Rev. Ibér. Parasitol., *54* (4), 1985, pp. 321-332

ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DE LA CERCARIA DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* (RUDOLPHI 1819) LOOS 1899

CANALS, A.; MARCOTEGUI, M. A.; TARAZONA, J. M.

I.N.I.A.

Departamento Higiene y Sanidad Animal
Embajadores, 68

28012 Madrid

(Recibido el 12 de Diciembre de 1984)

SUMMARY

Ultrastructural aspects of completely developed cercariae of *Dicrocoelium dendriticum* are described. The body wall is composed of a plasma membrane, a tegument with folds, certain electrondense inclusions and a muscular layer with circular and longitudinal fibres. The flame cell is a single cell structure; there is no evidence to suggest the presence of nephrostomes and no desmosomes were observed between ribs. Identic granules are present in the channels and the vesicle excretory walls; no microvilli were found in these areas.

Key Words: *Dicrocoelium dendriticum*; cercariae; body wall; flame cell; ultrastructure.

RESUMEN

Se describen distintos aspectos ultraestructurales de cercarias maduras de *Dicrocoelium dendriticum*. La pared corporal está formada por una membrana plasmática, tegumento con repliegues e inclusiones electrodensas y una capa muscular subtegumentaria con fibras longitudinales y transversales. Las células flamígeras aparecen como estructuras de una sola célula; no hemos encontrado poros organizados ni desmosomas entre las varillas. Se

observan granulaciones de naturaleza idéntica en las paredes de los canales y de la vesícula excretora. No hemos encontrado microvellosidades en ninguna de las dos zonas.

Palabras Clave: *Dicrocoelium dendriticum*; cercarias; pared corporal; célula flamígera; ultraestructura.

INTRODUCCION

Desde hace unos años ha ido creciendo el interés por las ultraestructuras de las formas juveniles de los trematodos. Podemos mencionar los trabajos de Zdarska [8, 9, 10, 11], Matthews [4] y Hoole et al.[3], utilizando la microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

La cercaria de *Dicrocoelium dendriticum* ha sido estudiada parcialmente por Zdarska [10], describiendo su estructura superficial con microscopía electrónica de barrido, y por Zdarska y Panin [12] investigando determinadas actividades enzimáticas e histoquímicas. Más recientemente Nesterenko et al.[5] han descrito la ultraestructura del tegumento al microscopio electrónico de transmisión.

El presente trabajo representa una contribución a los estudios ultraestructurales al microscopio electrónico de transmisión de la cercaria de *Dicrocoelium dendriticum.*

MATERIAL Y METODOS

El material fue obtenido de caracoles terrestres, *Cernuella cespitum* (Schmidt, 1875) (Gastropoda, Helicidae), infestados naturalmente. Las cercarias se encontraban totalmente desarrolladas y se recogieron a partir de las "bolas de mucus" eliminadas por los caracoles en condiciones de laboratorio. Fueron fijadas durante una hora en glutaraldehido al 6% en Buffer Milloning, y postfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante una hora. Después de una deshidratación en serie de etanol, se incluyeron en Epon-Araldite. Los cortes se obtuvieron con ultramicrotomo Sorvall-MT2-B, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio Jeol 100-B.

RESULTADOS

Los cortes obtenidos de las "bolas de mucus" contenían cercarias en el mismo estadío de desarrollo. El estudio comparado de las imágenes de las cercarias cortadas en distintos planos y orientaciones nos ha permitido hacer una reconstrucción general de diferentes estructuras de la cercaria de *Dicrocoelium dendriticum.*

Pared Corporal

La pared corporal está formada por una membrana plasmática y tegumento (Figura 1). La membrana plasmática es densa, contínua y está adosada a la cara superficial del tegumento, el cual presenta numerosos repliegues hacia el interior y gran cantidad de inclusiones fuertemente densas a los electrones. Una membrana basal separa el tegumento del tejido conectivo subtegumentario fibroso. La capa muscular adyacente presenta dos tipos de fibras musculares, las más externas transversalmente dispuestas y longitudinalmente las más internas. (Figura 1). La superficie más externa de la pared está recubierta por una sustancia amorfa que denominaremos glucocáliz. En la periferia de la ventosa oral se

