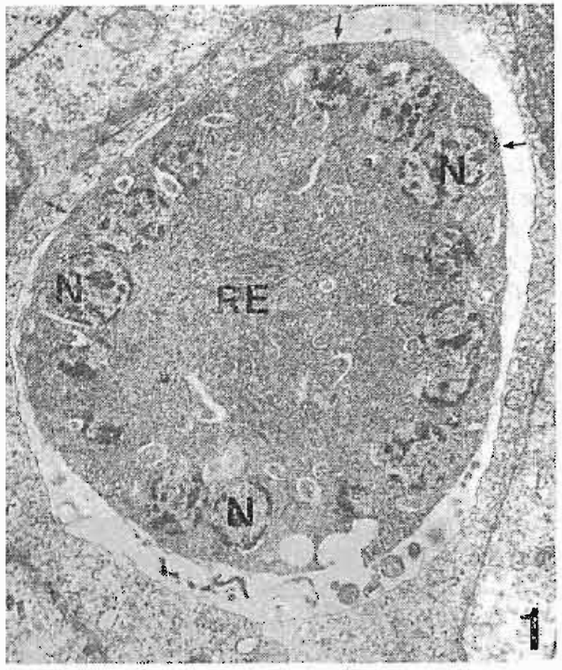
REFERENCIAS

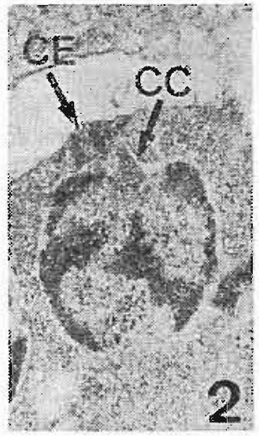
1. Ferguson, D. J. P.; Birch-Andersen, A.; Hutchison, W. M.; Siim, J. C.—Ultrastructural studies on the endogenous development of *E. brunetti*. II. Microgametogony and the microgamete. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand. B, 85*, 1977, 67-77.
2. Fernando, M. A.—Fine structural changes associated with microgametogenesis of *E. acervulina* in chicken. *Ztschr. Parasitenk., 43*, 1973, 33-42.
3. Kheysin, Y. M.—Electron microscopic study of microgametogenesis in two species of coccidia from rabbit (*E. magna* and *E. intestinalis*). *Acta Protozool., 3*, 1965, 215-224.
4. Mehlhorn, H.—Elektronenmikroskopische Untersuchungen and Entwicklungstadien von *E. maxima* der Mikrogameten. *Ztschr. Parasitenk., 40*, 1972, 151-163.

5. Navarrete, I.; Hernández, S.; Martínez, F.—Estudio al microscopio electrónico del ciclo evolutivo de *E. bateri* Bathia et al., 1965, en *Coturnix coturnix japonica*. I. Esquizogonia. *Rev. Ibér. Parasitol., 42*, 1982, 161-175.
6. Scholtyseck, E.; Mehlhorn, H.; Hammond, D. M.—Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups. *Ztschr. Parasitenk., 38*, 1972, 95-131.
7. Scholtyseck, E.; Chobotar, B.; Senaud, J.; Ernst, J. V.—Fine structure of microgametogenesis of *E. ferrisi* Levine and Ivens 1965 in *Mus musculus*. *Ztschr. Parasitenk., 51*, 1977, 229-240.
8. Scholtyseck, E.; Pellerdy, L.; Mehlhorn, H.; Haberkorn, A.—Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Mikrogametenentwicklung des Mausecoccids *Eimeria falciformis*. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 21*, 1973, 433-443.
9. Snigirevskaya, E. S.—Changes of some ultrastructures during microgametogenesis in the rabbit coccidia *Eimeria intestinalis* and *Eimeria magna*. *Acta Protozool., 11*, 1969, 382-385.

