

Ultraestructura del tegumento de la metacercaria, juvenil y adulto de *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae)

Feliciano Segovia-Salinas, Fernando Jiménez-Guzmán, Gloria Carranza-Imperial, Lucio Galaviz-Silva y Enrique Ramírez-Bon

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apartado Postal 143-F, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66451.

(Rec. 6-III-1992. Acep. 27-X-1992)

Abstract: The integuments of metacercariae, juveniles and adults of *Clinostomum complanatum* are described. The metacercariae have a large number of invaginations and below these a great number of vesicles. The surface of the integument is covered with microvilli in the young worm of 3-4 days and in the adult of 8 days postinfection. The mitochondria were found in the basal lamina and its bridges; they are round, oval or elongate and have several crests irregularly arranged. Few mitochondria occur in the metacercarial stage and the adult, while many are seen in the young. The basal lamina thickens slightly in conformity with growth. The perinuclear cytoplasm contains an ovoid nucleus with one nucleolus and vesicles. The surface of the 3-day postinfection young worms has an extraintegumental layer. The triangle-shaped cuticular spines were scarce and irregularly placed. They are also observed in metacercariae and young worms of 1-3 days. In the adults, microvillae are present in the external surface, they have diffuse vacuoles in the basal layers, and the basal lamina thickens slightly as it grows.

Key words: Ultrastructure, integument, metacercariae, juveniles, adults, *Clinostomum complanatum*.

Desde el inicio de los estudios de microscopía electrónica de tremátodos, han aparecido numerosas investigaciones (Senft *et al.* 1961, Bils y Martin 1966, Burton 1966, Lee 1966, Lee *et al.* 1984, Erasmus 1967, Smith *et al.* 1969, Wittrock *et al.* 1991), pero ninguna acerca de la estructura fina del tegumento de *Clinostomum complanatum*. A pesar de la amplia distribución geográfica que presenta en México este parásito, sólo se ha informado sobre aspectos taxonómicos y del ciclo vital (Bravo 1947, Caballero 1946, Pineda-López 1985, Mejía-Madrid 1987, Osorio *et al.* 1987 y Galaviz *et al.* 1992).

La presente investigación fue llevada a cabo para determinar la estructura de la super-

ficie tegumentaria de la metacercaria, juvenil y adulto de 8 días postinfección de *C. complanatum*.

MATERIAL Y METODOS

Las metacercarias de *Clinostomum complanatum* utilizadas en este trabajo fueron extraídas del músculo de peces (*Micropterus salmoides*, Centrarchidae) y administradas a pollos domésticos vía oral (Fried y Foley 1970). Los tremátodos fueron fijados con glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos 0.1M (pH 7.2) a 4°C por 4h; posteriormente fueron lavados por 12 horas en amortiguador de fosfatos y luego postfijados con tetraóxido

de osmio al 2% en amortiguador de fosfatos 0.01M por 1 hora, lavados nuevamente en amortiguador de fosfatos por 5 minutos, deshidratados en una serie gradual de alcoholes, aclarados en óxido de propileno y embebidos luego en resina epoxy. Se hicieron cortes semifinos para microscopia de luz y cortes finos (60-90 nm de espesor). Los cortes fueron depositados en rejillas de cobre doblemente teñidos en solución saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds 1963), para examen a 100 Kv.

RESULTADOS

Metacercaria: El estudio se basa en 6 ejemplares. La zona externa del tegumento (Figs. 1,2) presentó una membrana plasmática con numerosas invaginaciones en la superficie y puentes citoplasmáticos que contenían mitocondrias, gránulos de glucógeno y vesículas pequeñas que medían 20 a 140 nm de ancho por 70 a 240 nm de largo; el citoplasma midió 6.10 a 6.90 μm ; su matriz presentó escasas mitocondrias (25 a 60 nm de ancho por 260 a 830 nm de largo), localizadas generalmente en la parte central, y vesículas grandes con baja densidad electrónica (180 nm de ancho por 240 a 310 nm de largo). La lámina basal midió de 330 a 500 nm de espesor. En los puentes citoplasmáticos se notaron mitocondrias (400 a 660 nm de ancho por 700 a 2130 nm de largo) y primordios de espina cuticulares.

