

**PROCTOECES MACULATUS (TREMATODA: DIGENEA),
PARÀSIT DEL MUSCLO MYTILUS EDULIS:
ESTRUCTURA, DESENVOLUPAMENT I ULTRAESTRUCTURA
DE LA CERCÀRIA ***

Jaume R. Ferrer **

Rebut: juliol 1981

SUMMARY

**Proctoeces maculatus (Trematoda: Digenea), a parasite of the mussel *Mytilus edulis*:
Structure, development and ultrastructure of the cercaria**

About 1 % of the mussel beds of the Galician coast are affected by the so called «orange sickness», a disease detected for the first time by COLE (1935) and caused by **Proctoeces maculatus** (Trematoda: Digenea), whose sporocysts, approximately one thousand in number, infect different organs of the host, amongst the most important of which are the pallium and the gonads. The sporocyst has the shape of an oval bag in which sporocysts in formation as well as cercariae in different developing phases dwell; some morphological differences between the latter and the former appear already during the early phases.

The acetabulum of the cercaria differentiates itself as a spherical cavity whose wall presents muscular fibres in radial and circular directions. At the same time, the cercaria's own teguments are being developed and the tegumentary cover that surrounds it degenerates during development, which originated in the sporocyst's wall.

Cells of a connective tissue nature form the parenchyma of the cercaria, which present very well defined boundaries and scarcity of intercellular matter.

INTRODUCCIÓ

La morfologia de les fases larvàries que parasiten el musclo i que són objecte del present estudi ultrastructural ja van ésser descrites per COLE (1935), parasitant mus-

clos de les costes angleses; els va donar el nom específic de *Cercaria tenuans*.

En musclos de les costes americanes UZMANN (1953) trobà formes larvàries molt semblants i les anomenà *Cercaria milfordensis*. Posteriorment STUNKARD & UZMANN

* Un resum d'aquest treball fou exposat en la comunicació presentada a la Sessió Científica Ordinària de la ICHN, celebrada el 15 de maig de 1981.

** Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avgda. Diagonal, 645. Barcelona, 28.

(1959) inclogueren dintre de l'espècie *Proctoeces maculatus* (Loos 1901; Odhner 1911) (Sin. *Proctoeces subtenuis* Linton 1907; Hanson 1950) les larves en qüestió.

De forma natural, i també experimentalment, el cicle biològic de *Proctoeces maculatus* ha estat descrit per MARTÍNEZ (1972) en musclos de la costa mediterrània francesa (Regió de Sète). El musclo *Mytilus galloprovincialis* és típicament l'hoste de les fases de l' esporocist i de la cercària, es desenvolupen les metacercàries en *Nereis caudata* (poliquet) i finalment és *Labrus merula* (làbrid) l'hoste definitiu. Recentment també ha estat descrit un cicle biològic restringit al musclo *Mytilus edulis*, de les costes atlàntiques americanes (SYPEK, 1979).

El tegument de la cercària, així com el de la generalitat de plathelminths, presenta la capa més externa de la paret del cos constituïda per una zona anucleada que, a diferència de les rèdies i dels esporocists, no presenta *microvilli*, però per contra pot presentar espines, com *Schistosoma mansoni*, i també hi ha mitocondris i diferents tipus d'òrgànuls. Com a regla general, aquesta capa anucleada descansa damunt d'una làmina basal, i a sota hi ha dues capes de musculatura, circular i longitudinal; a sota ja es troba el parènquima.

En les ventoses, estructures típiques dels trematodes, presents en totes les fases del cicle biològic des de la cercària fins a l'adult, l'estudi ultraestructural demostra l'existència d'una musculatura radial i circular, com ja ha estat observat per REES (1974) a la cercària de *Cryptocotyle lingua*.

El present treball constitueix una introducció a l'estudi ultraestructural de la cercària de *Proctoeces maculatus* (Trematoda: Digenea: Fellodistomatidae), posant èmfasi a l'ultraestructura del tegument, acetàbul o ventosa ventral i parènquima, i descriu el desenvolupament de la cercària a l'interior de l' esporocist.

