

MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA DE *TRICHOMONAS GALLINAE* (RIVOLTA). ASPECTOS DE LA DIVISION Y ACCION DE LA COLCHICINA SOBRE SU ULTRAESTRUCTURA.

(OPTIC AND ELECTRON MICROSCOPY OF *TRICHOMONAS GALLINAE* (RIVOLTA). DIVISION FEATURES AND COLCHICINE ACTION ON THE ULTRAESTRUCTURE).

por

MANUEL BUSTOS RUIZ*

Introducción.

Es bien conocida la importancia de la utilización de cultivos de protozoos *in vitro*, para el estudio de su estructura. Honigberg propone el estudio ultraestructural de los tricomonádidos, como punto de partida para establecer su posición taxonómica y las líneas de su evolución.

Las investigaciones realizadas con microscopio electrónico en *Trichomonas spp.* no son muy numerosas, y sólo hay un trabajo sobre la ultraestructura de *Trichomonas gallinae* (Protozoa: Mastigophora).

Los estudios realizados sobre los aspectos que reviste la división de las diferentes especies del orden *Trichomonadida* son muy escasos. Tampoco existe ninguno que haga referencia a la ultraestructura de la división de *T. gallinae*.

La colchicina como mitotástico e inhibidor de la formación de microtúbulos se ha empleado usualmente en biología celular, en helizos, fibroblastos y leucocitos, preferentemente. Dicha droga se ha aplicado a estudios sobre biogénesis y ensamblaje microtubular de algunos protozoos aislados, y es la primera vez que se emplea en Trichomonádidos.

Nuestro trabajo tiene una triple finalidad, al aportar nuevos datos sobre la estructura y ultraestructura de *T. gallinae* y de sus fases de división, y al investigar la acción que desencadena la colchicina sobre el sistema microtubular y otros orgánulos.

* Universidad de Córdoba. Cátedra de biología. Sección de biología aplicada. Instituto de zootecnia. C. S. I. C. Facultad de veterinaria. Córdoba. (España).

Recibido para publicación el 14-3-77.

Revisión bibliográfica.

Aunque ha habido protozoólogos que se han ocupado de describir la estructura de las diversas especies de tricomonádidos, no existe abundancia de trabajos sobre el particular y menos aún sobre *Trichomonas gallinae*.

Donne (1836) describió la estructura microscópica de *Trichomonas vaginalis*.

Anderson (1955) estudió al microscopio electrónico *Trichomonas muris* (Grassi) y estableció que la estructura fina de los orgánulos de esta especie se puede tomar como prototipo del grupo.

Posteriormente, Osada (1962) estudió este protozoo comparando las estructuras que se observan mediante microscopía óptica y electrónica.

Pitelka (1963) efectuó una revisión de la ultraestructura de los protozoos, entre ellos de algunos tricomonádidos, y destacó como prototipo *Trichomonas muris*.

Joyon, Mignot, Kattar y Brugerolle (1969) realizaron un estudio comparado del sistema cinetosómico de *T. criceti*, *T. muris*, *T. minuta* y *T. augusta*. Los dos primeros, del tubo digestivo de roedores; y los segundos, del lagarto vivíparo y de la salamandra, respectivamente.

Daniel, Mattern y Honigberg (1971) estudiaron la ultraestructura de *T. muris*, e hicieron especial referencia al mastigonte. Describieron nuevas estructuras, entre ellas el cuerpo infracinetosómico.

Wenrich y Emerson (1933), Kerby (1951) y Ludvid (1954) entre otros, estudiaron la morfología de *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller) mediante el microscopio óptico.

Inoki, Ohno, Kondo y Sakamoto (1961) mostraron por primera vez las imágenes microscópico-electrónicas de la costa de *T. foetus*.

Yoshihiro Ito (1968) efectuó un estudio sobre la estructura y propiedades químicas de fracciones de *T. foetus* obtenidas por centrifugación diferencial.

El trabajo de Honigberg, Mattern y Daniel (1971), sobre la ultraestructura del sistema mastigonte de *T. foetus*, es el que aporta mayor claridad sobre los orgánulos de este protozoo.

Brugerolle (1971) publicó un estudio sobre la ultraestructura del género *Trichomitus* (Swezy, 1915) y Honigberg, Daniel y Mattern (1972) sobre *Trichomitus batrachorum* (Perty).

Honigberg, Mattern y Daniel (1963) realizaron un estudio microscópico, en *Pentatrichomonas hominis* (Davaine, 1860).

Sobre *Trichomonas vaginalis* se ha publicado mayor cantidad de trabajos, tanto en el campo de la microscopía óptica como electrónica.

Inoki, nakanishi y Nakabayashi, (1959) fueron los primeros en acometer el estudio de la ultraestructura de *T. vaginalis*.

Cavier, Georges y Savel (1965) contribuyeron al estudio citológico de *T. vaginalis*, usando digitonina como agente dispersante del citoplasma, puesto que el grosor de este protozoo hace difícil la observación microscópica en contraste de fases.

Yeh, Huang y Lien (1966) estudiaron la ultraestructura del mastigonte y de las mitocondrias en *T. vaginalis* y establecieron que la forma de célula varía en los cultivos *in vitro*.

Brugerolle (1971-1972) puso de manifiesto procesos de endocitosis y estructuras lisosómicas en *T. vaginalis*, mediante la acción de óxido de torio al medio de cultivo, lo que permite ver las vías de penetración alimentarias. Estableció la inexistencia de citostoma y la presencia de pinocitosis intensa.

Brugerolle y Metenier (1973) localizan y caracterizan intracelularmente dos tipos de malato-deshidrogenasa, en *T. vaginalis*, a nivel del nucleóide de los gránulos densos.

Sobre *Trichomonas gallinae* existen bastantes trabajos en cuanto a epidemiología y morfología fotomicroscópica se refiere.

Stabler (1954) llevó a cabo una revisión de los publicado hasta la fecha sobre *T. gallinae*.

Abraham y Honigberg (1964) estudiaron la estructura de *T. gallinae*, en contraste de fases oscuro y brillante, y mediante tinciones con hematoxilina férrica.

El trabajo de Mattem, Honigberg y Daniel (1967) es el que aporta la auténtica estructura de los orgánulos de *T. gallinae*. Dicho estudio, realizado mediante el microscopio electrónico, se refiere esencialmente al mastigonte de este protozoo.

En 1973, Levine realizó una importante revisión y puesta al día de lo más interesante publicado sobre tricomonádidos parásitos del hombre y de los animales domésticos y resaltó, sobre todo, los aspectos epidemiológicos y patológicos producidos por las distintas especies de tricomonádidos.

Creemos de interés incluir en esta revisión los trabajos realizados sobre la ultraestructura de dos géneros estrechamente relacionados con *Trichomonas*, pero que carecen de algunos orgánulos característicos de este último.

Hollande y Valentin (1969) estudiaron el sistema cinetosómico y sus dependencias en *Macrotrichomonas* (Grassi) y observaron la carencia, en este género, de la membrana ondulante.

Mattem, Daniel y Honigberg (1969) revelaron la ultraestructura de *Hypotrichomonas acosta* (Moskowitz) (*Monocercomonadidae*, *Trichomonadida*) y pres-

taron especial atención a las rudimentarias costa y membrana ondulante. Estos mismos autores (1972) observaron en *Monocercomonas spp.* la ausencia de costa y de membrana ondulante y la persistencia de la lámina marginal.

Con respecto a otros trabajos sobre tricomonádidos, en los que se presentan alteraciones de la estructura normal, hemos de citar los de Brugerolle (1973) y Mattern, Honigberg y Daniel (1973) sobre ultraestructura de los quistes y pseudoquistes, respectivamente, de *Trichomitus batrachorum*. En los pseudoquistes se observa internalización de la lámina marginal y de la membrana ondulante, que no va acompañada necesariamente de la internalización del flagelo recurrente ni de los flagelos anteriores. En las últimas fases de formación se perciben varias desviaciones de la estructura microtubular flagelar 9 + 2. Los quistes son esféricos y poseen pared quística que no presenta poros ni opérculo, en su parte más densa se encuentran constituidos por una especie de microfilamentos que recuerdan la costa. Se observa la aparición de axonemas intracitoplasmáticos con flagelos internalizados que muestran alterados algunos dobletes microtubulares. No es posible identificar la membrana ondulante ni la costa. A veces existe división bajo la forma quística, sin que intervenga más que el núcleo y el sistema cinetosómico, y no ha citodiéresis.

Brugerolle, Gobert y Savel (1974) ponen de manifiesto que *T. vaginalis* llega a ser ameboide, emite pseudópodos y contiene microfilamentos en su citoplasma, cuando se aísla de lesiones viscerales provocadas por inyección intraperitoneal en el ratón.

La mitosis en protozoos reviste múltiples aspectos. La mayoría de las observaciones se han hecho con el microscopio óptico. Hollande y Valentín (1972) estudian algunos aspectos y, de forma general, la pleuromitosis de los tricomonádidos e indican la presencia de una formación que sustituye al huso mitótico: el parademosoma. La membrana nuclear puede desaparecer o no. Falta el centrosoma, el cual es reemplazado por el atratóforo, que es un orgánulo de estructura periódica del cual parten los microtúbulos que forman el parademosoma.

Al no existir ninguna bibliografía sobre alteraciones experimentales de *Trichomonas*, provocadas por agentes físicos o químicos, hemos de referir nuestros ensayos a los resultados obtenidos en otros protozoarios. Afzelius (1963), en diversos trabajos realizados sobre distintos ciliados y flagelados, observó cilios y flagelos que se apartan de la estructura normal 9 + 2.

Tilney, Hiramoto y Marsland (1966-1968) ensayaron las temperaturas bajas y las presiones altas, la colchicina, vimblastina y vincristina, para provocar una despolimerización microtubular, en ciertos heliozoos.

Angelopoulos (1970), siguiendo el método de Langmuir (1917) de extensión por tensión superficial y el método del punto crítico de desecación, mostró el com-

plejo microtubular subpelicular, en tres dimensiones, de siete especies de cinco géneros de tripanosomátidos y concluyó que no se observa conexión entre los flagelos y los microtúbulos subpeliculares.

Behnke (1972) empleó la vimblastina para provocar una transformación directa de algunos microtúbulos citoplasmáticos, en estructuras helicoidales y hasta en cuerpos para cristalinos, en espermátidas de larvas de *Nephrotoma suturalis*.

En *Ochromonas*, Brown y Bouck (1973) han empleado la colchicina y las presiones hidrostáticas. Observaron cómo va cambiando la forma característica hasta hacerse totalmente redondeada. Al hacer desaparecer los agentes experimentales se recupera nuevamente la forma normal.

Summers y Gibbons (1973) estudiaron los efectos producidos por la digestión trispsínica de axonemas flagelares aislados de espermatozoides de erizo de mar y encontraron que se alteran la mayoría de las estructuras flagelares típicas.

Williams, Frankel y Nelsen (1973) establecieron dos modelos de reabsorción ciliar, *in situ* y después de una retracción dentro del citoplasma, en *Tetrahimena pyriformis*, bajo condiciones de privación de aminoácidos.

También se ha visto el mecanismo de acción de la colchicina en espermatozoides aislados del erizo de mar (Wilson y Meza, 1973). Observaron que se solubilizan y desaparecen los pares centrales de los flagelos.

Finalmente, queremos resaltar la importancia del sistema microtubular, no sólo en cuanto a su función de sostén, sino en cuanto a una función más dinámica, en el movimiento de ciertos protozoos.

Holt y Corliss (1973) comprobaron, en *Stentor coeruleus*, cómo el mecanismo contráctil del ciliado se debe a un sistema de fibrillas corticales que parten de los cinetosomas y están conectadas con microtúbulos.

Mooseker y Tilney (1973) han detectado una ATP-asa parecida a la dineína, en el axostilo de *Cryptocercus*. Aislan los axostilos y restablecen su motilidad normal con ATP.

Material y métodos.

Hemos empleado, como material de estudio, *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878), cepa II BP4, aislada por nosotros, de un palomo portador que había padecido tricomoniasis y que poseía restos de lesiones en el tramo digestivo superior.

El aislamiento inicial se hizo siguiendo la técnica de Herman (citado por Diamond, 1957), en caldo Trichosel (B.B.L.), el cual modificamos mediante la adición

mond, 1957), en caldo Trichosel (B.B.L.), el cual modificamos mediante la adición de extracto de levadura, ácido ascórbico y bicarbonato sódico; el pH del medio se ajustó a 6, con ácido clorhídrico 0.1 N. El medio de cultivo se suplementó con 5 p. 100 de suero de caballo, estéril e inactivado.

Los tubos sembrados con tricomonádidos se mantuvieron de 48 a 72 horas, a 37° C. Al final de este periodo se hacía una transferencia a otro tubo con el mismo medio de cultivo y se incubaba el mismo tiempo, a la misma temperatura.

A continuación se hicieron dos transferencias más al medio C. P. L. M. (Johnson y Tusell, 1943), modificado con la supresión de agar. El pH de este medio se ajustó a 7,3 con hidróxido sódico 1N y se añadió 5 p. 100 de suero de caballo, estéril e inactivado.

Se hacían recuentos del número de tricomonádidos móviles por ml de medio de cultivo, en una cámara de Neubauer, para comprobar si existía cantidad suficiente de microorganismos, la cual se estimó en unos 10^5 microorganismos por ml de medio.

Se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos, se decantaron los sobrenadantes y cada pella se suspendió en 1 ml de C. P. L. M. fresco y sin agar.

Mantenimiento de cultivos en nitrógeno líquido.

A continuación se procedió a congelar los microorganismos en nitrógeno líquido, según la técnica de Diamond (1964), en la que utilizamos D.M.S.O. (dimetil-sulfóxido al 10 p. 100) como agente protector.

Los tricomonádidos se sacaban del nitrógeno y se descongelaban por inmersión rápida en un baño de María a 45° C. Se efectuaban dos resiembras sucesivas en medio C.P.L.M., para estabilizar los cultivos y regular el crecimiento, al final de las cuales se hacían de nuevo tres series más de resiembras.

Una primera serie estaba constituida por tubos con *T. gallinae* mantenidos 72 horas a 37° C. en medio C.P.L.M. Una segunda serie era de tubos con *T. gallinae* mantenidos en medio C.P.L.M. durante 48 horas a 37° C. y 24 horas más, a la misma temperatura, y sometidos a la acción de la colchicina a diferentes concentraciones (1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM y 0.125 mM).

