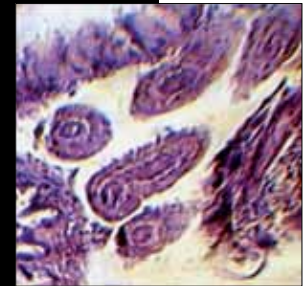


Estudio de los tejidos de moluscos *Lymnaea truncatula* y *Lymnaea cubensis* infectados por miracidios de *Fasciola hepatica*

Flora Sokolina^a, José Lino Zumaquero Ríos^b, Georgie Ignatiev^c, Christian Neftali Villaseñor Orozco^b, José Trinidad Sánchez-Vega^a, Héctor Cabrera Fuentes^{a,c}, Jorge Tay Zavala^c



Otorrigada por el autor

Resumen

En el presente trabajo se estudiaron las vías de penetración del miracidio de *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758) dentro del hepatopáncreas de *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774) y *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839), en 2 moluscos obtenidos de las zonas endémicas de Fasciolosis de Rusia y de la República Mexicana respectivamente¹.

El trayecto de la larva mostró la disolución de la sustancia intercelular y deformación de células epiteliales de los tejidos de los moluscos. A nivel citológico se observaron cambios en el epitelio lineal de cobertura de los ductos de la glándula digestiva y en el tejido conjuntivo del hepatopáncreas. Se observaron diferencias en las vías de penetración y afectación en las dos especies de moluscos estudiados, marcando así las diferencias de las condiciones ecológicas que prevalecen en cada zona geográfica.

Palabras clave: *Fasciola hepática*, tejidos infectados.

Study of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea cubensis* mollusk tissues infected by *Fasciola hepatica* miracidia

Abstract

The present work investigated the penetration pathways of *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758) into the hepatopancreas of *Lymnaea truncatula* (Muller, 1774) and *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839), two mollusks obtained from Fasciolosis endemic areas in Russia and Mexico, respectively.

The larval trajectory showed dissolution of intercellular substance and deformation of epithelial cells of mollusk's tissues. Cytological changes in the ductal epithelium of the digestive gland and in the connective tissue of hepatopancreas were found. Some differences in the penetration and damage pathways in the two species of mollusks studied were observed; thus highlighting the differences in the environmental conditions prevailing in each geographic area.

Key words: *Fasciola hepática*, infected tissues.

^aUniversidad Estatal de Kassar. Rusia.

^bBenemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México.

^cFacultad de Medicina. UNAM. México, DF.

Correo electrónico: pptrini@hotmail.com

Recibido: 06-junio-2011. Aceptado: 14-julio-2012.

INTRODUCCIÓN

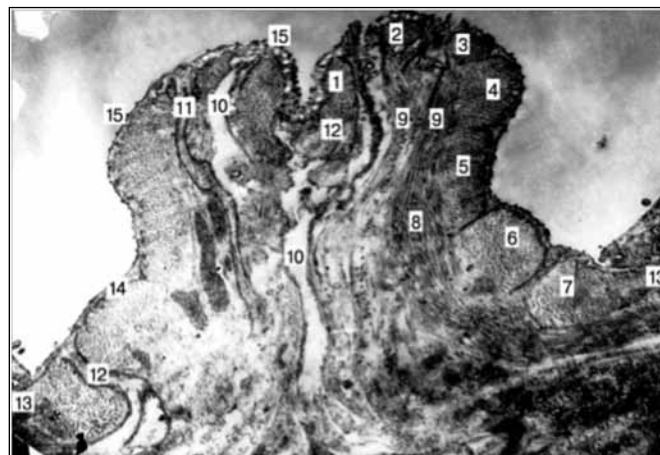
En los últimos años la fasciolosis ha sido notificada en más de 40 países. Las investigaciones realizadas por diversos grupos interdisciplinarios, han aporta-

Anteriormente creíamos que los gusanos de *Fasciola* sólo avanzan por ductos espaciados de tejidos, pero no a través de las fibras colagénicas en la sustancia intercelular como se observó en este estudio.

do resultados muy significativos para entender cada uno de los procesos que interactúan en la relación de este trematodo con sus hospederos y con el medio ambiente² así como con las manifestaciones clínicas que producen³; sin embargo, se requiere continuar con estudios y acciones tendientes para tratar de disminuir los daños socioeconómicos y a la salud que este parásito produce.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron moluscos, tanto de regiones de Rusia (*Lymnaea truncatula* [Müller, 1774]), como del Estado de Puebla, República Mexicana (*Lymnaea cubensis* [Pfeiffer, 1839]) con la finalidad de analizar histológicamente sus tejidos después de ser infectados con larvas de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).



