

LA CÉLULA FLAMÍGERA EN TREMATODOS: ULTRAESTRUCTURA EN EL ESPOROCISTO Y LA CERCARIA DE *PROCTOECES MACULATUS* (DIGENEA, FELLODISTOMATIDAE)

J. R. FERRER

Ferrer, J. R., 1986. La célula flamígera en trematodos: ultraestructura en el esporocisto y la cercaria de *Proctoeces maculatus* (Digenea, Fellodistomatidae). *Misc. Zool.*, 10: 45-53.

The flame cell in Trematoda: ultrastructure in the sporocyst and cercaria of Proctoeces maculatus (Digenea, Fellodistomatidae).— This study deals with the ultrastructure of the flame cell in the sporocyst and cercaria of *Proctoeces maculatus* (Trematoda, Digenea, Fellodistomatidae). In the cercaria, the flame cell has about seventy cilia and a few ribs; the peripheral ribs interlace with the ribs sent out by the plasmalemma from distally-located cell which is next to the ascending collector duct. This constitutes the filtration system of the flame cell, also known as the "weir apparatus" (KUMMEL, 1959). At the same time, this apparatus forms internal subperpendicular projections or internal leptotriches which maintain the barrel shape of the cavity where the basal zone of the cilia bundle is located. The sporocyst flame cell has considerably more cilia, between three and four hundred, as well as more ribs, which are distributed in several rows. The "weir apparatus" has alternately internal and external ribs and coming out from them are subperpendicular cytoplasmic projections or external leptotriches which extend into the wide cavity of the sporocyst parenchyma where the flame cell is located.

Key words: *Proctoeces maculatus*, Sporocyst, Cercaria, Flame cell, Ultrastructure.

(Rebut: 24-V-85)

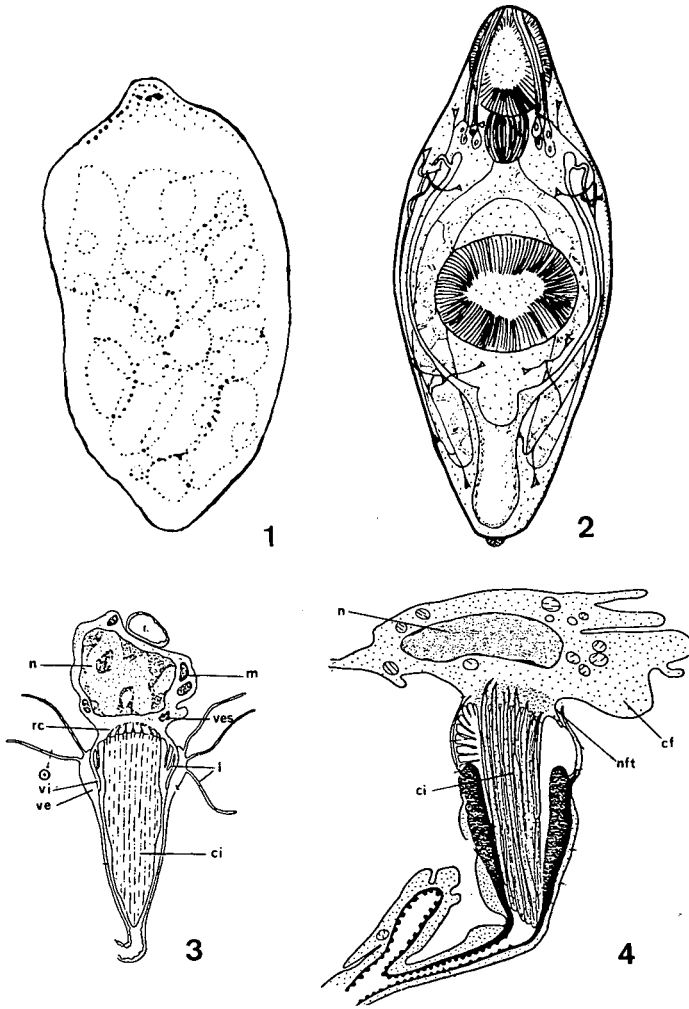
J. R. Ferrer, Dept. Morfologia Microscòpica, Fac. Biologia, Univ. Barcelona, Avda. Diagonal 637-647, 08028 Barcelona, Espanya.