También se sometió una tercera serie de cultivos de *T. gallinae* a la acción de la colchicina 1 mM. Mediante microscopía de contraste de fases brillante se comprobó si existían alteraciones de motilidad y de estructura, a intervalos de 1, 2, 4 y 8 horas, en cuyo momento se procedía a fijarlos y someterlos a las técnicas microscópico-electrónicas.

Microscopía electrónica.

Al final de las 72 horas de cultivo a 37° C todos los tubos se centrifugaron a 1.500 r. p. m., durante 10 minutos; se decantaron los sobrenadantes y las pellas se

fijaron en glutaraldehído al 5 p. 100, en tampón fosfato (pH 7.3), según el procedimiento de Sabattini y colaboradores, a la que siguió una posfijación en tetróxido de osmio al 1 p. 100, en el mismo tampón.

A continuación las pellas se preincluían en agar al 3 p. 100, enfriando en un baño de hielo, y se deshidrataban en la serie de acetonas.

La inclusión se hizo en Durcupán A. C. M. (araldita). Una vez obtenidas las cápsulas, los cortes, cuyo grosor oscilaba entre 40 y 60 nm se obtenían con un ultramicrotomo modelo L. K. B. III y se montaban en rejillas de cobre de 30 mm. El contraste se efectuaba en todas las ocasiones con acetato de uranilo, seguido por citrato de plomo. Las observaciones y electromicrofotografías se hacían en un microscopio Philips, modelo 300, y estas últimas han sido obtenidas mediante placas Agfa-Gevaert-Scientia, de 6,5 x 9 cm.

Microscopía óptica.

Antes de fijar en glutaraldehído se hacían preparaciones entre cubreobjetos y portaobjetos de muestras de pellas.

Las observaciones *in vivo* con contraste de fases brillante se han hecho en un microscopio invertido Nikon, modelo M, con sistema fotográfico y con flash electrónico incorporados.

También se llevaron a cabo observaciones y fotomicrofotografías en material normal fijado en glutaraldehído al 5 p. 100, en tampón fosfato de pH 7.3. En este caso se empleó el contraste interferencial de Normanskii, montado en un microscopio Leitz, Dialux, con sistema de fotografía incorporado.

Resultados.

Microscopía óptica y electrónica de T. gallinae (Trofozoito).

Las observaciones con contraste de fases interferencial de Normanskii muestran escasa resolución para localizar la forma y disposición de los orgánulos celulares, dado el grosor del cuerpo de *T. gallinae*.

En las microfotografías obtenidas *in vivo* (Lámina I, figs. a, b, c y d), con contraste de fases, pueden apreciarse con claridad caracteres externos como son la forma ovoide, la membrana ondulante, el tallo axostilar y los flagelos anteriores.

Son visibles, aunque en menor grado, los gránulos densos paracostales y endoaxostilares, el núcleo y las formaciones vacuolares.

Es prácticamente imposible identificar el complejo cinetosómico, el cuerpo parabasal y la costa.

Las observaciones realizadas bajo contraste interferencial muestran la misma dificultad de identificación exacta de los orgánulos internos celulares; no obstante, los

orgánulos que se proyectan hacia el exterior son perfectamente identificables, como son el tallo axostilar, la membrana ondulante, los flagelos anteriores, los pozos flagelares, el flagelo recurrente y las vacuolas (Lámina I, figs. e, f, g y h).

En microscopía electrónica adoptamos la orientación definida por los autores anglosajones, para los tricomonádidos, es decir, el flagelo recurrente, asociado o no a la membrana ondulante, está situado a la izquierda, respecto al observador, y define la cara dorsal del protozoo. La cara ventral se encuentra definida por la presencia del capítulo axostilar, a nivel del núcleo y de la unión pecto-axostilar. El eje antero-posterior va desde el centro del sistema cinetosómico hasta el extremo posterior o tallo del axostilo. El eje dorso ventral conecta el punto de la membrana ondulante situado a medio camino, entre el extremo anterior y posterior de este orgánulo y el punto correspondiente a nivel de la línea media ventral del organismo.

Un corte longitudinal de *T. gallinae* nos muestra, desde el extremo anterior, donde se encuentra situado el labio, el sistema cinetosómico y origen de la pelta, hasta el extremo posterior o tallo axostilar, los siguientes orgánulos, de izquierda a derecha, pelta, axóstilo y unión pecto-axostilar, cinetosomas y flagelos anteriores, núcleo, retículo endoplásmico, fibra parabasal, cuerpo parabasal o complejo de Golgi (Lámina II, fig. a), membrana ondulante, gránulos endoaxostilares, flagelo recurrente, costa, gránulos paracostales y vacuolas (Lámina II, fig. b).

Pelta y axostilo. La pelta es una formación microtubular que se extiende desde el extremo anterior más saliente del tricomonas (labio) hasta, aproximadamente, la altura de los cinetosomas (Lámina II, fig. b y lámina III, figs. a, b, c, d y e). Corre hacia la parte ventral, formando una abertura o capítulo que parece rodear los cinetosomas, a cuyo nivel se conecta con los microtúbulos que forman el capítulo axostilar, muy cerca del núcleo.

El axostilo se extiende desde la unión pecto-axostilar hasta el extremo posterior del organismo, en donde hace prominencia al exterior formando el tallo axostilar. Su diámetro varía en los distintos tramos, pero a nivel del tallo es de 330 nm aproximadamente. Su forma es similar a un bastón formado por microtúbulos paralelos, que a ciertos niveles se curvan de modo que sus secciones transversas aparecen dispuestas en circunferencia, y a veces adoptan forma de espiral abierta (Lámina II, figuras a y b, lámina III, figs. a, b, c, y e, y lámina IV, fig. a).

Tanto los microtúbulos de la pelta como los del axostilo tienen un diámetro de 25 nm aproximadamente, y se hallan separados por una distancia de 15 nm. Dichos microtúbulos no se encuentran independizados unos de otros, sino que están entrelazados por finas fibras que los mantienen unidos (Lámina V, fig. g).

A nivel de la unión pecto-axostilar hemos de considerar la presencia de unas formaciones muy densas a los electrones, que constituyen los filamentos sigmoideos o fibras preaxostilares del cinetosoma 2. (Lámina II, fig. a, y lámina III, figs. b, c y e). En número de nueve, constituyen una estructura formada por tres capas: la más

BUSTOS: ULTRAESTRUCTURA DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.

ventral, constituida por los microtúbulos del axostilo; la media, por los microtúbulos de la pelta, y la más dorsal, por los filamentos sigmoideos.

El tallo axostilar puede encerrar pequeñas formaciones similares a microvesículas (Lámina II, fig. a, flecha).

Sistema cinetosómico. Se encuentra situado encima del núcleo, en la región anterior del protozoo. Está formado por cinco cinetosomas, cuatro de ellos paralelos entre sí, que son los que corresponden a los flagelos anteriores. El quinto es el cinetosoma del flagelo recurrente y se sitúa perpendicularmente a los otros cuatro (Lámina III, figs. a, c y d). Sus dimensiones son de 210 a 164 nm de diámetro por 360 nm de largo.

Se hallan constituidos por 27 microtúbulos agrupados en nueve tripletes. Cada triplete mide 52 nm de largo y los microtúbulos constituyentes tienen un diámetro de 24 a 25 nm, aproximadamente. La asociación de microtúbulos que constituyen un triplete presentan dos paredes comunes, de unos 7 nm de grosor cada una.

Dependiendo del nivel a que se corten los cinetosomas, la ultraestructura tipo puede variar, pero en general podemos distinguir tres zonas: la anterior presenta, además de la estructura anteriormente expuesta, un microtúbulo central del que irradian finas fibras hacia el microtúbulo más interno de cada triplete. Otras finas fibras unen los microtúbulos internos de cada triplete a los externos (Lámina III, figura c). La zona media ofrece la estructura tipo, sin microtúbulo central, y unas finas fibras que unen los microtúbulos internos de los nueve tripletes (Lámina IV, figura b). En la zona distal o zona de transición el cinetosoma adopta una nueva configuración más parecida a la estructura típica flagelar 9 + 2; el par central de microtúbulos está ya presente, acompañado de nueve tripletes periféricos (Lámina IV, figura e).

Hay, además ciertas estructuras filamentosas asociadas a algunos de los cinetosomas, así, por ejemplo, los filamentos sigmoideos, que tienen un origen común en el cinetosoma 2.º y que se disocian a nivel de la unión pelta-axostilar.

Tanto el cinetosoma 1.º como el cinetosoma 3.º poseen unos filamentos que se curvan en el sentido del movimiento de las agujas de un reloj. El filamento del cinetosoma 1.º posee una estructura periódica de unos 10 nm, aproximadamente, que algunos autores identifican como el origen de la lámina marginal (Lámina III, figuras a, b, c y e).

Los cinetosomas 1.º y 2.º muestran, además, unas estructuras filamentosas en número de nueve, que se disponen radialmente en el exterior de los tripletes, curvadas también en el sentido del movimiento de las agujas de un reloj (Lámina III, figuras d, flechas) y que no parecen relacionarse entre sí.

Entre estos mismos cinetosomas se aprecia una estructura periódica (Lámina III, figuras b y c), curvada ligeramente en sentido inverso al del movimiento de las agujas de un reloj, que no parece relacionarse con ningún orgánulo y que denominare-

LAMINA I. Figuras a, b, c y d. *T. gallinae*, *in vivo*. Nótese la forma celular y el núcleo en posición anterior. Contraste de fases. x 1.500.

Figuras e, f, g y h. Se pueden observar el tallo axostilar y la membrana ondulante, los flagelos anteriores y el núcleo. Contraste interferencial. x 1.250.

LAMINA II. Figura a. Corte longitudinal mostrando diferentes orgánulos. Microvesículas en el tallo axostilar. x 15.400.

Figura b. Corte longitudinal. Arriba y a la derecha se observa un tallo axostilar en corte transversal. x 28.200.

LAMINA III. Figura a. Corte transversal a nivel del mastigonte. Nótese origen de la costa y la disposición de los cinetosomas. x 29.300.

Figura b. Relaciones entre algunos componentes del sistema cinetosómico. x 29.300.

Figura c. Cinetosomas y relaciones a nivel de la unión pelto-axostilar. x 75.200.

Figura d. Cinetosomas y filamentos radiales. x 61.600.

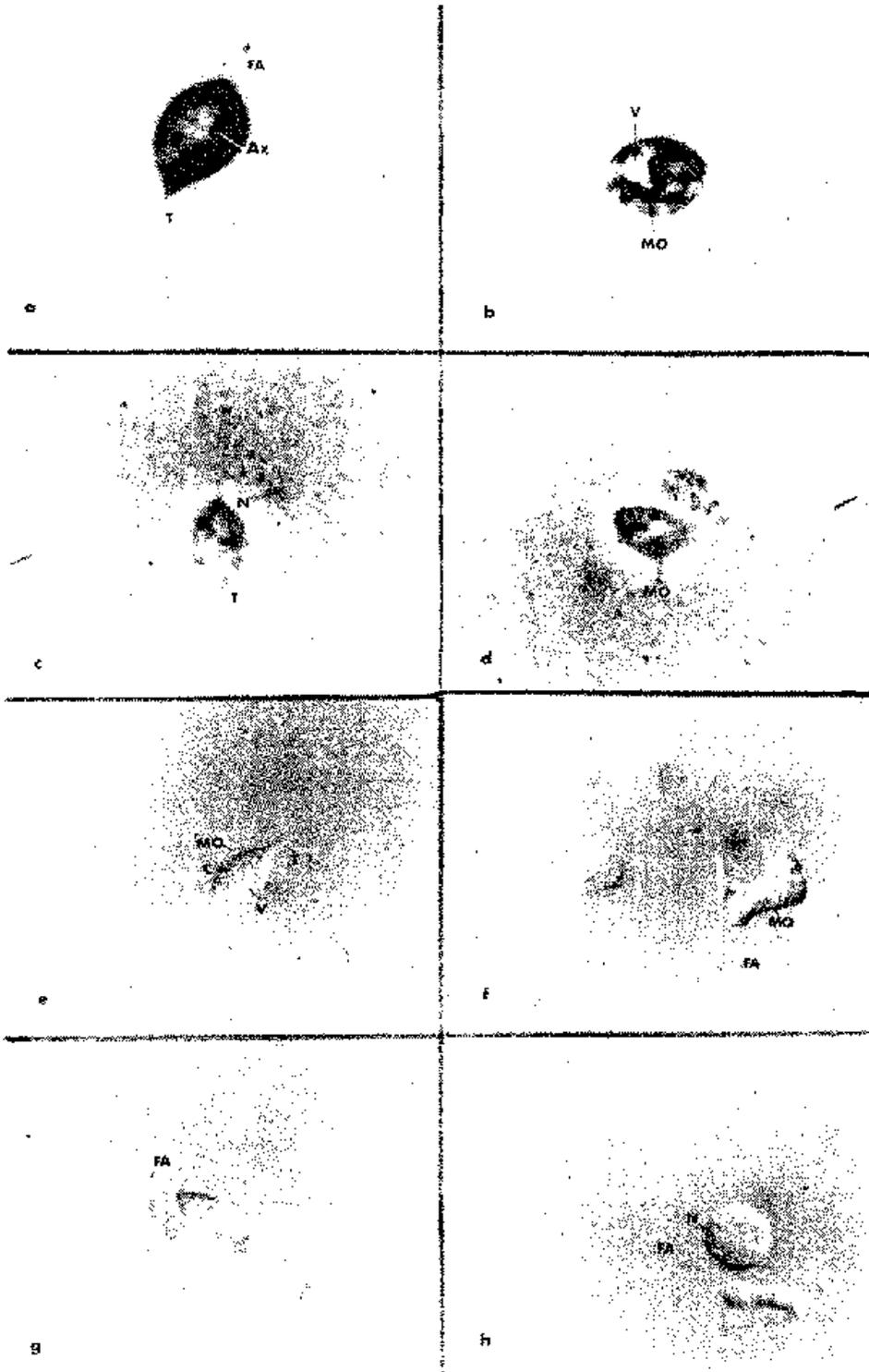
Figura e. Filamentos sigmoideos y estriación del filamento accesorio del cinetosoma 1°. x 92.300.

