

Osservazioni con il microscopio elettronico sulla superficie di rivestimento di alcuni platelminti parassiti

ANNAROSA CIOFI LUZZATTO e GIANFRANCO FERRETTI (*)

Laboratori di Fisica

Riassunto. — La superficie del corpo di Cestode *Hymenolepis nana* e del Trematode *Dicrocoelium dendriticum* è formata da un tegumento di tipo particolare, le cui cellule hanno forma molto irregolare e ramificata, col nucleo nella parte della cellula che si trova nel parenchima al di sotto degli strati muscolari e della membrana basale. Alcune ramificazioni di queste cellule si espandono a formare lo strato superficiale del tegumento ove costituiscono un vero e proprio sincizio ricco di mitocondri e granuli ed anucleato.

Il tegumento di *D. dendriticum* presenta un profilo molto irregolare, mentre tutta la superficie di *H. nana* presenta numerosi microvilli fittamente addensati. L'epitelio intestinale di *D. dendriticum* appare di natura sinciziale, e sulla sua superficie libera presenta numerosissimi microvilli filamentosi.

Summary (*Observation of the structure of the surface of some parasite tapeworms at the electron microscope*). — The structure of the surface of the Cestode *Hymenolepis nana* and of the Trematode *Dicrocoelium dendriticum* was studied. Previously some authors, in particular ROTHMAN (1963) and THREADGOLD (1965), had suggested that the surface of Cestode and Trematode was a tegument which forms a syncytium. Our observations confirmed that the surface has a characteristic structure and this structure is practically the same, in the general organization, in the two classes of tapeworms. It shows a superficial layer, rich of granules and mitochondria and without nuclei (Figs. 2, 21). This layer is connected by cytoplasmic tubes to the nucleated part of the cell, which is located deep down under the basement membrane and the muscular layers (Figs. 1, 20). In *H. nana* the superficial layer of the tegument forms a layer of numerous and characteristic microvilli on the outside (Fig. 2). In *D. dendriticum* there are no microvilli and the surface has a very irregular outline (Figs. 21, 22). The intestinal

(*) Istituto di Parassitologia, Università degli Studi, Roma.

epitelium of *D. dendriticum* appears to be a syncytium and its surface shows many filamentous microvilli (Fig. 23). The tegument covering the suckers shows a characteristic structure (Figs. 16, 24).

INTRODUZIONE

Il *Phylum* dei Platelmini è costituito da metazoi a simmetria bilaterale, più o meno appiattiti in senso dorso-ventrale. Il *Phylum* è sostanzialmente omogeneo, pur comprendendo specie che presentano tra loro differenze notevoli, sia per le dimensioni e la morfologia, sia — e in particolar modo — per l'habitat: accanto alla classe dei Turbellari, costituita da specie per lo più a vita libera, vi sono infatti altre classi — i Trematodi e i Cestodi — costituite da specie che sono parassite obbligate almeno allo stato adulto, e nelle quali si hanno fenomeni anche vistosi di adattamento alla vita parassitaria.

Se si considera il *Phylum* nel suo insieme, a partire dai Turbellari, generalmente considerati più primitivi, fino ai Cestodi, perfettamente e completamente adattati alla vita parassitaria, si rileva che l'adattamento al parassitismo diventa sempre più perfetto anche per quanto si riferisce al ciclo di vita, fino al punto che in molti Cestodi viene ad essere perduta la possibilità di sopravvivenza in ambiente esterno anche delle forme larvali. Prescindendo da quelli che sono gli adattamenti metabolici, si ha da un lato lo sviluppo di particolari organi di adesione (ventose e uncini), talora notevolmente sviluppati, dall'altro la riduzione dell'apparato digerente, che nei Cestodi scompare completamente, mentre nei Trematodi (così come nei Turbellari) è costituito da un intestino a fondo cieco. Trematodi e Cestodi vivono di regola in un ambiente nel quale sono presenti enzimi digestivi, in alta concentrazione: la loro superficie di rivestimento deve essere pertanto in grado di resistere all'azione di questi enzimi, ma deve essere anche in grado, in particolare nei Cestodi, di incorporare le sostanze alimentari già digerite dall'ospite. È pertanto lecito presumere che la superficie di rivestimento dei Cestodi abbia delle caratteristiche particolari per rispondere a queste due diverse esigenze, e che la superficie di rivestimento dei Trematodi, pur essendo questi forniti di un intestino cieco, presenti delle caratteristiche analoghe a quelle dei Cestodi: un particolare interesse in questo quadro viene ad assumere anche lo studio dettagliato dell'epitelio dell'apparato digerente dei Trematodi.

Nella letteratura classica la superficie di rivestimento dei Trematodi e dei Cestodi viene descritta come costituita da una « cuticola » omogenea anista, che poggia direttamente su una membrana basale. Al di sotto di questa viene descritta la presenza di uno strato muscolare costituito da fasci circolari e longitudinali, e quindi di cellule del parenchima. Il fatto che alcune di queste cellule mandino dei prolungamenti che raggiungono la « cuticola », osservazione che risale all'inizio di questo secolo, ha spinto PRATT (1909) a formulare l'ipotesi che la cuticola sia un secreto delle cellule del parenchima,

oppure di cellule mesenchimali o di altre cellule specializzate. Solo in questi ultimi anni, con lo studio della morfologia di questi parassiti mediante il microscopio elettronico, si è visto che la struttura della superficie di rivestimento era assai più complessa. Per primo READ (1955), studiando la superficie di rivestimento dei Cestodi *Hymenolepis diminuta* e *Railletina cesticiillus*, mette in evidenza la presenza di microvilli sulla superficie esterna del verme e descrive, nello spessore della « cuticola », delle strutture che considera simili a mitocondri. Successivamente ROTHMAN (1960; 1963) descrive con maggior precisione i microvilli (che chiama microtrichi), conferma la presenza di mitocondri e segnala la presenza di particolari formazioni, che chiama porocanali, che attraverserebbero la « cuticola » sboccando all'esterno. THREADGOLD (1962; 1963 a; b; 1964; 1965) descrive più dettagliatamente la struttura dello strato superficiale dei Cestodi che considera costituito da cellule tegumentali, sia per la presenza di mitocondri in quella che era considerata « cuticola », sia per la presenza di connessioni citoplasmatiche tra questa e determinate cellule che si trovano al di sotto della membrana basale e degli strati muscolari. Un disegno schematico del tegumento dei Cestodi è riportato in uno degli ultimi lavori di THREADGOLD (1965): lo strato superficiale, sinciziale, appare connesso con le cellule situate più profondamente. Ad analoghe conclusioni erano giunte le ricerche di altri AA. (THREADGOLD, 1964; CIOFI LUZZATTO, FERRETTI & MARINOZZI, 1965; BÉGUIN, 1966). I cestodi studiati appartenevano sia alla famiglia degli Pseudofillidei, sia a quella dei Ciclofillidei. I dati sulla superficie di rivestimento dei Trematodi sono ancora più scarsi: lo stesso THREADGOLD (1963) ha osservato che il trematode *Fasciola hepatica* è rivestito da un epitelio sinciziale, connesso mediante canali citoplasmatici con cellule situate più profondamente nel parenchima. WOTTON & SOGANDARES-BERNAL (1963) segnalano la presenza di « stereocilia o microvilli » nelle cellule dell'epitelio intestinale di Trematodi del genere *Cleptodiscus*.