MATERIAL I MÈTODE

Els musclos comprats als mercats de Barcelona, provenen de viviers de la costa gallega i han estat passats per la depuradora. L'índex de parasitisme és de l'1 %.

L'existència d'infecció en el musclo es fa palesa mitjançant l'aparició d'unes zones de color taronja als òrgans infectats,

que no són més que acumulacions de nombrosos esporocists del trematode en qüestió.

Per la forma dels esporocists i per la seva profusió numèrica, s'ha pogut treballar amb esporocists aïllats, en càpsules de Petri en aigua de mar, mantenint-se en aquestes condicions extraparasitàries fins a un període de temps d'una setmana a 4° C, i, fins i tot, emetent cercàries.

Ambdues formes larvàries s'han tenyit vitalment, i s'han obtingut els millors resultats amb el roig neutre a una concentració de l'ordre de 1:10.000, posant-se de manifest, quan ha penetrat totalment el colorant, els cecs intestinals i l'aparell excretor de les cercàries.

Per a l'estudi al microscopi electrònic de transmissió, els esporocists han estat sotmesos a una doble fixació amb glutaral·dehid al 2,5 % tamponat amb Sörensen a pH 7,2, durant dues hores a 4° C, seguit d'una postfixació amb OsO₄ a l'1 %, tamponat igualment amb Sörensen. El mitjà d'inclusió ha estat preferentment l'araldita. Generalment els talls ultrafins obtinguts han estat sotmesos a un contrast amb acetat d'uranil al 2 % en solució aquosa, seguit del citrat de plom, preparat d'acord amb la tècnica de REYNOLDS (1963). L'observació ha estat duta a terme en un microscopi de transmissió Phillips EM 200, del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