LAMINA IV. Figura a. Corte transversal de *T. gallinae*. Nótese el capítulo axostilar y la costa. x 22.800.

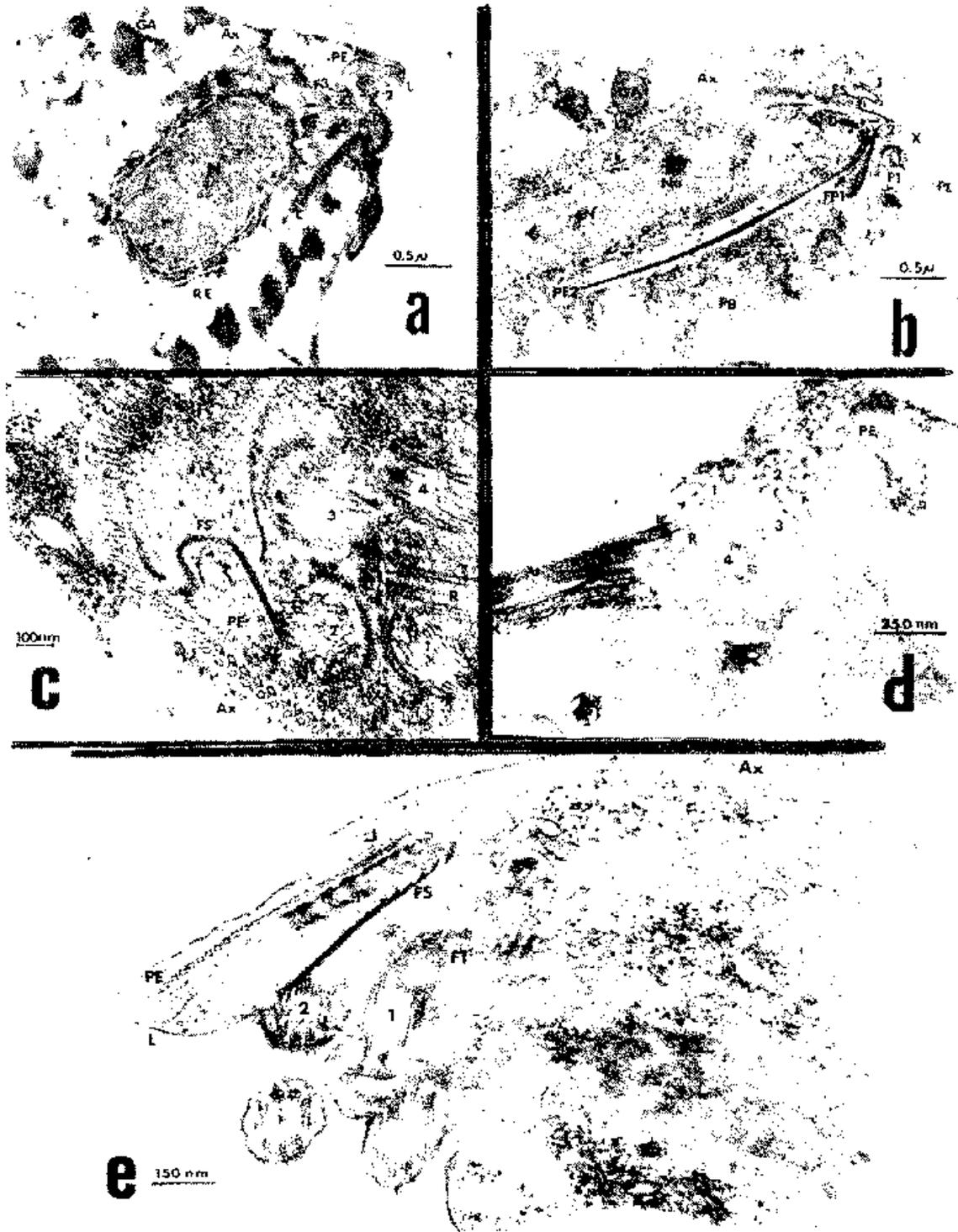
Figura b. Detalle de un cinetosoma en corte transversal a nivel de la zona media. x 156.600.

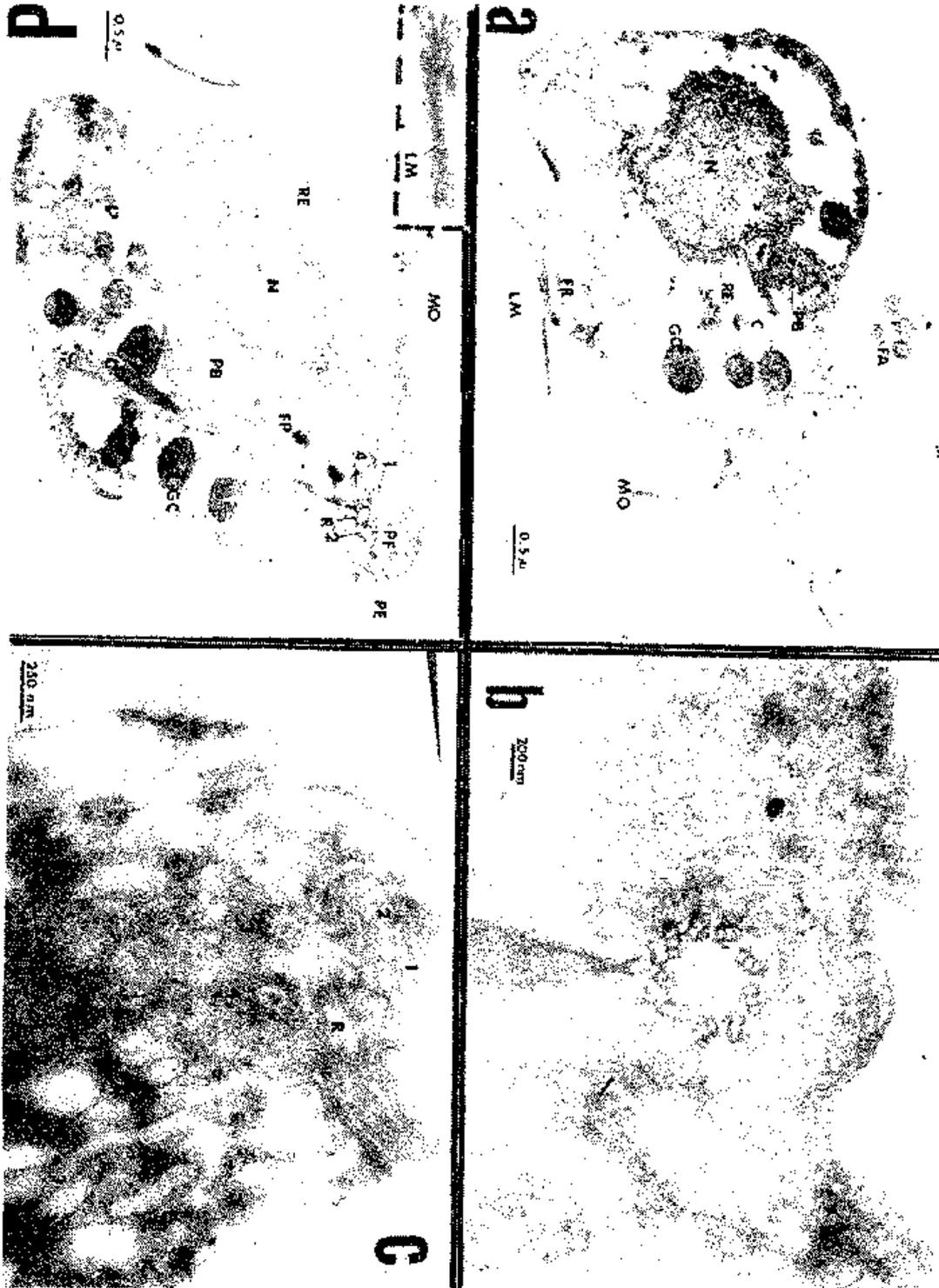
Figura c. Detalle de cinetosomas en corte transversal, a nivel de la zona de transición. x 58.600.

Figura d. Corte transversal. Se puede observar un flagelo emergiendo por el pozo flagelar. Detalle de la lámina marginal. x 22.800.









mos X siguiendo la nomenclatura de estructuras similares vistas en otros tricomonádidos. Además, el sistema cinetosómico es origen de otros orgánulos de *T. gallinae*, como la costa, la fibra parabasal y posiblemente la membrana ondulante.

Costa y fibra parabasal. La costa (Lámina II, fig. b, lámina III, fig. a, lámina IV, figuras a y d, y lámina V, figs. a, b y c) se origina en las inmediaciones del cinetosoma del flagelo recurrente, y corre dorsalmente hacia el extremo distal del microorganismo, muy próxima a la membrana ondulante. Su anchura máxima es de 0,2 micras. Se halla envuelta por una membrana de unos 5 nm de espesor. En un corte longitudinal ofrece una estructura estriada característica, formada por bandas gruesas de 10 nm de espesor, separadas por distancias de 40 nm. A ciertos niveles, entre cada dos bandas gruesas se ven una o dos bandas más finas, de grosor variable. Si aparece una sola banda fina, su grosor es de 4 nm, pero a los niveles en que se ven dos bandas finas el grosor de cada una es de unos 2,5 nm, aproximadamente. Esto último nos hace pensar que posiblemente a los niveles en que se observa una sola banda fina de 5 nm puede ocurrir que se superpongan dos bandas finas de 2,5 nm. Según lo anteriormente expuesto y siguiendo los diferentes modelos de estriación transversa propuestos por Honigberg y col. (1971), la estriación de la costa de *T. gallinae* corresponde al tipo A. Además, la costa presenta una estriación longitudinal formada por finos filamentos de unos 2,5 nm de espesor, separados por una distancia de unos 7 nm (Lámina IV, fig. a, y lámina V, fig. c).

Hay dos filamentos parabasales que suelen caminar muy próximos y que revelan una estructura transversa similar a la de la costa. El filamento parabasal 1.º (Lámina III, fig. b, y lámina IV, fig. d) parece originarse en las proximidades del cinetosoma 2.º y camina hacia el extremo distal del protozoo. Al comienzo ocupa una posición más dorsal que el filamento parabasal 2.º, pero a nivel del núcleo y del cuerpo parabasal la posición es más ventral que la de su homólogo. El filamento parabasal 2.º parece originarse próximo a los cinetosomas 3.º y R, camina hacia el extremo distal del tricomonádido y a nivel del núcleo se sitúa entre el filamento parabasal 1.º y el cuerpo parabasal. El grosor máximo de ambos filamentos es de 0,1 micras y en la mayoría de los casos es difícil distinguir uno de otro. A veces podrían confundirse con la costa, pero además del grosor diferente y de las distintas posiciones que ocupan en el citoplasma, existe un dato muy importante a tener en cuenta, y es que la costa está rodeada en su recorrido por unos gránulos densos que estudiaremos más adelante. Las fibras parabasales carecen de dichos gránulos en sus inmediaciones. Finalmente, entre ambas fibras, en posición anterior, se aprecia una pequeña estructura periódica en forma de cresta (Lámina III, fig. b, flecha), descrita en otras especies de tricomonádidos.

Membrana ondulante y flagelos. La membrana ondulante está formada por un repliegue del cuerpo de *T. gallinae* (Lámina II, fig. b, lámina IV, fig. a, y lámina V, figura a). Se extiende dorsalmente desde los pozos flagelares hasta las proximidades

BUSTOS: ULTRAESTRUCTURAS DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.

del tallo axostilar. En un corte transversal y de fuera hacia dentro se halla constituida por la membrana citoplasmática, cuyo espesor es de 7,5 nm, una capa citoplasmática de 7,5 nm, aproximadamente, y una estructura o filamento muy osmiófilo que corresponde a la lámina marginal (Lámina V, fig. d). Esta, cuando se ve como una fibra única, presenta un grosor de 43 nm, pero a ciertos niveles aparece como un doble filamento y entonces su grosor es de 9 nm para cada uno, con una separación de 14 nm entre ambos, lo que nos induce a pensar que posiblemente en los casos en que se observa un solo filamento, realmente esté formado por la unión de dos.

Se supone que el origen de la lámina marginal está localizado a nivel del sistema cinetosómico, y más exactamente en las proximidades del cinetosoma 1°, pero esto último no se ha podido determinar claramente. La lámina marginal puede observarse en algunos cortes y a grandes aumentos, como una fibra que presenta estriación periódica (Lámina IV, fig. d).

El grosor total de la membrana ondulante es de unos 750 nm, pero hay una zona más estrecha, de 350 nm, aproximadamente, que es la que corresponde a la localización del flagelo recurrente, y su axonema se sitúa muy próximo a aquélla, si bien no llegan a contactar en ningún caso.

T. gallinae posee cuatro flagelos anteriores y uno recurrente, los cuales se originan en los correspondientes cinetosomas y emergen al exterior por una depresión o pozo flagelar. Los flagelos anteriores pueden alcanzar en longitud el doble del largo o cuerpo del protozoo. El flagelo recurrente acompaña siempre a la membrana ondulante, y no se hace libre. Todos ellos presentan la estructura típica 9 + 2. El diámetro flagelar es de 245 nm, aproximadamente.

Núcleo, retículo endoplasmático y cuerpo parabasal. El núcleo se halla situado en la porción anterior, junto al sistema cinetosómico. Sus dimensiones varían entre 2 a 4 micras de largo por 1 a 1,5 micras de ancho. Presenta la doble envoltura característica con poros no muy numerosos; en su interior se encuentra un nucleolo de forma variable, en el que abunda la *pars granularis* y suele ser excéntrico.

Rodeando al núcleo se percibe el retículo endoplasmático, que es de tipo rugoso y se encuentra muy poco desarrollado. En la mayoría de los casos se reduce a una o dos capas concéntricas de canalículos que no suelen poseer ramificaciones. En el resto del citoplasma hay abundantes ribosomas diseminados, pero nunca se ve retículo endoplasmático asociado.