Nel quadro di queste ricerche ci è parso interessante studiare il tegumento del Cestode *Hymenolepis nana* e del Trematode *Dicrocoelium dendriticum*: mentre le osservazioni relative alla struttura submicroscopica del tegumento di *H. nana* (Fig. 1) possono considerarsi concluse, salvo per quanto riguarda il rivestimento dello scolice ed in particolare del rostro, le ricerche sul tegumento dei Trematodi, e sull'epitelio che riveste il loro apparato digerente — strutture tra loro connesse da un punto di vista funzionale, in quanto entrambe addette alla incorporazione di sostanze alimentari — non sono ancora completate: d'altronde, per tracciare un quadro organico, le ricerche su questo argomento dovranno estendersi ad altri Trematodi sia di famiglie diverse, sia di diversi habitat (intestino, apparato respiratorio, ecc.) e dovranno estendersi anche allo studio dello sviluppo embrionale e delle diverse forme larvali.

MATERIALE E METODI

Le ricerche sono state eseguite sul Cestode *Hymenolepis nana* e sul Trematode *Dicrocoelium dendriticum*. Sono stati esaminati anche preparati allestiti con il Trematode *Fasciola hepatica*.

I Cestodi *Hymenolepis nana* sono stati prelevati dall'intestino di topi albini infestati in laboratorio con un ceppo isolato dall'uomo; i Trematodi sono stati raccolti dal fegato di pecore naturalmente infestate, macellate nella campagna romana.

I Cestodi sono stati fissati in una soluzione di tetrossido d'osmio al 2 % in tampone Palade per un'ora, oppure in una soluzione di permanganato di potassio al 2 % in acqua distillata per due ore. I preparati sono stati quindi disidratati con alcool a concentrazione crescente e inclusi in Araldite polimerizzata a 60° C, oppure disidratati con acetone a concentrazione progressiva e inclusi in Vestopal W polimerizzato a 60° C. L'inclusione era sempre orientata, in modo da ottenere sezioni trasversali del verme.

I Trematodi *Dicrocoelium dendriticum* hanno presentato notevoli difficoltà per la fissazione. Il tetrossido d'osmio al 2 % in tampone Palade, che aveva dato buoni risultati per *H. nana*, in questo caso dava preparati quasi completamente svuotati con le membrane in parte scoppiate. La doppia fissazione in glutaraldeide prima, quindi in osmio, è stata provata con tamponi diversi. I risultati migliori sono stati ottenuti con la fissazione in glutaraldeide a 6,5 % per 30 minuti in tampone Millonig 0,2 M pH 7,6 seguita da un lavaggio in tampone per 12 ore, e quindi postfissazione in tetrossido d'osmio all'1 % sempre nello stesso tampone Millonig. Anche in questo caso però la fissazione non può essere ritenuta perfetta, in quanto in particolare i mitocondri non risultano ben conservati, per cui sono necessarie ulteriori prove per riuscire ad avere una fissazione ottimale. Anche per i Trematodi sono state eseguite le inclusioni orientate sia in Vestopal W che in Araldite.

Le sezioni, ottenute con un microtomo Porter-Blum MT-1 con lama di vetro, sono state guardate direttamente al microscopio elettronico nel caso dei preparati fissati in permanganato, nei casi invece dei preparati fissati in osmio o in glutaraldeide e osmio, le sezioni sono state colorate con ossido di piombo secondo la tecnica di KARNOVSKY (1961).

Le sezioni sono state osservate e fotografate con un microscopio elettronico Siemens Elmiscop I.

Per poter mettere in relazione le immagini osservate al microscopio elettronico con quelle ben note date dalla microscopia ottica al taglio di sezioni fine (40-60 m μ) veniva alternato quello di sezioni semifine (0,5-1 μ) di spessore che venivano poi colorate a caldo per pochi secondi con una soluzione di azzurro II e blu di metilene in borace all'1 % (RICHARDSON, JARRET

& FINKA, 1960). In alcuni casi le sezioni semifine sono state colorate con la tecnica dell'impregnazione argentea dopo acido periodico (MARINOZZI, 1961) oppure col reattivo di Shiff dopo acido periodico.

OSSERVAZIONI

A. — *Hymenolepis nana*.

La struttura della superficie di rivestimento, al microscopio elettronico appare molto complessa (Fig. 2, 3). Sulla superficie esterna della cosiddetta « cuticola » si possono osservare numerosissimi microvilli caratteristici costituiti da una parte cilindrica, lunga circa $0,5 \mu$ e del diametro di circa $0,2 \mu$, che si continua con una porzione soprastante, a punta: le due porzioni sono divise da un setto molto evidente. La parte basale, ricoperta da una doppia membrana fortemente elettrodensa dello spessore complessivo di circa 400 \AA , nei preparati fissati in osmio (Fig. 4) risulta a sezione approssimativamente quadrangolare con degli ispessimenti ai vertici. La parte a punta del microvillo è fortemente ed uniformemente elettrodensa e spesso inclinata rispetto alla porzione sottostante.

Nello spessore dello strato superficiale del tegumento (Fig. 2) corrispondente in senso stretto alla « cuticola » degli AA. classici, si evidenziano numerosi mitocondri integri e numerosissime vescicole (Fig. 9), che appaiono vuote dopo la fissazione in permanganato. Nei preparati fissati in osmio si evidenziano invece numerosi granuli fortemente elettrodensi, di forma allungata, probabilmente omologabili alle vescicole che si notano dopo la fissazione in permanganato. Nello spessore della « cuticola » non si notano né membrane del reticolo endoplasmico, né membrane che indichino divisione tra cellula e cellula. Si osservano soltanto delle piccole introflessioni della membrana basale che penetrano per lo più perpendicolarmente nella « cuticola », sempre però per un tratto molto breve (Fig. 10).

La membrana basale (Fig. 10), situata sotto allo strato superficiale del tegumento, presenta numerose fibrille variamente orientate. Al di sotto si evidenzia talora uno strato di fibre caratteristiche (Fig. 11), dallo spessore di circa 300 \AA , nelle quali non è stato per ora possibile evidenziare la striatura propria del collagene. In uno strato ancora più profondo vi sono i fasci muscolari longitudinali e trasversali.

