ULTRAESTRUCTURA DE LA CUBIERTA CORPORAL Y EPITELIO INTESTINAL DE OSTERTAGIA CIRCUNCINCTA (STADELMANN, 1894) RANSOM, 1907, (NEMATODA, TRICHOSTRONGYLOIDEA)

por

MARTINEZ GOMEZ, FRANCISCO Y HERNANDEZ RODRIGUEZ, SANTIAGO

SUMMARY

As structural study is made on the body wall and the intestinal epithelium.

The body wall is composed of cuticle, hypodermis, and muscular layer. The cuticle presents 8 layers: external membrane, external cortex, internal cortex, 3 fiber layers and a basal lamella. The hypodermis presents cytoplasmic prolongations and four hypodermal chords. A laminar, pear-shaped structure, possibly with a secretory function, is described. The muscular layer is composed of two zoned cells: the contractile and fibrillar one, and the noncontractile, amyofibrillar zone, rich in glycogene and mitocondria.

The intestine is composed of a single layer of wide, elongated, epithelial cells, resting on a homogeneous basament layer, and with numerous microvilli on the free border. This microvilli is composed of a central core wich penetrates until the luminal layer, a double membrane unit, and tubulli external to the membrane. The other structures that we have seen in the intestinal cell are like the other nematodes formerly studied.

El estudio sobre la ultraestructura de algunas nematodos (Lee, 1965; Jamuar, 1966; Browne y Chowdhury, 1959; Jenkins, 1969; Wright, 1963, y Bird, 1971) ha sido en la última década motivo de numerosas publicaciones que tratan de investigar la función de determinados órganos y su semejanza con los de otros organismos de mayor nivel. En este trabajo intentamos estudiar la cubierta corporal y el epitelio intestinal de Ostertagia circuncincta como una aportación más al conocimiento de la ultraestructura de los nematodos parásitos gastrointestinales.

Recibido en Junio de 1973

MATERIAL Y METODOS

Se recogen vermes adultos de O. circuncincta de cuajares de ovejas sacrificadas en el Matadero Municipal de Córdoba. Los ejemplares obtenidos se lavan en suero fisiológico templado con objeto de observar su vitalidad y posteriormente se procede a su estudio y clasificación en suero fisiológico. Cerciorados de que los helmintos son de la especie que tratamos de estudiar, se fijan en glutaraldehido al 5 por ciento, a 4 grados C. Se cortan inmediatamente después de su muerte para facilitar la penetración del fijador, y posteriormente se lavan en una solución tamponada de fosfatos. La postfijación se efectúa en tetróxido de osmio al 1 por ciento (ZAPATOSKI, 1971). Los trozos son incluidos en agar al 3 por ciento (WRIGHT y Jones, 1965) y deshidratados en la serie de etanoles. Finalmente son embebebidos en Araldit 502. Los cortes se obtienen con cuchilla de vidrio en ultramicrotomo LKB III y las secciones se montan sobre rejilla de cobre y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones se observan en un microscopio electrónico Philips 300. trabajando a un voltaje de aceleración de 60 a 80 Kv. Las fotografías se obtienen en placa y en película de 35 mm.

RESULTADOS

1.—PARED CORPORAL

1.1.—Cuticula

Es una cubierta que rodea al parásito y mide 1,3-1,5 micras de espesor. Está compuesta de varias capas y presenta crestas longitudinales y surcos transversales: (Fig. 1).

Las capas (Foto 1, B) son las siguientes: una electrodensa que muestra unidad de membrana, de 180 Angström. Por debajo de ella, una corteza externa de 65 a 10 milimicras y una corteza interna de 75 a 90 milimicras. Más internamente se observa la lámina matriz, de 400 a 500 milimicras de espesor, seguida de tres láminas fibrosas. La más externa tiene 200-225 milimicras y está compuesta por bandas que se doblan sobre sí mismas hasta formar un ángulo de 90°. La lámina media, de 170 a 200 milimicras presenta bandas paralelas orientadas en el mismo sentido que la capa electrodensa más externa. La más interna, de 300 a 325 milimicras, tiene sus bandas para-