INTRODUCCIÓN

Los esporocistos de *Proctoeces maculatus* (LOOSS, 1901; ODHNER, 1911) (fig. 1), trematodo digenético de la familia Fellodistomatidae, parasitan al mejillón *Mytilus edulis*, y en su interior se forman las cercarias al cabo de dos o tres generaciones (MARTÍNEZ, 1972). Distintas citas dan cuenta de la existencia de larvas de felodistomátidos parasitando al mejillón, dando cada autor un nombre específico a cada una de ellas: *Cercaria tenuans* (COLE, 1935), *C. milfordensis* (UZMANN, 1953), *C. brachidontis* (HOPKINS, 1954). Formas sexuadas pero estériles son descritas en mejillones de la costa atlántica por STUNKARD & UZMANN en 1959, identificándolas

estos autores con la especie *Proctoeces maculatus*. Mucho más tarde WARDLE (1980) incluye dentro de esta especie a las tres formas larvianas anteriormente mencionadas. El ciclo biológico de este trematodo ha sido descrito en aguas mediterráneas francesas por MARTÍNEZ (1972): las cercarias emitidas por el mejillón parasitan a un poliqueto nereidomorfo en el que se transforman en metacercarias; un pez lábrido ingiere los gusanos parasitados y en éste las metacercarias se transforman en adultos.

Los primeros trabajos sobre la ultraestructura de la célula flamígera de trematodos datan de finales de los años cincuenta. En efecto, destacan en este sentido los de KUMMEL (1959), KRUIDENIER (1959) en la cercaria de *Schisto-*



Figs. 1-4. 1. Esporocisto de *Proctoeces maculatus* (Según STUNKARD & UZMANN, 1959). 2. Cercaria de *Proctoeces maculatus* (Según MARTÍNEZ, 1972). 3. Modelo de célula flamígera propuesto por WILSON (1969), en el miracidio de *Fasciola hepatica*: ci. Cilio; l. Leptotrico; m. Mitochondria; n. Núcleo; rc. Raíz ciliar; ve. Varilla externa; ves. Vesícula; vi. Varilla interna. 4. Modelo de célula flamígera propuesto por HOWELLS (1969) en el cestodo *Moniezia expansa*: cf. Soma de la célula flamígera; ci. Cilio; n. Núcleo; nft. Nefrostoma.

1. Sporocyst of *Proctoeces maculatus* (From STUNKARD & UZMANN, 1959). 2. Cercaria of *Proctoeces maculatus* (From MARTÍNEZ, 1972). 3. Diagrammatic representation of the flame cell model according to WILSON (1969), in the miracidium of *Fasciola hepatica*: ci. Cilium; l. Leptotriche; m. Mitochondria; n. Nucleus; rc. Ciliary root; ve. Outer rib; ves. Vessel; vi. Inner rib. 4. Diagrammatic representation of the flame cell model according to HOWELLS (1969) in the cestode *Moniezia expansa*: cf. Pericarium of flame cell; ci. Cilium; n. Nucleus; nft. Nephrostome.

soma mansoni, SENFT et al. (1961) en el adulto de esta misma especie, LAUTENSCHLAGER & CARDELL (1961) en la metacercaria de *Diplostomum trituri*, y PANTELUORIS & THREADGOLD (1963) en el adulto de *Fasciola hepatica*. Todos estos autores coinciden en que la célula flamígera consta de un citoplasma de forma irregular y de un núcleo ostensible; se describen en el citoplasma gránulos diversos, vesículas, aparato de Golgi y ergastoplasma. Pero lo que caracteriza esencialmente a la célula flamígera es el haz de cilios que presenta apicalmente, cuyo número es variable: 40 a 80 en el adulto de *Schistosoma man-*

soni, mientras que en el adulto de *Fasciola hepatica* de 120 a 135; la fórmula axonemática es, en todo caso, constante: 9+2 pares de microtúbulos. Una cavidad tubuliforme existente en el seno de la célula flamígera alberga el haz de cilios; secciones transversales de esta cavidad a nivel del haz ciliar, muestran que está limitada por unas formaciones digitiformes dispuestas en zig-zag, es decir, alternándose unas más interiores con otras más exteriores; otras formaciones digitiformes cortadas transversalmente, se aprecian en estas secciones a nivel de la luz de la cavidad.