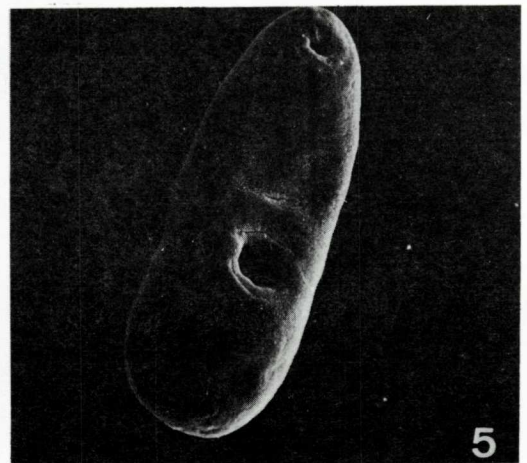
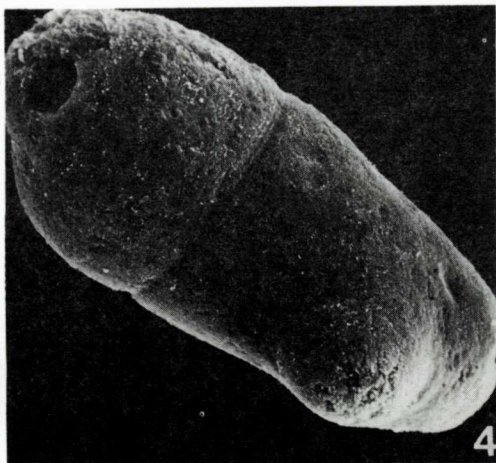
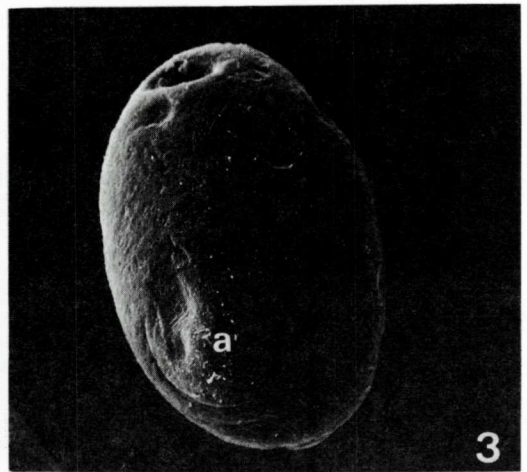
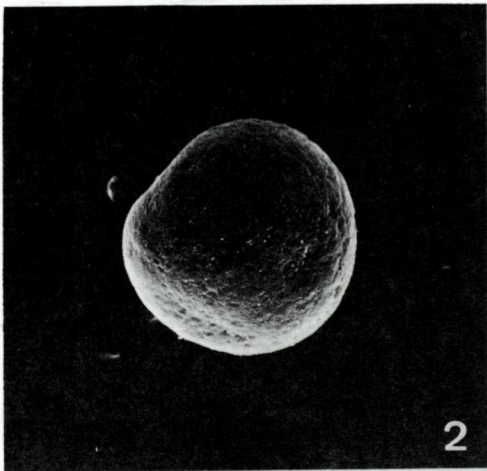
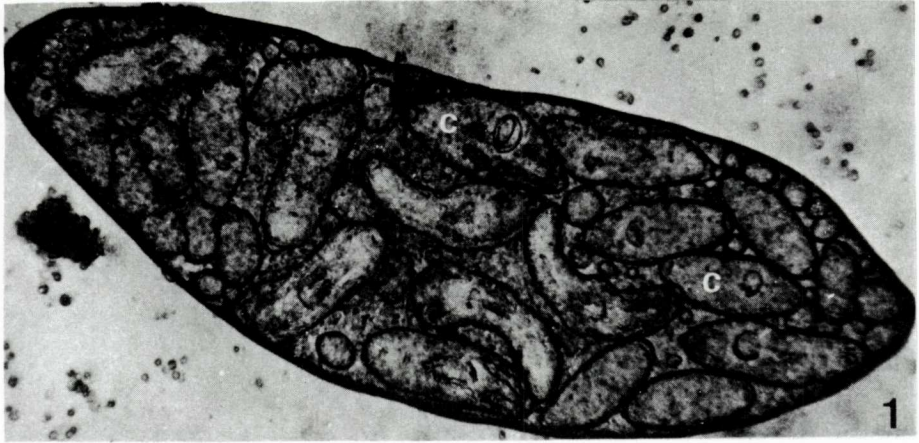
Igualment per a l'observació al microscopi electrònic d'escombratge, els esporocists aïllats han estat sotmesos a la mateixa doble fixació. Després han estat tractats amb CO₂ líquid i sotmesos a la pressió i temperatura corresponents al seu punt crític. Finalment han estat metallitzats mitjançant la tècnica del *sputtering*. Les observacions han estat efectuades en

FIG. 1. Esporocist amb les cercàries en formació en el seu interior. c, cercària. 75x.
Sporocyst with undeveloped cercariae inside. c, cercaria. 75x.

FIG. 2. Bola germinativa. 600x.
Germinating ball. 600x.

FIGS. 3 i 4. Diferenciació de l'acetàbul. a, acetàbul. 600x.
Differentiation of acetabulum. a, acetabulum. 600x.

FIG. 5. Cercària formada. 300x.
Developed cercaria. 300x.



