

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS GLICEROMONO-  
NOFOSFATASAS EN LOS PLATELMINTOS  
PARASITOS

POR

*José M. Tarazona Vilas*

Veterinario. Prof. del Centro Medio y Profesional de Barbastro (Huesca)

Escasas y contradictorias, en ocasiones, son las investigaciones realizadas en torno a las gliceromonofosfatasas de los animales parásitos y, concretamente, de los Platelminotos.

Utilizando métodos bioquímicos, Pennoit-De Cooman y Van Grembersen (1942 y 1947) han realizado estudios sobre *Fasciola hepática*, *Moniezia* sp. y *Taenia pisiformis* y su larva (*Cysticercus pisiformis*), encontrando que cada especie posee un enzima que trabaja a un pH característico, no coexistiendo en una misma especie dos fosfatasas distintas, mientras que, por el contrario, pueden hallarse en platelmintos de vida libre y siendo diferentes por su pH óptimo los fermentos de *T. pisiformis* y de su estado larvario. Sanz Sánchez, Castella y Varela (1952) estudian, entre las de otras especies, las fosfatasas de *M. expansa*, *Anoplocephala magna* y *F. hepática*, siendo sus resultados contradictorios en parte con los de los autores anteriores, pues demuestran la presencia de ambas fosfatasas ácida y alcalina en dichos parásitos, si bien existe predominio de una sobre otra. En *M. expansa* y *A. magna* la alcalina predomina sobre la ácida, mientras que en *F. hepática* sucede lo contrario.

Rogers (1947) y Yamao (1952 a, b y c) han seguido técnicas histoquímicas en el estudio de estos enzimas. Rogers localiza la fosfatasa alcalina en la cutícula de *Moniezia* sp., únicamente en los anillos maduros, pudiendo observarse alguna actividad en los lugares de formación de los huevos. Yamao, en trabajos inasequibles para nosotros, ha estudiado las fosfatasas de *Anoplocephala perfoliata*, *A. magna*, *Moniezia benedeni*, *M. expansa*, *Taenia taeniformis*, *Eurytrema coelomaticum*, *E. pancrea-*

*ticum*, *Dicrocoelium dendriticum* y *Clonorchis sinensis* y en varias larvas de cestodes. En los cestodes, ambos fermentos estaban localizados en las capas cuticular y subcuticular y, a excepción de *T. taeniformis*, la fosfatasa alcalina se demostraba en el epitelio del conducto excretor. En los tres primeros trematodes la actividad fosfatásica alcalina se manifiesta en la pared del cuerpo y en los canales excretores, y la misma localización tiene la ácida, la que da reacciones menos intensas en los dos *Eurytrema*. En *D. dendriticum* predomina la ácida, localizándose en las fibras mesenquimatosas y en sus núcleos, no pudiendo demostrar fosfatasas alcalinas en *C. sinensis*.

Nada se conoce hasta el momento del papel desempeñado por estos fermentos en los seres parásitos, admitiendo Von Brand (1952) la posibilidad de que intervengan en el metabolismo de los hidratos de carbono.

En el presente trabajo damos cuenta de los resultados que hemos obtenido en una serie de determinaciones por métodos histoquímicos de las fosfatasas de las especies *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepática*, *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum* y *Taenia pisiformis*.

#### MATERIAL Y TÉCNICAS

*Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepática* y *Moniezia expansa* fueron recogidos sobre óvidos carnizados en el Matadero de Barbastro (Huesca). El cestode fué fijado inmediatamente después de su separación del intestino. Los hígados parasitados por los dos trematodes se cortaban en trozos de 3-4 cm. de anchura y por compresión se extraían los vermes de los conductos biliares, lavándolos en agua y fijándolos seguidamente. Aunque se procuró tardar el menor tiempo posible, en ocasiones no fueron fijados hasta después de 4 ó 5 horas, comprobando en este caso la vitalidad de los ejemplares.

*Taenia pisiformis* y *Dipylidium caninum* se obtuvieron del intestino de un perro eutanasiado con éter y se fijaron inmediatamente después.

La fijación se realizó, en todos los casos, en tres cambios de acetona enfriada a 4-6° C., permaneciendo 15-20 minutos en cada cambio, conservando los ejemplares en otra acetona a la temperatura ambiente y en la oscuridad.

Al preparar el material para los cortes, se hidrataron por pase por alcoholes hasta agua destilada, ejemplares completos de trematodes o varios proglotis de distintos puntos del estró-bilo en los cestodes.