Origiada por el autor

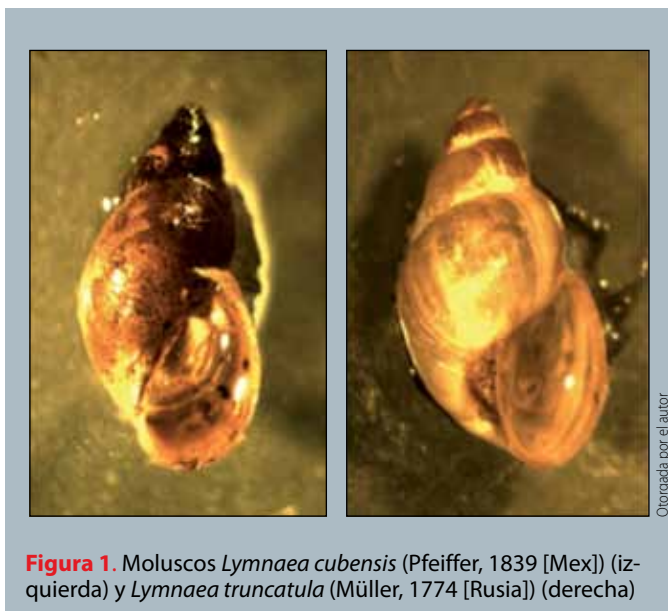
Figura 2. Terobatrio *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

1-7. Fibras musculares circulares. 8. Fibras especializadas. 9. ramas de músculos retráctiles. 10. canales glandulares principales. 11. canales de glándulas accesorias. 12. canales de glándulas laterales. 13. canales de glándulas subepiteliales. 14. hipodermis sincisial. 15. "espinas" (Microscopia electrónica $\times 11,200$).

Los moluscos colectados se desarrollaron en el laboratorio satisfactoriamente, se observó su preferencia por alojarse en las paredes superiores de los contenedores de agua. Los miracidios una vez colocados en esos mismos recipientes, se trasladaron también a esas mismas zonas, debido al resultado de las interacciones fotohemogeotáxicas, iniciando posteriormente la penetración de los caracoles.

Estos, una vez infectados, fueron fijados en solución de Bouen, además, algunos de ellos se mantuvieron en este fijador hasta por 2 meses con el fin de descalcificar su concha y así estar en la posibilidad de realizar cortes histológicos sin destruir la topografía del molusco. Posteriormente el fijador fue retirado mediante alcohol etílico a 70° , después, los cortes fueron llevados a través de rangos de alcohol con concentraciones ascendentes, transferidos dentro de medios intermedios y después envueltos con parafina. Finalmente, se realizaron cortes de 4 a 7μ y fueron teñidos con hematoxilina-eosina, de acuerdo al método de Geidengain (figura 1).

Cabe señalar que, con la finalidad de contar con el éxito en la infección de los moluscos, se realizaron detenidamente los 5 factores estudiados y propuestos por Sokolina y cols⁴.



Origiada por el autor

Figura 1. Moluscos *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839 [Mex]) (izquierda) y *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774 [Rusia]) (derecha)