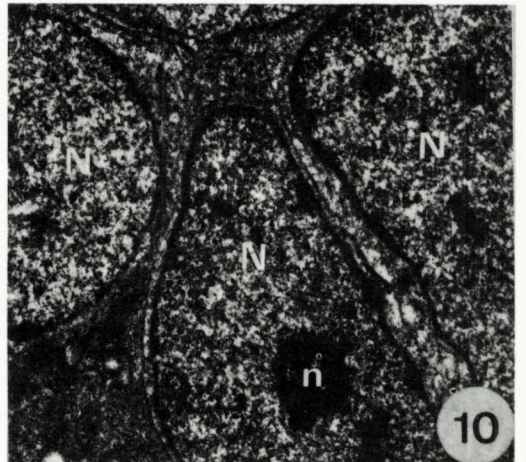
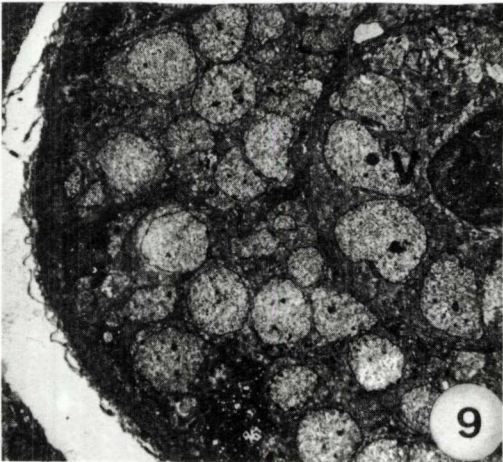
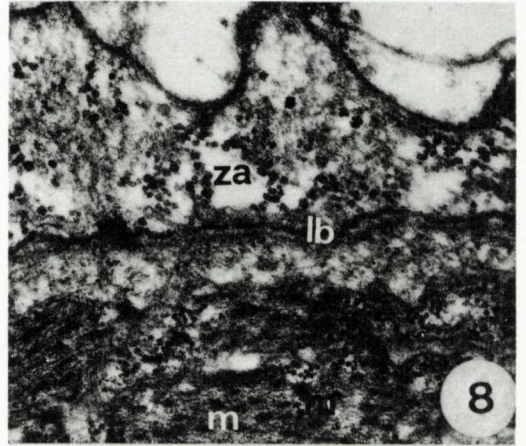
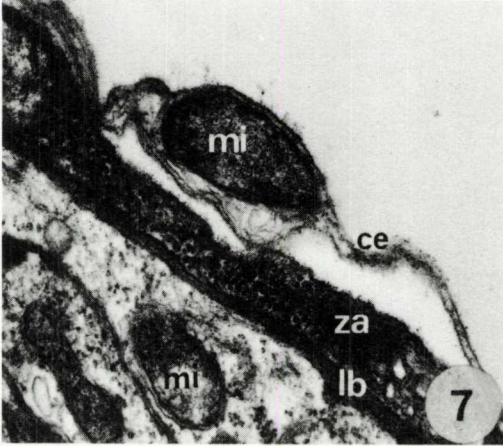
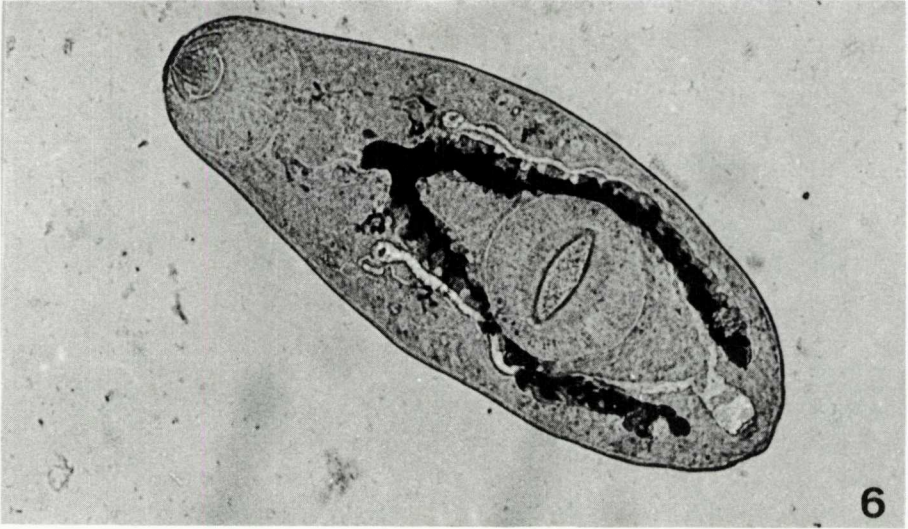


Fig. 6. Cercària tenyida amb roig neutre. 320x.
Cercaria with neutral red stain. 320x.