Esta ultraestructura es observada, diez años

más tarde, en otras fases del ciclo biológico, como por ejemplo en el miracidio de *Fasciola hepatica* por WILSON (1969) (fig. 3); en otros platelmintos, como en el cestodo *Moniezia expansa* por HOWELLS (1969) (Fig. 4); o re-descrita en la cercaria de *Schistosoma mansoni* por EBRAHIMZADEH y KRAFT (1971). Estos autores aportan nuevos datos acerca de la naturaleza de las formaciones digitiformes limitantes, mencionadas anteriormente, y que constituyen lo que KUMMEL (1959) denomina el "weir apparatus". En efecto, según esta nueva concepción, el sistema de varillas del "weir apparatus" es de naturaleza mixta, en el sentido de que las varillas internas son prolongaciones de la célula ciliada, mientras que las externas con las cuales se intercalan, lo son de una célula tubuliforme, situada distalmente con respecto a la célula ciliada y en solución de continuidad con el conducto colector ascendente. Al mismo tiempo, estos autores consignan prolongaciones también digitiformes ("varillas secundarias" de HOWELLS (1969) o "leptotricos" de WILSON (1969)) que, lateral y subperpendicularmente, parten de las varillas internas y externas hacia, respectivamente, el interior de la cavidad tubuliforme de la célula flamígera y al exterior de la misma. Además se señala un contacto desmosómico en cada par de varillas, interna y externa, consecutivas.

Más recientemente RÖHDE (1982) en las células flamígeras de *Polystomoides asiaticus* (Monogenea) y de *Multicotyle purvisi* (Aspidogastrea) observa diversas imágenes en las que se ponen de manifiesto varios hechos con relación a la naturaleza del "weir apparatus": a saber, hay una continuidad entre cualquier varilla y el soma de la célula ciliada; no se encuentra alternancia entre las varillas sino que preferentemente están situadas frente por frente; algunas varillas parecen duplicarse y también detecta alguna que otra varilla externa rodeada por un conjunto de varillas internas en disposición circular. Estos hechos inducen a este autor a considerar que el sistema de varillas del "weir apparatus" pertenece en su totalidad a la célula ciliada, de modo que ésta, además del haz de cilios y las varillas in-

ternas, emite todas las varillas del "weir apparatus"; éste pues, no es, según esta nueva idea, de naturaleza mixta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los mejillones examinados son de batea y criados en la costa gallega. El porcentaje medio de infestación por el parásito es del uno por ciento. El manto y la gónada, así como también a veces el hepatopáncreas y el órgano de Bojanus son los órganos preferentemente infestados.

Para la observación al microscopio electrónico, el material, consistente en esporocistos y cercarias aisladas del órgano parasitado, ha sido sometido primero a una fijación en una mezcla de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 1,5%; soluciones ambas en tampón fosfato de Sörensen, durante una y media a dos horas y a 4°C, y posteriormente a una postfijación con tetróxido de osmio al 1 ó 2% también tamponado con Sörensen. Después de una deshidratación con acetona en concentraciones crecientes, se ha procedido a una inclusión del material en araldita Durcupan ACM de la casa Fluka, habiéndose utilizado también como medio de inclusión la resina tipo Spurr (SPURR, 1969), obteniéndose buenos resultados debido a su baja viscosidad. Los bloques se han confeccionado en cápsulas de gelatina o en moldes adecuados, previamente desecados. Estos bloques piramidados con la ayuda de un aparato denominado "pyramitone" diseñado a tal efecto y de marca Reichert modelo TM60, han sido cortados con un ultramicrotomo Reichert modelo OmU2. Los cortes obtenidos han sido sometidos a un contrastado con una solución de acetato de uranilo en acetona al 50% durante cuatro minutos y a temperatura ambiente, y seguidamente con citrato de plomo preparado según la técnica de REYNOLDS (1963), durante diez minutos a temperatura ambiente. Las observaciones se han efectuado en los microscopios de transmisión del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona, ambos Philips, modelos EM200 y EM301.

RESULTADOS

En la cercaria de *Proctoeces maculatus* existen 16 células flamígeras, distribuidas según la fórmula excretora de 2 [(2+2) + (2+2)] (MARTÍNEZ, 1972), las cuales ocupan los extremos proximales de conductos colectores ascendentes, que, a su vez desembocan en dos conductos colectores descendentes que se reúnen en una vesícula excretora caudal (fig. 2). En el caso del esporocisto hay dos pares de células flamígeras; en cada par, las células flamígeras comunican con sendos conductores excretorios que se reúnen distalmente en un poro excretor (MARTÍNEZ, 1972).

Célula flamígera

La célula flamígera se puede considerar constituida por dos elementos celulares, de los cuales el más representativo es la célula ciliada en posición basal proximal, pero cuya membrana apical también emite una serie de expansiones digitiformes a modo de varillas paralelas a los cilios (figs. 5-11). Las expansiones o varillas más periféricas están relacionadas con prolongaciones citoplasmáticas procedentes de otra u otras células en su extremo más distal (figs. 5,6,8).