Dallo strato superficiale del tegumento partono delle connessioni citoplasmatiche che, attraversata la membrana basale e gli strati muscolari, raggiungono la parte nucleare delle cellule tegumentali che si trova nel parenchima (Fig. 5, 6, 7, 8). Il citoplasma che circonda il nucleo delle cellule tegumentali presenta membrane del reticolo endoplasmico ed è ricchissimo di ribosomi liberi, così che nel complesso tali cellule appaiono molto scure.

I mitocondri, relativamente numerosi, sono in media più grossi e di forma più regolare e tondeggiante di quelli che si trovano nella parte delle cellule che forma lo strato superficiale del tegumento. Il nucleo ha un contorno piuttosto regolare e contiene un nucleolo ben definito. La forma delle cellule tegumentali è molto irregolare: lo strato di citoplasma che circonda il nucleo è in genere piuttosto sottile, ma molto ramificato: alcuni dei prolungamenti citoplasmatici si dirigono verso l'esterno e, dopo aver attraversato gli strati muscolari e la membrana basale, si espandono formando lo strato superficiale. Mentre le cellule del tegumento, nella parte situata profondamente nel parenchima, sono nettamente distinte l'una dall'altra, anche se naturalmente non è possibile escludere che in alcuni casi le ramificazioni di cellule vicine che hanno spesso rapporti di stretta contiguità si uniscano, nello strato superficiale esse si fondono tra loro in modo completo, al punto che in nessun livello del verme, dalla regione del collo alle ultime proglottidi, è possibile individuare traccia di divisione tra cellula e cellula.

Non è stato possibile mettere in evidenza differenze sostanziali del tegumento ai diversi livelli del verme. Nelle proglottidi più distali i microvilli sembrano talvolta più radi, e allora al loro posto si osservano delle strutture particolari, di forma tondeggiante o ovale, che paiono formarsi alla base dei microvilli per poi liberarsi nell'ambiente circostante (Fig. 14).

In un unico caso è stata messa in evidenza una particolare struttura, costituita da una doppia membrana che racchiude una piccola porzione dello strato superficiale, costituendo una formazione che partendo dal parenchima attraverso sia la membrana basale sia lo strato superficiale del tegumento per raggiungere la superficie esterna, dove termina con una membrana liscia e priva di microvilli (Fig. 12). In un altro paio di casi sono state messe in evidenza doppie membrane che circondano porzioni del citoplasma nello spazio superficiale del tegumento, senza raggiungere la superficie esterna (Fig. 13). In altri casi sono stati osservati, nello spessore dello strato superficiale del tegumento, dei vacuoli piuttosto voluminosi che talvolta ne occupano quasi tutto lo spessore.

Il nucleolo di alcune cellule, soprattutto nelle ultime proglottidi, appare caratterizzato da formazioni lineari fortemente elettrondense dopo fissazioni in osmio (Fig. 15).

I muscoli sono costituiti da fasci formati da due tipi di miofibrille, alcune più spesse (circa 160-200 Å di diametro), altre più sottili (circa 50 Å). Il rapporto numerico tra questi due tipi di fibrille è di circa 1 : 6; non è stato però possibile evidenziare alcun rapporto definito nella loro posizione reciproca. Le cellule muscolari nella parte non fibrillata presentano una granulazione ribosomica relativamente scarsa, per cui nel complesso queste cellule appaiono più chiare delle cellule tegumentali; inoltre si evidenziano numerose

vescicole del reticolo endoplasmico molto rigonfie e mitocondri; anche in questo caso le cellule presentano delle ramificazioni contenenti quasi esclusivamente glicogeno nella caratteristica forma a rosetta.

Scolice. — Le ventose sono ricoperte da un tegumento alquanto diverso (Fig. 16) rispetto a quello che ricopre le proglottidi: i microvilli sono più radi e sembrano più tozzi; sono presenti, ma assai più rare, gocce lipidiche e mitocondri; mancano i granuli elettrodensi interpretabili come granuli di pinocitosi. Lo strato superficiale del tegumento è spesso interrotto da doppie membrane, che circoscrivono delle porzioni di citoplasma (Fig. 18); in un caso una di queste raggiunge la superficie esterna; non è stato finora possibile mettere in evidenza connessioni citoplasmatiche tra strato superficiale e cellule tegumentali situate in uno strato più profondo. Le cellule, d'altra parte, sembrano mancare completamente a livello delle ventose, per cui lo strato di citoplasma che ricopre le ventose sembra essere in connessione solamente con le cellule situate intorno ad esse.

Le fibre muscolari delle ventose presentano un aspetto particolare, in quanto si inseriscono direttamente sulla membrana basale per mezzo di una struttura che ha una forma ad anello se la sezione è perpendicolare alle fibre stesse (Fig. 17).

Il tegumento, sia tra le ventose sia tra queste e la base del rostro, presenta la struttura descritta per le proglottidi. Alla base del rostro si ha un breve tratto nel quale lo strato superficiale appare ricchissimo di mitocondri e privo di microvilli e di granuli elettrodensi. Per quanto si riferisce al rostro (Fig. 19), pur disponendo fino ad ora solo di poche immagini che non consentono ancora di trarre conclusioni definitive, è tuttavia possibile affermare che la struttura della superficie di rivestimento è sostanzialmente diversa, in quanto appare molto vacuolizzata e con numerose formazioni fortemente elettrodense: allo stato attuale delle nostre ricerche non è possibile affermare se si tratti di un tegumento o invece di una vera cuticola.

B. — *Dicrocoelium dendriticum*.

La struttura fondamentale del tegumento appare sostanzialmente analoga a quella descritta per *H. nana* (Fig. 20).

La superficie esterna presenta un profilo molto irregolare, per cui lo spessore dello strato superficiale del tegumento è molto variabile, ed è costituita da una membrana plasmatica che forma delle piccole estroflessioni relativamente frequenti, prive di strutture caratteristiche, che possono fare pensare a microvilli rudimentali. Nello spessore dello strato superficiale del tegumento (Fig. 21 e 22) si osservano, anche in questo caso, numerosi mitocondri e numerosissimi granuli fortemente elettrodensi dopo fissazione in

osmio: granuli analoghi, sempre in concentrazione piuttosto elevata, si trovano anche nel citoplasma che circonda il nucleo delle cellule tegumentali situate in uno strato più profondo, al di sotto della membrana basale e dello strato muscolare. I nuclei sono piuttosto voluminosi e, con le tecniche da noi usate, mostrano la cromatina addensata in blocchi.

Non sono state messe in evidenza differenze della struttura del tegumento in corrispondenza alle diverse parti del parassita, così che appaiono sostanzialmente uguali sia la parte dorsale sia quella ventrale del verme.