El golgi, denominado cuerpo parabasal en los tricomonádidos, se sitúa dorsalmente debajo del sistema cinetosómico, entre el núcleo y el borde externo del organismo. Está formado por un paquete de cisternas aplanadas de 20 a 25 nm, cada una, que en los extremos tienden a hacerse globosas y a desprenderse (Lámina V, figuras c y e). El centro de algunas de las cisternas presenta un acúmulo de material denso y muy osmiófilo, que puede a veces desplazarse a las vesículas que se desprenden, por lo que algunos autores piensan que el cuerpo parabasal es el que origina los gránulos densos.

Gránulos densos y otras estructuras citoplasmáticas. Los gránulos densos, de forma esférica y ovoide, varían notablemente de tamaño, entre 0.25 y 0.6 micras de diámetro. Están constituidos por una matriz muy densa y osmiófila, rodeados por una membrana unitaria de 7.5 nm y se localizan en las inmediaciones de la costa y del axostilo, por eso reciben denominaciones diferentes según su posición: gránulos densos paracostales y endoaxostilares, respectivamente. Algunos poseen inclusiones paraecristalinas y microfilamentos de tamaño variable, pero en algún caso hemos apreciado estructuras internas semejantes a crestas mitocondriales (Lámina III, fig. a y lámina V, fig. c, flechas).

A veces, en regiones próximas al axostilo hemos encontrado haces de fibroproteína compuestos por filamentos de alrededor de 10 nm, cada uno (Lámina V, figura f).

Numerosas vacuolas que varían por su forma, contenido y tamaño, se encuentran repartidas en el citoplasma, y se localizan preferentemente en la mitad posterior del organismo. En ningún caso dichas vacuolas están tan desarrolladas que lleguen a comprimir otros orgánulos de la célula.

Microscopía óptica y electrónica de T. gallinae en división.

En las observaciones realizadas sobre preparaciones fijadas y bajo contraste interferencial, apreciamos las diferentes formas que adopta *T. gallinae* durante la división. En una fase temprana (Lámina VI, fig. b) se produce un alargamiento de la región anterior, en la que se localizan los flagelos anteriores y la membrana ondulante, en la región posterior persiste la forma típica de tricomonádido, pero no hemos podido apreciar la existencia de flagelos o de membrana ondulante. Posteriormente, este alargamiento se hace más neto y los dos polos adoptan formas más características (Lámina VI, fig. c); finalmente, el puente que une los dos polos, que ya ostentan la forma típica, se hace más estrecho y alargado, y origina en su separación los tallos axostilares (Lámina VI, fig. d).

Las estructuras organulares internas son difíciles de identificar, no obstante se puede apreciar un intenso fenómeno de vacuolización.

En algunos casos se ha podido observar formas de *T. gallinae* totalmente redondeadas, de tamaño superior al normal (de 10 a 12 micras de anchura) y con gran cantidad de flagelos; estas formas anómalas fueron identificadas posteriormente, con el microscopio electrónico, como tricomonádidos plurinucleados.

Al microscopio electrónico no hemos visto el atractófono; estructura que en algunos tricomonádidos sustituye al centrosoma durante la división mitótica.

Se observa la presencia de dos núcleos de dimensiones normales, que se sitúan en los polos opuestos (Lámina VII, fig. a), pero que en una fase temprana se encuentran muy próximos (Lámina VII, fig. b).

El retículo endoplasmático, que es de tipo rugoso, no sufre variación en cuanto a localización se refiere, no obstante, está constituido por una sola cisterna concéntrica al núcleo.

Igualmente, se puede apreciar la existencia de dos cuerpos parabasales muy próximos a los respectivos núcleos. A este nivel puede observarse, así mismo, que se conserva la disposición y estructuras características de los axostilos, pero además, esparcidos por todo el citoplasma se encuentran agrupaciones microtubulares de formas variables, muy similares a restos o trozos de axostilo (Lámina VII, fig. a).

En algunos casos la separación de los dos tricomonas no se lleva a cabo por alargamiento, como vimos anteriormente, sino que posiblemente se produce una separación a nivel del plano medio que pasa entre los dos núcleos, cuando éstos se sitúan paralelamente (Lámina VII, fig. c), en vez de emigrar a polos opuestos.

También se observan orgánulos duplicados, tales como la costa, la fibra parabasal y el sistema cinetosómico, que conservan sus estructuras características (Lámina VII, figs. a, b y c).

Los gránulos densos aumentan en número, y su forma, aunque se mantiene muy similar a la normal, sufre algunas variaciones en el sentido de que en algunos de ellos se puede apreciar una elongación (Lámina VII, fig. a).

En el citoplasma se perciben numerosas vacuolas irregularmente repartidas, de forma y tamaño diversos, pero que en ningún caso alcanzan tamaños tan grandes que lleguen a comprimir otros orgánulos (Lámina VII, figs. a y c, y lámina VIII, figura a).

Tanto los flagelos como la membrana ondulante sufren modificaciones importantes en cuanto a su localización se refiere, ya que su estructura íntima se conserva inalterada.

Es muy frecuente encontrar en *T. gallinae* en división flagelos interiorizados (Lámina VII, fig. a, y lámina VIII, figs. a y b), es decir, flagelos incluidos en el citoplasma, que en una presentación normal deberían localizarse en el exterior del cuerpo del protozoo; tendrían su origen en los cinetosomas respectivos y emergerían por los pozos flagelares. Hemos podido apreciar que no existe una norma fija respecto al fenómeno de internalización flagelar; fenómeno que por otro lado es la primera vez que se describe. Lo mismo podemos encontrar un solo flagelo en una pequeña oquedad citoplasmática, que la totalidad de los flagelos, incluido el recurrente y la membrana ondulante, en una vacuola o canal flagelar intracitoplasmático. Así mismo, la localización de estos flagelos internalizados varía notablemente, todo lo cual dificulta la posible explicación que este fenómeno pudiera tener. No obstante, en cuanto a los flagelos anteriores se refiere, se puede producir la internalización por alguna de las siguientes vías:

a) Una vez que emergen al exterior, se producen invaginaciones de la membrana celular en diversas localizaciones, y los flagelos se introducen, total o parcialmen-

te en ellas. Incluso los flagelos podrían presionar la pared celular y penetrar en su interior.

b) También podría ocurrir que, realmente, lo que se observa sea la presencia de auténticos pozos flagelares y que el sistema cinetosómico correspondiente se sitúe en un plano de corte inmediatamente inferior, lo cual nos induciría a creer en auténticas internalizaciones, cuando en realidad tal fenómeno no existiría.

Sin embargo, creemos que esto último no es probable, ya que en todos los casos los sistemas cinetosómicos se encuentran situados en la porción anterior del tricomonádido, y en los casos en los que debido a la esfericidad de éste no es posible distinguir los extremos anterior y posterior, los cinetosomas se sitúan muy próximos a la superficie celular.

c) Se puede pensar en la aparición de un fenómeno de isofagia durante la división de *T. gallinae*, a semejanza de las descripciones de algunos autores sobre otras especies de tricomonádidos. En tal caso, las vacuolas isofágicas son de grandes dimensiones y en su interior se encuentran axonemas flagelares, pero además se pueden observar restos de otros orgánulos, como son costa, axostilo y cuerpo parabasal.

Nosotros sólo hemos hallado en los anómalos canales periflagelares descritos, estructuras flagelares clásicas, y nunca restos de otros orgánulos; además las dimensiones de estas vacuolas o canales son tan reducidas, en comparación con aquellas, que sólo poseen el diámetro preciso para albergar el número de flagelos que se localice en su interior. Todo esto nos inclina a pensar que el fenómeno de internalización flagelar se realiza mediante la forma descrita en a).

Respecto a la internalización del flagelo recurrente y de la membrana ondulante, la posible explicación del fenómeno parece estar más clara. Aunque, como vimos al describir la ultraestructura del trofozoíto del *T. gallinae*, ambas estructuras caminan dorsalmente, siempre emparejadas, pero nunca presentan relación de continuidad aparente, cuando este protozoo se encuentra en división aparece, a ciertos niveles, la membrana ondulante sin flagelo recurrente (Lámina VII, fig. c, y lámina VIII, fig. a) y viceversa (Lámina VII, fig. a). Esto nos ha hecho pensar que posiblemente la internalización de uno y otra, a estos niveles, se puede efectuar independientemente. En la mayoría de los casos hemos podido apreciar que la internalización de dichas estructuras se verifica a la vez. Dicho proceso parece ser el siguiente: la membrana ondulante se repliega sobre sí misma y se aproxima a la membrana celular. En ese momento aparece un fino puente citoplasmático que crea una continuidad entre ambas estructuras (Lámina VIII, fig. a, flecha), con lo cual si el flagelo recurrente acompaña a la membrana ondulante, también queda enclausurado en el interior de la célula.

También puede ocurrir que a otros niveles se produzca una invaginación de la membrana celular y la membrana ondulante y el flagelo recurrente se introduzca en esta invaginación, la cual se cerraría posteriormente (Lámina VII, fig. a, flecha gruesa).

Pies de las figuras

LAMINA V. Figura a. Corte longitudinal de *T. gallinae*. Nótese la extensión de la costa y de la membrana ondulante. x 12.800.

Figura b. Detalle de la costa en sección longitudinal. x 239.400.

Figura c. Detalles de la costa, pozos flagelares e inclusiones de los gránulos densos. x 25.600.

Figura d. Detalle de la membrana ondulante y de los flagelos anteriores y recurrente. x 53.900.

Figura e. Detalle del cuerpo parabasal. x 36.500.

Figura f. Haz de fibroproteína intracitoplasmática. x 74.100.

Figura g. Detalle del axostilo en corte transverso. Nótese las finas uniones entre los microtúbulos. x 179.500.

LAMINA VI. Figura a. Vista general de *T. gallinae* en división junto a otras formas normales. Contraste interferencial. x 2.500.

Figuras b, c y d. Diversos estadios de la división. Contraste interferencial. x 2.500.

LAMINA VII. Figura a. Corte longitudinal de *T. gallinae* en división. Nótese la fragmentación axostilar. x 19.200.

Figura b. Duplicidad de núcleos y axostilos durante la división. x 22.800.

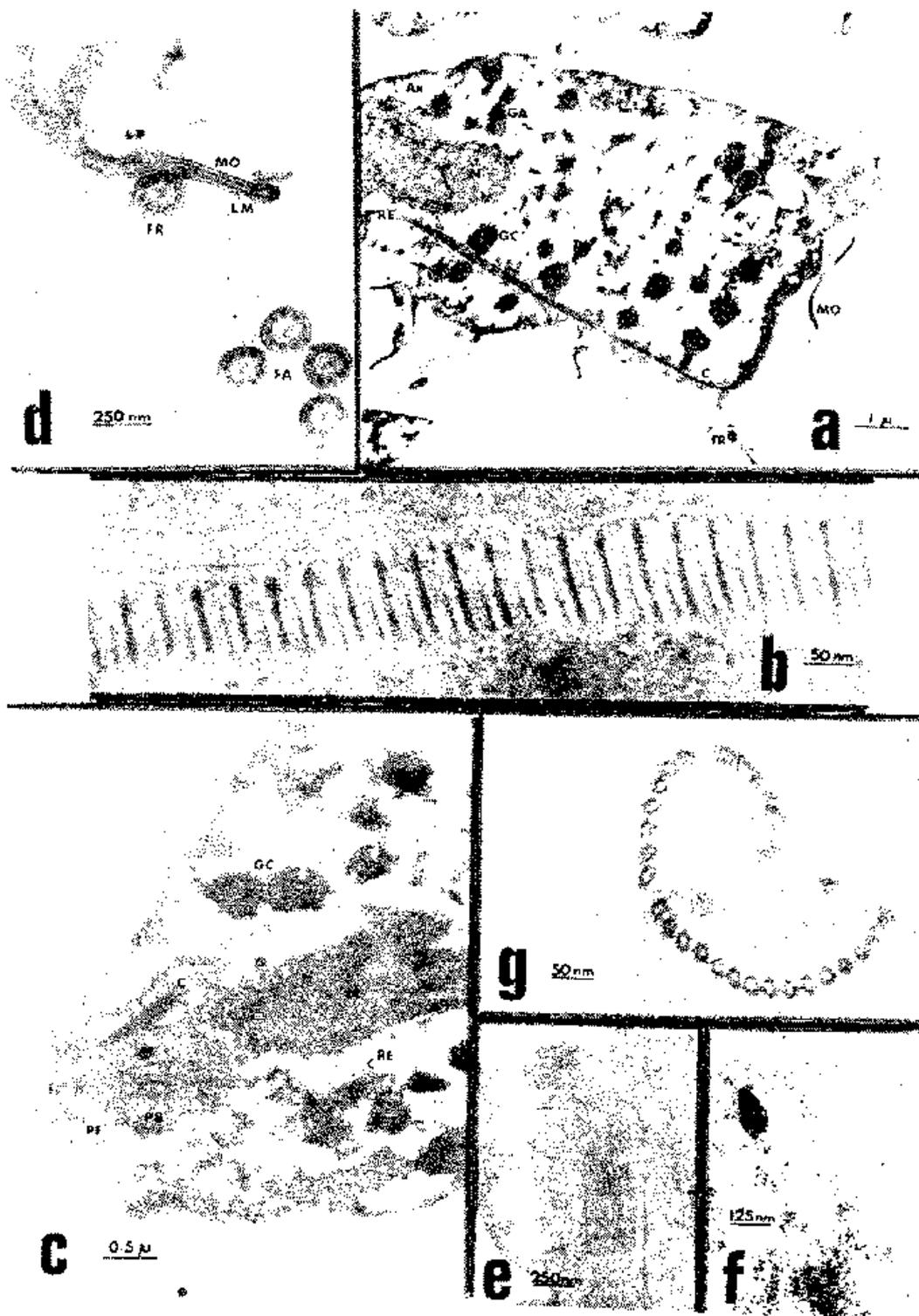
Figura c. Detalle del complejo núcleo-sistema cinetosómico, durante la división. x 12.800.