Juvenil de un día postinfección: El estudio se basa en dos ejemplares. El tegumento es semejante al observado en la metacercaria, aunque tiene forma más irregular (Fig. 3) El citoplasma distal midió 8.41 a 9.18 μm , notándose en esta zona una gran cantidad de mitocondrias (300 nm de ancho por 430 a 830 nm de largo). Las vesículas pequeñas midieron 20 a 240 nm de ancho por 200 a 300 nm de largo y las mas grandes 200 nm de ancho por 220 a 320 nm de largo. El espesor de la lámina basal fue de 330 a 500 nm. Las mitocondrias localizadas en los puentes citoplasmáticos midieron 400 a 660 nm de ancho por 660 a 1660 nm de largo. Las espinas midieron 2.64 a 3.33 μm de ancho de su base y 7.00 a 7.83 μm de largo (Fig.4).

Juvenil de 3 días postinfección: El estudio se basa en dos ejemplares. Presentó un cubierta extraintegumentaria, escasas invaginaciones y microvellosidades (Fig. 5). El citoplasma distal fue irregular y midió 6.12 a 15.3 μm de espesor. Las mitocondrias cercanas al integumento midieron 230 a 360 nm de ancho por 250 a 1000 nm de largo. Se observaron solamente vesículas de 30 a 160 nm por 60 a 230 nm de largo (Fig. 6). La lámina basal midió 330 a 500 nm de espesor. Las mitocondrias de los puentes citoplasmáticos midieron 260 a 330 nm de ancho por 400 a 1600 nm de largo. Se notaron primordios de espinas muy pequeñas por encima de la lámina basal.

Juvenil de 4 días postinfección: Es estudio se basa en dos ejemplares. El tegumento se encuentra cubierto de numerosas microvellosidades (Fig. 7). El citoplasma distal midió 9.94 a 10.71 μm de espesor y presentó numerosas mitocondrias (260 a 500 nm de ancho por 330 a 830 nm de largo) y vacuolas de apariencia difusa (120 a 210 nm de ancho por 250 a 280 nm de largo) agrupadas en su mayoría en la base de las microvellosidades (Figs. 7,8). La lámina basal midio 500 a 660 nm de espesor; las mitocondrias cercanas a los puentes citoplasmáticos midieron 400 nm de ancho por 600 a 1330 nm de largo. Se observó un núcleo y nucléolo en el citoplasma. Se notaron vesículas pequeñas que midieron 1.00 a 1.33 μm de ancho por 1.33 a 2.63 μm de largo (Fig. 9).

Adulto de 8 días postinfección: El estudio se basa en dos ejemplares obtenidos experimentalmente de la cavidad bucal de pollos de un día de nacidos. Presentó un tegumento irregular y escasas microvellosidades (Figs. 10,11,12). El citoplasma distal midió 3.06 μm de espesor en su parte más delgada y 10.71 μm en su parte más gruesa (Fig. 10). La matriz citoplasmática incluye una escasa cantidad de mitocondrias que se distribuye uniformemente así como escasas vacuolas difusas (130 a 260 nm de ancho por 200 a 260 nm de largo) cerca de la membrana plasmática externa (Figs. 10, 11). Se observaron dos tipos de músculos: el circular y longitudinal (Figs. 11,12). El grosor de la lámina basal fue de 360 a 530 nm. de ancho por 430 a 170 nm de largo (Fig. 12).