Entrambe le ventose sono ricoperte da uno strato di citoplasma analogo a quello che riveste la restante superficie del corpo (Fig. 24). Nelle osservazioni fino ad ora condotte non è stato possibile evidenziare a livello delle ventose immagini riferibili a connessioni che raggiungono la parte nucleare delle cellule, né nuclei riferibili a cellule del tegumento come già si era riscontrato in *H. nana*. Nello strato superficiale del tegumento, sempre in corrispondenza delle ventose, non si rinvengono i granuli elettrondensi riferibili a fenomeni di pinocitosi, mentre invece sono presenti i mitocondri. La membrana basale forma delle trabecole che si insinuano nello strato superficiale del tegumento, quasi ad assicurarne una migliore adesione.

All'interno delle ventose — poco muscolarizzata quella ventrale, relativamente di più quella orale — si rinvengono cellule il cui citoplasma contiene numerosi granuli elettrondensi, talvolta più voluminosi di quelli che si trovano allo strato superficiale del tegumento, rispetto ai quali presentano una maggiore variabilità di forme (Fig. 26). Nel citoplasma delle stesse cellule sono anche stati trovati, in alcuni casi, degli inclusi di tipo particolare del diametro di 5-10 μ che presentano una struttura molto regolare simile a quella riscontrabile in cristalli proteici (Fig. 25).

Ciechi (Fig. 23). — La superficie dell'epitelio è caratterizzata dalla presenza di numerosi microvilli filamentosi assai lunghi. I nuclei, anche in questo caso piuttosto voluminosi e con cromatina a blocchi, si trovano quasi sempre vicino alla membrana basale, talora come incuneati in infossature di questa. In parecchi casi si osservano delle ramificazioni del citoplasma delle cellule epiteliali che attraversano la membrana basale espandendosi nel parenchima sottostante. Non è stato possibile mettere in evidenza pareti cellulari che dividano l'una dall'altra le cellule epiteliali, cosicchè anche in questo caso sembra trattarsi di un sincizio.

A questo proposito è interessante osservare che anche nell'intestino di *Fasciola hepatica* (Fig. 27) (*) sono presenti microvilli ancora più lunghi e numerosi di quelli osservati in *D. dendriticum*.

(*) Osservazioni non pubblicate.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONI

L'affermazione degli AA. classici secondo la quale il corpo dei Cestodi è rivestito da una « cuticola » anista portava a presupporre che l'incorporazione delle sostanze alimentari avesse luogo per via passiva. Anche per i Trematodi, gli AA. classici consideravano il corpo rivestito da una cuticola anista, talora ricoperta di spine: per i Trematodi tuttavia, così come per i Turbellari, la presenza di un intestino a fondo cieco portava a ritenere che l'assorbimento e la digestione delle sostanze alimentari avessero luogo in questo apparato specializzato.

Le prime osservazioni al microscopio elettronico sulla superficie di rivestimento dei plattelminti parassiti, mettendo in evidenza la presenza nella « cuticola » dei Cestodi di microvilli da un lato e di mitocondri dall'altro, portavano a concludere che la « cuticola », per i Cestodi e così anche per i Trematodi, era costituita da uno strato di citoplasma connesso con cellule la cui parte contenente il nucleo era situata in uno strato più profondo; esse prospettavano perciò il problema dell'assorbimento in un modo nuovo.

Sulla base delle osservazioni al microscopio elettronico è possibile trarre le seguenti conclusioni:

1) La superficie esterna dei Cestodi è ricoperta da numerosi microvilli (READ, 1955; ROSARIO, 1962; ROTHMAN, 1959; 1960; 1963; THREADGOLD, 1965) di struttura caratteristica. Nei Trematodi invece la superficie esterna del corpo presenta delle estroflessioni di forma irregolare e assai rade, la superficie esterna del verme appare peraltro di forma assai irregolare.

La presenza dei microvilli nei Cestodi porta ad un considerevole aumento della superficie di contatto con l'ambiente circostante, attraverso la quale — mancando un apparato digerente — vengono incorporate le sostanze alimentari. La presenza di microvilli con caratteri e frequenze sostanzialmente uguali in diversi livelli del parassita, conferma la autonomia relativa delle singole proglottidi anche per quanto si riferisce alla incorporazione di sostanze alimentari.

2) Lo strato che tradizionalmente veniva considerato « cuticola » presenta uno spessore variabile (da circa 1 μ a circa 1,5 μ in *H. nana* e fino a 5 μ circa nel *D. dendriticum*) e si continua mediante numerosi ma esili prolungamenti con cellule situate in uno strato più profondo (ROSARIO, 1962; THREADGOLD, 1962; 1965). Tale strato, che deve essere considerato come un peculiare tipo di espansione del citoplasma delle cellule tegumentali con le quali è connesso, pur essendo in comunicazione con cellule diverse (talora sono anche evidenziabili più connessioni che lo uniscono alla medesima cellula tegumentale sottostante) non presenta traccia di pareti cellulari che

dividano il citoplasma connesso con diversi nuclei. Si deve pertanto concludere che le cellule tegumentali vengono a costituire un unico sincizio anche se appartenenti, nel caso dei Cestodi, a proglottidi diverse. Talora alcune porzioni dello strato tegumentale superficiale appaiono delimitate da una doppia membrana che non è tuttavia interpretabile come una parete di divisione delle cellule tegumentali tra loro; sembra piuttosto trattarsi di parti di altre cellule situate nello strato più profondo, i cui prolungamenti vengono ad affacciarsi sulla superficie esterna del corpo: in corrispondenza di queste porzioni di citoplasma delimitate rispetto al resto del tegumento non si evidenziano microvilli.

3) Nello strato tegumentale superficiale vi sono dei mitocondri e numerose vescicole presumibilmente riferibili a fenomeni di pinocitosi (READ, 1965; ROTHMAN, 1963; THREADGOLD, 1965). In *D. dendriticum* numerose vescicole analoghe si trovano nella parte del citoplasma che circonda il nucleo delle cellule tegumentali. Nello strato superficiale del tegumento non si rinvenivano né nuclei, né membrane endoplasmiche.

4) Lo strato tegumentale superficiale poggia su una membrana basale, al di sotto della quale si rinvenivano fasci muscolari con miofibrille riferibili a due tipi diversi, le une più spesse le altre più sottili. Sia la membrana basale sia lo strato muscolare risultano interrotti a tratti in corrispondenza delle ramificazioni citoplasmatiche che collegano lo strato superficiale del tegumento con la parte nucleata delle cellule, situate in uno strato più profondo (THREADGOLD, 1965). Il nucleo di tali cellule è circondato da uno strato relativamente esile di citoplasma. Queste cellule risultano circondate da numerose ramificazioni citoplasmatiche ricche di granuli di glicogeno e ribosomi, forse in connessione con le cellule del tegumento.