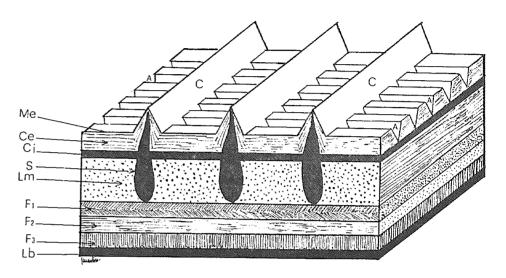


Figura 1.—Corte esquemático de la cutícula de *O. circuncincta* A = Anillo cuticular; C = Crestas longitudinales; Ce = Corteza externa; Ci = Corteza interna; F1 = Lámina fibrosa externa; F2 = Lámina fibrosa media; F3 = Lámina fibrosa interna; Lb = Lámina basal; Lm = Lámina matriz; Me = Membrana externa; S = Contrafuerte.

lelas entre sí y perpendiculares a la de la capa media. Finalmente, existe una lámina basal, de estructura homogénea y 125-150 milimicras de grosor.

En la lámina matriz aparecen unas formaciones piriformes y electrodensas que penetran en los apéndices del borde de la cutícula y reciben la denominación de "contrafuertes".

1.2.—Hipodermis

La hipodermis (Foto 2) está constituida por unas prolongaciones citoplasmáticas que rodean los campos de fibras musculares externamente, penetrando entre ellos y engrosándose hasta formar los cordones hipodermales, en número de cuatro, dorsal, ventral y dos laterales, que separan las células musculares en cuatro campos. En los cordones hipodermales, de naturaleza celular, hemos observado la presencia de nervios y canales excretores, así como mitocondrias poli y pleomórficas, complejo de Golgi y algunos gránulos de glu-

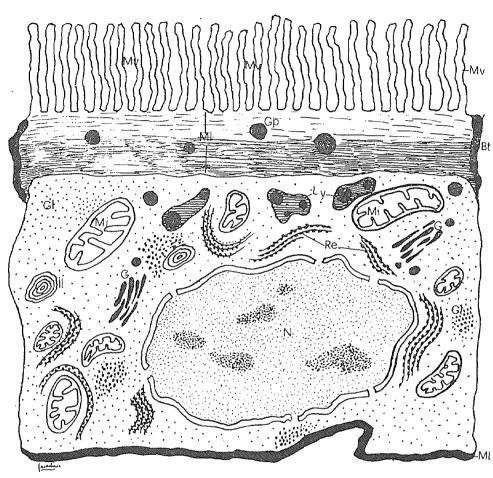
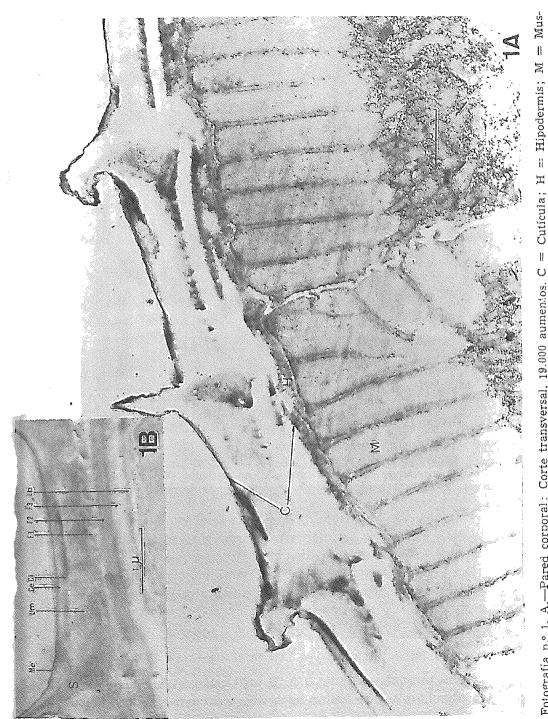
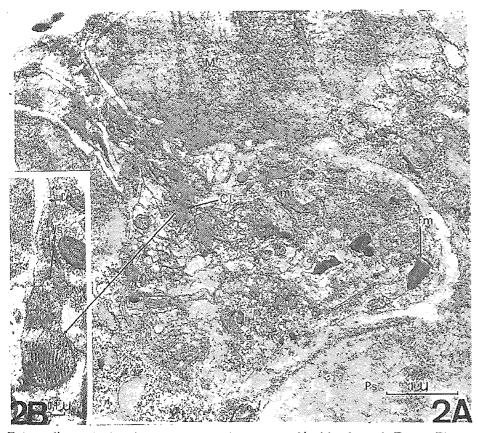