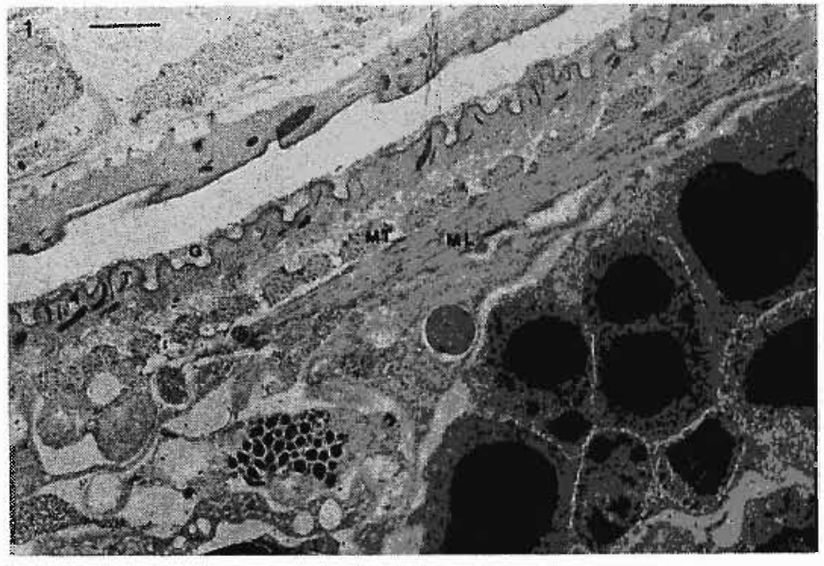


Figura 1.—Corte transversal de la pared corporal: G: glucocáliz. ML: fibras musculares transversales. T: tegumento. Marca= 1 micra.

pueden apreciar microvellosidades (Figura 2), y en distintas zonas de la pared de la cercaria surcos tegumentarios (Figura 3).

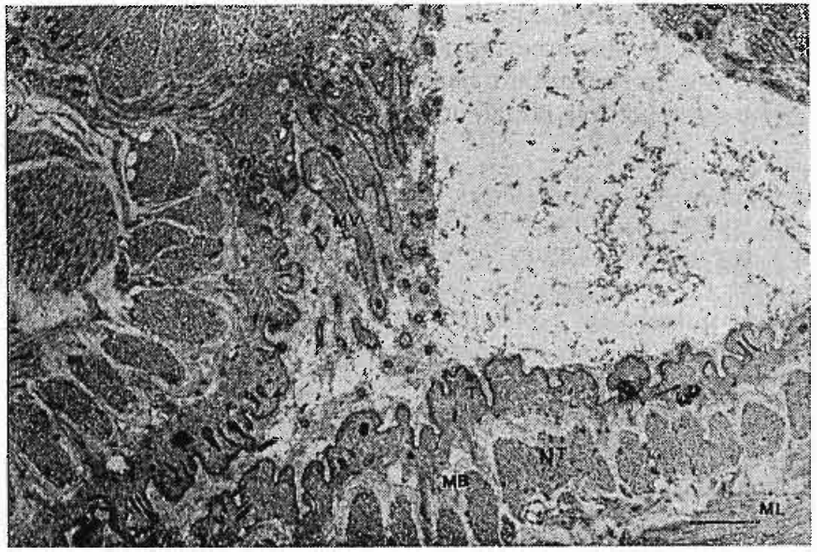


Figura 2.—Tegumento en la periferia de la ventosa oral. MT: fibras musculares transversales. ML: fibras musculares longitudinales. MB: membrana basal. MV: microvellosidades. T: tegumento. Marca= 1 micra.