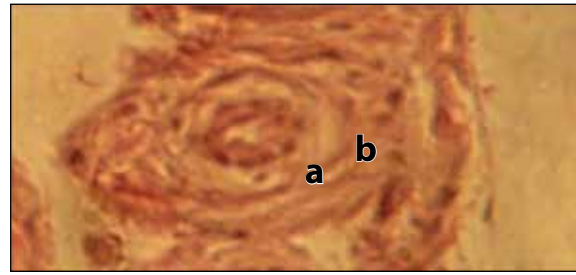
En los últimos años la fasciolosis ha sido notificada en más de 40 países. Las investigaciones realizadas por diversos grupos interdisciplinarios, han aportado resultados muy significativos para entender cada uno de los procesos que interactúan en la relación de este trematodo con sus hospederos y con el medio ambiente así como con las manifestaciones clínicas que producen; sin embargo, se requiere continuar con estudios y acciones tendientes para tratar de disminuir los daños socioeconómicos y a la salud que este parásito produce.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los miracidios de *F. hepática* y tejidos de los moluscos fueron estudiados mediante microscopía óptica, electrónica y de barrido, gracias a lo cual observamos que en su parte frontal el miracidio cuenta con una papila apical denominada terobatrio, la cual utiliza para sujetarse a la superficie de la pared epitelial del cuerpo del molusco y así, penetrar a los tejidos de especies que infecta (**figura 2**).

La base de este órgano tiene un diámetro aproximado de $32\ \mu$ y su longitud es de $29\ \mu$. La parte activa de la papila mide entre 15 a $16\ \mu$ de largo. Además, se encuentra cubierto por una hipodermis sincisial, cuyo espesor es irregular, dado que su grosor varía de $982\ \text{Å}$ a $3214\ \text{Å}$, esta estructura está densamente adyacente a la membrana basal y cubre los miocitos circulares de la probóscide.

La densa membrana plasmática cubre el hipodermo sincisial del terobatrio así como unas estructuras afiladas de consistencia densa que corresponden a pequeños apéndices inclinados de $467\ \text{Å}$ de altura. Estos apéndices se encuentran localizados aproximadamente a la mitad de la longitud del terobatrio y mantienen la misma distancia uno



Otorgada por el autor

Figura 3. Miracidio esporocisto (a) penetrando el epitelio inferior del cuerpo del molusco (b) (microscopía electrónica $\times 1350$).

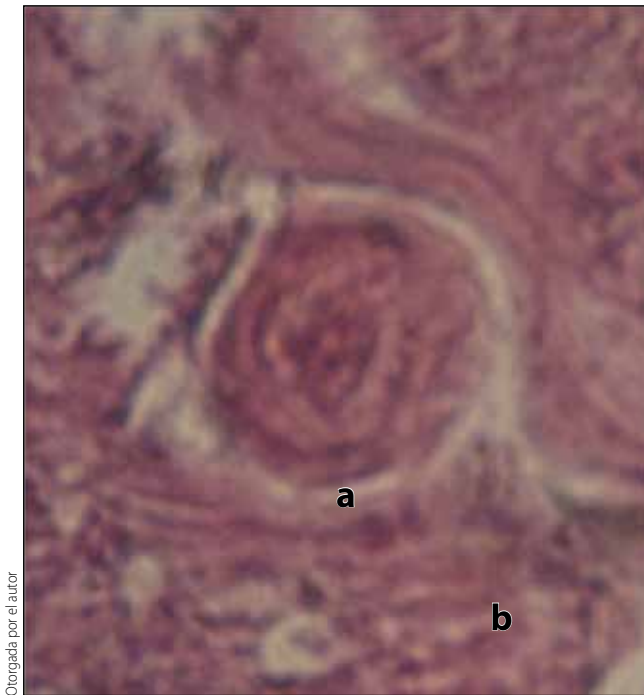
del otro. A estas estructuras las hemos denominado “espinas”, dado que le dan al miracidio la posibilidad de sujetarse entre las células de la pared del epitelio, penetrando así, por debajo de este y moviéndose entre las células de los tejidos del molusco.

La membrana basal está agujerada por los desmosomas, los cuales son estructuras semejantes a “poros” que comunican al hipodermo sincisial con células de la fibra muscular. La longitud de los desmosomas es de $992\ \text{Å}$. Con una distancia entre “poro y poro” de $472\ \text{Å}$ a $1379\ \text{Å}$. También, en la parte superior del terobatrio se localizan formaciones sensoriales y poros excretores de las glándulas⁵.