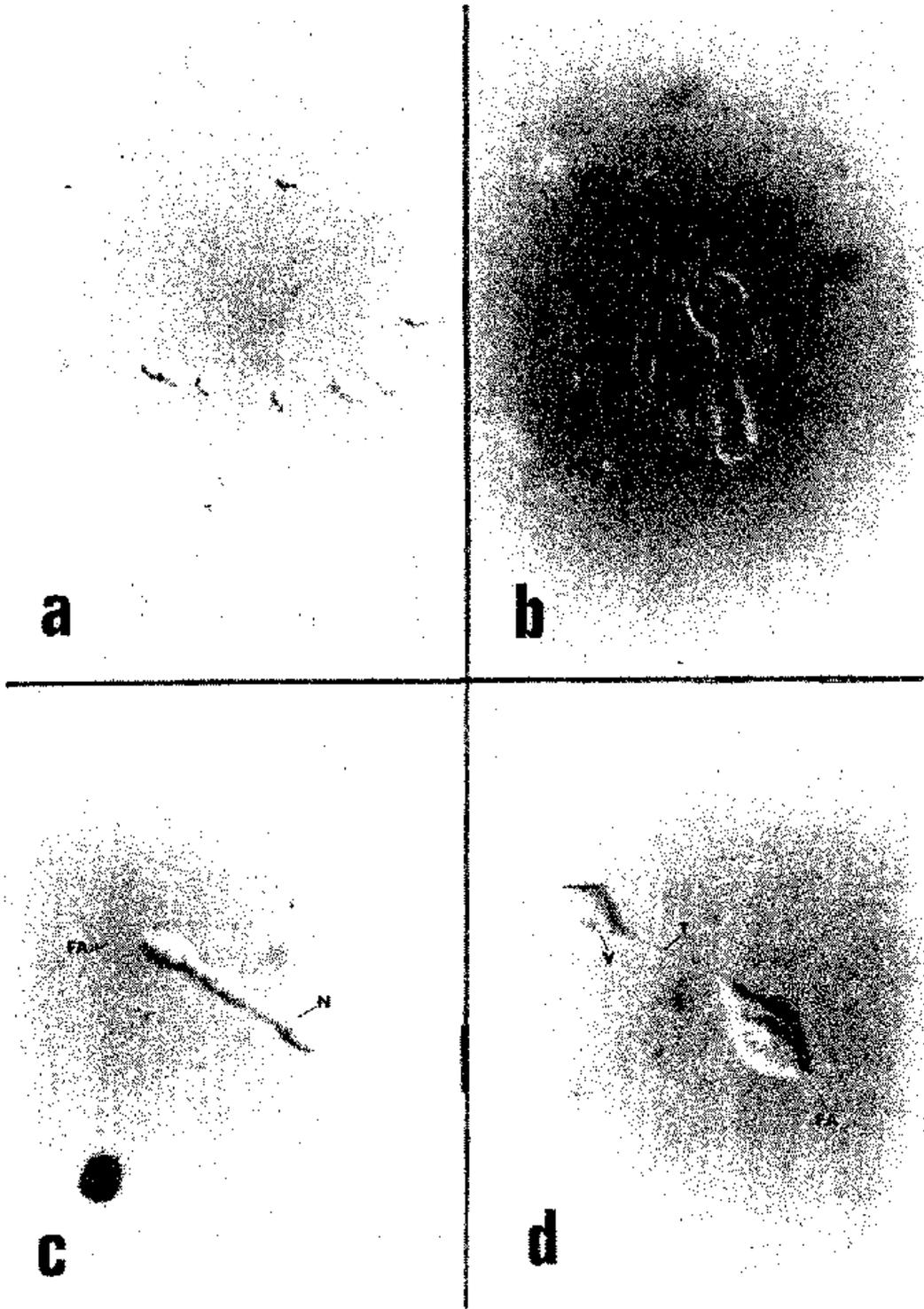
LAMINA VIII. Figura a. Internalización del flagelo recurrente e intensa vacuolización durante la división de *T. gallinae*. x 15.500.

Figura b. Nótese la internalización de todos los flagelos y de la membrana ondulante. x 12.800.

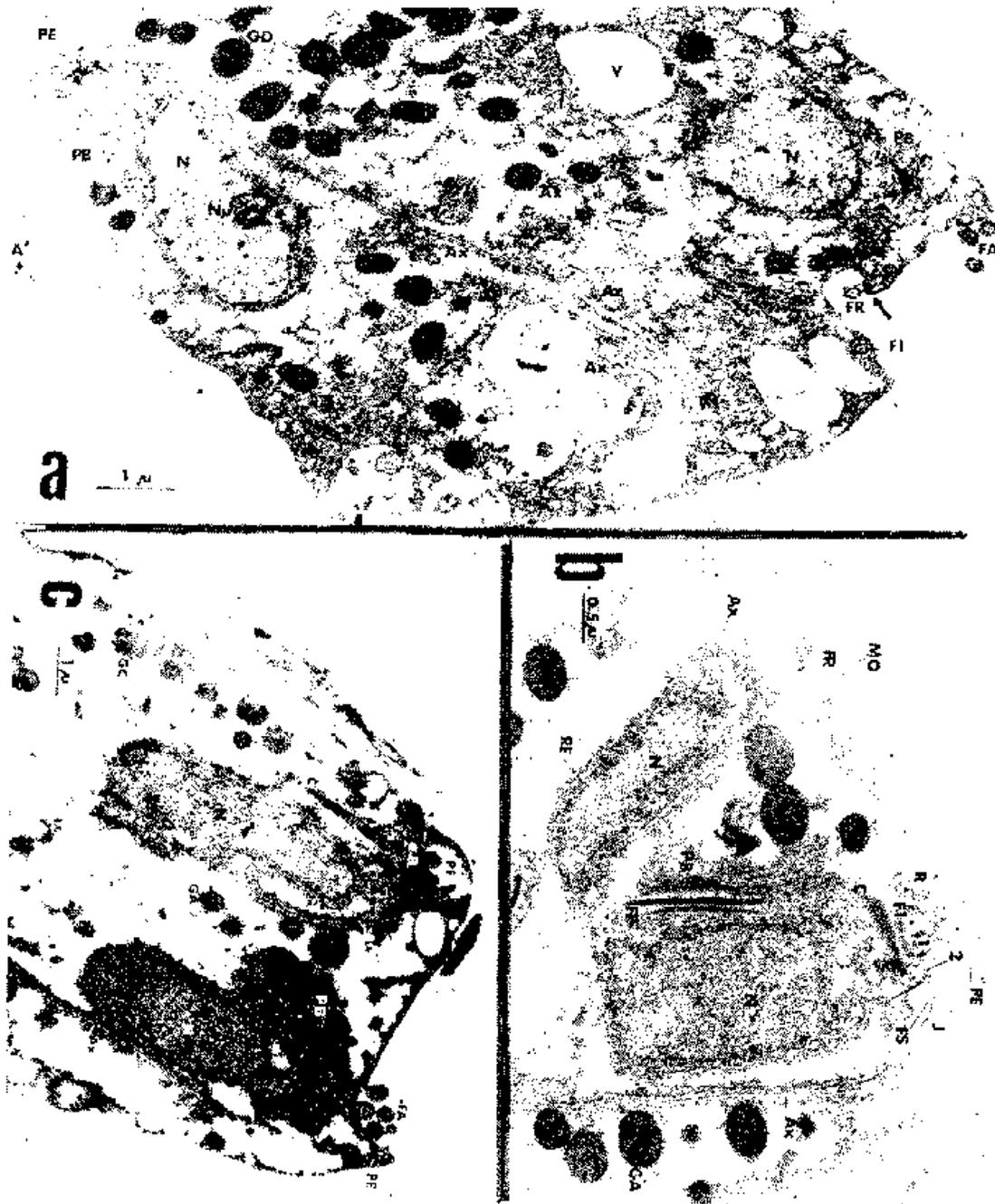
Figura c. *T. gallinae* con cuatro núcleos. x 10.250.

Figura d. *T. gallinae* afectado por la colchicina. Obsérvese la intensa vacuolización. Contraste de fases. x 2.000.

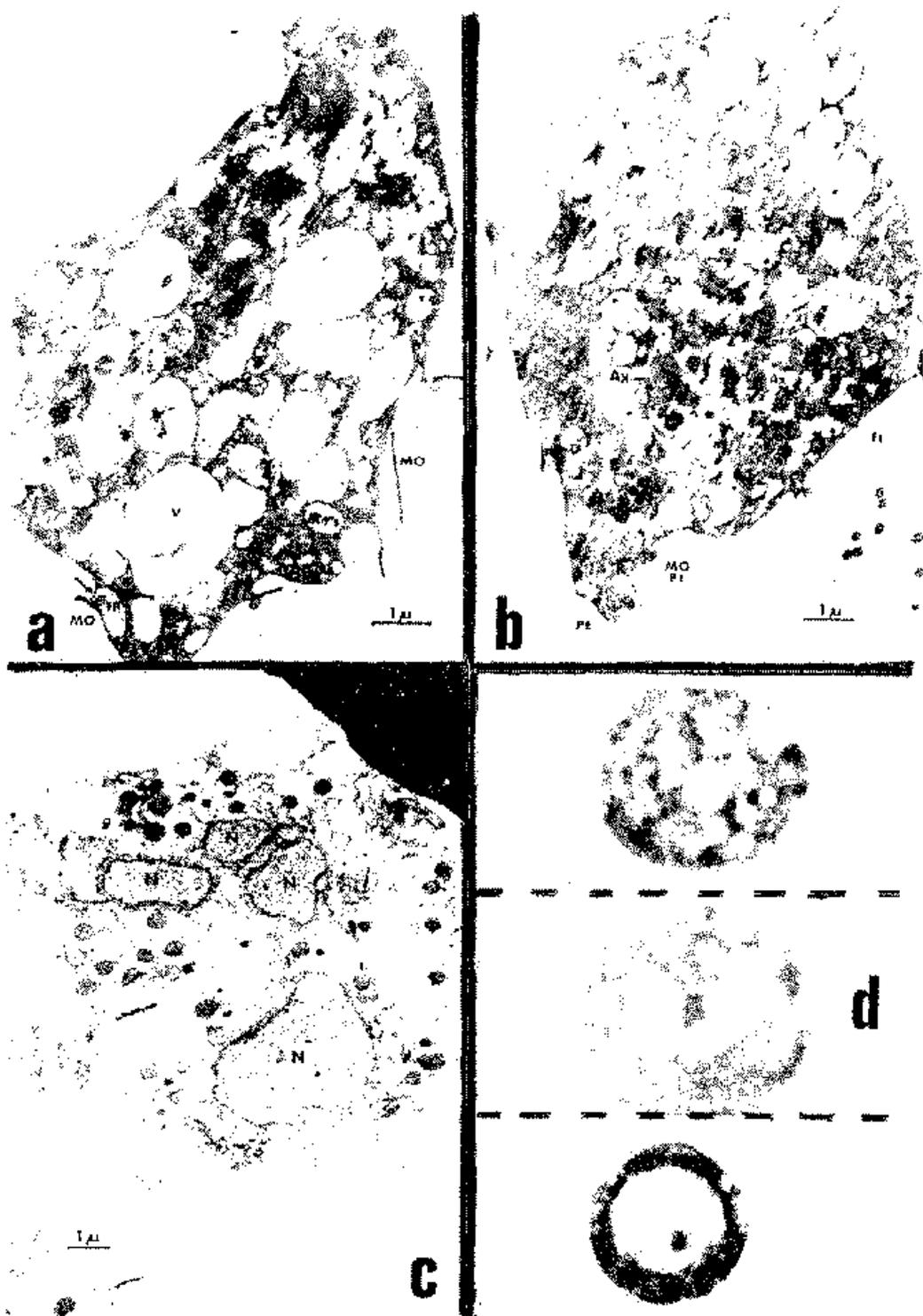




BUSTOS: ULTRAESTRUCTURA DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.



BUSTOS: ULTRAESTRUCTURA DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.



sa). En algunos casos, cuando la membrana ondulante se internaliza totalmente es imposible distinguirla, dado que se pierde la estructura característica de la lámina marginal.

No es muy frecuente la aparición, en cultivos *in vitro*, de formas de *T. gallinae* con más de dos núcleos, y en este caso sólo los poseen cuando están en división.

Nosotros hemos podido sorprender *T. gallinae* con hasta cuatro núcleos en un mismo organismo (Lámina VIII, fig. c). Sería lógico pensar que los orgánulos, en este caso, deberían encontrarse cuadruplicados; sin embargo parece que no es así. Se observan dos sistemas cinetosómicos, gran número de gránulos densos irregularmente repartidos, y de forma normal, intensa vacuolización del citoplasma, y numerosos restos axostilares localizados, generalmente, cerca de los núcleos. No se advierte la presencia de membrana ondulante ni de flagelo recurrente.

Las variaciones anteriormente descritas, sobre la ultraestructura normal de *T. gallinae* y principalmente las que afectan al sistema flagelar y membrana ondulante, producen una notable alteración de la motilidad normal del flagelado, como hemos apreciado *in vivo*, mediante el fotomicroscopio.

Cuando va a comenzar la división, la frecuencia de la oscilación flagelar disminuye ostensiblemente; en una fase más avanzada, los movimientos del protozoo desaparecen casi por completo y el proceso se invierte al final de la división.

Alteraciones estructurales debidas a la colchicina.

En el estudio de las alteraciones producidas por la colchicina sobre la estructura de *T. gallinae*, hemos usado dos variables, el tiempo y la concentración.

Experimentalmente, se ha determinado que las concentraciones 1 mM, 0.5 mM y 0.25 mM, actuando durante 24 horas sobre el protozoo, son las que producen efectos más notables y en todos los casos dichos efectos son similares. Por otro lado, los efectos producidos por la colchicina a la concentración de 0.125 mM, durante el mismo periodo de actuación, se asemejan más a los que produce una concentración de 1 mM, cuyo tiempo de actuación sea sólo de 8 horas.

No obstante hemos de indicar que la diferencia entre ambos grupos de efectos son más de carácter cuantitativo que cualitativo, por lo que vamos a relatar principalmente las alteraciones estructurales provocadas por la colchicina a las concentraciones de 1 mM y 0.5 mM, con un periodo de actuación de 24 horas, sobre cultivos de tricomonádidos.

In vivo y bajo contraste de fases las alteraciones observadas se traducían en pérdida de la forma característica, adoptando una forma redondeada en muchos casos, con presencia de vacuolas citoplasmáticas de distribución irregular (Lámina VIII, figura d). En muchos casos se podía observar la presencia de una sola vacuola que ocupaba casi todo el cuerpo del tricomonas (Lámina VIII, fig. d).