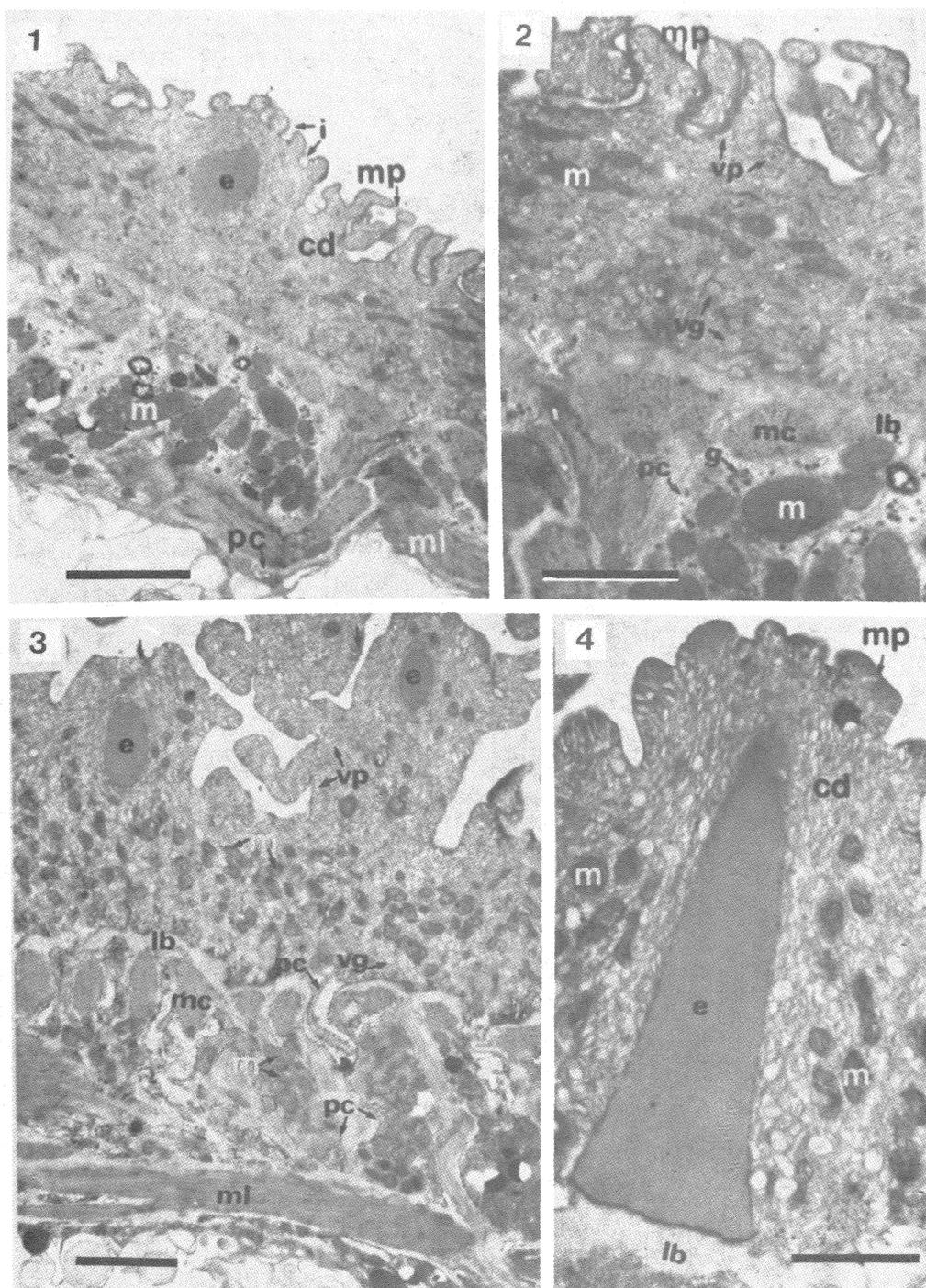


Fig. 1. Tegumento de la metacercaria de *Clinostomum complanatum*. I= invaginaciones en la superficie, pc= puentes citoplasmáticos, m= mitocondrias, e= espina, mp=membrana plasmática, cd= citoplasma distal, ml=músculo longitudinal. Barra= 5.0µm. Fig. 2. Amplificaciones del área del tegumento en la metacercaria. pc=puentes citoplasmáticos, m= mitocondrias, mp= membrana plasmática, mc= músculo circular, vp= vesículas pequeñas, vg= vesículas grandes, g=gránulos de glucógeno, lb= lámina basal. Barra= 0.1µm. Fig. 3. Tegumento del juvenil de 1 día postinfección. cd=citoplasma distal, vp= vesículas pequeñas, vg= vesículas grandes, pc= puente citoplasmático, mc= músculo circular, ml= músculo longitudinal, lb= lámina basal, e= primordio de espinas. Barra= 2.0µm. Fig. 4. Amplificación de una espina madura localizada en el tegumento del juvenil de 1 día. mp= membrana plasmática, cd=citoplasma distal, m=mitocondrias, lb= lámina basal. Barra= 2.0µm.