Figs. 7 i 8. Tegument: za, zona anucleada; ce, coberta d'origen esporocístic; lb, làmina basal; mi, mitocondria; m, musculatura. 39000x i 48500x, respectivament.

Tegument. za, unnucleated zone; ce, sporocystic origin cover; lb, basal lamina; mi, mitochondrion. Respectively, 39000x, 48500x.

Figs. 9 i 10. Parènquima: V, ventosa; N, nucli; n, nuclèol. 1650x i 9500x, respectivament.

Parenchyma. V, sucker; N, nucleus; n, nucleolus. Respectively, 1650x, 9500x.



un microscopi electrònic d'escombratge Cambridge Stereoscan S.4, del Servei anteriorment esmentat.

Per a l'extracció dels elements de dintre dels esporocists mares (cercàries i esporocists en formació), s'ha emprat la tècnica dels ultrasons, tècnica habitualment emprada per a eliminar les impureses de tot material del qual es vol estudiar la superfície i que, en aquest cas, ha servit per a fragmentar els esporocists i treure'n el contingut i, fins i tot, obtenir cercàries trencades de tal forma que ens ha estat permès de veure la superfície interna de l'acetàbul amb una imatge semblant a la que donaria la tècnica de la criofractura (figura 12).

OBSERVACIONS

Els esporocists tenen forma de sac ovalat d'uns 800 μm de llargada i donen lloc a la vegada a esporocists i a cercàries (fig. 1). Aquestes dues formes larvàries en els seus primers estadis de formació tenen forma subsfèrica, i els elements que donaran lloc als esporocists són mòbils, mentre que els que donaran lloc a les cercàries es presenten rígids des del primer moment del desenvolupament. El moviment dels esporocists en formació és una contracció semblant a la dels esporocists madurs.

Així mateix, amb l'ajut del microscopi electrònic d'escombratge, es veu que tant les cercàries en formació com les ja desenvolupades presenten una superfície llisa amb absència total de les estries, espines i protuberàncies que es troben en altres cercàries (figs. 2-6), mentre que els esporocists en formació presenten les estries i

microvilli que ja han estat observades en els esporocists madurs (FERRER, 1979).

DESENVOLUPAMENT DE LA CERCÀRIA

La bola germinativa que donarà lloc a la cercària augmenta de grandària i la primera cosa que es diferencia és la ventosa oral (fig. 3). Després es comença a diferenciar l'acetàbul, apareixent un bony que tanca una cavitat. Finalment aquesta cavitat s'obre a l'exterior (figs. 3-5).

Un cop madura la cercària, surt de dintre de l'esporocist i és emesa per l'hoste parasitat. Normalment la cercària abandona l'esporocist sortint per un porus que té a tal efecte, el porus de posta (FERRER, 1979).

Observacions *in vivo*, però, han permès veure que quan l'esporocist degenera, queden encara cercàries vives en el seu interior, i llavors surten de l'esporocist tot foradant qualsevol punt de la paret, independentment de l'existència del porus de posta.

MORFOLOGIA DE LA CERCÀRIA

La cercària de *Proctoeces maculatus* és distoma i gimnofala, i observada *in vivo* en coloració vital amb roig neutre (fig. 6) presenta l'aparell digestiu amb els dos cecs intestinals característics, on preferentment s'acumula el colorant. També amb el mateix mètode de coloració i, en el moment en què la cercària és a punt de degenerar, és quan poden veure's el màxim nombre de característiques pel que fa a l'aparell excretor: la vesícula excretora i els conductes excretors, els descendents i part dels secundaris. Les cèl·lules flamígeres no s'arriben a veure ben bé perquè estan camuflades per les cèl·lules parenquimàtiques properes a elles. Igualment *in vivo* es visualitza la faringe, la ventosa oral i l'acetàbul.