En otras ocasiones, la forma típica de pera se conserva parcialmente, pero con tendencia a la esfericidad (Lámina VIII, fig. d), los flagelos permanecen en el polo

anterior, pero no se observa membrana ondulante ni flagelo recurrente. Hemos de indicar que ambas formas son viables, si bien la motilidad se encuentra muy disminuida.

Al microscopio electrónico hemos observado que hay determinados orgánulos cuya estructura permanece invariable, como son, la costa y las fibras parabasales; otros, como el cuerpo parabasal, el retículo endoplasmático, el núcleo y los gránulos densos, sufren variaciones en cuanto a desarrollo, forma y disposición se refiere. La pelta y el axostilo desaparecen totalmente la mayoría de las ocasiones y quedan, sólo a veces, restos de microtúbulos irregularmente repartidos en el citoplasma.

En cualquier caso, la desorganización del sistema cinetosómico y la irregularidad adoptada por el cuerpo de *T. gallinae* hacen imposible atenerse a la orientación definida para un tricomonádido normal; sólo a veces se puede identificar un extremo anterior, determinado por la posición de los núcleos, y un extremo posterior antípoda.

Hemos de indicar, que junto a los tricomonádidos, sobre los que la colchicina ha ejercido su acción, se presentan ocasionalmente formas que no han sido alteradas en absoluto por dicha droga (Lámina IX, fig. a, flechas).

El diámetro celular, en las formas esféricas, que aparecen con una o dos grandes vacuolas (Lámina IX, figs. b, c y d), es de 10 a 14 micras. Las formaciones vacuolares pueden alcanzar un diámetro comprendido entre 5 y 8 micras, y hasta 9 micras cuando sólo hay una vacuola presente. En tal caso se observa generalmente la presencia de dos o tres núcleos, que no llegan a ser muy voluminosos y que conservan la forma y dimensiones características.

La membrana ondulante y el flagelo recurrente están muy poco desarrollados o desaparecen totalmente, y se puede observar cómo existe internalización de dichas estructuras (Lámina IX, fig. d y lámina X, fig. a).

También puede advertirse que el cuerpo parabasal se encuentra duplicado o triplicado sin que su estructura íntima sufra variación sustancial; si bien desaparecen a veces las condensaciones osmiófilas intercisternales, anteriormente descritas (Lámina IX, fig. b y lámina X, fig. b).

En la mayoría de los individuos la pelta y el axostilo desaparecen totalmente, y son raros los tricomonádidos que muestren la alterada morfología descrita y presenten restos de axostilo dispersos por el citoplasma (Lámina IX, fig. d).

El sistema cinetosómico (Lámina IX, fig. c, y lámina X, figs. b, c y d) se suele desorganizar y desaparece en su totalidad o quedan sólo algunos cinetosomas. Cuando éstos persisten se presentan sólo dos o cuatro (nunca hemos encontrado los cinco) y las relaciones posicionales están alteradas; resulta imposible la identificación exacta de cada cinetosoma, pues al desaparecer la pelta y el axostilo también desa-

parecen los filamentos sigmoideos y en algunos casos sólo queda el filamento común en el que tienen su origen.

Respecto al retículo endoplasmático, suele conservar la disposición y composición característica en torno al núcleo, pero además se suelen desarrollar canalículos, también de tipo rugoso, que adoptan formas extrañas e incluso se presentan restos de dichos canales dispersos en el citoplasma, próximos siempre a algún núcleo (Lámina IX, fig. c, y lámina XI, fig. a).

Otra modificación importante es la que tiene lugar en la superficie celular, en los casos en que *T. gallinae* no adopta la forma esférica descrita. En tales ocasiones la forma celular es más o menos oval y la superficie se presenta muy irregular y con abundante desprendimiento de vesículas que portan contenido celular (Lámina X, figura b, flechas).

A semejanza de los tricomonádidos que se encuentran en división, los microorganismos alterados por la acción de la colchicina ofrecen internalización de la membrana ondulante y de los flagelos, lo que sería un primer paso que conduciría en algunos casos a la pérdida total de dichos orgánulos.

Los gránulos densos, que son muy escasos en las formas esféricas con grandes vacuolas, muestran cierta elongación, y son más numerosos en las formas celulares ovales. En algunos casos, se siguen encontrando las inclusiones paracrystalinas descritas para las formas normales (Lámina XI, fig. b).

Respecto al menor número de gránulos densos y al aumento de tamaño de las vacuolas en las formas esféricas, hemos observado la existencia de ciertos fenómenos que bien pudieran ser autofágicos, mediante los cuales los gránulos densos son englobados en el interior de una vacuola, lo que produciría ese paulatino aumento del tamaño vacuolar y la disminución numérica de los gránulos (Lámina XI, fig. b).

Ya hemos indicado que frecuentemente el número de núcleos es de dos o tres; no obstante, en muchas ocasiones, hemos podido hallar protozoos con cinco y hasta siete núcleos, sin que el resto de los orgánulos se encuentre multiplicado de la misma forma (Lámina X, fig. c, y lámina XI, figs. c y d).

A veces, el polimorfismo y la abundancia nuclear parece ser debida a una fragmentación múltiple a partir de un núcleo, que anteriormente había aumentado su tamaño hasta 4 micras de largo por 2 micras de ancho.

Es en los flagelos, y sobre todo en el recurrente, donde las alteraciones producidas por la colchicina muestran mayor variedad, cuando no se ha producido la desaparición total de estos orgánulos.

La estructura microtubular típica $9 + 2$ se encuentra frecuentemente alterada, tanto numérica como posicionalmente, y se puede observar la carencia de uno o dos pares periféricos, la falta del par central o la dislocación de alguno de los dobletes periféricos (Lámina XII, figs. a¹, a², a³ y a⁴). Generalmente, las alteraciones microtubulares van acompañadas por alteraciones del axonema flagelar, y es el flagelo

Pies de las figuras.

LAMINA IX. Figura a. Aspecto general de *T. gallinae* afectados por la colchicina. x 7.500.

Figura b. Alteraciones debidas a la colchicina. Forma esférica, gran vacuola central y dos núcleos. x 10.300.

Figura c. Anómala disposición del retículo endoplasmático; desorganización del sistema cinetosómico y de los axonemas flagelares. Efectos debidos a la colchicina. x 15.500.

Figura d. Forma esférica con fragmentación axostilar. Nótese procesos de internalización de la membrana ondulante y del flagelo recurrente, provocados por la colchicina. x 7.500.

LAMINA X. Figura a. Internalización flagelar ocasionada por la colchicina. x 34.200.

Figura b. Desprendimiento de vesículas con contenido citoplasmático y duplicidad del complejo parabasal. Otros efectos de la colchicina. x 18.300.

Figura c. Fragmentación nuclear debida a la colchicina. x 10.300.

Figura d. Detalle de la desorganización del sistema cinetosómico, originada por la colchicina. x 23.400.

LAMINA XI. Figura a. *T. gallinae* alterado por la colchicina. Pérdida del flagelo recurrente y retículo endoplasmático con disposición anómala. x 15.500.

Figura b y b1. Inclusiones en los gránulos densos. detalle de gránulo denso en el momento de ser englobado por una vacuola. Efectos de la colchicina. x 12.800.

Figura c. Tricomonádido con cinco núcleos debido a la acción de la colchicina. x 12.800.

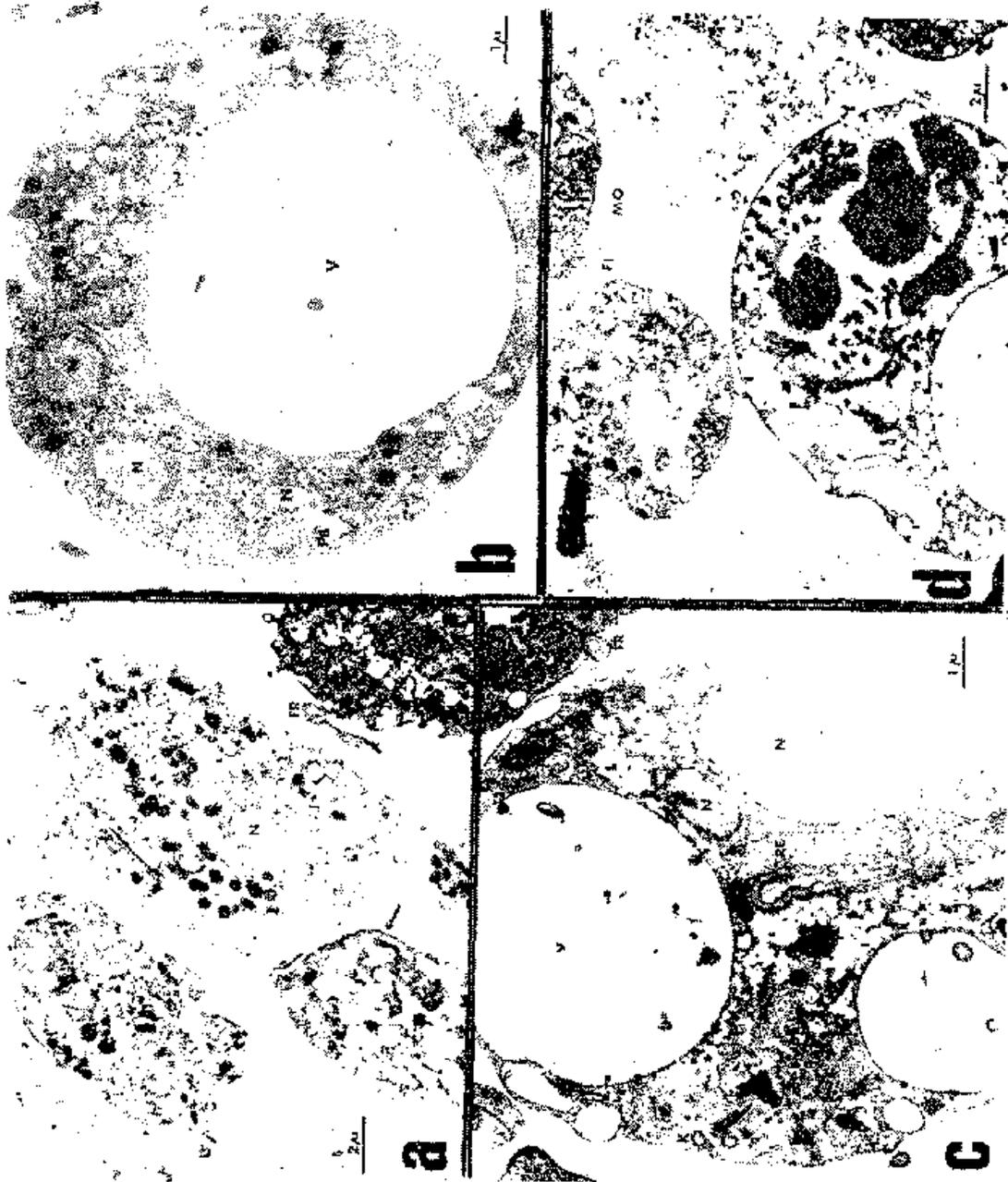
Figura d. Nótese el elevado número de núcleos y el cinetosoma aislado en el citoplasma. Alteraciones debidas a la colchicina. x 15.500.

LAMINA XII. Figuras a1, a2, a3 y a4. Alteraciones de los microtúbulos flagelares de *T. gallinae*, originadas por la colchicina. a1 x 77.000; a2 x 107.700; a3 x 51.300, y a4 x 79.800.

Figuras b1, b2, b3 y b4. Axonemas flagelares anómalos, alterados por la colchicina. b1 x 57.000 y b2, b3 y b4 x 51.300.

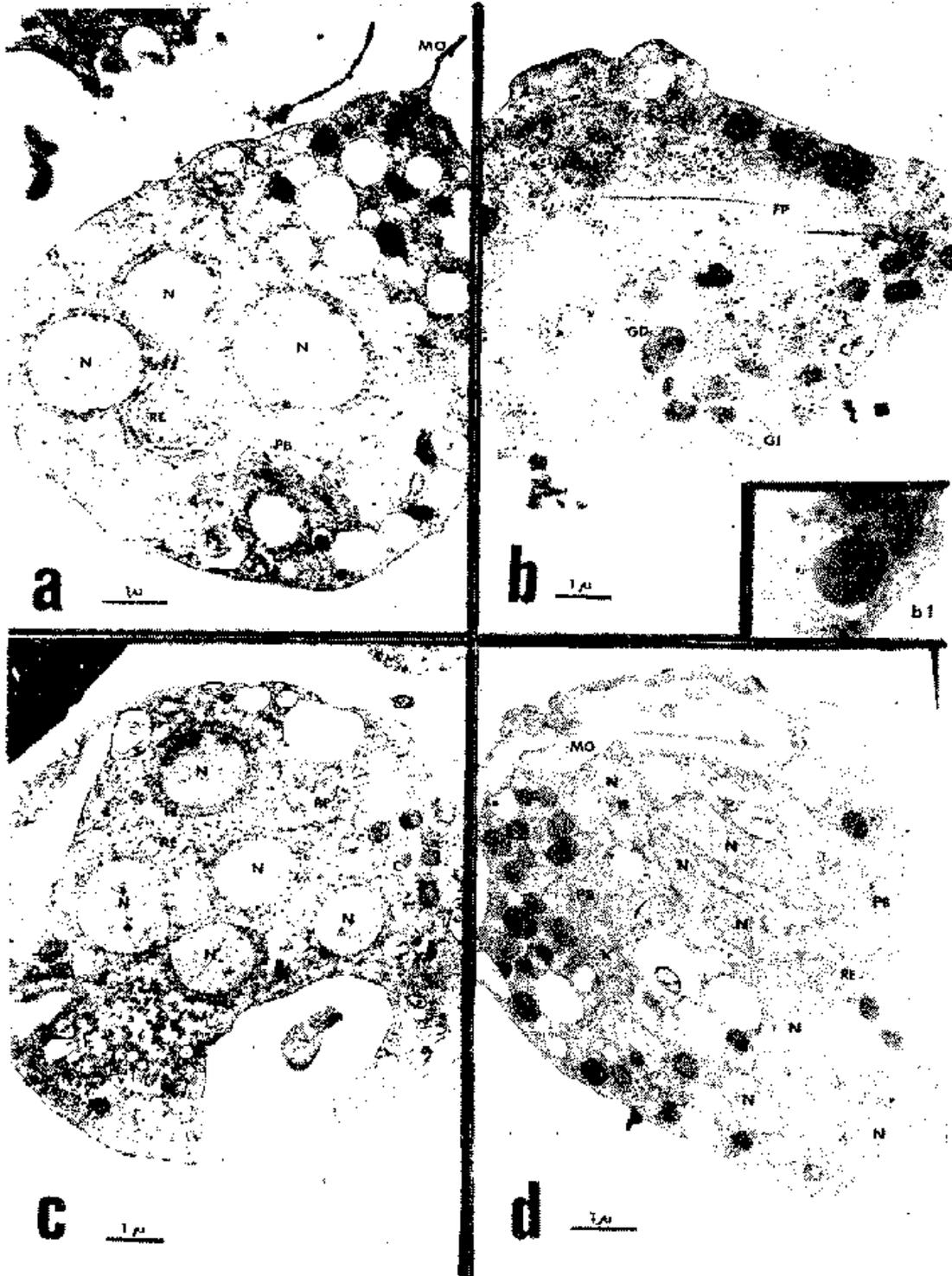
Figuras c1, c2, c3 y c4. Diversas alteraciones flagelares debidas a la colchicina. c1 x 66.000; c2 x 61.600; c3 x 23.300 y c4 x 23.500.