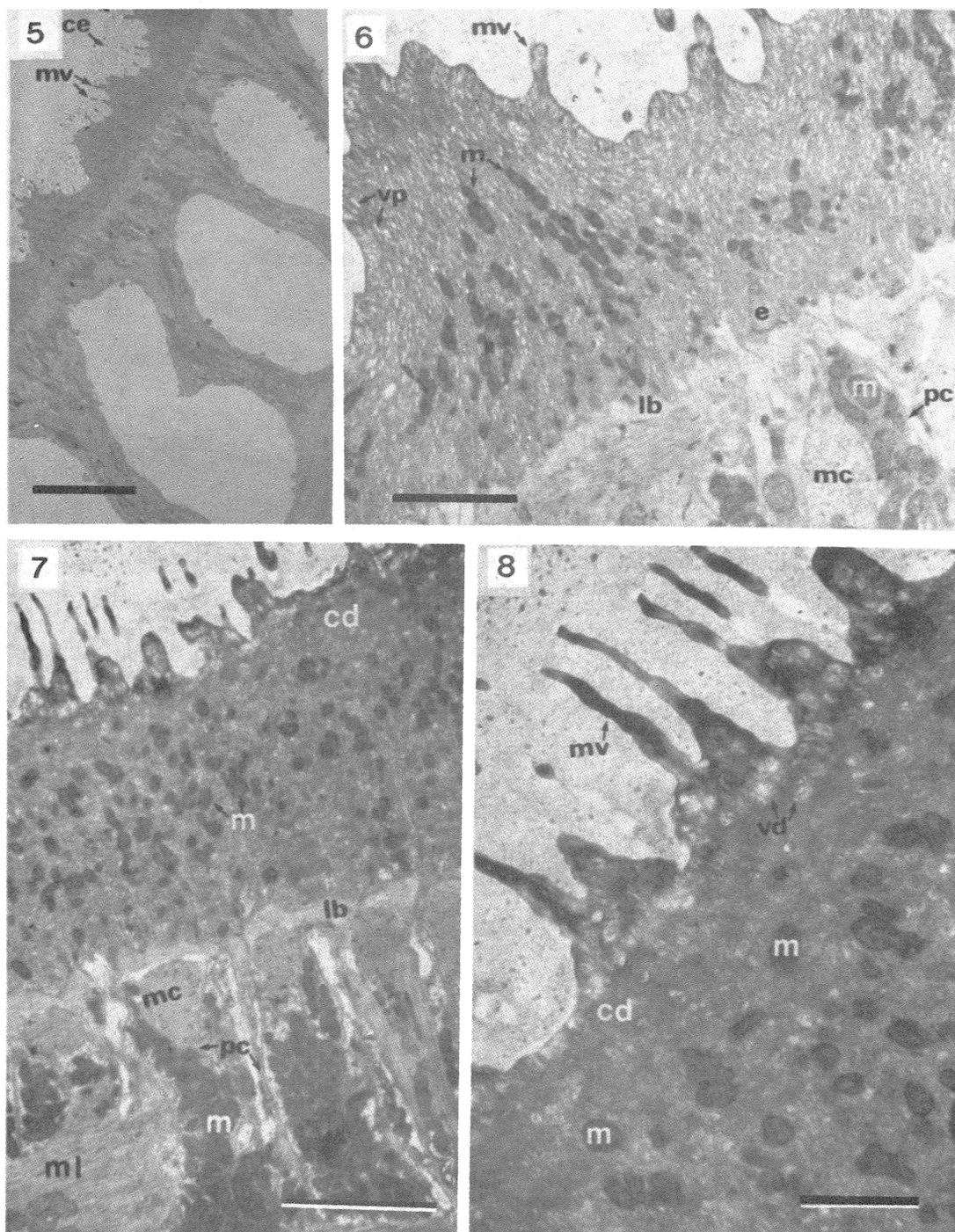


Fig. 5. Tegumento del juvenil de 3 días. ce=cubierta extrategumentaria, mv= microvellosidades. Barra= 20.0 μ m. Fig. 6. Tegumento de juveniles de 3 días. mv=microvellosidades, m=mitocondrias, vp=vesículas pequeñas, mc=músculo circular, lb=lámina basal, pc=puente citoplasmático, e=primordios de espinas tegumentarias. Barra= 1.0 μ m. Fig. 7. Tegumento del juvenil de 4 días. mv=microvellosidades, cd= citoplasma distal, m=mitocondrias, lb=lámina basal, mc=músculo circular, pc=puente citoplasmático, ml=músculo longitudinal. Barra=5.0 μ m. Fig. 8. Amplificación de la zona tegumentaria en un juvenil de 4 días. mv=microvellosidades, vd=vacuolas difusas, cd=citoplasma distal, m=mitocondrias. Barra=0.1 μ m.