Célula ciliada

El pericarion contiene un núcleo más o menos alargado, parcialmente lobulado, con una cromatina formando amplios acúmulos periféricos. En el citoplasma se encuentran mitocondrias y grandes vacuolas inmersas en una matriz citoplasmática de contenido finamente granuloso y medianamente denso a los electrones (fig. 5).

En la cercaria, esta célula emite un haz de

unos 65 cilios, con una longitud decreciente desde el centro del haz hasta la periferia del mismo, por lo que en cortes transversales varía el número de cilios (figs. 7, 8). Las raíces ciliares no presentan la típica estriación transversal (figs. 5, 6), y la fórmula axonemática es la típica de 9+2, observándose claramente los dos brazos del microtúbulo A de cada par; los cilios se disponen según una trama de simetría hexagonal (fig. 8). En el esporocisto el número de cilios del haz emitidos es mucho mayor, de dos a tres centenares (fig. 10), presentando sin embargo la misma fórmula axonemática y la misma disposición (fig. 11).

El plasmalema apical de esta célula ciliada periféricamente adyacente al haz de cilios, emite una serie de expansiones digitiformes de 650 Å de grosor medio (fig. 6) dispuestas preferentemente de una forma curvada y subparalela al "weir apparatus" o estructura que limita a la cavidad dentro de la que se ubica la zona basal del haz de cilios, y así como, naturalmente, el haz de expansiones digitiformes mencionado (figs. 5,6,9). En la cercaria el número de estas expansiones o varillas es reducido (fig. 7), mientras que en el esporocisto es mucho más numeroso formando tres o cuatro series (figs. 10, 11).

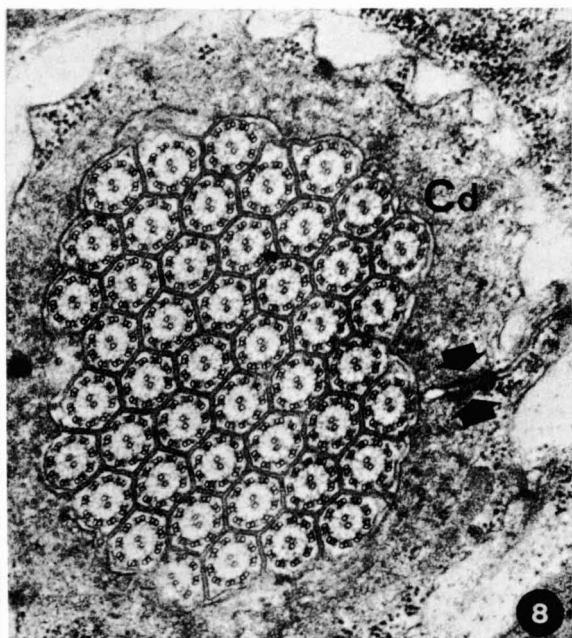
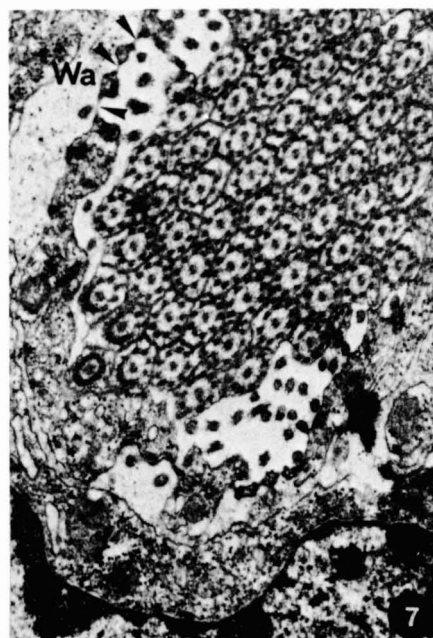
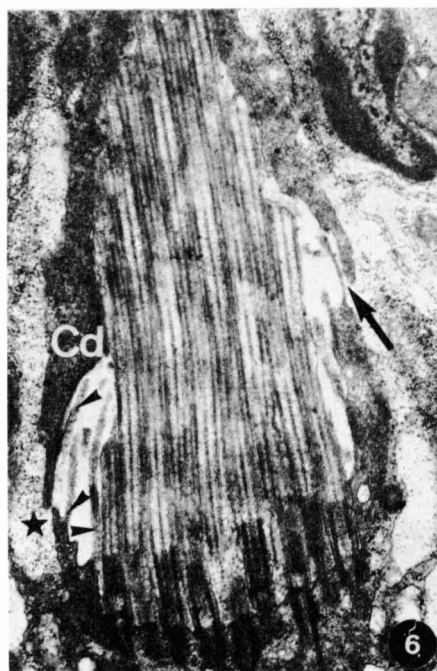
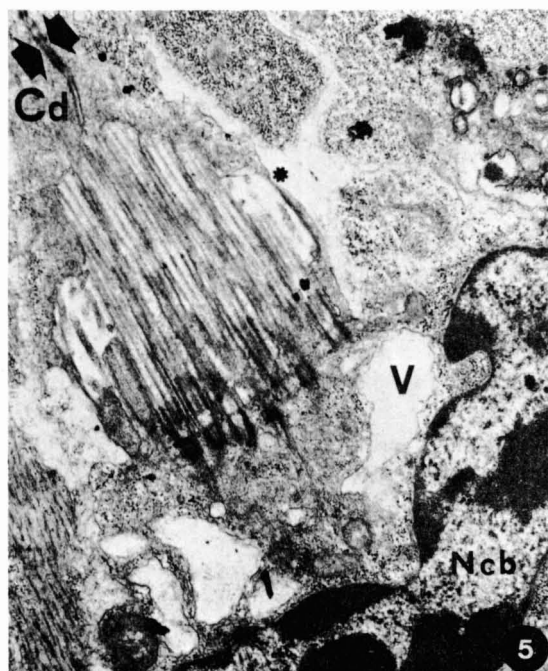
Célula o células distales