Se observaron también 2 acúmulos longitudinales de miocitos en la parte frontal del terobatrio, uno se encuentra fijo en su porción superior, y el otro, rodeando al primero, pero sólo que se localiza dentro de una pared subepitelial.

Las células epiteliales de *L. truncatula* tienen un tamaño de 5 a $10\ \mu$ y el epitelio respiratorio mide alrededor de 15 - $16\ \mu$ en promedio, en cambio, las células epiteliales de *L. cubensis* miden de 10 a $14\ \mu$ y el epitelio respiratorio aproximadamente $16\ \mu$.

Nosotros concluimos que el miracidio se ancla sobre el epitelio del molusco, formando así una especie de embudo de succión al realizar contracciones simultáneas de los 2 miocitos longitudinales y el primer miocito circular. Posteriormente, el diámetro del embudo se incrementa al expandirse las contracciones del segundo y tercer miocito circulares. Esta última contracción origina que se abran 4 poros de la glándula apical y 4 poros de las glándulas accesorias, con lo que se deja fluir secreción hacia la parte baja del embudo formado.



Origiada por el autor

Figura 4. Miracidio esporocisto (a) penetrando el hepatopáncreas (b) a lo largo de la sustancia intercelular de colágena (microscopia electrónica $\times 1350$).



Origiada por el autor

Figura 5. Miracidio esporocisto (a) penetrando directamente al epitelio del hepatopáncreas (b) (microscopia electrónica $\times 1350$).

Esta secreción formada en las glándulas del miracidio se encuentra constituida por hialuronidasa, mientras que la sustancia intercelular de las células epiteliales del molusco está compuesta de mucopolisacáridos, con gran contenido de ácido hialurónico (figura 3).

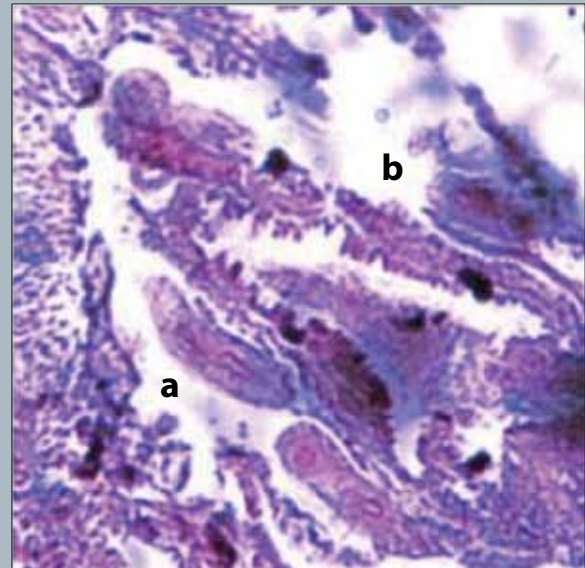
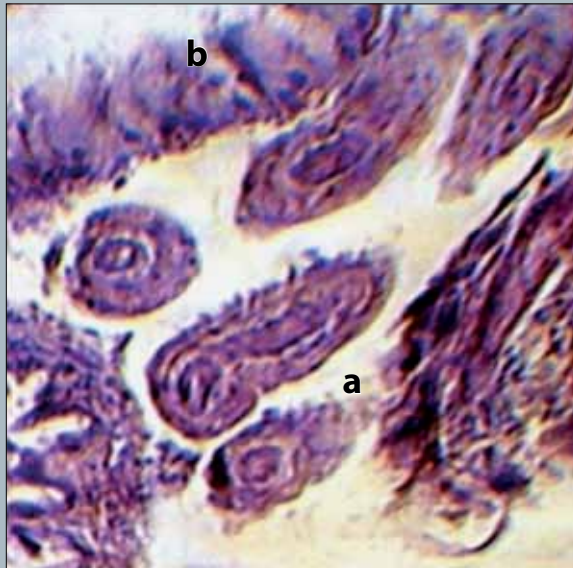
La interacción de la hialuronidasa y el ácido hialurónico se mantiene por espacio de 30-45 min,

La secreción de la glándula caudal se consume mientras penetra a través del tegumento del molusco, los corpúsculos embrionarios inician su incremento, la parte frontal del gusano ligeramente crece a su alrededor, el terobatrio se aplana y las glándulas apical y las 4 accesorias son discretamente observables, mientras que se ve también como opera el sistema protonefridial.