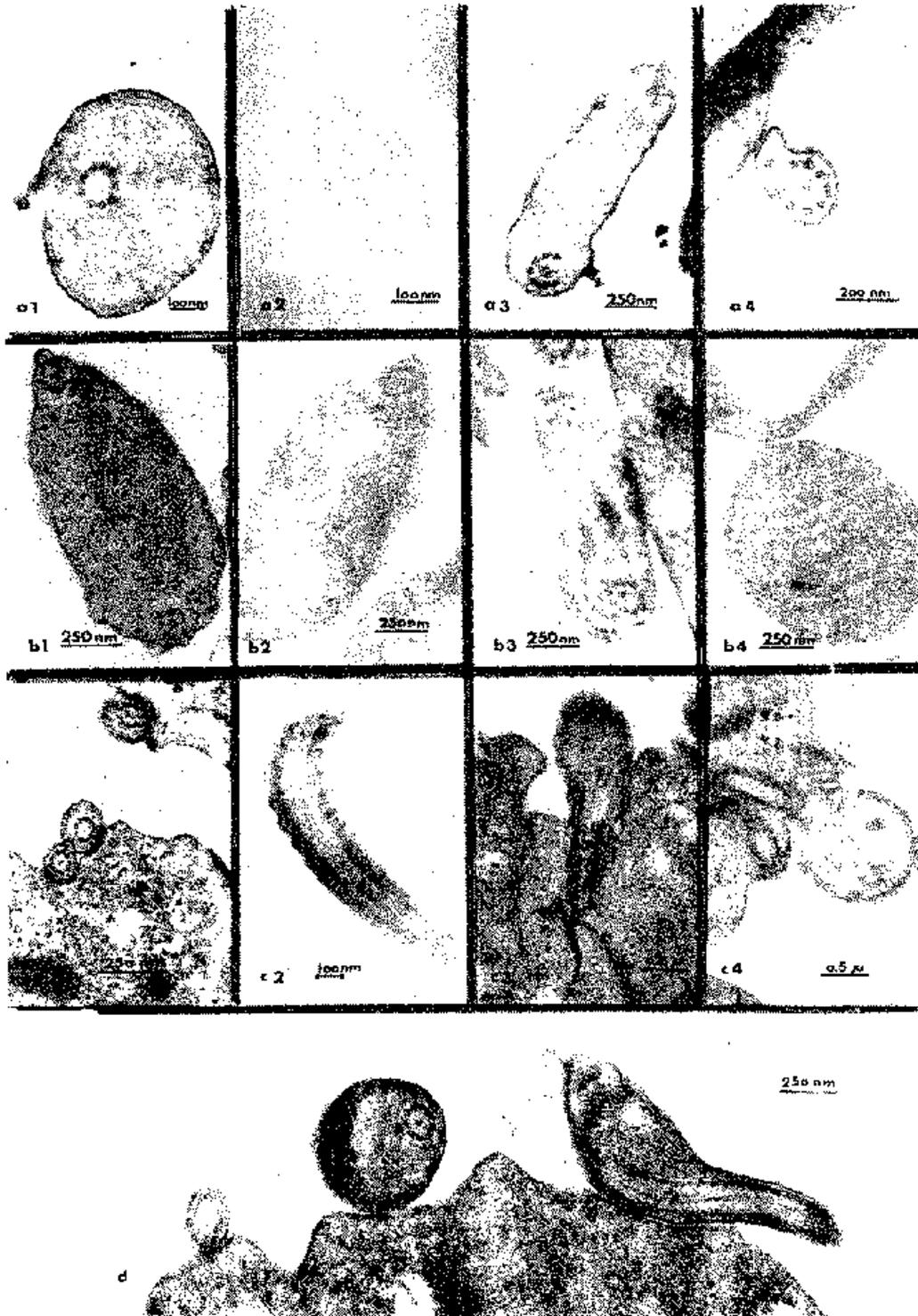
Figura d. Variabilidad del diámetro del axonema del flagelo recurrente en distintos tramos. Acción de la colchicina. x 57.000.



BUSTOS: ULTRAESTRUCTURAS DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.







recurrente el más afectado en este sentido. Normalmente, el flagelo posee una pared flagelar completamente lisa y muy próxima a los pares de microtúbulos periféricos. Bajo la acción de la colchicina, la pared flagelar puede adoptar una configuración rugosa (Lámina XII, fig. c₂), en la que el diámetro flagelar se conserva inalterado. En el caso de algunos flagelos anteriores, y casi siempre en el recurrente, se observa un notable ensanchamiento del axonema flagelar, cuyo diámetro puede llegar a ser de 1 micra (Lámina XII, figs. a₁ y b₄). Así mismo, hemos podido encontrar axonemas con casi 2 micras de diámetro, que poseen tres y hasta cuatro estructuras microtubulares completas $9 + 2$ (Lámina XII, figs. b₁ y b₂). También se pueden encontrar con dislocación microtubular (Lámina XII, figs. b₃ y b₄). La formación de estos anómalos flagelos se produce seguramente por unión de dos o más axonemas agrandados que entrelazan en un punto sus paredes; posteriormente desaparece dicha unión (Lámina XII, fig. c₁).

Respecto al flagelo recurrente, sobre el que recaen la mayoría de las modificaciones descritas, se puede apreciar cómo, inmediatamente después de emerger del cuerpo celular, el axonema se ensancha y los microtúbulos se encuentran ya dislocados; conserva sin embargo inalterada la estructura del cinetosoma correspondiente (Lámina XII, figs. c₃ y c₄). No obstante, el diámetro flagelar no se mantiene ensanchado en todo su recorrido, sino que varía en diferentes tramos e incluso en algunos puede ser normal (Lámina XII, fig. d).

Discusión.

Los resultados obtenidos por nosotros, mediante el empleo del fotomicroscopio son idénticos a los expuestos por Abraham y Honigberg (1964).

Las diversas técnicas de tinción para microscopía óptica, empleadas entre otros por Stabler (1954), en *T. gallinae*, y por Wenrich (1939) en *T. vaginalis*, para poner de manifiesto orgánulos tales como el núcleo, la costa y el cuerpo parabasal, además de un mayor trabajo, suponen un mayor peligro de alteraciones estructurales, debidas a la manipulación, pues nosotros hemos obtenido resultados similares con ayuda del contraste interferencial, sin necesidad de teñir los microorganismos, y hemos podido ver además el tallo axostilar y los flagelos anteriores, que normalmente son difíciles de teñir.

Al microscopio electrónico, la estructura de *T. gallinae*, mostrada por Mattern, Honigberg y Daniel (1967), es casi idéntica a la que nosotros presentamos, si bien hay ciertos detalles ultraestructurales en los que hemos obtenido diferentes resultados. Así por ejemplo, presentan el cuerpo parabasal con una configuración altamente irregular; indican que en algunas áreas el flagelo recurrente y la membrana pueden estar unidas, y que ambos terminan hacia la mitad del cuerpo del flagelado. En este sentido, las imágenes que presentamos muestran el cuerpo parabasal con una estructura totalmente ordenada y claramente diferenciada; no hemos encontrado, en ningún caso, unión alguna entre la membrana ondulante y el flagelo recu-

rente, y la primera se extiende hasta las proximidades del tallo axostilar en el extremo posterior del tricomonádido.

Otra diferencia que hemos notado, respecto a la constitución microtubular de los cinetosomas, la constituye la presencia, en la zona de transición, de dos microtúbulos centrales, rodeados de las nueve triadas características de todo cinetosoma.

Honigberg y col. (1971) observaron en *T. foetus* que la membrana ondulante está compuesta de dos segmentos: sólo hay de 8 a 9 filamentos sigmoideos que no llegan a contactar con la unión pelta-axostilar, y delatan la presencia de dos cuerpos supra e infracinetosómicos, que no existen, según hemos podido apreciar, en *T. gallinae*. Este posee de 10 a 12 filamentos sigmoideos y su membrana ondulante es continua. Tampoco hay anillo cromatínico en *T. gallinae*, a diferencia de lo que estos mismos autores observaron en *T. foetus*.

Joyon y col. (1969) situaron el origen del axostilo, en *T. muris*, *T. minuta*, *T. lacertae* y *T. augusta*, en los filamentos sigmoideos; creemos que, al menos en *T. gallinae*, esto no es posible, ya que dichos filamentos no poseen estructura microtubular o microfibrilar alguna.

Hollande y Valentin (1968) detectaron en *T. termopsidis* gran abundancia de glucógeno distribuido por el citoplasma, en contraposición a lo observado por nosotros en *T. gallinae*.

Ciertas vesículas que contienen microfibrillas dispuestas radialmente, las ha localizado Brugerolle (1972) en el citoplasma de *T. vaginalis* y otros tricomonádidos de ciertos roedores y reptiles. En *T. gallinae* no hemos visto este tipo de inclusiones, por lo que dicho carácter se ha de tener en cuenta con vista a la diferenciación de especies.

En estudios del proceso contráctil en el ciliado *Stentor coeruleus*, Huang y Pitelka (1973) comprobaron que el mecanismo locomotor se debe a un sistema de fibrillas que partiendo de los centriolos se conectan a los microtúbulos. La fuerza motriz se transmite por las interconexiones microtubulares. Hemos observado cómo los filamentos sigmoideos que se originan en el cinetosoma 2.^o se conectan con los microtúbulos de la pelta y axostilo; igualmente hemos visto cómo estos microtúbulos están intercomunicados por finas fibras. Todo esto nos hace pensar que en el mecanismo locomotor de *T. gallinae* pueden participar dichas estructuras, para producir el proceso contráctil axostilar, el cual ayudaría a la motilidad, junto con los flagelos y la membrana ondulante.

Hollande y Valentin (1972), estudian a *T. termopsidis*, en división. En este protozoo detectan, a diferencia de los resultados obtenidos por nosotros, la presencia de dos formaciones periódicas, denominadas "attractóforos", a los cuales se conectan los microtúbulos constituyentes del huso aeromático, creemos que puede ser el axostilo el que desempeña la función de conducir los núcleos duplicados por endomitosis, a los polos opuestos de la célula.

Hawes (1974) plantea que en algunos flagelados los cuerpos basales de ciertos flagelos pueden actuar como centriolos en la división mitótica, aún cuando permanezcan unidos a los canales flagelares. En las electromicrografías que mostramos en este trabajo, podemos observar cómo los sistemas cinetosómicos duplicados se encuentran a veces en polos opuestos de la célula, y quedan trozos axostilares entre ambos, lo cual podría indicar la presencia de restos de un aparato mitótico.

La colchicina produce desensamblaje microtubular en ciertos heliozoos, en los que según Tilney (1968), provoca una formación de cristales proteicos en la célula. Al desaparecer la pelta y el axostilo en *T. gallinae*, no hemos observado la aparición de dichos cristales, por lo que creemos que el enunciado de este autor no se puede hacer extensivo a nuestro material. Otro tanto podemos decir de los observado por Banks y col. (1971) en fibroblastos y leucocitos de algunos mamíferos.

Wilson y Meza (1973) clasifican los microtúbulos, respecto a su comportamiento frente a la colchicina, en lábiles y estables. Son lábiles los del aparato mitótico de células en división y los hallados en los citoplasmas de células animales y vegetales. Son estables los microtúbulos de cilios y flagelos. De acuerdo con estos autores, los microtúbulos de la pelta y el axostilo pertenecen a la categoría de lábiles, ya que dichas estructuras desaparecen totalmente; sin embargo, no estamos de acuerdo en lo que se refiere a la estabilidad de los microtúbulos flagelares, pues si bien no son muy lábiles, hemos observado cómo a veces desaparece algún doblete central o periférico, lo cual tampoco los hace totalmente estables a la acción de la colchicina.

Honigberg, Mattern y Daniel (1972), al estudiar la ultraestructura de *T. batrachorum*, observaron la presencia, en la superficie posterior del organismo, de estrechas extensiones citoplasmáticas parecidas a pseudópodos, que son similares a las proyecciones descritas por nosotros en tricomonadidos, cuando los altera la colchicina.

La forma esférica, la membrana celular festoneada, la internalización flagelar, la desaparición de dobletes de microtúbulos flagelares y de la membrana ondulante, la presencia de dos núcleos y la persistencia del cuerpo parabasal y los gránulos densos observados por Brugerolle (1973), en quistes de *T. batrachorum*, coincide con las imágenes que hemos obtenido en *T. gallinae* alterado por acción de la colchicina. Este mismo autor, también detalla la desaparición de la costa y describe la transformación de la pelta y del axostilo en una lámina arqueada de microtúbulos que se localiza a nivel del núcleo en el mismo microorganismo; en este sentido, difiere de los resultados que hemos obtenido, ya que la costa persiste y la pelta y el axostilo desaparecen.