Figura 2.—Representación esquemática de una célula intestinal (Corte transversal; B! = Barra terminal; G = Complejo de Golgi; Gl = Rosetas de glucógeno; Gp = Gránulos pigmentados; Il = Inclusiones laminares; Ly = Lisosomas; Mb = Membrana basal; Mi = Membrana luminal; Mi = Mitocondrias; Mv = Microvilli; N = Núcleo; Re = Retículo endoplásmico.



and the state of t



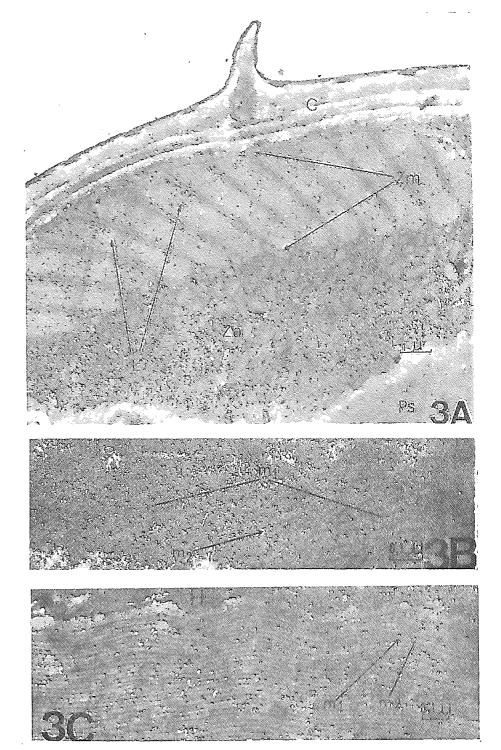
Folografía n.º 2. A.—Corte transversal de un cordón hipodermal. Fm = Figura de mielina; Cl = Cuerpo de estructura laminar; mi = Mitocondria; M = Musculatura. \times 18.000.

B.—Detalle del cuerpo de estructura laminar, con vesícula (Vs) y conducto en el extremo distal (Cd). \times 34.200.

cógeno irregularmente repartidos. Se aprecia también, en el estrechamiento del cordón, una estructura constante, a nivel de todos los cortes, de disposición laminar y aspecto piriforme, en la que se observa alguna vesícula que parece abrirse apicalmente por medio de un conducto más o menos sinuoso. Esta estructura podría tener una función secretora.

1.3.—Musculatura

Las células musculares (Foto 3 A, B y C) están situadas por debajo de la hipodermis y se hallan agrupadas en cuatro campos con



Fotografía n.º 3.—A: Corte oblicuo de una célula muscular, en el que se aprecia la zona miofibrilar (Zm), con sus lóbulos (L), y la zona amiofibrilar (Za). Ps = P. Seudoceloma. Se puede observar gran cantidad de glucógeno y y de mitocondrias en las proximidades de la zona contráctil. \times 8.000.

B: Corte transversal de los miofilamentos de una célula muscular, con miofilamentos gruesos (m_1) y delgados (m_2) . \times 56.000.

C: Corte longitudinal de una célula muscular en su porción apical mostrando miofilamentos gruesos (m_1) y delgados (m_2) . H = Hipodermis. \times 50.000.

un número de seis a diez células cada uno de ellos. Están divididas en una parte apical, contráctil, y una parte basal no contráctil.