Las glándulas de penetración detienen su función, todas las transformaciones ocurren en 24 h y el gusano se convierte en esporocisto, el cual crece internamente en 5 días en la glándula digestiva para transformarse en esporocisto madre. Estos son activos y móviles, originando cambios importantes en el hepatopáncreas como oclusión local de los senos venosos, inflamación de los conductos de la glándula digestiva y atrofia del tejido conjuntivo. Sobre el décimo día, el esporocisto se aquieta y comienza el nacimiento de las redias.

tiempo en que se disuelve la sustancia intercelular, con lo que se asegura la penetración del miracidio bajo la pared epitelial del molusco. Para ese tiempo el miracidio se desprende de la capa epitelial ciliar de su cuerpo, que consiste de 21 células y la hipodermis sincisial de la membrana basal. Los gusanos en este estado (que dura aproximadamente 24 h de acuerdo con el tiempo consumido en la penetración al hígado), son llamados “miracidio esporocisto”⁶.

Una vez que los gusanos han penetrado por debajo de la pared epitelial del cuerpo de los caracoles, tienen que librar otro obstáculo correspondiente al tejido conjuntivo que rodea el hepatopáncreas y sus



Otorgada por el autor

Figura 6. *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758) esporocisto (a) en el tejido conjuntivo destruido del hepatopáncreas (b) del molusco *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774) (Rusia, izquierda) y *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839) (México, derecha) ($\times 1350$).

La presión ejercida sobre los conductos hepáticos por los parásitos genera la desaparición de sus hendiduras; dificulta el acceso de hemolinfa, sustancia alimenticia y oxígeno, lo que genera que se produzcan depósitos adiposos en el hígado del molusco y se presente autólisis de las células digestivas; los moluscos mueren de hambre, además de pasar por un proceso "tóxico" que genera profundas alteraciones fisiológicas y muerte de las células hepáticas.

epitelios, mientras tanto, el terobatrio permanece elongado.

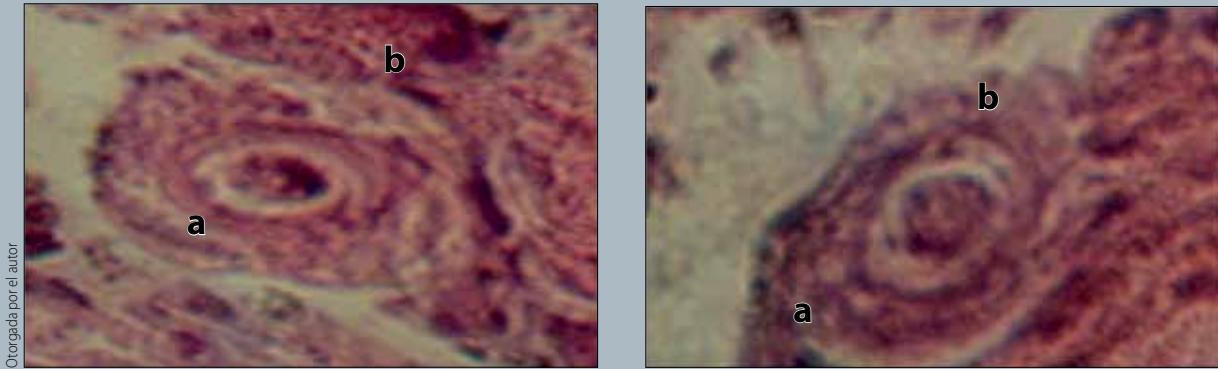
Son diversas y abundantes las células que configuran el tejido conjuntivo de *L. truncatula* (no así las de *L. cubensis*), éstas están representadas por células fusiformes y células en forma de estrella que

con sus ramales se sujetan a la membrana basal que es muy delgada, y no es raro observar que se acompañe de fibras elásticas de colágena unidas dentro de paquetes robustos. Estas fibras son siempre notables por su gran durabilidad y poca elasticidad, además son parte de la sustancia intercelular que es amorfa, viscosa e incolora, la cual no tiene diferenciación morfológica visible y no es observable mediante microscopía óptica (figura 4).