Se hicieron cortes por congelación, transversales y longitudinales, abandonando estos últimos al observar eran poco demostrativos. Los cortes de 50-100  $\mu$  se llevaron a un portaobjetos con una gota de agua en su centro, procurando quedaran en la mejor extensión. Con papel chupón se eliminaba el agua y se lograba la adherencia de las secciones al porta dejándolos 2-3 horas a las temperaturas de la habitación (14-18° C.) o, con más frecuencia, por permanencia en la estufa a 40° C. durante quince-veinte minutos.

Las técnicas para la demostración de los fermentos fueron las de Gomori tomadas de las descripciones de Pearse (1954). Hemos ensayado la actividad a dos pH distintos, 5 y 9. Como sustrato para ambos fermentos hemos utilizado el glicero-fosfato sódico y como tampones el dietil-barbiturato de sodio para la fosfatasa alcalina y el de acetatos de Walpole para la ácida. En la primera se utilizaron como activadores iones de magnesio.

La demostración del fosfórico desdoblado se hizo siguiendo el proceder de Gomori del sulfuro de cobalto para la gliceromonofosfatasa alcalina y las del precipitado del sulfuro de plomo para la ácida.

Los tiempos de incubación en el medio sustrato fueron de 2 horas para la fosfatasa alcalina y de 4 horas para la ácida. Como coloración contraste se utilizó la eosina al 1 por 100.

En todos los casos se utilizaron como testigos cortes de cada anillo, sobre los que se practicaron todos los puntos de las técnicas a excepción de la incubación en el sustrato.

Las preparaciones se examinaron al microscopio a pequeños y fuertes aumentos y las microfotografías han sido obtenidas con películas pancromáticas.

## RESULTADOS

*Dicrocoelium dendriticum*.—(Lámina I, fig. 1).

Con las técnicas utilizadas, no hemos observado en esta especie zonas de actividad fosfatásica ni a pH=5 ni a pH=9. A pequeños aumentos no aparecen zonas de actividad y el examen

a fuertes aumentos no descubre en las células de los diferentes tejidos señales de actividad fosfatásica. Las únicas zonas de color castaño que aparecen corresponden a las células de las glándulas vitelógenas, pero se observa la misma coloración en las preparaciones de las secciones testigo.

*Fasciola hepática*.—(Lámina I, figs. 2 a 5).

La fosfatasa alcalina presenta una actividad moderada en los testículos, perfectamente distinguible de la coloración propia de las glándulas vitelógenas. No existen otros puntos de actividad, ni siquiera intracelulares.

La gliceromonofosfatasa ácida está localizada exclusivamente en las paredes de las ramificaciones de los ciegos. La reacción es extraordinariamente activa, siendo visible en toda la longitud del verme. El resto de los tejidos no presenta zonas de actividad.

*Moniezia expansa*.—(Lámina I, figs. 6 a 8, y Lám. II, fig. 1).

La fosfatasa alcalina de *Moniezia expansa* se halla localizada en la cutícula o subcutícula y en las glándulas interproglotidianas, dando intensas reacciones en dichos puntos en los proglotis sexualmente maduros. A lo largo del estróbilo la actividad es diferente, disminuyendo conforme alcanzan la gravidez, siendo muy escasa o nula en los últimos anillos que comienzan a desprenderse y que contienen huevos completamente formados. En el resto de los tejidos del verme no puede apreciarse actividad ni aun intracelular.

La fosfatasa ácida tiene la misma localización, pero su actividad es menos intensa cualquiera que sea la región del estróbilo examinada, pareciendo ser, sin embargo, más marcada en los anillos maduros que en los grávidos.

*Dipylidium caninum*.—(Lámina II, figs. 2 a 5).

La actividad fosfatásica alcalina está localizada en este ceste en cutícula y subcutícula. La reacción no tiene la misma intensidad a lo largo del estróbilo. Es débil y aun nula en los anillos inmaduros y se hace intensa en los sexualmente maduros y en los grávidos. Los corpúsculos calcáreos se colorean de negro también intensamente, aunque con menor intensidad que en la ácida.

La fosfatasa ácida queda exclusivamente localizada a zonas

pequeñas situadas entre los huevos de las cápsulas uterinas y presenta actividad moderada.

*Taenia pisiformis*.—(Lámina II, figs. 6 a 10).

La actividad fosfatásica alcalina se localiza en cutícula y subcutícula, preferentemente en ésta, poseyendo actividad bastante intensa en los anillos sexualmente maduros, pero siendo la reacción de mayor intensidad en los grávidos.