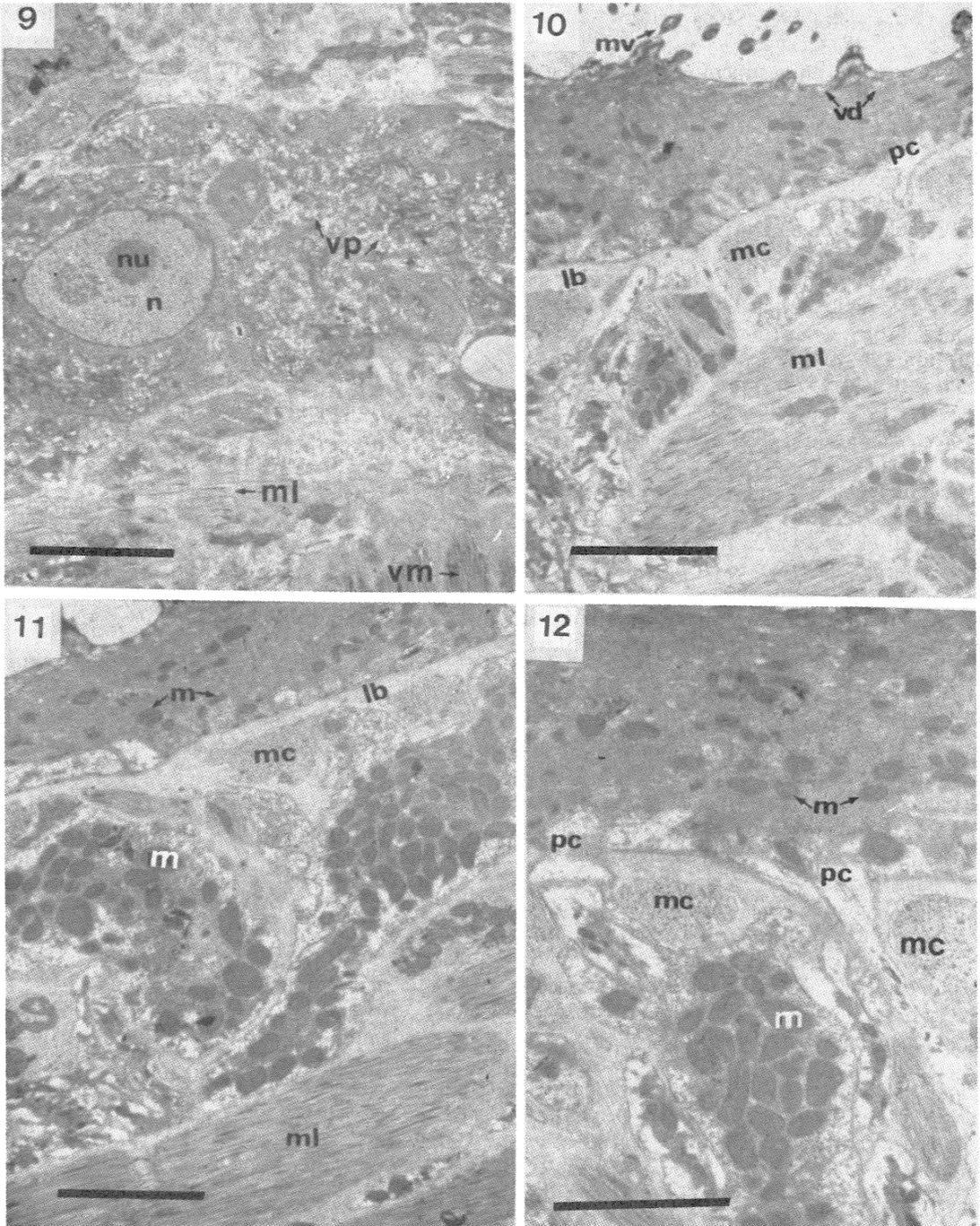


Fig. 9. Citoplasma perinuclear de un juvenil de 4 días. vp=vesículas pequeñas, ml=músculo longitudinal, n=núcleo, nm=nucléolo, vm=músculo vertical. Barra= 1.0 μ m. Fig. 10. Tegumento del adulto. mv=microvellosidades, vd=vesículas difusas, pc=punteo citoplasmático, lb= lámina basal, mc= músculo circular, ml= músculo longitudinal, Barra= 1.0 μ m. Fig. 11. Tegumento del adulto. Escasas mitocondrias (m) en el citoplasma distal (cd) y un gran número de ellos en los puentes citoplasmáticos (pc), lb=lámina basal. Barra= 5.0 μ m. Fig. 12. Tegumento del adulto. pc=puentes citoplasmáticos, m=mitocondrias, mc=músculo circular. Barra= 5.0 μ m.

DISCUSION

Este estudio ultraestructural del tegumento de *Clinostomum complanatum*, complementa la descripción morfológica realizada por Galaviz *et al.* (1992) acerca de las etapas del desarrollo de la metacercaria al adulto de dicho parásito.

Nuestras observaciones ultraestructurales de los cambios tegumentarios de *C. complanatum* indican la presencia de numerosas invaginaciones en metacercarias y microvellosidades en juveniles y adultos, lo cual es similar a lo informado para *Haematoloechus medioplexus* (Burton 1964), *Leucochloridiomorpha constantiae* (Cheng 1973, Harris *et al.* 1974, Contos y Fried 1976); *Cyathocotyle bushiensis* y *Holostephanus luhei* (Lee 1966).

Uno de los constituyentes del tegumento que frecuentemente ha sido informado en tremátodos son los cuerpos de secreción, particularmente en *Fasciola hepatica*, *H. medioplexus*, *Gorgoderina* sp. y *Conspicuum* sp. (Bjorkman y Thorsell 1963, Burton 1964, 1966 y Galaviz 1983); sin embargo éstos no se apreciaron en los juveniles ni adultos de *C. complanatum* estudiados.