En un corte subparalelo al haz de cilios (fig. 5), se observa que éste está interceptado apicalmente por un citoplasma finamente granuloso perteneciente, en principio, a dos territorios celulares distintos, entre los que existe una unión densa (flechas).

En cortes transversales, en este citoplasma, que presenta gránulos de glucógeno, se patentiza una única unión o contacto denso (fig. 8, flechas), lo que hace sospechar que se

Figs. 5-8: Célula flamígera de la cercaria de *Proctoeces maculatus*: 5. Corte sublongitudinal: Ncb. Célula basal ciliada; V. Vacuolas; Cd. Célula distal; 18.000X. 6. Corte longitudinal: ▲ Proyecciones digitiformes; Cd. Célula distal; 20.000X. 7. Corte transversal en un nivel basal; W.A. "weir apparatus"; ▲ "weir membrane"; 22.000X. 8. Corte transversal a nivel distal: Cd. Célula distal; 39.000X.

Sections of a flame cell of the cercaria of *Proctoeces maculatus*: 5. Sublongitudinal (18.000X); 6. Longitudinal (20.000X); 7. Cross section (22.000X); 8. Cross section at distal level (39.000X). Nucleus of ciliated basal cell (Ncb); vacuoles (V); distal cell (Cd); contact between distal cell and ciliated basal cell (*).



trata de una sola célula, que distalmente rodea al haz de cilios. En un nivel basal, se detecta en el esporocisto, una unión de este tipo (fig. 10, flecha) y no es descartable que, en este nivel, también se dé en la cercaria.

“Weir apparatus”

La zona basal del haz de cilios y de las varillas que emite la célula ciliada, aparecen, en corte longitudinal, encerrados en una cavidad en forma de tonel (figs. 5,6,9) como se ha indicado anteriormente. Transversalmente, el “weir apparatus” limitante de esta cavidad aparece en la cercaria en forma de una estructura consistente en una hilera de procesos digitiformes, de 1600 Å de diámetro, unidas por una tenue membrana a la que KUMMEL (1959) denomina “weir membrane” (fig. 7). También es detectable, en la célula flamígera de la cercaria, una cierta alternancia de varillas internas y externas (fig. 9); de las internas se emiten leptotricos internos hacia la cavidad en forma de tonel (fig. 9, indicadores).

En el esporocisto se observa claramente, a nivel del “weir apparatus”, una alternancia de varillas internas y externas (fig. 11) y de algunas de estas últimas se emiten leptotricos externos (fig. 10, indicadores) imágenes comparables al modelo propuesto por WILSON (1969).