La gliceromonofosfatasa ácida tiene la misma localización que la alcalina, comportándose idénticamente en cuanto a intensidad, pero poseyendo la misma en los proglotis sexualmente maduros y en los grávidos. Con actividad bastante acentuada se observa en el epitelio de la vagina y en el del extremo distal del canal del cirro. Con caracteres difusos, hay actividad entre las células del parénquima. Los corpúsculos calcáreos dan reacción fuerte.

#### DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

No hemos encontrado datos sobre determinaciones de fosfatasas por métodos bioquímicos en *Dicrocoelium dendriticum*. Yamao (1952 a) localiza la fosfatasa alcalina en la cutícula y en las paredes de los canales excretores, obteniendo reacciones fuertemente positivas y recoge reacciones positivas para la ácida en la mayor parte de los tejidos y de manera particular en las fibras mesenquimatosas y en sus núcleos.

Frente a estos resultados aparecen los nuestros, habiéndonos dado ambos fermentos reacciones negativas en todas las preparaciones realizadas con secciones de los distintos tercios del verme. No habiendo podido consultar el trabajo del autor japonés, desconocemos el método por él seguido y los pH a los que trabajó. Aparecen como contradictorias las dos observaciones, siendo necesarias nuevas investigaciones para aclarar este punto.

La actividad fosfatásica en *Fasciola hepática*, en las observaciones de Pennoit-De Cooman y Van Grembergen (1942), se inicia a un pH menor de 2 alcanzando a pH=5 la máxima actividad con 9,6 gammas de fósforo liberado, decreciendo la actividad hasta desaparecer a un pH próximo a 9. La fosfatasa se inhibe por el fluoruro de sodio y no es activada por los iones de magnesio. Las observaciones de Sanz Sánchez, Castella y Varela (1952) encuentran a la fosfatasa ácida una actividad media

de 325 unidades Bodansky por 100 gramos de órgano, mientras que la alcalina sólo llega a alcanzar 19,5 unidades de media, observando gran número de reacciones negativas. Estas reacciones con métodos bioquímicos son en todo coincidentes con nuestras determinaciones histoquímicas. La comparación de nuestras microfotografías permite apreciar la intensidad de la reacción de la fosfatasa ácida y la moderada actividad fosfatásica alcalina, únicamente observable en los testículos del trematode. Es notable en nuestros resultados la ausencia de actividad fosfatásica en la cutícula de este verme, en contraste con la localización principal observable en los cestodes.

Pennoit-De Cooman y Van Grembergen (1942), investigando las fosfatasas de *Moniezia* sp., determinan que la actividad se inicia a pH por debajo de 4, para alcanzar el máximo (de casi 10 gammas de fósforo liberado) a pH=8, anulándose entre pH 9 y 10. Sus propiedades difieren marcadamente de las de los enzimas de *F. hepática*, pues se activa por la presencia de iones de magnesio, no se inhibe por el fluoruro de sodio y sí por el cianuro de potasio en presencia de magnesio, pareciendo, por tanto, una fosfatasa alcalina típica de mamífero. Las investigaciones de Sanz Sánchez, Castella y Varela (1952) con *M. expansa*, señalan una extraordinaria actividad de la fosfatasa alcalina, que llega a alcanzar una media de 862 unidades Bodansky por 100 grs. de tenia, con un máximo de actividad de 2.272 u. B., cifra raramente hallada en órganos de animales superiores y que coincide con las elevadas cifras encontradas por los autores anteriores. La fosfatasa ácida es mucho menos abundante que la alcalina, alcanzando una media de 186 u. B. Las observaciones de Rogers (1947) localizan la fosfatasa alcalina, en una *Moniezia* no determinada, únicamente en la cutícula de las proglotis maduros y en la vecindad de los huevos en desarrollo. Coinciden estas observaciones con las de Yamao (1952 b), quien aprecia actividad fosfatásica ácida y alcalina en la cutícula y subcutícula y, además en el epitelio de los conductos excretores. De acuerdo con Yamao, es más intensa la actividad de la fosfatasa alcalina y coincidimos con Rogers en la diferente de los proglotis, señalando que los que se encuentran grávidos y en vías de desprendimiento, es decir, los últimos del proglotis, han perdido la actividad o se manifiesta muy escasa. La misma localización y acti-

vidad señala Yamao para *M. benedeni*, especie muy próxima sistemáticamente.

No conocemos se hayan investigado por método alguno las fosfatasas de *Dipylidium caninum* ni de alguna otra especie próxima. En nuestras observaciones, la fosfatasa alcalina se localiza, como en los otros cestodes, en los tejidos cuticular y subcuticular, aumentando conforme los proglotis alcanzan la madurez. La fosfatasa ácida no se demuestra en cutícula y subcutícula y sólo da reacciones positivas entre los huevos de las cápsulas uterinas, siendo ésta la única especie de cestode estudiado que carece de actividad en este fermento en la cutícula.