Harris *et al.* (1974) al estudiar la estructura fina del tegumento de metacercarias y adultos de 9 días postinfección de *L. constantiae*, notaron que las primeras estaban rodeadas por un tegumento externo rugoso y un glicocálix filamentososo que cubre el tegumento, mientras que en los segundos estaba ausente el glicocálix y el tegumento externo era liso y con pocas vesículas de secreción. En *C. complanatum* la lámina basal sufrió un ligero engrosamiento.

Bjorkman y Thorsell (1964) informan en el tegumento de *F. hepatica* una cubierta inconspicua extraña y Burton (1966) notó una capa extrategumentaria en *Gorgoderina* sp. En el tegumento del juvenil de 3 días de *C. complanatum* aquí informado, se presenta una cubierta semejante a la descrita para *Gorgoderina* sp. En la metacercaria, juvenil de un día postinfección, juvenil de 4 días postinfección y adulto de 8 días postinfección, no se logró observar la capa extrategumentaria, pero es muy probable que la presente debido a que toda célula eucariótica se recubre generalmente con una capa de aspecto filamentososo semejante a un glicocálix.

Las espinas cuticulares encontradas en *C. complanatum* son de forma triangular y presentan una distribución irregular, mientras que en

F. hepatica y *H. medioplexus*, son en forma alargada, tienen extremos puntiagudos y una base plana, principalmente en juveniles (Threadgold 1963a, b, Burton 1964). Las espinas del juvenil de 3 días fueron muy pequeñas, lo que podría indicar que empiezan a absorberse, ya que no están presentes en el juvenil de 4 días ni en el adulto; ello concuerda con las observaciones de Fujino *et al.* (1979).

Las mitocondrias observadas en el tegumento de *C. complanatum* fueron de forma oval, redondeada o alargada y poseen varias crestas arregladas irregularmente. Su número varía, localizándose escasas mitocondrias en las metacercarias, una gran cantidad de los juveniles; en el adulto disminuye nuevamente el número. Generalmente las mitocondrias se encuentran en el área central del citoplasma distal, alineación semejante a lo informado para *F. hepatica* (Threadgold 1963a, b, Bjorkman y Thorsell 1964).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Paul Earl del Departamento de Ciencias Exactas de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, por la revisión del manuscrito.

RESUMEN

Se describe el tegumento de la metacercaria, juvenil y adulto de *Clinostomum complanatum*. La metacercaria presentó numerosas invaginaciones y bajo éstas una gran cantidad de vesículas. En el juvenil de 3 y 4 días y el adulto de 8 días postinfección, la superficie tegumentaria estuvo cubierta por microvellosidades. Las mitocondrias se encontraron en la lámina basal y puentes citoplasmáticos, tuvieron forma oval, redondeada o alargada y poseen varias crestas arregladas irregularmente. En la etapa de metacercaria y adulto se encontraron escasas mitocondrias y en los juveniles se presentaron en gran cantidad. La lámina basal sufre un ligero engrosamiento conforme se desarrolla. El citoplasma perinuclear contiene un núcleo ovoide con un nucleólo y numerosas vesículas. La superficie del juvenil de 3 días presentó una cubierta extrategumentaria. Las espinas cuticulares son de forma triangular y estuvieron esparcidas

irregularmente, se observaron en metacercarias y juveniles de 1 y 3 días. En los adultos se notaron microvellosidades en la superficie externa, vacuolas difusas en la base de éstas y la lámina basal se engrosa ligeramente conforme se desarrolla el parásito.