DISCUSIÓN

Aspectos morfológicos

El modelo de célula flamígera estudiado en el esporocisto y en la cercaria de *Proctoeces maculatus* se puede comparar a grandes rasgos al modelo correspondiente a una célula flamígera con un “weir apparatus” de naturaleza

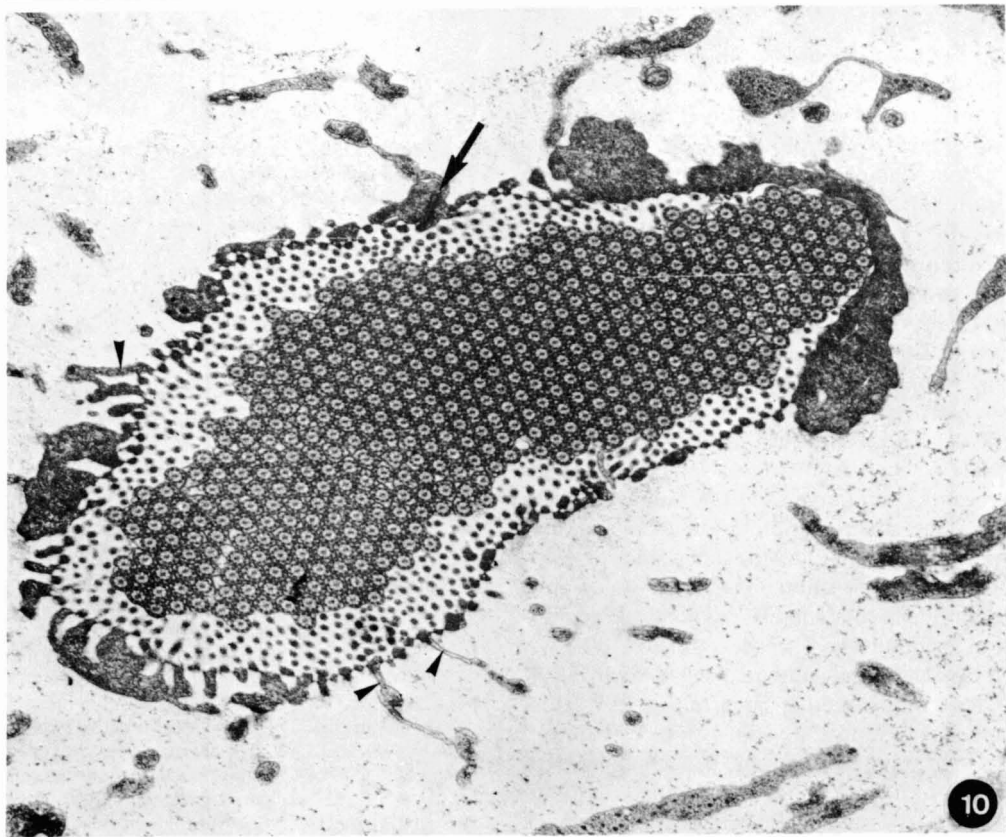
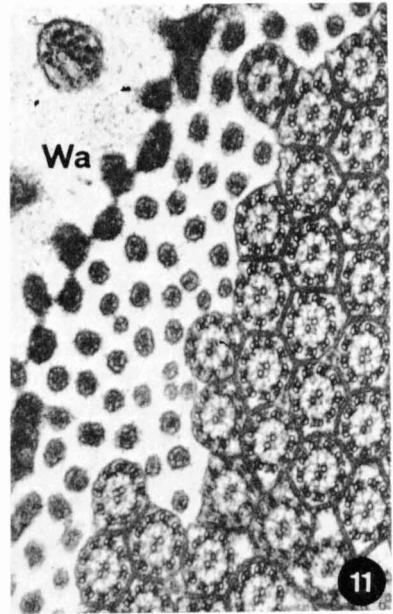
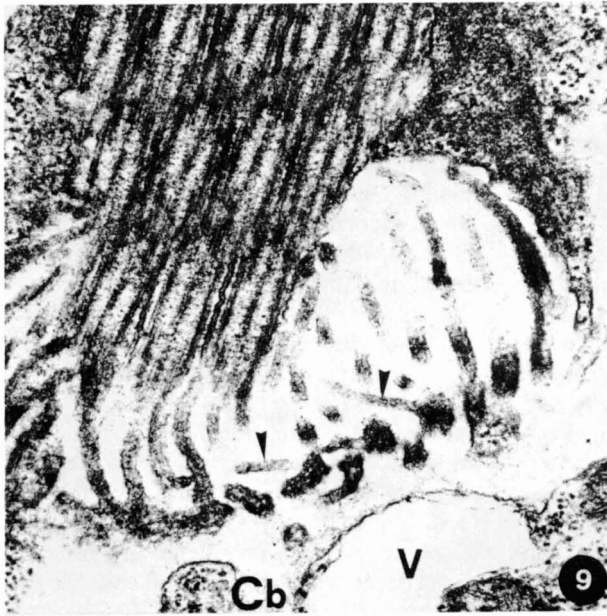
mixta, o lo que es lo mismo, al modelo bicelular, con una célula basal ciliada y una célula distal perfectamente diferenciadas la una de la otra. Detalles en las imágenes anteriormente mencionadas corroboran este hecho: se observa, en efecto, que una prolongación de la célula distal se une con una varilla periférica de la célula basal ciliada (fig. 6); pero al mismo tiempo, prolongación y varilla periférica están cortadas en distinto nivel, observándose ésta última muy tenuemente; este hecho está en correspondencia con la disposición alternante de las varillas que constituyen el “weir apparatus”. Tal alternancia se observa claramente en el esporocisto (figs. 9,11).