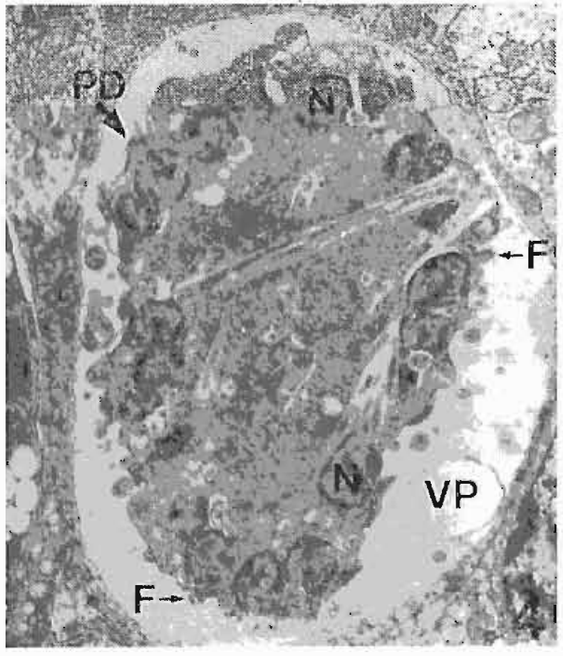
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LAS FIGURAS

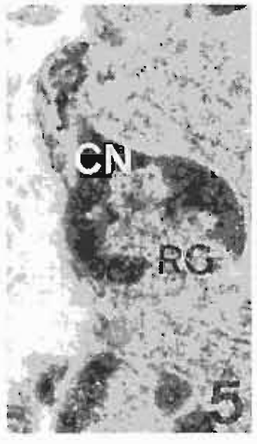
CC:	Centrocono
CE:	Centriolo
CN:	Cromatina nuclear electrodensa
CP:	Collar del pedúnculo
F:	Flagelo
N:	Núcleo
Mi:	Mitocondria
MP:	Microporo
MT:	Microtúbulo
PD:	Placa densa del perforatorium
RC:	Residuo citoplasmático
RE:	Retículo endoplásmico
RG:	Región granular del núcleo
RN:	Resto nuclear
VP:	Vacuola parasitófora