Anteriormente creíamos que los gusanos de *Fasciola* sólo avanzan por ductos espaciados de tejidos, pero no a través de las fibras colagénicas en la sustancia intercelular como aquí observamos⁴.

Suponemos que la secreción de las 4 glándulas laterales está involucrada en la formación del tegumento del futuro esporocisto, y es la responsable de regenerar los daños originados por la penetración inicial.

Se observó también, que la secreción de la glándula caudal se consume mientras penetra a través del tegumento del molusco, los corpúsculos embrionarios inician su incremento, la parte frontal del gusano ligeramente crece a su alrededor, el teroba-



Orografía por el autor

Figura 7. Esporocisto (a) de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) en el tejido conjuntivo del molusco (b) *L. truncatula* Müller, 1774 (Rusia, izquierda) y *L. cubensis* Pfeiffer, 1839 (México, Derecha) (x 1350).

trio se aplana y las glándulas apical y las 4 accesorias son discretamente observables, mientras que se ve también como opera el sistema protonefridial⁶.

Con todo lo antes descrito, queda sólo una barrera que superar, la cual corresponde a un epitelio intergumentario del hepatopáncreas. Superado éste, el miracidio se encontrará en el tejido conjuntivo del hígado. En los cortes histológicos de los tejidos observamos miracidios-esporocistos penetrando el epitelio del hepatopáncreas (**figura 5**).

Las glándulas de penetración detienen su función, todas las transformaciones ocurren en 24 h y el gusano se convierte en esporocisto, el cual crece internamente en 5 días en la glándula digestiva para transformarse en esporocisto madre. Estos son activos y móviles, originando cambios importantes en el hepatopáncreas como oclusión local de los senos venosos, inflamación de los conductos de la glándula digestiva y atrofia del tejido conjuntivo. Sobre el décimo día, el esporocisto se aquieta y comienza el nacimiento de las redias (**figura 6**).

Como es bien conocido dentro del estudio del ciclo biológico, estas redias reciben el nombre de redias de primera generación y éstas a su vez darán origen a redias hijas para finalmente dar pie a la formación de las cercarias para abandonar finalmente en esta fase a los moluscos.

Se encontró también en los cortes longitudinales, tangenciales y transversos del molusco (*L. cubensis*) que miracidios que penetran a través de la parte

dorsal de la superficie lateral de su pie, aparentemente sobreviven y alcanzan el hepatopáncreas, sólo si penetran en ductos lagunares cercanos al hígado, lo que no ocurre para la otra especie del molusco, por lo que se cree que este último, sea más selectivo su ingreso.

Se descubrieron larvas atrapadas (*L. truncatula*). Asumimos que estos miracidios no hallaron o encontraron pocos recursos metabólicos para su seguimiento. También se puede relacionar con la búsqueda de especies puente en el medio acuoso en condiciones naturales por un largo tiempo (**figura 7**).

Como las fibras del tejido conjuntivo del molusco se desarrollan de manera abundante, la cantidad de sustancia amorfa disminuye, pierde mucopolisacáridos y dificulta la penetración de las larvas en el hepatopáncreas.

Las mejores larvas de fasciola se adaptan al parasitismo en los tejidos de este molusco, viene una reacción inflamatoria débil y se obtiene una estructura más específica por las cápsulas alrededor de ellos.

El desarrollo de los esporoquistes de *Fasciola* en la glándula digestiva de los moluscos *L. truncatula* y *L. cubensis* afecta sus tejidos y sus ductos. Se presentan cambios a nivel citológico en el epitelio de cubierta de los ductos glandulares digestivos de los moluscos¹.