Son especialmente curiosos los resultados obtenidos por Pennoit-De Cooman y Van Grembergen (1942) sobre *T. pisiformis* y su estado larvario, hallando que sus respectivos fermentos difieren en el punto de pH a que presentan su máxima actividad, que se halla en el lado ácido para la larva y en el alcalino para la tenia adulta, suponiendo que la transformación debe tener lugar en algún momento del ciclo evolutivo y de una manera brutal. Los mismos autores (1947) no hallan restos de actividad fosfatásica ácida en los escolex ni en los proglotis jóvenes de esta especie. Nuestras observaciones parecen ser las primeras que han empleado técnicas histoquímicas. Como resultado de ellas demostramos la presencia de ambos enzimas en los tejidos cuticular y subcuticular, con la misma intensidad en los anillos maduros y grávidos para la ácida y más intensa en los ovíferos para la alcalina. Hay actividad fosfatásica ácida en los epitelios vaginal y del canal del cirro, siendo esta especie la única que nos la ha presentado en tales lugares, que Yamao no ha señalado para otras especies.

#### RESUMEN

Utilizando técnicas histoquímicas descritas por Gomori, ha sido estudiada la localización de las gliceromonofosfatasas en *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum* y *Taenia pisiformis*.

No ha podido señalarse actividad en *D. dendriticum* en substratos tamponados a pH 5 y 9. *Fasciola hepatica* posee actividad fosfatásica alcalina moderada en los tejidos testiculares y ácida muy intensa en las paredes de las ramificaciones intestinales. En los tres cestodes estudiados, la fosfatasa alcalina se sitúa en las zonas cuticular y subcuticular, variando para cada especie su distribución en los anillos en distinto momento de evolución.

*M. expansa* y *T. pisiformis* presentan actividad del enzima ácido en los mismos lugares, mientras que en *D. caninum* únicamente está localizado en el interior de las cápsulas uterinas. En *T. pisiformis* hay, además, actividad de este fermento en los epitelios vaginal y del canal del cirro.

Se discuten estos resultados con los obtenidos por otros autores con métodos bioquímicos e histoquímicos.

### S U M M A R Y

By means of Gomori's histochemical technics we have studied the localization of the glycerol-mono-phosphatases in *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum* and *Taenia pisiformis*.

We have not been able to discovery activity in *Dicrocoelium dendriticum*, in buffered substrates to pH 5 and 9. *Fasciola hepatica* possesses moderate amounts of alkaline phosphatasic activity in testicular tissues, an the acid phosphatasic activity is very intens in the walls of the branches of intestine.

In the three cestodes studied, the alkaline phosphatase is situated in the cuticular and subcuticular zones, varying for every species its distribution in the proglottis in moments distinct of evolution. *Moniezia expansa* and *Taenia pisiformis* present activity of the acid enzyme in the same places, when in *Dipylidium caninum* is localized only in the interior of the uterine capsules. In *Taenia pisiformis* is, moreover, activity of this ferment in the epithelium vaginal and of the cirrus channel.

Are discuted this results with the obtained by other authores with biochemical and histochemical methods.

### BIBLIOGRAFIA

- PEARSE, A. G. E. 1954.—Histochemistry theoretical and Applied.  
PENNOIT-DE COOMAN, E., y VAN GREMBERGEN, G. 1942.—*Verhadel. Koninkl. Vlaam. Acad. Wetenschap. Belg. Klasse Wetenschap*, 4, 7-77.  
PENNOIT-DE COOMAN, E., y VAN GREMBERGEN, G. 1947.—*Natuurw. Tijdschr. Belg.*, 29, 9-12.  
ROGERS, W. P. 1947.—*Nature*, 159, 374.  
SANZ SÁNCHEZ, CASTELLA, E., y VARELA, G. 1952.—*An. Fac. Veterinario. Madrid*, 6, 368-382.  
YAMAO, Y. 1952.—*J. College Arts. Sciem. Chiba University*. (En *Helminthological Abstracts*.)  
YAMAO, Y. 1952b.—*Zoological Magazine. Tokyo*. (En *Helminthological Abstracts*.)  
YAMAO, Y. 1952c.—*Zoological Magazine. Tokyo*. (En *Helminthological Abstracts*.)