5) La struttura dello strato tegumentale superficiale non presenta differenze sostanziali nei diversi livelli di *H. nana* né in corrispondenza delle diverse parti dei Trematodi esaminati. Lo strato tegumentale superficiale si continua anche in corrispondenza delle ventose pur essendo, in *H. nana*, povero di microvilli e caratterizzato dalla quasi completa assenza dei granuli riferiti a fenomeni di pinocitosi. La superficie del rostro di *H. nana* presenta caratteristiche diverse: al momento attuale non è possibile affermare se si tratti di un tegumento o di una « cuticola » in senso stretto.

Nei Trematodi inoltre, l'epitelio dei ciechi è caratterizzato da numerosi e lunghissimi microvilli (WOTTON & SOGANDARES-BERNAL, 1963) che risultano enormemente sviluppati in *Fasciola hepatica*.

In *D. dendriticum* i nuclei della cellula dell'epitelio intestinale appaiono situati nella parte più vicina alla membrana basale, e talora quasi infossati; attraverso la membrana basale passano ramificazioni del citoplasma delle cellule epiteliali, che si espandono nel parenchima sottostante. Non è stato

possibile evidenziare pareti cellulari che dividono tra loro le cellule dell'epitelio dei ciechi, così che anche in questo caso sembra trattarsi di un sincizio.

Per quanto ci risulta, mancano ricerche dettagliate sulla struttura ultra-microscopica del tegumento e dell'apparato digerente dei Turbellari: le osservazioni sopra riportate, e le altre riferite in letteratura, permettono peraltro di fare alcune considerazioni comparative per quanto si riferisce ai plateminti parassiti.

Per i Cestodi il quadro descritto mostra come la scomparsa dell'apparato digerente è accompagnata da una particolare differenziazione della superficie di rivestimento del corpo. Lo sviluppo dei microvilli ha evidentemente la funzione di aumentare in modo assai considerevole la superficie di assorbimento, e forse permette anche di assicurare una più stretta aderenza dei parassiti alla parete dell'intestino dell'ospite, come del resto era già stato supposto dagli AA. sopra citati. Il meccanismo attraverso il quale le sostanze alimentari vengono incorporate dalle cellule del tegumento sarà oggetto di successive indagini.

Nei Trematodi lo sviluppo dei microvilli al livello dei ciechi mostra che questi svolgono una importante funzione per quanto riguarda l'incorporazione delle sostanze alimentari: questo è del resto confermato dalla possibilità di reperire, con esame di preparati istologici, residui alimentari all'interno dei ciechi stessi. Il fatto peraltro che il tegumento abbia caratteri simili a quello dei Cestodi, permette di presumere che, in questi parassiti, l'incorporazione di sostanze alimentari abbia luogo anche attraverso il tegumento (BJORKMAN & THORSELL, 1964).

Rimane aperto il problema dell'origine embriologica delle cellule del tegumento. Ricerche condotte sistematicamente su proglottidi di *H. nana* di varia età — da quelle più prossimali a quelle più distali — non hanno permesso di chiarire il problema, in quanto la struttura delle cellule tegumentali appare sostanzialmente uguale a tutti i livelli. Il problema — se cioè i nuclei delle cellule del tegumento tendano a migrare verso gli strati più profondi, o se lo strato tegumentale superficiale derivi da estroflessioni di cellule che da uno strato più profondo si espandono verso l'esterno e successivamente si uniscono tra loro per formare un sincizio — potrà forse essere chiarito con ricerche sulla embriologia di questi parassiti.

Gli Autori desiderano ringraziare la prof. D. Steve Bocciarelli e il prof. V. Marinozzi per i suggerimenti dati e la sig.na P. Crateri per l'assistenza tecnica prestata nello svolgimento del lavoro.

Questo lavoro è stato eseguito nel quadro dell'attività svolta dai Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità con l'appoggio del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

31 ottobre 1966.

BIBLIOGRAFIA

- BÉGUIN, F., 1966. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **72**, 30.
- BJORKMAN, N. & W. THORSELL, 1964. *Exptl. Cell. Res.*, **33**, 319.
- CIOFI-LUZZATTO, A., G. FERRETTI & V. MARINOZZI, 1965. *Atti V Congresso Italiano di Microscopia Elettronica*, Bologna, p. 182.
- KARNOVSKY, M. T., 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 729.
- MARINOZZI, V., 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 121.
- PRATT, M. S., 1909. *Am. Naturalist*, **43**, 705.
- READ, C. P., 1955. *Some physiological aspects and consequences of parasitism*. University Press, New Brunswick.
- RICHARDSON, K. C., L. JARETT & E. M. FUIKA, 1960. *Stain Technol.*, **35**, 313.
- ROSARIO, B., 1962. *Fifth Intern. Congr. Electr. Micr.*, Philadelphia, Vol. II, LL 12.
- ROTHMAN, A. H., 1959. *J. Parasitol.*, **45**, 4 (Suppl.), 28.
- ROTHMAN, A. H., 1960. *J. Parasitol.*, **46**, 5 (Suppl.), 10.
- ROTHMAN, A. H., 1963. *Trans. Am. Microscop. Soc.*, **88**, 22.
- THREADGOLD, L. T., 1962. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **103**, 135.
- THREADGOLD, L. T., 1963 a. *Exptl. Cell. Res.*, **30**, 238.
- THREADGOLD, L. T., 1963 b. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **104**, 505.
- THREADGOLD, L. T., 1964. *Third Europ. Reg. Conf. Electr. Micr.*, Praga, vol. B, 563.
- THREADGOLD, L. T., 1965. *Parasitology*, **55**, 467.
- WOTTON, R. M. & F. SOGANDARES-BERNAL, 1963. *Parasitology*, **53**, 157.

Fig. 1. — Schema del tegumento del Cestode *Hymenolepis nana*. A: microvilli; B: strato superficiale del tegumento contenente mitocondri e granuli elettrodensi; C: membrana basale; D: fibre muscolari; E: ramificazioni cellulari contenenti glicogeno e gocce lipidiche (E'); F: cellule tegumentali che presentano numerose ramificazioni del citoplasma: alcune di queste ramificazioni attraversano gli strati muscolari e la membrana basale e si espandono a formare lo strato superficiale del tegumento.