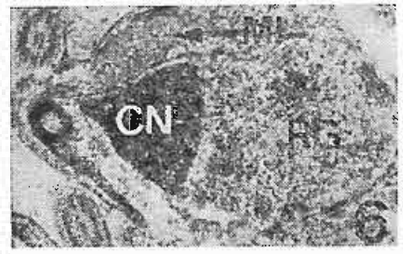

N
RE
N
N
1

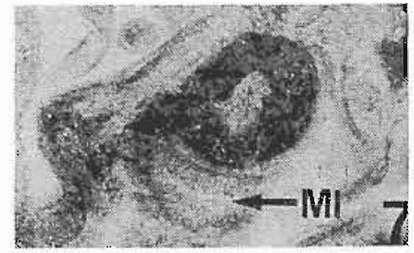

CE
CC
2

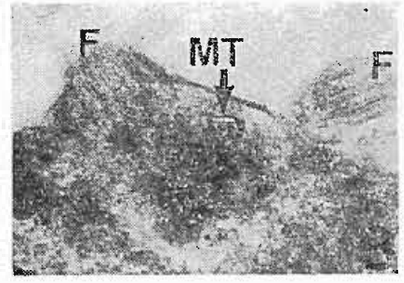
CE
PD
3

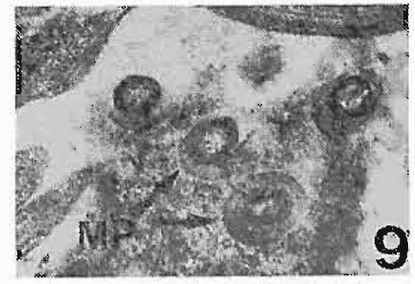

PD
N
F
N
VP
F
4

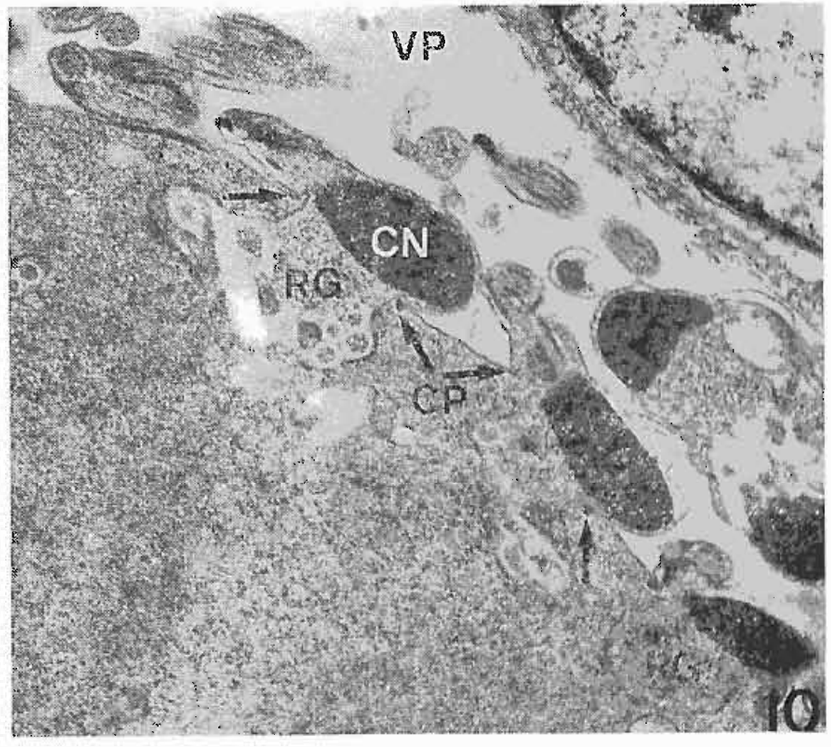

CN
RG
5


ML
CN
RG
6


MI
7


F
MT
F


MP
9


VP
CN
RG
CP
10

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Fig. 1.—Microgametocito joven con núcleos periféricos próximos a la membrana plasmática. Entre ésta y el núcleo está presente un centriolo (Flechas). El citoplasma contiene en la parte central retículo endoplásmico en agrupaciones de estratos paralelos. 12.500 ×.

Fig. 2.—Detalle de un núcleo de un microgametocito joven con su centrocono dirigido hacia el centriolo. La cromatina comienza a situarse en la periferia. 30.400 ×.

Fig. 3.—Inicio del abombamiento de la membrana plasmática con una banda lateral densa en cuyas proximidades se localiza un centriolo. La cromatina nuclear se hace manifiestamente periférica. 40.600 ×.

Fig. 4.—Microgrametocito con núcleos de bordes muy irregulares y próximos a la membrana limitante. 10.000 ×.

Fig. 5.—Comienzo de la emigración de la cromatina hacia un polo del núcleo. 19.600 ×.

Fig. 6.—Núcleo con dos regiones manifiestas, una apical de gran densidad electrónica y acuminada en el polo próximo al centriolo y otra basal, granular y sin apenas material cromatínico. Una mitocondria se aloja entre la membrana limitante y el núcleo. Dos flagelos seccionados transversalmente pueden verse en la vacuola parasitófora. 37.800 ×.

Fig. 7.—Detalle del núcleo y la mitocondria introducidos en la evaginación. 34.580 ×.

Fig. 8.—Evaginación con dos flagelos laterales, y, equidistante de ambos, cuatro microtúbulos en línea. 48.100 ×.

Fig. 9.—Sección transversal superficial de cuatro microporos. 25.650 ×.

Fig. 10. Sección de la periferia de un microgametocito con microgametos en estado avanzado de formación y unidos a aquél mediante un pedúnculo. La porción electrodensa del núcleo ha penetrado en el microgameto y aparece todavía ligada a la porción granular que permanece en el citoplasma. El pedúnculo está limitado por dos condensaciones membranosas que lo rodean a modo de collar. 29.000 ×.

Fig. 11.—Microgametocito maduro con numerosos microgametos libres en la vacuola parsitófora alrededor de una masa citoplasmática central que contiene a los restos nucleares. 8.600 ×.