REFERENCIAS

- Bils, R. F. & W. E. Martin. 1966. Fine structure of the trematode integument. *Tr. Am. Micr. Soc.* 85: 78-88.
- Bjorkman, N. & W. Thorsell. 1964. On the fine structure and resorptive function of the cuticle of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. *Exp. Cell Res.* 33: 319-329.
- Bravo, H.M. 1947. Dos especies de *Clinostomum* (Trematoda) de aves procedentes del Estado de Nuevo Leon. México. *An. Inst. Biol. Méx.* 18: 489-598.
- Burton, P.R. 1964. The ultrastructure of the integument of the frog lung fluke *Haematoloechus medioplexus* (Trematoda: Plagiorchiidae) *J. Morphol.* 115: 305-318.
- Burton, P.R. 1966. The ultrastructure of the integument of frog bladder fluke, *Gorgoderina* sp. *J. Parasitol.* 52: 926-934.
- Caballero, y C.E. 1946. Tremátodos de la región oncocercosa de México y Guatemala. *Trematoda. An. Inst. Biol. Mex.* 7: 137-165.
- Contos, N. & B. Fried. 1976. Histochemical observations on the body surface of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) cultivated in vitro. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 43: 88-89.
- Cheng, T.C. 1973. *General Parasitology*. Academic, Nueva York, 916 p.
- Erasmus, D. A. 1967. The host-parasite interface of *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (Trematoda: Strigeoidea) II. Electron microscope studies of the tegument. *J. Parasitol.* 53: 703-714.
- Fried, B. & D.A. Foley. 1970. Development of *Clinostomum marginatum* (Trematoda) from frogs in the chick and on the choroallantois. *J. Parasitol.* 56: 332-335.
- Fujino, T. Y. Ishii & D. W. Choi. 1979. Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis sinensis* newly excysted juveniles and adults worms. *J. Parasitol.* 65: 5790-590.
- Galaviz, S.L. 1983. Descripción taxonómica de una nueva especie de *Conspicuum* (Trematoda: Dicrocoelidae) y consideraciones ultraestructurales de su tegumento. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Galaviz, S.L., S.G. De Witt & F. G. Jiménez. 1992. Identificación de *Clinostomum complanatum* (Trematoda) mediante el desarrollo experimental del estadio metacercarial al adulto. *Publ. Biol.* 6(1): en prensa.
- Harris, K. R., T.C. Cheng & A. Cali. 1974. An electron microscope study of the tegument of the metacercaria and adult of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda: Brachylaemidae) *Parasitol.* 68: 57-67.
- Lee, D. L. 1966. The structure and composition of the helminth cuticle. *Adv. Parasitol.* 4:187-254.
- Lee, S.H., B.S. Seo, J.Y. Chai & S.J. Hong. 1984. Study on *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) in Korea. VII Electron microscopic observation on the tegumental structure. *Kor. J. Parasitol.* 22:1-10.
- Mejía-Madrid H.H., 1987. Helmintofauna del "tiro" *Goodea atrippinis* Jordan 1880, en el Lago de Patzcuaro, Michoacán. Algunas consideraciones ecológicas de las poblaciones de helmintos en sus hospederos. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Osorio, S.D., D.R. Pineda & G.M. Salgado. 1987. Fauna helmintológica de peces dulceacuícolas de Tabasco. *Univ. Ciencia.* 4: 5-33.
- Pineda, L. R. 1985. Infección por metacercarias (Platyhelminthes: Trematoda) en peces de agua dulce de Tabasco. *Univ. Ciencia* 2: 47-60.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- Senft, A.W., D.E. Philpott & A. H. Pelotsky. 1961. Electron microscope observations of the integument, flame cells, and gut of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 47:217-229.
- Smith, J. H., E. S. Reynolds & von F. Lichtenberg. 1969. The tegument of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:28-49.
- Threadgold, L. T. 1963b. The ultrastructure of the 'cuticle' of *Fasciola hepatica*. *Exp. Cell Res.* 30: 238-242.
- Threadgold, L.T. 1963b. The ultrastructure of the 'cuticle' of *Fasciola hepatica*. *Exp. Cell Res.* 30:238-242.
- Wittrock, D.D., C.S. Bruce & A. D. Johnson. 1991. Histochemistry and ultrastructure of the metacercaria cysts of blackspot trematodes *Uvulifer ambloplitis* and *Neascus pyriformis*. *J. Parasitol.* 77: 454-460.