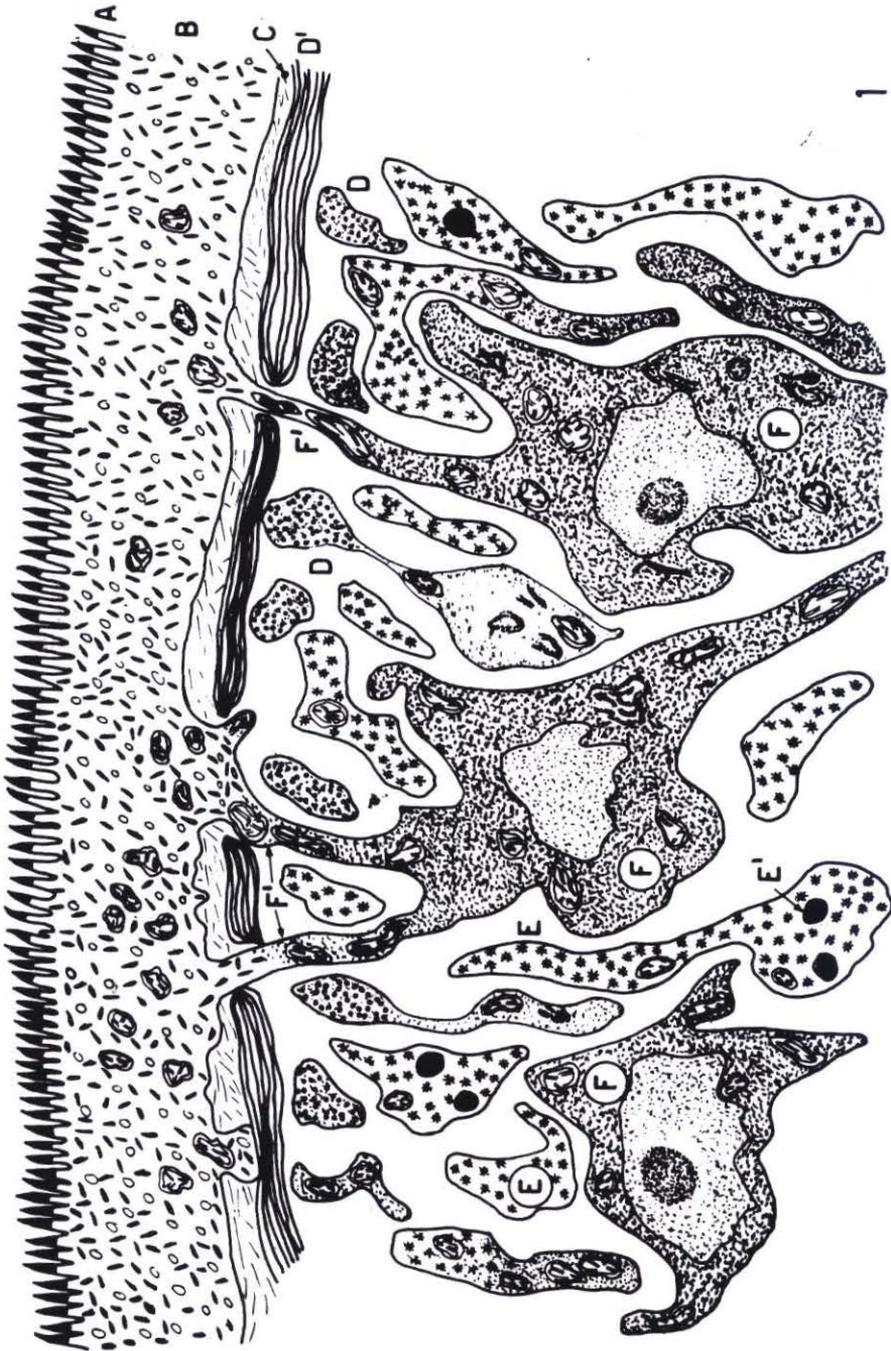


Fig. 2. — Sezione del tegumento del Cestode *H. nana*, fissato in osmio e incluso in araldite. Si può osservare una connessione citoplasmatica che attraversa la membrana basale.