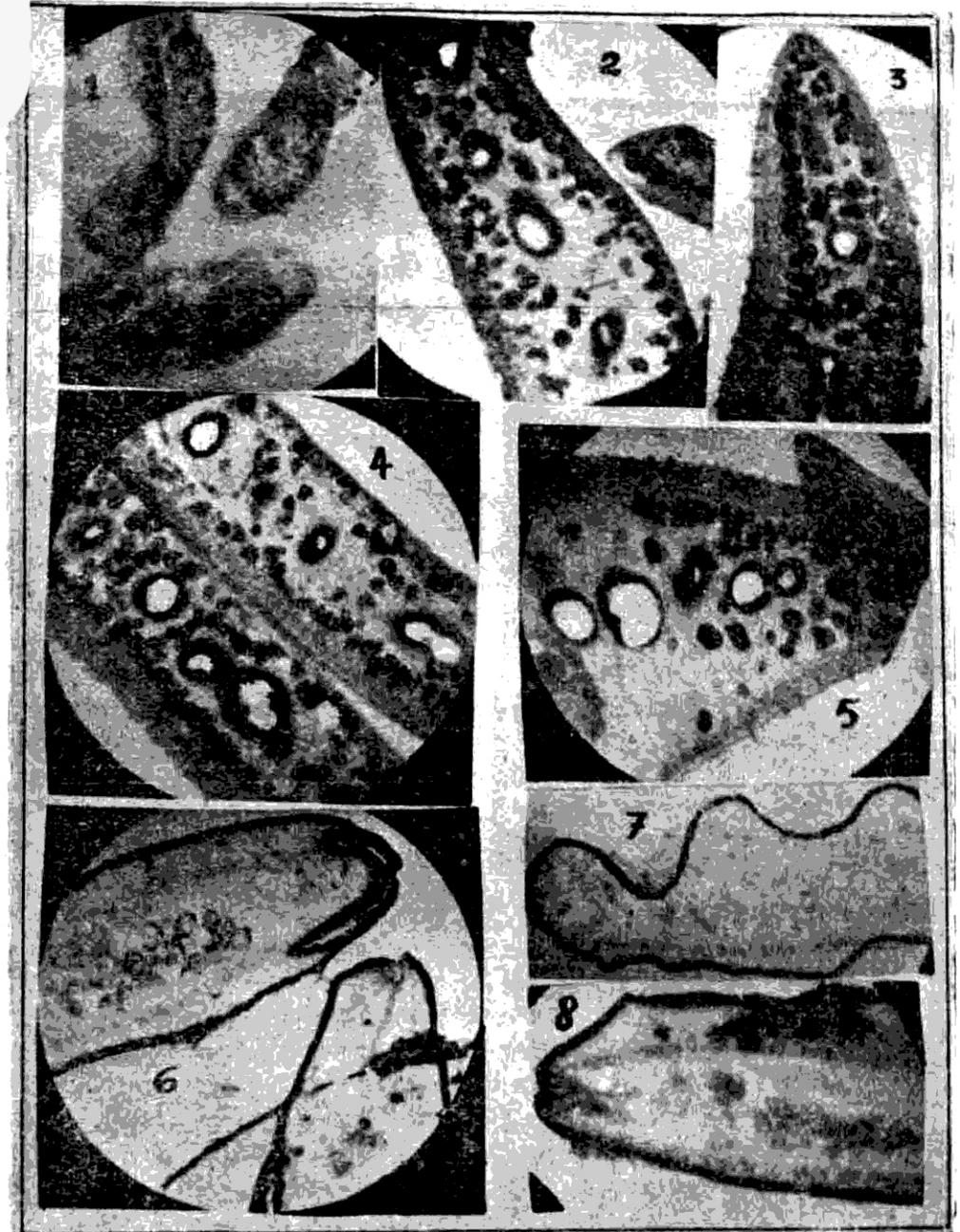


LÁMINA I

- 1.—*Dicrocoelium dendriticum*.—Ausencia de actividad fosfatásica.  
2 y 3.—*Fasciola hepática*.—Localización de la fosfatasa alcalina.  
4 y 5.—*Fasciola hepática*.—Localización de la fosfatasa ácida.  
6 y 7.—*Moniezia expansa*.—Localización de la fosfatasa alcalina.  
8.—*Moniezia expansa*.—Localización de la fosfatasa ácida.



LÁMINA II

- 1.—*Moniezia expansa*.—Localización de la fosfatasa ácida.  
 2, 3 y 4.—*Dipylidium caninum*.—Localización de la fosfatasa alcalina.  
 5.—*Dipylidium caninum*.—Localización de la fosfatasa ácida.  
 6 y 7.—*Taenia pisiformis*.—Localización de la fosfatasa alcalina.  
 8, 9 y 10.—*Taenia pisiformis*.—Localización de la fosfatasa ácida.