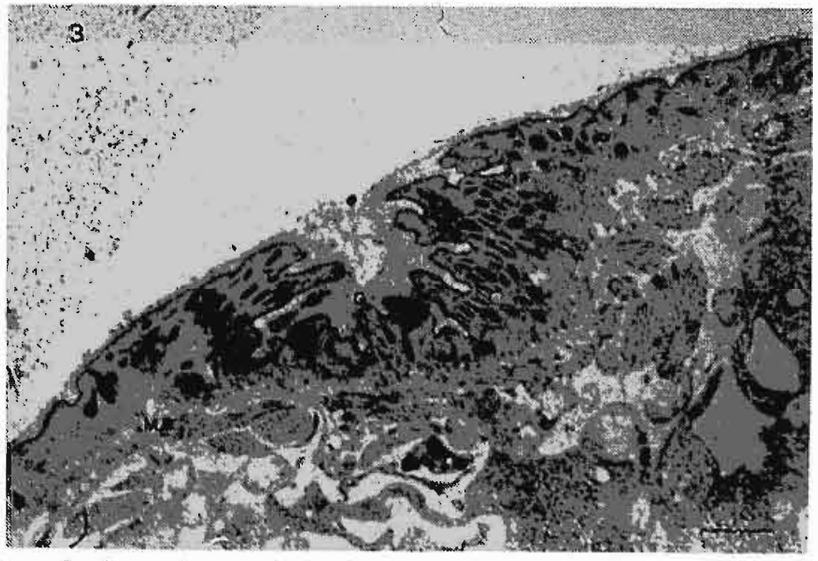


Figura 3.—Surco tegumentario de la pared corporal. G: glucocáliz. MB: membrana basal. T: tegumento. Marca= 1 micra.

Célula Flamígera

La célula flamígera se compone de tres zonas estructuralmente distintas; zona basal, media y distal (Figura 4).

— Zona Basal; presenta un núcleo relativamente grande, citoplasma poco denso que contiene ribosomas, mitocondrias, vacuolas y proyecciones citoplásmicas alargadas. Una estrangulación separa el área citoplásmica nuclear del área que contiene los cuerpos basales de los cilios, presentes en número variable, de 40 a 46 en las células observadas (Figura 4).



Figura 4.—Corte longitudinal de una célula flamígera. C: cilios. CB: cuerpos basales. M: membrana. MI: mitocondrias. L: prolongaciones de las varillas. P: prolongaciones citoplásmicas. N: núcleo. V: vacuolas. VE: varillas externas. VI: varillas internas. Marca= 1 micra.

— Zona Media; es inmediata a los cuerpos basales. Corresponde al principio del canal, formado por un conjunto de varillas citoplásmicas internas y externas dispuestas alternadamente, en cuyos espacios intermedios se observa una membrana contínua

(Figura 5), existen proyecciones citoplásmicas de ambos tipos de varillas. En el interior del canal se encuentran los cilios agrupados en un haz compacto.