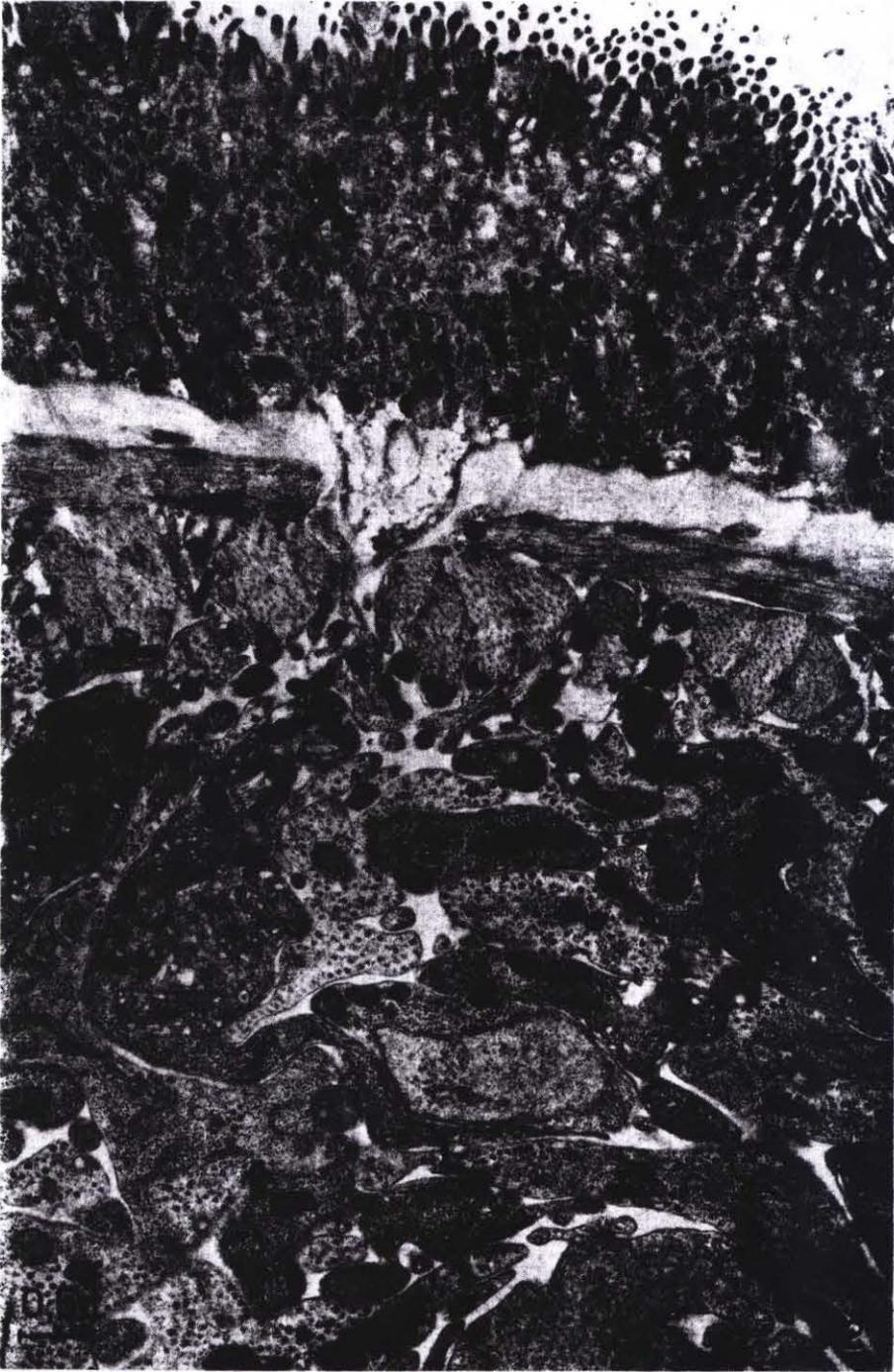


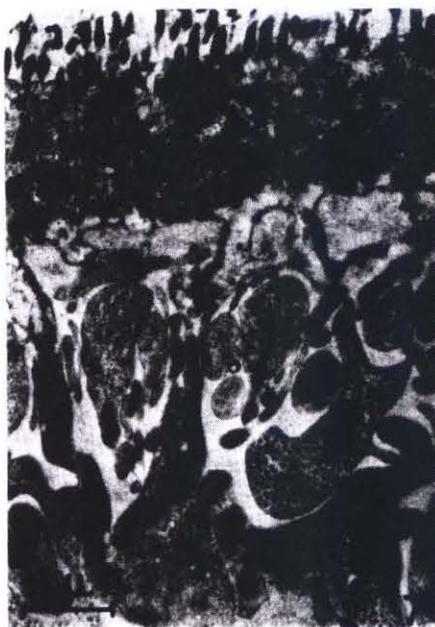
Fig. 3. — *H. nana*. Strato superficiale del tegumento fissato in osmio e incluso in araldite. Sulla superficie esterna si possono osservare i microvilli che presentano una estremità appuntita fortemente elettrondensa. Il setto che separa l'estremità appuntita dalla base del microvillo è, in alcuni casi, nettamente visibile. All'interno dello strato superficiale del tegumento si possono notare mitocondri e granuli elettrondensi.

Fig. 4. — *H. nana*. Sezione trasversa dei microvilli, sempre dopo fissazione in osmio. Si può notare la forma approssimativamente quadrangolare e gli spigoli elettrondensi.

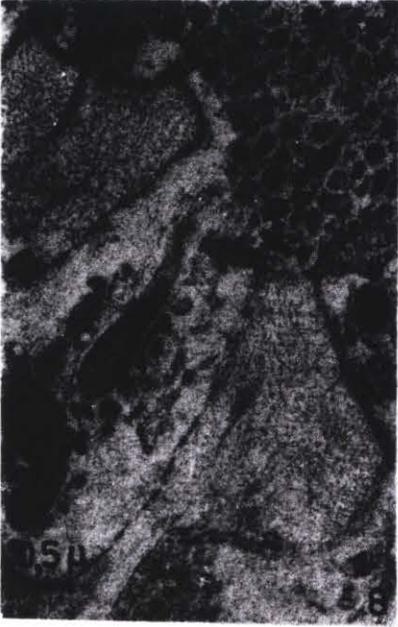


Fig. 5. — *H. nana*. Sezione del tegumento fissato in osmio e incluso in Vestopal. In questo caso si notano delle zone vuote, corrispondenti alle zone che, in altre immagini, erano ricche di glicogeno a rosetta. Sono presenti delle connessioni citoplasmatiche che attraversano la membrana basale e gli strati muscolari.

Fig. 6. - Fig. 7. — *H. nana*. Sezioni in serie del tegumento fissato in osmio e incluso in araldite. Nella Fig. 6 si notano due connessioni citoplasmatiche che dalla parte nucleata delle cellule tegumentali si dirigono verso lo strato superficiale del tegumento, mentre in Fig. 7 si possono osservare le medesime connessioni che, attraversati gli strati muscolari e la membrana basale, si espandono a formare lo strato superficiale del tegumento.



- Fig. 8. — *H. nana*. Altra immagine di una connessione citoplasmatica che sbocca a formare lo strato superficiale del tegumento.
- Fig. 9. — *H. nana*. Strato superficiale del tegumento fissato in permanganato e incluso in araldite. Notare le vescicole vuote, una delle quali è in via di formazione.
- Fig. 10. — *H. nana* (osmio e araldite). Sezione della membrana basale: notare le numerose fibrille disposte in tutte le direzioni.
- Fig. 11. — *H. nana*. (osmio e araldite): notare lo strato di fibre, apparentemente prive della striatura del collagene, che si trovano subito al di sotto della membrana basale.



- Fig. 12. — *H. nana* (permanganato e araldite): in questo caso si può osservare una struttura, circondata da una propria membrana, che attraversa tutto lo spessore dello strato superficiale del tegumento sino a sboccare all'esterno del parassita.
- Fig. 13. — *H. nana* (osmio e araldite): si noti la doppia membrana che circonda una zona dello strato superficiale del tegumento.
- Fig. 14. — *H. nana* (osmio e araldite): si possono osservare le caratteristiche formazioni tondeggianti che paiono formarsi tra un microvillo e l'altro, per poi liberarsi all'esterno del verme.
- Fig. 15. — *H. nana* (osmio e araldite): sezione di una cellula tegumentale delle proglottidi mature, il cui nucleolo presenta le caratteristiche formazioni lineari.