En la parte apical el sarcolema presenta unas invaginaciones que penetran en la célula y la dividen longitudinalmente en 18-22 lóbulos, que se encuentran situados a modo de empalizada, con una altura casi constante de 2 a 2,5 micras y una anchura de 0,5 micras. Están constituidos por miofilamentos que, en cortes transversales al eje del parásito se ofrecen de dos tipos distintos: unos gruesos, situados en la parte media del lóbulo, de 180 Angström, y otros más delgados, marginales, de 60-70 Angström de diámetro. En cortes longitudinales se observan los miofilamentos perfectamente ordenados y paralelos unos a otros. La separación entre dos miofilamentos gruesos es de 200 Angström. Los delgados se observan solo en las zonas próximas a la hipodermis.

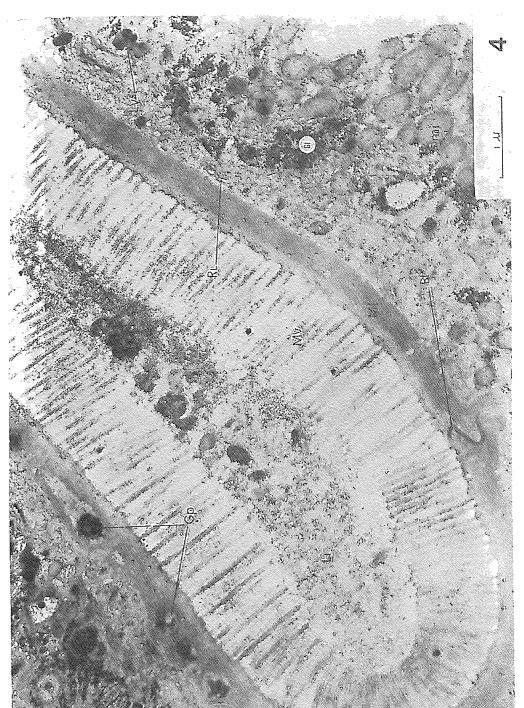
La parte basal, no contráctil, amiofibrilar o sarcoplásmica, está constituida por numerosas mitocondrias localizadas con mayor profusión en las proximidades de la parte contráctil y difusamente repartidas por el resto del citoplasma. Asimismo se observa gran cantidad de glucógeno irregularmente repartido y escaso retículo endoplásmico rugoso. En los cortes estudiados no hemos observado ningún núcleo ni complejo de Golgi.

2.—EPITELIO INTESTINAL

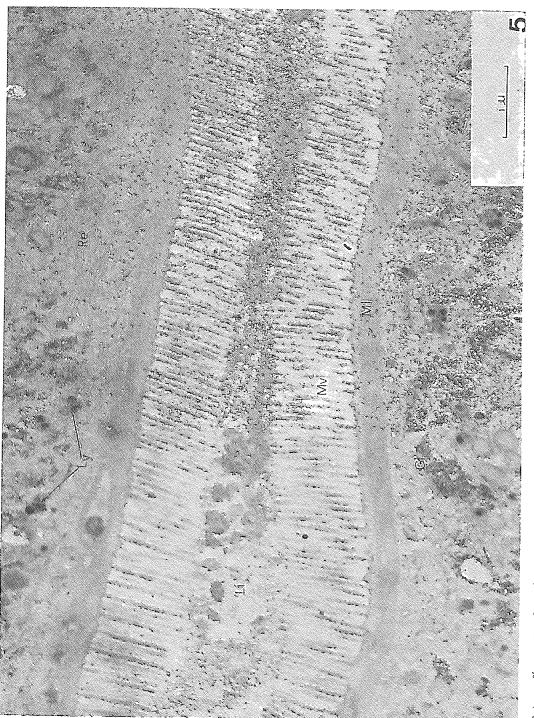
La luz intestinal (Fotos 4 y 5) se presenta, al microscopio electrónico, tapizada por unos elementos epiteliales de revestimiento, que, en cortes transversales, aparecen en número escaso. (Tres a cinco células). Estas células son alargadas y predomina la anchura sobre la altura.

La membrana plasmática se asienta, en su porción distal, sobre una membrana basal adielectrónica y homogénea, y posee estructura fibrilar. En su porción apical se encuentra una diferenciación que caracteriza ultraestructuralmente a este tipo de célula: la microvilli, que recorre todo el borde luminal en forma de prolongaciones constantes de 1,25-1,40 micras de altura, con una base de implantación de unas cien milimicras.