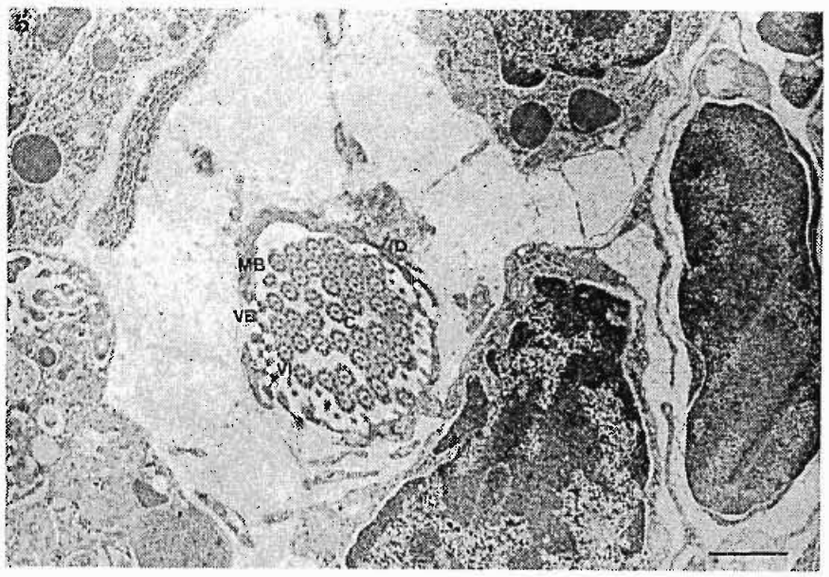


Figura 5.—Corte transversal zona media de una célula flamígera. C: cilios. D: desmosoma. MB: membrana. VE: varillas externas. VI: varillas internas. Marca= 1 micra.

— Zona Distal; más arriba de la zona de las varillas el canal aparece como una vaina citoplásmica contínua limitada por dos membranas, con una superficie interna globular y otra externa granular en la que pueden verse mitocondrias (Figura 6). La apariencia es la de una célula plana, enrollada sobre sí misma y unidos los dos extremos por un desmosoma (Figura 6) para formar el canal, envolviendo el paquete de cilios centrales.

Canales y Vesícula Excretora

Los canales y vesícula excretora tienen una estructura similar. La luz del canal está limitada por un grupo de células cuboidales de tipo epitelial, con granulaciones electrodensas (Figura 7). Esta formación de células se asemeja a un epitelio cuboide monoestra-

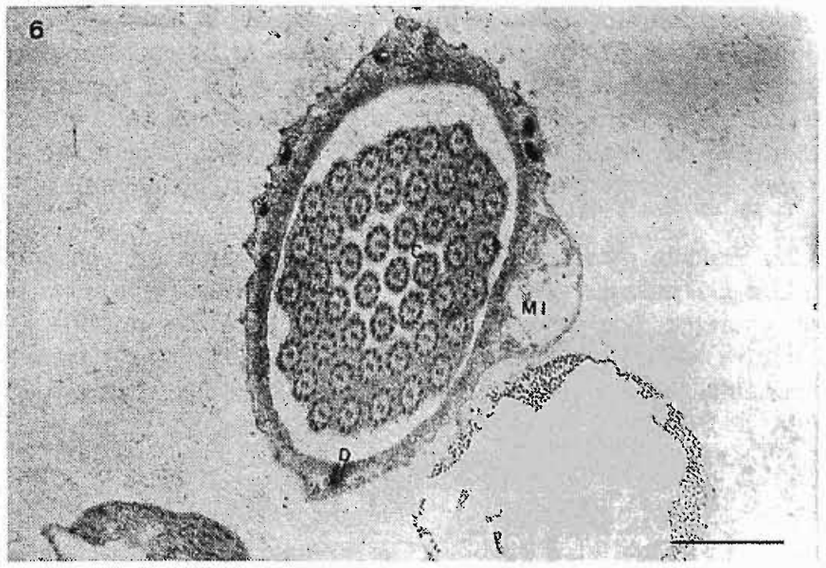


Figura 6.—Corte transversal zona distal de una célula flamígera. C: cilios D: desmosoma. MI: mitocodria. Marca= 1 micra.