TEGUMENT

Quan la cercària roman dintre de l'esporocist, durant el seu desenvolupament, està rodejada per una coberta que s'origina a partir de l'esporocist. Aquesta coberta presenta mitocondris (amb molt poques crestes com és típic en organismes

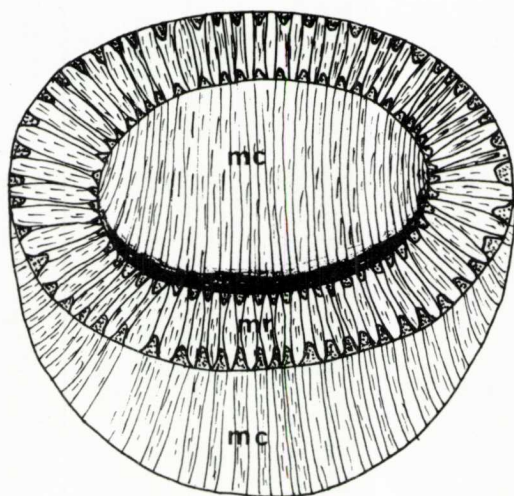


FIG. 11. Esquema de la disposició de les fibres musculars de l'acetàbul. mr, musculatura radial; mc, musculatura circular.
Disposition schema of muscular fibres of acetabulum. mr, radial muscle; mc, circular muscle.

endoparàsits), nuclis, però no hi ha límits cel·lulars diferenciats, essent, doncs, de tipus sincicial; i, finalment, una vacuolitzaació que paulatinament va creixent durant el desenvolupament de la cercària, indicatiu que aquesta coberta va degenerant durant el procés de formació de la cercària (fig. 7).

La cercària apareix limitada exteriorment per les capes característiques de tots els plathelminths: zona anucleada externa, que presenta els orgànuls normals: mitocondris, amb les característiques esmentades abans, vesícules de diferent mida i inclusions. Durant el desenvolupament de la cercària, aquesta capa anucleada es va engruixant i, tanmateix, la densitat de les inclusions va minvant. La làmina basal presenta un aspecte granulós, i les dues capes musculars són, típicament, una de circular i l'altra longitudinal (figs. 7, 8).

PARÈNQUIMA

Sota el tegument, la cercària presenta cèl·lules de naturalesa conjuntiva que constitueixen el parènquima. Els nuclis d'aquestes cèl·lules tenen una acumulació regular de cromatina i un nuclèol molt ostensible. Entre els nuclis veïns es veuen els plasmalemmes de les dues cèl·lules cor-

responents, hi ha un espai intercel·lular molt petit, i no s'ha observat cap tipus de contacte especial (figs. 9, 10).

ACETÀBUL

Amb tinció vital amb roig neutre, l'acetàbul presenta una vora epidèrmica que envolta l'obertura (fig. 2). El microscopi electrònic d'escombratge permet veure (fig. 12) que l'acetàbul és un òrgan esfèric que tanca una cavitat interna també esfèrica. Funcionalment l'acetàbul és important pel moviment de reptació i com a òrgan adhesiu, cosa que té una especial importància en la cercària que ens ocupa, perquè, com ja hem assenyalat, es tracta d'una cercària gimnofala, és a dir, sense cua, i per tant el desplaçament fora del músculo, el fa per reptació i no per natació com succeeix en d'altres cercàries.

Fonamentalment, al microscopi electrònic de transmissió (figs. 14, 15), la paret de l'acetàbul presenta dos sistemes de fibres musculars: unes en direcció radial i les altres en direcció circular. Tot tallant l'acetàbul equatorialment, les fibres circulars queden tallades transversalment, i no es veu cap ordenació geomètrica constant dels filaments d'actina i miosina.