La naturaleza de la “weir membrane” es dudosa. Más que una membrana unitaria, parece tratarse de una prolongación del territorio citoplasmático de las varillas del “weir apparatus” (fig. 7). ROHDE (1982) opina en este sentido que la “weir membrane” es una estructura membranosa que penetra en el interior de las varillas del “weir apparatus”, sin entrar en detalles acerca de su naturaleza. WILSON (1969) en su modelo propuesto, no consigna ninguna “weir membrane”; considera que la célula basal ciliada y la distal son dos células interdigitadas, cuyas interdigitaciones constituyen el “weir apparatus” con alternancia de varillas internas y externas; en esta línea se podría inscribir el “weir apparatus” del esporocisto en estudio (fig. 11).

En cuanto a la existencia de nefrostomas o poros de comunicación entre la cavidad interna de la célula flamígera y el espacio exterior de la misma, se puede decir que en el material en estudio, de entre los tipos de contacto entre las células basal y distal, se aprecia uno en el que las varillas que forman parte del “weir apparatus” aparecen en corte longitudinal paralelas y dejando un espacio entre sí que

Figs. 9-11. 9. Cavidad en forma de tonel en la cercaria: ▲ Leptotricos internos; V. Vacuola de la célula basal (Cb); 45.000X. 10. Corte transversal de la célula flamígera del esporocisto de *P. maculatus*: ▲ Leptotricos externos; → Unión densa a nivel basal; 12.000X. 11. Detalle de una porción del “weir apparatus” de la célula flamígera del esporocisto con alternancia de varillas internas y externas; 42.000X.

9. Barrel-like cavity in the cercaria: ▲ Inner leptotriches; V. vacuole of the basal cell (Cb); 45.000. 10. Cross section of the flame cell of the sporocyst of *P. maculatus*: ▲ Outer leptotriches. → Dense contact at basal level; 12.000X. 11. Detailed view of a portion of the “weir apparatus” of the flame cell of the sporocyst with alternating inner and outer ribs; 42.000X.



constituye el nefrostoma (fig. 6, flecha). HOWELLS (1969) describe en *Moniezia expansa* nefrostomas tanto en corte longitudinal como en corte transversal (fig. 4); sin embargo, transversalmente, no se han detectado nefrostomas en *Proctoeces maculatus*.

Aspectos funcionales

Los autores de los años 60 (SENFET et al. 1961; PANTELOURIS & THREADGOLD, 1963), consideran a la célula flamígera como una bomba impelente, que, con el movimiento de los cilios, crea un flujo de fluidos corporales que atraviesan el "weir apparatus" y se canalizan por los conductos colectores. WILSON (1969) acepta que el flujo se efectúa a través de las uniones entre las varillas del "weir apparatus", uniones que este autor considera de tipo desmosómico, mientras que HOWELLS (1969) dice que estos flujos tienen lugar a través de los nefrostomas.

Estos dos autores también dan una interpretación funcional a la existencia de leptotricos internos y externos. En efecto, los internos, que son prolongaciones digitiformes subperpendiculares al "weir apparatus" y que parten de las varillas internas del mismo, son rígidos, y por tanto mantienen rígida la cavidad en forma de tonel donde reside la zona basal del haz de cilios, lo cual permite que éste disponga de un espacio lateral para moverse. Los leptotricos externos, descritos por WILSON (1969) en su modelo y que parten subperpendicularmente de las varillas externa del "weir apparatus", pueden servir de anclaje de la célula flamígera con las células adyacentes, aunque no se observan estructuras de contacto ostensibles. Otra función más plausible es, que, debido a la rigidez de estos procesos, mantienen una cavidad rígida alrededor de la célula flamígera donde se acumulan los líquidos a filtrar.