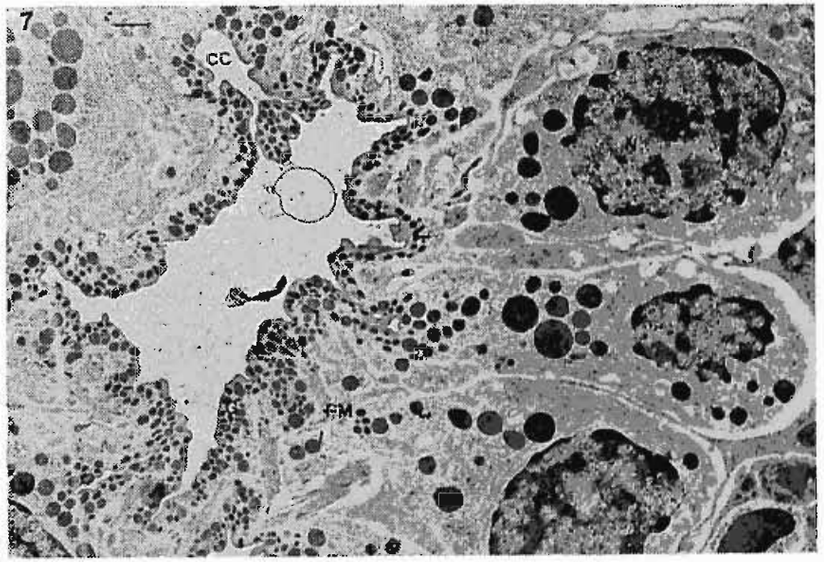


Figura 7.—Luz del canal excretor. CC: canalículos colectores. FM: fibras musculares. N: núcleo. Marca= 1 micra.

tificado con amplios espacios intercelulares. En la zona apical del epitelio (Figura 7) se aprecia la presencia de haces musculares dispuestos perpendicularmente, semejantes a los del tegumento, que podrían actuar como activadores de un hipotético movimiento peristáltico del canal. Al canal excretor confluyen canalículos colectores que parecen formados por el mismo tipo de células (Figura 7).

La vesícula excretora está limitada por células de tipo epitelial, con las mismas granulaciones que las células limitantes del canal excretor. Los espacios intercelulares son más amplios y la estructura muscular es notablemente más discreta (Figura 8). La vesícula se continúa con el poro excretor de estructura tegumentaria. Se observa la presencia de complejos de unión entre las células de la vesícula y del poro excretor.

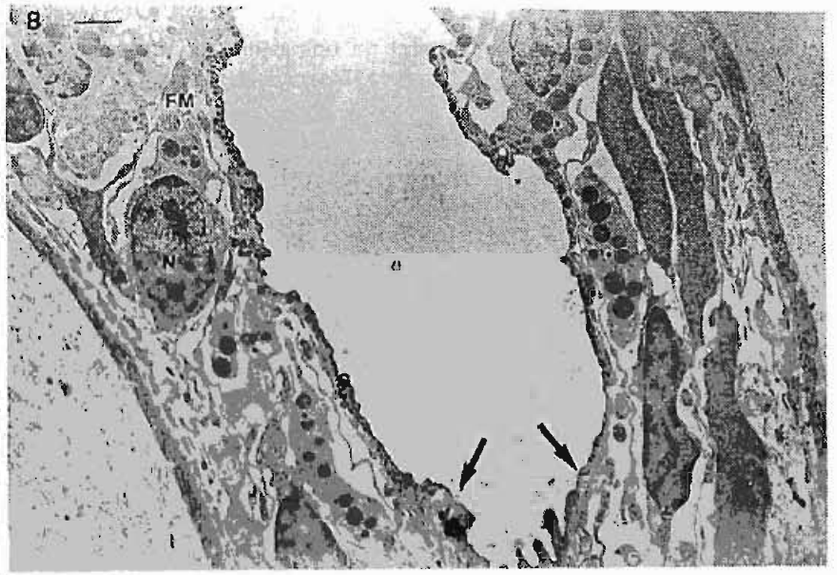


Figura 8.—Luz de la vesícula excretora. FM: fibras musculares. N: núcleo. FLECHAS: discontinuidades con el poro excretor. Marca= 2 micras.

Zona Caudal

En la unión entre el cuerpo de la cercaria y la cola se observa una continuidad de la capa muscular subtegumentaria de la pared del cuerpo con la de la cola (Figura 9). La pared caudal es más fina y simplificada, con el tegumento apenas con repliegues. En el interior de la cola no se observan estructuras funcionales ni orgánulos, solamente un material amorfo poco denso y los restos de estructuras membranosas irregularmente repartidas.