DISCUSSIÓ

Les dades ultraestructurals obtingudes del tegument concorden amb les descripcions fetes per BIBBY & REES (1971), MORRIS (1971), REES (1972), HOCKLEY (1972), KECHEMIR (1978) en diferents trematodes digenètics.

La coberta sincicial d'origen esporocístic ja va ser assenyalada en *Schistosoma mansoni* (HOCKLEY, 1972) i en *Halipegus ovocaudatus* (KECHEMIR, 1978) entre d'altres. Cal dir, però, que per l'efecte dels ultrasons en l'estudi dut a terme, no és possible veure aquesta coberta a les imatges del microscopi electrònic d'escombratge.

Les estries i els *microvilli* i, també, el moviment continu de contracció existents en totes les fases de creixement dels esporocists confirmen el fet que la nutrició d'aquests organismes és per absorció a través del tegument, com és característic també dels esporocists i les rèdies, que són formes larvàries amb un aparell digestiu inexistent o bé molt reduït.

Finalment, cal assenyalar que aquesta introducció a l'estudi ultraestructural de la cercària de *Proctoeces maculatus*, dóna peu a observacions d'altres elements de la cercària tan importants com els diferents tipus de glàndules, tant a nivell de

tegument com a nivell de ventoses i, també, a observacions d'òrgans interns com els cecs intestinals i els elements excretors, observacions i estudis que seran objecte de properes publicacions.

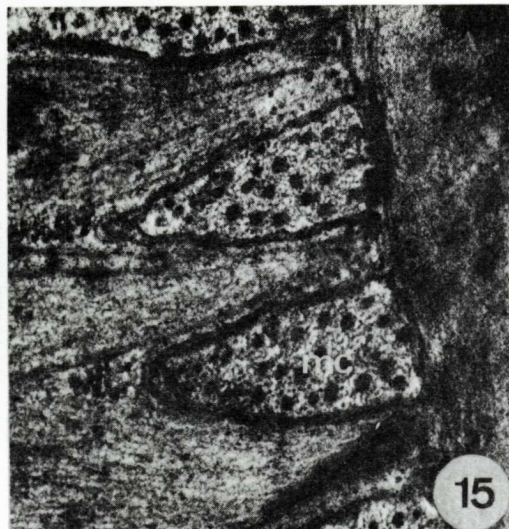
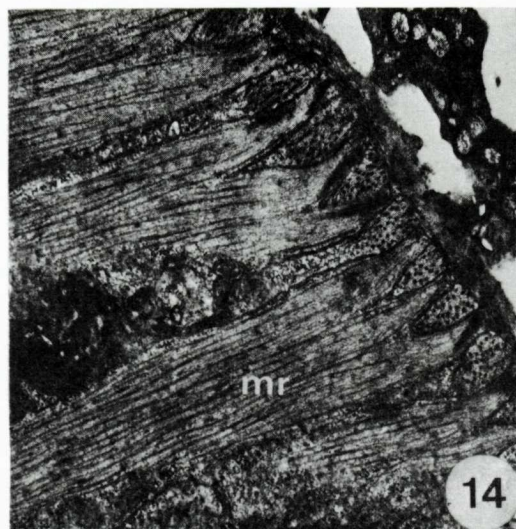
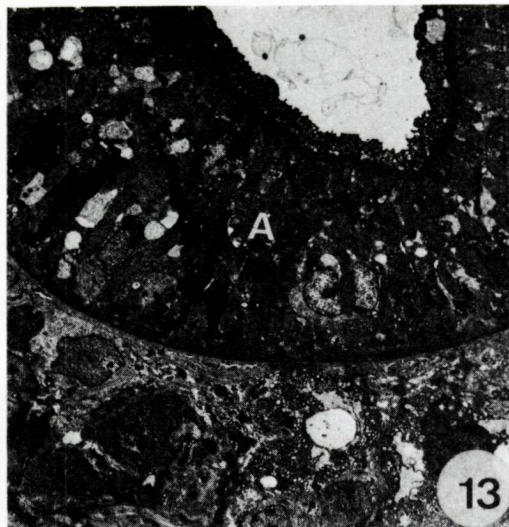
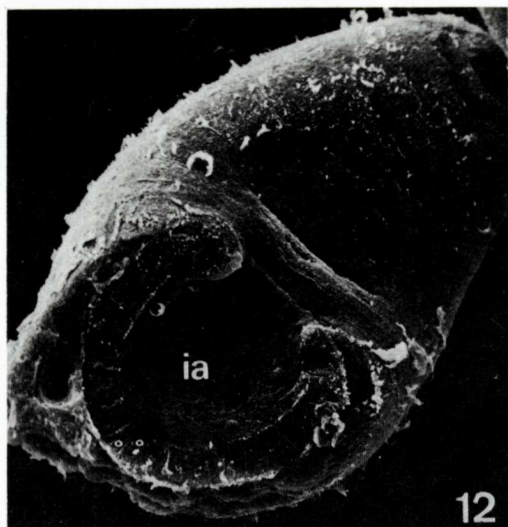