En las larvas estudiadas se observan leptotricos, internos en la cercaria (fig. 9) y externos en el esporocisto (fig. 10); en este último caso hay que destacar que la célula flamígera está ubicada en una amplia cavidad existente en el parénquima de esta larva. En los cortes

longitudinales de la célula flamígera de la cercaria se patentiza la forma de tonel de la cavidad donde se sitúa la zona basal del haz de cilios, cavidad que, como se ha apuntado anteriormente, es rígida debido a la existencia de leptotricos internos; ello permite un movimiento ondulatorio transversal del haz de cilios en su zona basal. Apicalmente este haz de cilios está fuertemente abrazado por la célula distal, no habiendo espacio lateral alguno y encajando perfectamente los límites ciliares con la superficie interna de dicha célula (fig. 8); por tanto, el movimiento ondulatorio transversal basal del haz de cilios se traduce apicalmente en un movimiento ondulatorio longitudinal, y así el haz de cilios actúa como un verdadero émbolo de una bomba impelente, idea que coincide con la de los autores de los años 60. Este razonamiento es compatible con el hecho de que todos los cilios del haz actúan sincrónicamente.

BIBLIOGRAFÍA

- COLE, W.H., 1935. On some larval trematode parasites of the mussel (*Mytilus edulis*) and the cockle (*Cardium edule*). *Parasitology*, 27: 276-280.
- EBRAHIMZADEH, A. & KRAFT, M., 1971. Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Anatomie der Cercarien von *Schistosoma mansoni*. II. Das Excretionssystem. *Z. Parasitenkunde*, 36(4): 265-290.
- HOPKINS, S.H., 1954. *Cercaria brachidontis* n. sp. from the hooked mussel in Louisiana. *J. Parasitol.*, 40: 29-31.
- HOWELLS, R.E., 1969. Observations on the nephridial system of the cestode *Moniezia expansa* (Rud., 1805). *Parasitology*, 59: 449-459.
- KRUIDENIER, F.J., 1959. Ultrastructure of the excretory system of cercariae. *J. Parasitol.*, 45:59.
- KUMMEL, G., 1959. Feinstruktur der Wimperflame in der Protonephridien. *Protoplasma*, 51: 371-376.
- LAUTENSCHLAGER, E.W. & CARDELL, R.R., 1961. Ultrastructure of the cuticular region and flame cell system of the metacercaria of *Diplostomum trituri*. *J. Parasitol.*, 47: 46 (Abstr.).
- LOOS, A., 1901. Über einige Distomen der Labriden des Triester Hafens. *Zentrbl. Bakt.*, 29: 402-404.
- MARTÍNEZ, J.C., 1972. Recherches sur quelques stades larvaires de Digènes parasites de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Thèse Doctorale, Université des Sciences et Techniques de Languedoc.
- ODHNER, T., 1911. Zum natürlichen System der digenen Trematoden. III. Steringophoridae. *Zool.*

- Anz., 38: 97-117.
- PANTELOURIS, E.M. & THREADGOLD, L.T., 1963. The excretory system of the adult *Fasciola hepatica* L. *La Cellule*, 64: 63-67.
- 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.
- ROHDE, K., 1982. The flame cells of a monogenean and an aspidogastrea, not composed of two interdigitating cells. *Zool. Anz.*, 209 (5-6): 311-314.
- SENF, A.W., PHILPOT, D.E. & PELKOFKY, A.H., 1961. Electron microscope observations on the integument, flame cells and gut of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 47: 217-229.
- SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, 26: 36-43.
- STUNKARD, H.W. & UZMANN, J.R., 1959. The life-cycle of the digenetic trematode, *Proctoeces maculatus* (Looss, 1901; Odhner, 1911) (syn. *P. subtenuis* (Linton, 1907; Hanson, 1950) and description of *Cercaria adranocerca* n. sp. *Biol. Bull.*, 116(1): 184-193.
- UZMANN, J.R., 1953. *Cercaria milfordensis* n. sp. microcercous trematode larva from a marine bivalve *Mytilus edulis* L. with special reference on its effect on the host. *J. Parasitol.*, 39: 445-451.
- WARDLE, W.J., 1980. On the life-cycle stages of *Proctoeces maculatus* (Digenea Fellodistomatidae) in mussels and fishes from Galvestone Bay, Texas. *Bull. Mar. Sci.*, 30: 737-743.
- WILSON, R.A., 1969. The fine structure of the protonephridial system in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 59: 461-467.