En ocasiones hemos observado que estas prolongaciones pueden ocluir totalmente la luz intestinal. En otros cortes, transversales al eje de la microvilli, se comprueba la existencia de estructuras tubu-

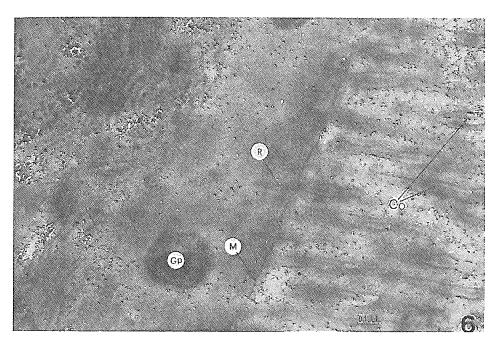


gran cantidad (Bt), Barra terminal



Membrans MI = Microvilli; 23.000.

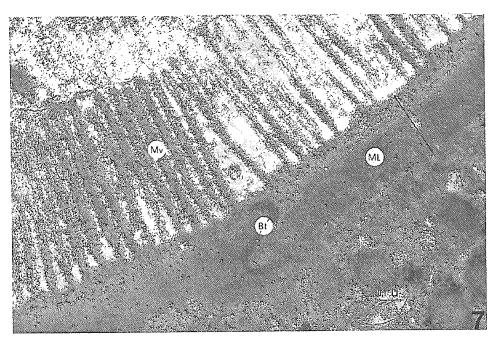
lares adosadas externamente a la membrana microvillar. Asimismo se comprueba la existencia de un corazón electrodenso, situado en el interior de las prolongaciones, que penetra en la membrana luminal a modo de raíz. Esta penetración a modo de raíz, que actúa como soporte de la microvilli, la hemos denominado "extensión radicular". (Foto 6).



Fotografía n.º 6.—Detalle de las microvillosidades de una célula intestinal, en las que se aprecia el corazón central (Co), y las extensiones radiculares (R) que penetran en la membrana luminal. Gp = Gránulo pigmentado; $M = Membrana celular_1 \times 71.000$.

En el citoplasma submicrovillar observamos la membrana luminal (Foto 7) constituída por una banda de gran densidad electrónica en la que se diferencian dos zonas: una más densa y homogénea, la más alejada de la luz intestinal, y otra, menos densa, de estructura fibrilar, próxima al nacimiento de la microvilli. En ambas zonas se observan gránulos pigmentados de gran densidad electrónica.

La unión de las membranas plasmáticas de dos células contiguas (Foto 7) a nivel de la membrana luminal, presenta bandas de cierre configuradas por las llamadas "zónulas ocludens".



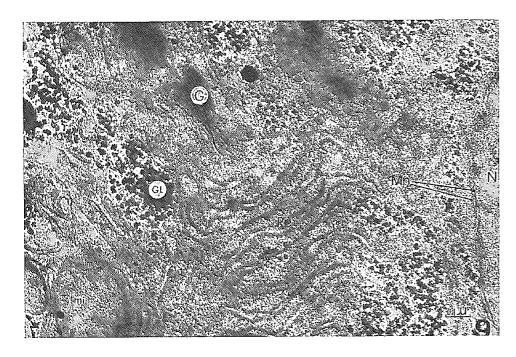
Fotografía n.º 7.—Detalle de la unión de dos células intestinales por su barra terminal (B!). Se delimitan perfectamente las dos zonas de que consta la membrana luminal (Ml). × 50.000.

El núcleo de la célula epitelial (Foto 8) se encuentra situado en posición basal, sin contactar con la membrana plasmática. Es muy voluminoso (Figura 2) y en algunos casos ocupa más de la mitad del volumen protoplasmático, con unas dimenciones de 4-4,5 micras de longitud por dos de anchura. El contenido nuclear está limitado por dos membranas concéntricas muy definidas, en las que se ven con frecuencia poros nucleares. Los ácidos nucleicos se distribuyen de forma irregular constituyendo zonas relativamente densas a los electrones.