Por otro lado, Mattern y col. (1973) estudian los cambios ultraestructurales asociados con la formación de pseudoquistes en *T. Batrachorum*, y encuentran cómo se internaliza la membrana ondulante, sin necesidad de que este proceso se verifique también con el flagelo recurrente, si bien en las últimas fases de la formación

del pseudoquiste el flagelo recurrente se encuentra muy distendido y contiene un gran número de filamentos, además de diversas desviaciones de la estructura 9 + 2. Los cinetosomas, la pelta y el axostilo quedan aparentemente inalterados. Si exceptuamos estas últimas observaciones, coincidimos con dicho autor, pues las alteraciones referentes a la membrana ondulante y a los flagelos son idénticas a las halladas por nosotros; lo que posiblemente podría significar que la colchicina induce a la formación de pseudoquistes en *T. gallinae*.

Las analogías que presentan los quistes y pseudoquistes de *Trichomonitus batrachorum* con las formas alteradas de *T. gallinae* halladas por nosotros, y a la vista de un cuadro evolutivo hipotético elaborado por Honigberg (1963), en el que se relacionan las posibles líneas de evolución en el orden Trichomonadida, nos inclinamos en favor de la opinión de este autor, la cual muestra la posibilidad de formación del género *Trichomonas* a partir del género *Trichomonitus* tanto más cuanto que creemos que lo que la colchicina produce es una desdiferenciación celular, y un salto atrás en dicho proceso evolutivo, que sin llegar a originar quistes o pseudoquistes característicos de *Trichomonitus*, da lugar a formaciones muy parecidas.

De los estudios realizados por Rybicka y col. (1972) sobre la ultraestructura de formas en cultivo de *Histomonas meleagridis* podemos concluir que las estructuras correspondientes al sistema mastigonte, a las fibras parabasales, a los filamentos sigmoides y al complejo pelta-axostilar son idénticas a las descritas en *T. gallinae*; no obstante hay algunas diferencias como son la ausencia de membrana ondulante, de tallo axostilar y de costa, y la presencia de cuatro cinetosomas de los que parte un solo flagelo. Estos caracteres son muy parecidos a los producidos por la colchicina en el trichomonádido descrito en nuestro trabajo, por lo que planteamos también la posibilidad de que el género *Histomonas* descienda del género *Trichomonas*, luego de una adaptación al medio en que normalmente se desarrolla, que como sabemos es el hígado. En este sentido, consideramos de interés un fenómeno observado por Brugerolle, Gobert y Savel (1974), en lesiones hepáticas provocadas por inyección intraperitoneal de *T. vaginalis* en ratón. En tales circunstancias, este protozoo pierde la membrana ondulante y adopta forma ameboide, lo que produce mayor similitud entre los dos géneros a los que antes hemos hecho referencia.

Resumen.

En el presente estudio hemos descrito la estructura normal de *Trichomonas gallinae*, en la fase de trofozoito y en división, así como las alteraciones producidas en cultivos con colchicina a concentraciones de 1 mM y de 0.5 mM. Dichas investigaciones se han realizado con los microscopios de contraste de fases, contraste interferencial y electrónico.

Como material de investigación hemos utilizado tricomonas aislados por nosotros de un palomo portador que poseía nódulos calcificados tricomoníasicos en el tramo digestivo superior. Posteriormente estos protozoos se cultivaron en medios específicos *in vitro*, para su purificación y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

In vivo y con las diversas técnicas de microscopía óptica empleadas, sólo es posible diferenciar claramente caracteres externos como la forma celular, los flagelos, la membrana ondulante y el tallo axostilar; y de los internos, el núcleo y las formaciones vacuolares.

Con el microscopio electrónico hemos encontrado y estudiado todos los orgánulos característicos de este protozoo y hemos analizado las correspondencias con otras especies afines.

Las alteraciones de la estructura normal, cuando se encuentra en división, podemos resumirlas en una desaparición temporal de la membrana ondulante, duplicación de orgánulos y aparición de fenómenos de internalización flagelar.

La colchicina produce cambios como pérdida de la forma celular, aumento del número de núcleos, desorganización de los sistemas cinetosómico y flagelar e intensos fenómenos de vacuolización.

S u m m a r y .

In this study we describe the structure of *Trichomona gallinae*, as trophozoite and during division, besides the changes promoted by colchicine on this trichomonad on cultures at concentrations 1 mM and 0.5 mM.

The observations were made by phase contrast, interferential contrast and electronmicroscope.

We have used trichomonads isolated from pigeon which had chronic lesions in the upper digestive tract. They were cultured *in vitro* to purification on specific medium and preserved in liquid nitrogen.

In vivo by the optic microscope it is possible to differentiate external characters as well as undulating membrane and the axostile trunk. The nucleus and the vacuolar formations are also seen.

By the electron microscope we analyse the cellular organization and the homologies whit other related species.

The structural changes during division, can be summarized as it follows: temporal disappearance of the undulating membrane, presence of duplicated structures and of internalized flagella.

Colchicine causes changes such as: strong deformation of the shape, existence from 2 to nuclei, disorganization of the cinetosomic and flagelar system, and intensive cell vacuolization.

Agradecimientos.

Al profesor Jordano Barea.
Al profesor Martínez Gómez.
A los profesores ayudantes D. Antonio Gázquez y D. Juan García.
A la señorita María Teresa Palop.

Bibliografía.

- Abraham, R. and B. M. Honigberg, 1964.—*J. Parasitol.*, 50: 608-619.
Actor, P., D. S. Ziv and J. F. Pagano, 1969.—*Science*, 164: 439-440.
Anderson, F. and Beams, 1959.—*J. Morphol.*, 104: 205-235.
Angelopoulos, E., 1970.—*J. Protozool.*, 17: 39-51.
Basch, H. and H. H. Gadebusch, 1968.—*Amer. Society Microb.*, 16: 1953.
Barrow, G. I. and C. Ellis, 1970.—*J. Clin. Pathol.*, 23: 90.
Behke, O. and A. Forer, 1972.—*Exptl. Cell. Res.*, 73: 506-509.
Berkaloff, A., J. Bourguet, P. Favard y M. Guinebault, 1971.—*Biología y fisiología celular*. Editorial Omega. Barcelona.
Brown, D. L. and G. B. Bouck, 1973.—*J. Cell. Biol.*, 56: 360-378.
— 1974.—*J. Cell. Biol.*, 61: 514-536.
Brugerolle, G. 1971.—*C. R. Acad. Sci. Paris* 272: 2558-2560.
— 1971.—*Protistologica*, 7: 171-176.
— 1972.—*Protistologica*, 8: 353-363.
— 1973.—*J. Protozool.*, 20: 320-327.
— 1973.—*C. R. Acad. Sc. Paris*, 277: 2193-2196.
— , J. G. Gobert et J. Savel, 1974.—*Ann. Parasitol.*, 49: 301-318.
Bustos, M. y M. Pérez, 1975.—*Arch. zoot.*, 24: 259-265.
Capet, R. G., 1968.—*Can. J. Pub. Heal.*, 59: 201-203.
— , and P. Payment, 1969.—*Obst. Gynecol.*, 33: 564-568.
Careri, I. A. Emanuelli and I. Signorelli, 1968.—*Amer. J. Obst. Gynecol.*, 100: 299-301.
Cavier, R. P. Georges et J. Savel, 1965.—*Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 40: 407-420.
Daniel, W. A., C. F. T. Mattem and B. M. Honigberg, 1971.—*J. Protozool.*, 18: 575-586.
Dawes, B. 1968.—*Adv. Parasitol.*, 6: 177-188.

BUSTOS: ULTRAESTRUCTURAS DE TRICHOMONAS GALLINAE.

- Diamond, L. S., 1957. *J. Parasitol.*, 43: 488-490.
- 1964. *Cryobiology*, 1: 95-102.
- , I. L. Bartgis and E. V. Reardon, 1965. *Cryobiology*, 1: 295-297.
- Dwyer, D. M., 1972. *J. Protozool.*, 19: 316-325.
- Eddie, D. A. S., 1968. *J. Med. Microbiol.*, 1: 153-159.
- Fitzgerald, P. R. and al., 1954. *Veterinary Medicine*, 18: 409.
- and N. D. Levine, 1961. *J. Protozool.*, 8: 21-27.
- Gherman, I., M. Plecias and L. Sendroiu, 1960. *Microb. Parazitol. Epidem.*, 5: 543-546.
- Gibbons, I. R. and A. V. Grimstone, 1969. *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 7: 697-716.
- Grell, K. G., 1973. *Protozoology*. Springer-Verlag. New York.
- Gualandi, G. A. Zanella, 1961. *Veterinaria Italiana*, 12: 95-99.
- Hibler, C. P. et al., 1960. *Protozool.*, 7: 159-171.
- Hollande, A. et J. Valentin, 1968. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 267: 1383-1386.
- 1968. *Prostilologica*, 4: 127-140.
- 1969. *Prostilologica*, 5: 335-343.
- Holt, P. A. and J. O. Corliss, 1973. *J. Cell. Biol.*, 58: 213-219.
- Honigberg, B. M. 1953. *J. Parasitol.*, 39: 191-208.
- and C. P. Read, 1960. *Science*, 131: 352-353.
- and V. M. King, 1962. *J. Protozool.*, 9: 18.
- 1963. *J. Protozool.*, 10: 20-63.
- , V. K. Farris and M. C. Livingston, 1965. *2. Conferencia Intern. Protozool.*, London.
- 1968. *J. Protozool.*, 15: 223-230.
- , C. F. T. Matern and W. A. Daniel, 1968. *J. Protozool.*, 15: 419-430.
- 1970. *J. Parasitol.*, 56: 701-708.
- , H. Firedman and S. Stepkowski, 1971. *J. Parasitol.*, 57: 363-369.
- , C. F. T. Mattern and W. A. Daniel, 1971. *J. Protozool.*, 18: 183-198.
- 1972. *J. Protozool.*, 19: 446-453.
- Huang, B. and D. R. Pitelka, 1973. *J. Cell. Biol.*, 57: 704-728.
- Inoki, S., K. Nakanishi and T. Nakabayashi, 1959. *Bikens's J.*, 2: 21-24.
- , M. Ohno, K. Kondo and H. Sakamoto, 1961. *Biken's J. Preliminary Report*, 63-65.

BUSTOS: ULTRAESTRUCTURAS DE *TRICHOMONAS GALLINAE*.

- Irina Proca, M., 1972. - *Arch.Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, 31: 315-321.
- Ito, Y., 1968. - *J. Parasitol.*, 17: 494-508.
- Kulda, J. 1967. - *Folia Parasitologica*, 14: 295-310.
- and B. M. Honigberg, 1969. - *J. Protozool.*, 16: 479-495.
- , B. M. Honigberg, J. K. Frost and D. H. Hollander, 1970. - *Amer. J. Obst. Gynecol.*, 108: 908-918.
- 1973. -IV Cong. Intern. Protozool. Clermont-Ferrand, 234.
- Lamy, L. H. 1972. - *Ann. Biol.*, 11: 145-183.
- Levine, N. D. 1973. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Luft, J. H., 1961. - *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, 9: 409-414.
- Mandel, M. and B. M. Honigberg and W. A. Daniel, 1967. - *J. Protozool.*, 14: 320-339.
- 1969. - *J. Protozool.*, 16: 668-685.
- 1972. - *J. Protozool.*, 19: 265-274.
- 1973. - *J. Protozool.*, 20: 222-229.
- Mooseker, M. S. and L. G. Tilney, 1973. - *J. Cell. Biol.*, 56: 13-26.
- Muller, M. 1973. - *J. Cell. Biol.*, 53: 453-474.
- Osada, M., 1962. - *Keio J. Med.*, 11: 227-252.
- Pitelka, D. R., 1963. Electron microscopic structure of protozoa. Intern. Series Monogr. Pure and Applied Biol., 13. Pergamon Press, Oxford.
- 1969. - Fibrillar system in protozoa. *Research in Protozoology*, 3. Pergamon Press, Oxford.
- Rybicka, K., B. M. Honigberg and S. Holt, 1972. - *Prostilologica*, 8: 107-120.
- Sjostrand, F. S., 1967. - *Electron microscopy of cells and tissues*. Academic Press, London.
- Sleigh, M. A., 1962. The biology of cilia and flagella. Pergamon Press, New York.
- Stabler, R. M., 1954. - *Exp. Parasit.*, 3: 368-402.
- Stepkowski, S. and B. M. Honigberg, 1972. - *J. Protozool.*, 19: 306-315.
- Summers, K. E. and I. R. Gibbons, 1973. - *J. Cell. Biol.*, 58: 618-629.
- Sutka, P. and P. L. Katai, 1969. - *Ac. Vet. Acad. Sci. Hung.*, 19: 385-389.
- Taylor, A. E. R. and J. R. Baker, 1968. - *The cultivation of parasites in vitro*. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg.

- Thomas, R. J. and B. C. Maher, 1969.- Sonderdruck *Ans. Microsc.*, 24: 296-298.
- Vaccari, J. e L. Bertoni, 1957.- *La Nuova Veterinaria*, 33: 1-6.
- Williams, N. E. and J. Frankel, 1973.- *J. Cell. Biol.*, 56: 441-457.
- and E. M. Nelsen, 1973.- *J. Cell. Biol.*, 56: 458-465.
- Wilson, L. and J. Meza, 1973.- *J. Cell. Biol.*, 58: 709-719.
- Ying, Y., M. Y. Huang and W. N. Lien, 1966.- *Chinese Med. J.*, 85: 375-390.

Abreviaturas empleadas.

- 1, 2, 3, 4, R y K – Cinetosomas.
Ax -- Axostilo.
C -- Costa.
FA-- Flagelos anteriores.
FI -- Flagelo internalizado.
FR-- Flagelo recurrente.
FS -- Filamentos sigmoideos.
F1, F2, F3, y F4 -- Raíces filamentosas o filamentos asociados a los cinetosomas correspondientes.
FP1 y FP2 -- Filamentos parabasales 1.º y 2.º .
GD-- Gránulos densos.
GA-- Gránulos densos endoaxostilares.
GC-- Gránulos densos paracostales.
Gl -- Glucógeno.
J -- Unión pecto-axostilar.
L -- Labio.
LM-- Lámina marginal.
MO-- Membrana ondulante.
MT -- Microtúbulos.
N -- Núcleo.
Nu-- Nucleolo.
PB-- Cuerpo parabasal.
Pe -- Pelta.
RE -- Retículo endoplasmático.
T -- Tallo axostilar.
V -- Vacuola.
X -- Estructura periódica situada entre los cinetosomas 1.º y 2.º .