Ginetsinskaya subraya que la presión ejercida sobre los conductos hepáticos por los parásitos genera la

El hígado de estos moluscos consiste en numerosos tubos formados por una capa de células hepáticas con núcleo redondo u oval situado en la parte basal de la célula, y tejido elástico de sostén (células ovaladas con núcleo redondo u oval pero con superficie espiculada).

desaparición de sus hendiduras; dificulta el acceso de hemolinfa, sustancia alimenticia y oxígeno, lo que genera finalmente que se produzcan depósitos adiposos en el hígado del molusco y se presente autólisis de las células digestivas; por ende, los moluscos mueren de hambre, además de pasar por un proceso “tóxico” al tener la hemolinfa problemas de salida hacia los riñones, por lo que se acumula junto con los productos metabólicos de los parásitos, estos productos son absorbidos por el epitelio del hígado, lo que genera profundas alteraciones fisiológicas y muerte de las células hepáticas del molusco⁷.

El hígado de los moluscos *L. truncatula* y *L. cubensis* consiste en numerosos tubos redondos y ovalados en la sección transversal unidos a la masa compacta por tejido conjuntivo. Están formados por una capa de células de 2 tipos: hepático (grandes células cilíndricas con núcleo redondo u oval situado en la parte basal de la célula) y tejido elástico de sostén (células ovaladas con núcleo redondo u oval pero con superficie espiculada).

Las larvas se localizan entre los conductos hepáticos en el tejido conjuntivo, los cuales se expanden y contraen mientras los parásitos crecen; las paredes de los conductos hepáticos se acercan, las hendiduras entre ellas disminuyen, si la mayor intensidad de invasión se da, las hendiduras se cierran completamente y las células de los ductos cambian a límites no recuperables.

Si se da una invasión seria se observa la completa destrucción de los tejidos, que causa necrosis del hepatopáncreas. Sólo quedan integumentos externos de tejido conjuntivo. Las larvas de *Fasciola* en diferentes etapas de desarrollo se sitúan debajo de estos. El molusco pronto muere.

En condiciones naturales existe una dependencia de invasión a partir de la edad y el periodo del año para los moluscos *L. truncatula*. Para *L. cubensis*, que normalmente habita cuencas de agua de México, esta dependencia no aplica.

Cabe señalar la gran utilidad de haber trabajado con las 2 especies de moluscos, dado que por las características climáticas que prevalecen en Rusia y no así en México, existe lo que llamamos una dependencia de invasión a los moluscos y una adaptación al parasitismo, ya que en condiciones adversas, la invasión y trayecto del miracidio en *L. truncatula* no se realiza, se retrasa o se interrumpe, con lo que se marca una importante diferencia en cuanto a la facilidad que tuvo la larva para ingresar y desarrollarse en *L. cubensis*. Fue significativo también el daño y muerte provocado por la larva de *F. hepática* en *L. truncatula* a diferencia de *L. cubensis*, lo que probablemente explicaría que ante tantas vicisitudes que tiene que sortear, la larva genera una importante reacción defensiva en el molusco, con lo que se presentan alteraciones metabólicas que conllevan a una toxicidad, inflamación y necrosis hepática y muerte del molusco. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sokolina FM. Ultramorphological level of knowledge of the organization in miracidium *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. Russia. Kazan; 2007. p.146.
2. Sánchez Vega JT, Tay Zavala J y Robert GL. Fasciolosis o Fascioliasis. Rev Fac Med UNAM. 1989;32-3:91-8.
3. Sánchez-Vega JT, Tay ZJ, Salinas VR, Ruiz-Sánchez D, Ordoñez MJ y Rodríguez Covarrubias JA. Fasciolosis. Presentación de un caso y revision acerca de esta trematodiosis. Rev Méx Pediatr. 2001;68(1):17-20.
4. Sokolina FM. The formation, ultrastructure, biology and ecology of *Fasciola hepatica* L. 1758. Russia. Kazan: Publishing house Kazan University; 2003. p.184.
5. Sokolina FM. The investigation of the muscular system of the *F. hepatica* miracidium/Ecologically morphological investigation of the invertebrates. Russia. Kazan: Publishing house Kazan University; 1976.
6. Sokolina FM. The early stages of the *F. hepatica* sporocyst development/The problems of the evolutionary morphology and biogeography. Russia. Kazan: Publishing house Kazan University; 1970.
7. Ginetcinskaya TA. Trematoda, life cycles, biology and evolution. Russia. Leningrad; Publishing house Science; 1968. p. 412.