FIG. 12. Cercària tractada amb ultrasons; es pot veure l'interior de l'acetàbul (ia). 500x.
Cercaria under ultrasound effects. ia, inside of acetabulum. 500x.

FIG. 13. Zona de l'acetàbul. A, acetàbul. 1600x.
Acetabulum zone. A, acetabulum. 1600x.

FIGS. 14 i 15. Detalls de l'acetàbul tallat equatorialment. mr, musculatura radial; mc, musculatura circular. 16250x i 64500x, respectivament.
Acetabulum details in equatorial section. mr, radial muscle. mc, circular muscle. Respectively, 16250x, 64500x.

BIBLIOGRAFIA

- COLE, H. A. 1935. On some larval trematode parasites of the mussel (*Mytilus edulis*) and the cockle (*Cardium edule*). *Parasitology*, 27: 276-280.
- FERRER, J. 1981. Estructura y ultraestructura del esporocisto de un trematodo parásito del mejillón *Mytilus edulis*. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 79 (1): 5-15.
- HOCKLEY, D. J. 1972. *Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument. *Parasitology*, 64: 245-252.
- KECHEMIR, N. 1978. Evolution ultrastructurale du tegument d'*Halipegus ovocaudatus* (Vulpian, 1858) au cours de son cycle biologique. *Z. Parasitenkd.*, 57: 17-33.
- MARTÍNEZ, J. C. 1972. *Recherches sur quelques stades larvaires de Digènes parasites de Mytilus galloprovincialis Lmk.* Thèse Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- MORRIS, G. P. 1971. The fine structure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Z. Parasitenkd.*, 36: 15-31.
- REES, G. 1974. The ultrastructure of the body wall and associated structures of the cercaria of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) (Digenea, Heterophyidae) from *Littorina littorea* L. *Z. Parasitenkd.*, 44: 239-265.
- REISSIG, M. 1970. Characterization of the cell types in the parenchyma of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 60: 273-279.
- STUNKARD, H. W. & UZMANN, J. R. 1959. The life-cycle of the digenetic trematode, *Proctoeces maculatus*, and description of *Cercaria adranocerca*. *Biological Bulletin*, 116: 184-193.
- SYPEK, J. P. 1979. *Histopathological investigations of the digenetic trematode Proctoeces maculatus (Loos 1901), Odhner 1911, and its bivalve molluscan host, Mytilus edulis L.: Life cycle, host defense reactions and mechanism of pathogenesis.* Thesis, University of Rhode Island.
- UZMANN, J. R. 1953. *Cercaria milfordensis* n. sp., a microcercous trematode larva from the marine bivalve *Mytilus edulis* L. with special reference to its effect on the host. *J. Parasitology*, 39: 445-451.