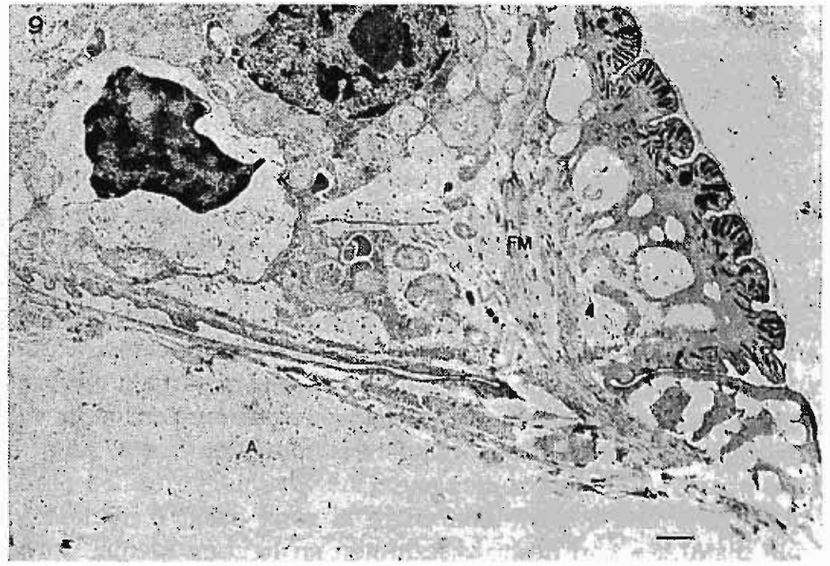


Figura 9.—Detalle de la unión entre el cuerpo de la cercaria y la cola. A: material amorfo. FM: fibras musculares. T: tegumento. Marca = 1 micra.

DISCUSION

La pared corporal de la cercaria de *Dicrocoelium dendriticum* es similar a las descritas en otros trematodos digenéticos, y coincide con las observaciones de Nesterenko et al.[5]. La gran cantidad de repliegues en la membrana plasmática externa del tegumento podría interpretarse como un incremento de la superficie de intercambio; se han descrito vesículas en el tegumento de naturaleza

secretora, que descargan en su superficie en un proceso previo al enquistamiento (Matthews [4]; Higgins [2]) y se ha supuesto también una misión de absorción de nutrientes a través del tegumento (Fujino [1]). Contradictoriamente observamos una estructuración no dinámica, sin vesículas y carente de mitocodrias. En el caso de la pared caudal, su estructuración más simplificada podría corresponderse con la pérdida de significación de la cola, como órgano de locomoción, en esta cercaria. Zdarska [10] al microscopio electrónico de barrido no detectó terminales sensoriales en la superficie de la cola, presentes en otras cercarias que se mueven por natación en el ambiente. El mismo autor describe papilas y tubérculos en la parte anterior del cuerpo de la cercaria; en los cortes efectuados por nosotros no hemos podido encontrar ningún tipo de terminal sensorial.