El hialoplasma presenta gran cantidad de rosetas de glucógeno, distribuido irregularmente en zonas de mayor o menor densidad, así como retículo endoplásmico de tipo granular, constituido por membranas que se disponen en cisternas paralelas (Foto 9) o en estratos concéntricos (Foto 10), densas a los electrones y separadas por 100 milimicras, tapizadas por ribosomas que se aprecian con gran claridad. Se observa también retículo endoplásmico liso en las proximidades de la membrana luminal, con estructura sacciforme.



Fotografía n.º 8.—Corte transversal de una célula intestinal con su núcleo (N), membrana luminal (MI) y borde microvillar (Mv). × 21.000.



Fotografía n.º 9.—Detalle de una célula intestinal, con su complejo de Golgi (G), glucógeno (Gl), Retículo endoplásmico (Re) y núcleo (N). Obsérvese la doble membrana nuclear (Mn). × 74.000.

El complejo de Golgi se localiza en las proximidades del retículo endoplásmico y está constituido por una serie de sacos aplanados.

Las mitocondrias, pleomórficas, se encuentran diseminadas por todo el campo celular y presentan crestas escasas y pequeñas.

Además de todas estas estructuras, que son constantes en todas las células de organismos superiores, existen unas inclusiones citoplásmicas en forma de corpúsculos con estructuras laminares concéntricas y algunos cuerpos electrodensos homogéneos. También se encuentran lisosomas.

DISCUSION

La cubierta corporal de *O. circuncincta* consta fundamentalmente de tres capas: cutícula, hipodermis y musculatura somática.



Fotografía n.º 10.—Detalle del retículo endoplásmico en estratos concéntricos, con sus ribosomas (Rb). \times 95.000.

La cutícula, con las tres láminas clásicas que son la característica general en todos los nematodos parásitos, coincide con la descrita por otros autores (Lee, 1965; Jamuar, 1966; Wright, 1967, y Bruce, 1970). Estas tres láminas están constituidas por un total de ocho capas bien diferenciadas, semejantes a las descritas por Smith y Harness, 1972. Además de estas estructuras observamos otras, que hemos denominado contrafuertes, electrodensas y piriformes, que arrancan de las láminas fibrosas y penetran hasta la corteza, y que actuarían reforzando la cutícula en los movimientos de flexión y torsión, sirviendo como punto de apoyo el verme en el sustrato. Esta estructura ha sido descrita anteriormente por Lee, 1965 y Jamuar.

1966 en Nippostrongylus brasiliensis y por Smith y Harness, 1972, en Haemonchus placei.

La corteza y la lámina matriz son acelulares y homogéneas. En esta última, a grandes aumentos, no hemos encontrado las bandas transversas de las que hablan Lee y Jamuar, y que parecen estar constituidas por fibras de colágeno. Por debajo de la matriz se localizan tres láminas fibrosas, acelulares y de distinta orientación. El mismo número señalan también Lee y Jamuar en N. brasiliensis; Bruce, 1970, en Trichinella spiralis; Colley, 1970, en Strongylöides myopotami, y Smith y Harness en Trichostrongylus colubriformis y H. placei.

Por debajo de las capas fibrosas se encuentra la hipodermis, con abundantes mitocondrias y glucógeno y escaso retículo endoplásmico y complejo de Golgi. Se supone que las mitocondrias situadas en esta región tienen un papel importante en la oxidación metabólica, mientras que otros complejos encargados de realizar la síntesis proteica existen en escasa cantidad. Wright y Bruce sugieren que la hipodermis puede actuar en el mantenimiento y en la elaboración de la cutícula. Las estructuras laminares observadas por nosotros en los cordones hipodermales, tiene alguna semejanza con las descritas por Wright en células glandulares de *Trichuris myocastoris*, si bien son mucho menos complejas.