Las células flamígeras se describieron inicialmente como estructuras de una sola célula, con unas características que en general coinciden con las observadas por nosotros. Este concepto fue modificado por Wilson [7], describiéndolas como un agregado de dos células unidas en la zona media mediante desmosomas situados entre las varillas. En oposición a este concepto, Rohde [6] opina que se trata de una única célula, ya que observa continuidad entre las varillas internas y externas, la zona nuclear y la vaina citoplásmica. Nuestras observaciones confirman esta idea. No hemos observado desmosomas entre las varillas, y nuestro parecer es que existe una continuidad entre la zona basal o nuclear y el túbulo distal. Se han descrito, también en la zona media, poros o nefrostomas, proponiéndose como lugar de ultrafiltración. Wilson [7] no observa poros, y supone que la filtración se realizaría a través de los desmosomas que unen cada varilla con su vecina. Nuestras observaciones confirman las ideas de Rohde [6], en el sentido de la ausencia de poros. En nuestro estudio en las zonas de separación entre las varillas internas y externas solamente existe la membrana y coincidimos con Rohde [6] al pensar que estas simplificaciones de la estructura podrían actuar de forma de poros, permitiendo la "filtración por presión" sugerida por distintos autores. Las prolongaciones citoplásmicas internas observadas en la zona media mantendrían un espacio de separación entre los cilios y las varillas, de manera que pudieran circular los fluidos (Wilson [7]). La continuidad y similitud entre las granulaciones que limitan los

canales y la vesícula excretora, y las granulaciones citoplásmicas de las células que los forman, nos hace pensar en una elaboración celular de naturaleza secretora. Al sistema protonefridial se le atribuyen funciones de excreción y osmorregulación, de esta forma los líquidos filtrados en las células flamígeras podrían ser modificados mediante reabsorción selectiva (Wilson [7]). Nosotros no hemos encontrado microvellosidades ni en los canales ni en la vesícula. Según nuestras observaciones nos parece más lógico pensar en un papel de secreción más que en uno de reabsorción selectiva. No es posible afirmar esto sólo con estudios morfológicos, pero una actividad secretora selectiva podría estar relacionada con su función osmorreguladora.

REFERENCIAS

1. Fujino, T.; Ishii, Y.; Choi, W. D.—Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis siniensis* newly excysted juveniles and adult worms. *J. Parasitol., 65*, 1979, 579-590.
2. Higgins, J. C.—Formation of the cyst wall and related changes in the structure of the tegument of *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) during its metamorphosis from the cercarial to the metacercarial stage. *Parasitology, 81*, 1980, 47-59.
3. Hoole, D.; Mitchell, J. B.; Masona, R.—Ultrastructural observations on the penetration glands of *Gorgoderina vitellilova* (Digenea; Gorgoderidae). *J. Parasitol., 13*, 1983, 83-90.
4. Matthews, B. F.—*Cercaria vaullegardi*, Pelsener 1906 (Digenea; Hemiuridae); developed and ultrastructure. *Parasitology, 83*, 1981, 575-586.
5. Nesterenko, L. T.; Zdarska, Z.; Fedosenko, V. M.—Ultraestructura del tegumento del esporoquiste y cercaria del trematodo *Dicrocoelium dendriticum* (en ruso). *Nauka*, 1981, 156-162.
6. Rohde, K.—The flame cells of a Monogenean and Aspidogastrean, not composed of two interdigitating cells. *Zool. Anz. Jena, 209*, 1982, 311-314.
7. Wilson, R. A.—The fine structure of the protonephiridial system in the miracidium of *Fasciola hepatica. Parasitology, 59*, 1969, 461-467.
8. Zdarska, Z.—The gland cells of the cercaria of *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) and the cyst wall of its adolescaria. *Folia Parasitol. (Praha), 17*, 1970, 31-47.

9. Zdarska, Z.—The cystogenic gland cells of the cercaria of *Philophtalmus* sp. *Folia Parasitol. (Praha), 18*, 1971, 119-125.

10. Zdarska, Z.—Scanning electron microscopy of the cercaria of *Dicrocoelium lanceatum. Folia Parasitol. (Praha), 24*, 1977, 265-267.

11. Zdarska, Z.—Histochemistry of the cercariae and sporocyst of *Dicrocoelium lanceatum. Folia Parasitol. (Praha), 26*, 1979, 35-38.

12. Zdarska, Z.; Panin, V. Ya.—Activity of some enzymes in the sporocyst and cercariae of *Dicrocoelium lanceatum* and *Eurytrema pancreaticum. Folia Parasitol. (Praha), 24*, 1977, 117-121.