La diferenciación de las células musculares en dos zonas, fibrilar y amiofibrilar, así como de dos tipos de miofilamentos de distinto grosor y distribución es semejante a la descrita en otros nematodos (Lee; Jamuar; Colley y Smith y Harness), si bien no hemos observado en nuestros cortes las bandas H, A, I y Z de las que habla Rosembluth, 1965. La presencia de gran número de mitocondrias en el sarcoplasma próximas a los lóbulos, hace suponer que juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo de la musculatura. En Ascaris lumbricoides, los gránulos de glucógeno se han visto en gran cantidad en la zona amiofibrilar e interfibrilar de las células musculares (Rosembluth). En O. circuncincta los gránulos de glucógeno los hemos observado con mayor profusión en el sarcoplasma. La musculatura, además de intervenir en los movimientos del nematodo, actuaría también regulando la presión hidrostática.

Los estudios iniciales sobre el epitelio intestinal de algunos nematodos, como los de Browne y Chowdhury, 1959, en *Ancylostoma caninum* y BECKET y BOOTHROYD, 1960, en larvas de *T. spiralis*, seña-

lan que el borde apical de la célula está constituido por estructuras ciliadas. Posteriormente Kessel et al., 1961, y Sheffield, 1964, sobre Ascaris suum; Browne, Miller, 1967, y C. C. Lee, 1969, sobre A. caninum; Wright, 1963, 1967, sobre Capillaria hepatica; Jamuar sobre N. brasiliensis; Jenkins et al., 1969, sobre Metastrongylus sp. y Smith y Harness sobre T. colubriformis y H. placei, encuentran que el borde apical de la célula intestinal está constituido por una serie de prolongaciones protoplasmáticas denominadas microvilli. El intestino de O. circuncincta tiene un borde microvillar bien desarrollado (un cuarto de la altura de la célula), y su estructura concuerda con la de las células intestinales de N. brasiliensis (Jamuar) y de T. colubriformis y H. placei (Smith y Harness).

Los gránulos pigmentados son de dos tipos: unos, esféricos, más numerosos, homogéneos, compactos y densos a los electrones, y otros menos numerosos, constituidos por formaciones concéntricas. Primitivamente se creyó que estaban formados por material inorgánico de deshecho, después se pensó en una sustancia intermedia entre la lipofuscina y la ceroidina y en la actualidad se le asigna un papel lisosómico. Los hallados por nosotros en O. circuncincta son semejantes, aparte de los descritos por Jamuar en N. brasiliensis y C. C. Lee en A. caninum. El estudio completo sobre la composición y función de los gránulos pigmentados será motivo de ulteriores investigaciones histoquímicas y electrónicas.

Las "zónulas ocludens" se han descrito anteriormente en casi todos los nematodos como elementos de unión entre dos células intestinales contiguas.

RESUMEN

Se estudia al microscopio electrónico la cubierta corporal y el epitelio intestinal de Ostertagia circuncincta.

En la cubierta corporal se distinguen cutícula, hipodermis y musculatura. La cutícula está constituida por ocho capas diferentes: membrana externa, corteza externa, corteza interna, lámina matriz, y tres láminas fibrosas que descansan sobre una última lámina basal. La hipodermis presenta una serie de prolongaciones citoplasmáticas que se engrosan en cuatro puntos concretos para formar los cordones hipodermales. Se describe una estructura laminar, piriforme, posiblemente de función secretora. La capa muscular está formada por células con dos porciones bien diferenciadas: una contráctil y fibrilar, con dos tipos de miofilamentos, y otra no contráctil, amiofibrilar, con gran cantidad de glucógeno y mitocondrias.

— 312 **—**

— 313 —

El intestino está constituido por una sola capa de células epiteliales de revestimiento, anchas y alargadas, que se asientan sobre una membrana basal adielectrónica y homogénea y que presentan en su borde libre una diferenciación característica: la microvilli. En esta microvilli se aprecia un corazón central que penetra hasta la membrana luminal (extensión radicular), una doble unidad de membrana y túbulos situados externamente a la membrana microvillar.

Las demás estructuras observadas en la célula intestinal son semejantes a las ya descritas en otros nematodos.

BIBLIOGRAFIA

- BECKETT, E. B. y BOOTRHOYD, B., 1960.—The ultrastucture of the "cilialike" processes in the midgut of Trichinella spiralis larvae. Proceeding of the European Regional Conference on Electron microscopy, Delft. 2: 938-941.
- BIRD, A. F., 1971.—The structure of nematodes. Academic Press. New York. Browne, H. G. y Chowdhury, A. B., 1959.—The ultrastucture of the intes-
- tinal wall of Ancylostoma caninum. Journal of Parasitology, 45: 241-247.
- Browne et al., 1965.—Further studies on the ultrastructure and histochemistry of the intestinal wall of *Ancylosoma caninum*. *Journal of Parasitology*, 51: 389-391.
- BRUCE, R. G., 1966.—The fine structure of the intestine and hindgut of the larva of *Trichinella spiralis*. Parasitology, 56: 359-365.
- BRUCE, R. G., 1970.—Trichinella spiralis: fine structure of the body wall with special reference to formation and moulting of cuticle. Experimental Parasitology, 28: 499-511.
- Colley, F. C., 1970.—Strongylöides myopotami: fine structure of the body wall and alimentary tract of the adult and third-stage larva. Experimental Parasitology, 28: 400-434.
- Jamuar, M. P., 1966.—Cytochemical and electron microscope studies on the pharynx and intestinal epithelium of Nippostrongylus brasiliensis. Journal of Parasitology, 52: 1116-1128.
- JENKINS, T. y Erasmus, D. A., 1969.—The ultrastructure of the intestinal epithelium of *Metastrongylus* sp. (Nematoda: Strongyloidea). *Parasitology*, 59: 335-342.
- Kessel, R. G. et al., 1961.—Cytological studies on the intestinal epithelium of Ascaris lumbricoides suum. Transactions of the American Microscopical Society, 80: 103-118.
- LEE, C. C., 1969.—Ancylostoma caninum: Fine structure of intestinal epithelium. Experimental Parasitology, 24: 336-347.
- LEE, D. L., 1965.—The cuticle of adult Nippostrongylus brasiliensis. Parasitology, 55: 173-181.
- LEE, D. L., 1966.—The structure and composition of the helminth cuticle.

 Advances in Parasitology, 4: 187-254.
- LEE, D. L., 1972.—The structure of the helminth cuticle. Advances in Parasitology, 10: 347-379.

- MILLER, J. H., 1967.—Fine structure of the striated border of the intestinal cells of Ancylostoma caninum. Journal of Parasitology, 53: 94-99.
- ROSEMBLUTH, J., 1965.—Ultrastructural organisations of obliquely striated muscle fibres in Ascaris lumbricoides. Journal of cell biology, 25: 495-515.
- SHEFFIELD, H. G., 1964.—Electron microscope studies on the intestinal epithelium of Ascaris suum. Journal of Parasitology, 50: 365-379.
- SMITH, K., 1970.—Electron microscopical observations on the body wall of the third-stage larvae of *Haemonchus placei*. Parasitology, 60: 411-416.
- SMITH, K. y HARNESS, E., 1971.—The fine structure of the alimentary tract of third-stage larvae of the Haemonchus placei and Trichostrongylus colubriformis. Parasitology, 62: 355-360.
- SMITH, K. y HARNESS, E., 1972.—The ultrastructure of the adult stage of Trichostrongylus colubriformis and Haemonchus placei. Parasitology, 64: 173-179.
- WRIGHT, K. A., 1963.—The cytology of the intestine of the parasitic nematode Capillaria hepatica. Journal of Ultrastructure Research, 9: 143-155.
- WRIGHT, K. A. y Jones, N. O., 1965.—Some techniques for the orientation and embedding of nematodes for electron microscopy. *Nematologica*, 11: 125-130.
- WRIGHT, K. A., 1967.—The fine structure of the cuticle and interchordal hypodermis of the parasitic nematodes Capillaria hepatica and Trichuris myocastoris. Canadian Journal of Zoology, 46: 173-188.
- ZAPATOSKY, J. E., 1971.—The cuticular ultrastructure of Paragordius varius (Leidy, 1851) (Gordioidea: Chordodiadae). Proceeding of the Helminthological Society of Washington, 38: 228-236.