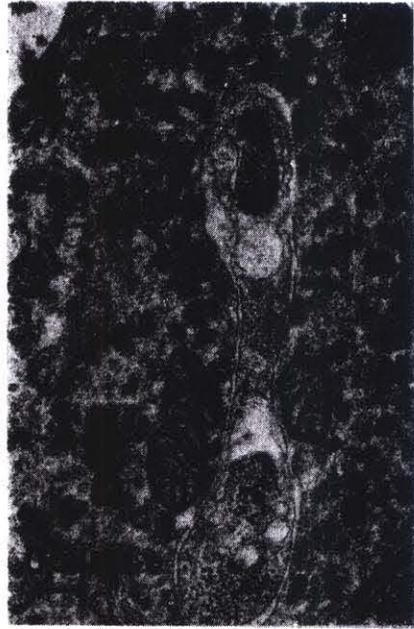
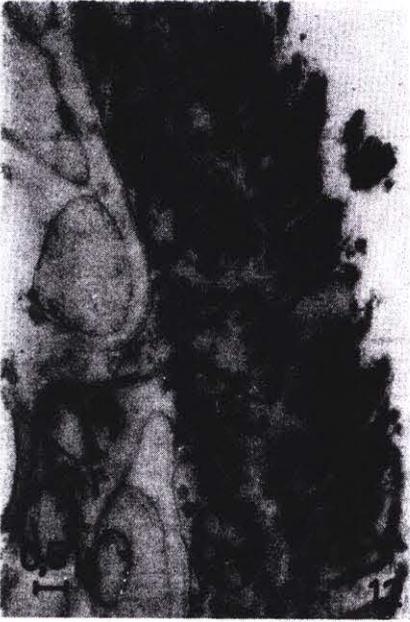
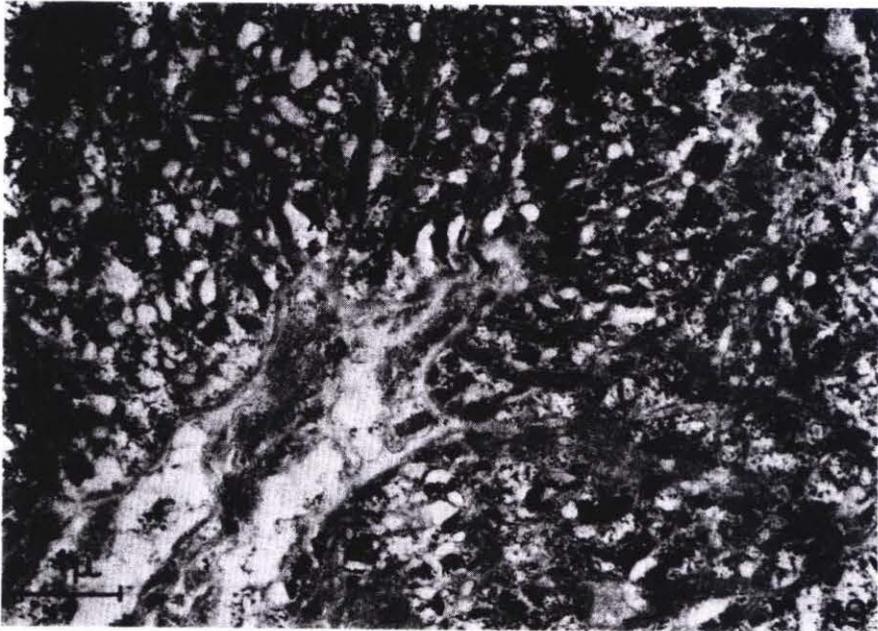
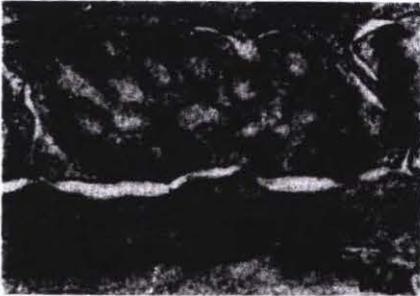
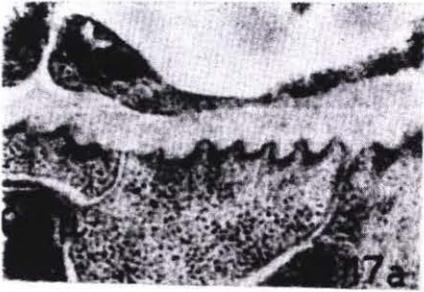


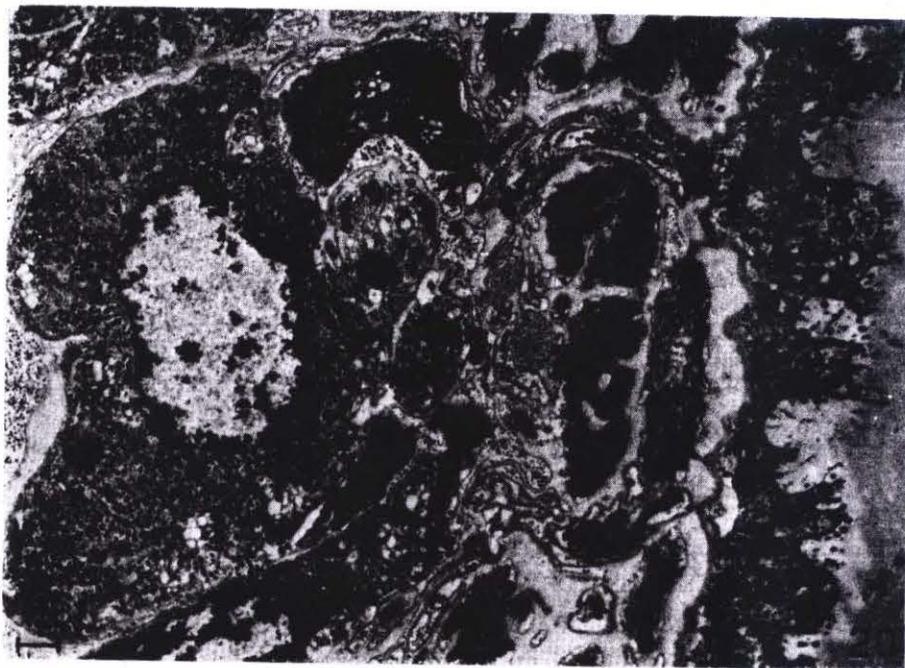
Fig. 16. — *H. nana* (osmio e araldite): sezione di una ventosa. Notare l'aspetto diverso dello strato superficiale del tegumento, e la forte muscolarizzazione della ventosa.



- Fig. 17. — *H. nana* (osmio e araldite): particolare dell'attacco dei muscoli della ventosa direttamente sulla membrana basale, in sezione parallela (*a*) e perpendicolare (*b*) rispetto alle fibre muscolari.
- Fig. 18. — *H. nana* (osmio e araldite): particolare dello strato superficiale del tegumento che ricopre le ventose.
- Fig. 19. — *H. nana* (osmio e araldite): sezione dello strato superficiale e livello del rostro.



- Fig. 20. — *Dicrocoelium dendriticum* fissato in glutaraldeide e osmio e incluso in araldite; sezione del tegumento. Notare il profilo irregolare della superficie del verme, e i granuli elettrondensi presenti sia nello strato superficiale del tegumento che nella parte di citoplasma che circonda il nucleo.
- Fig. 21. — *D. dendriticum*: sezione dello strato superficiale del tegumento. Si può notare una connessione citoplasmatica che attraversa la membrana basale per raggiungere la parte nucleata delle cellule tegumentali.
- Fig. 22. — *D. dendriticum*: sezione dello strato-superficiale del tegumento.



- Fig. 23. — *D. dendriticum*: sezione dell'epitelio intestinale. Si può notare come anche l'epitelio intestinale appaia di natura sinciziale.
- Fig. 24. — *D. dendriticum*: sezione del tegumento al livello della ventosa ventrale.
- Fig. 25. — *D. dendriticum*: particolare di un incluso che si può osservare con una certa frequenza nel citoplasma nelle cellule delle ventose.

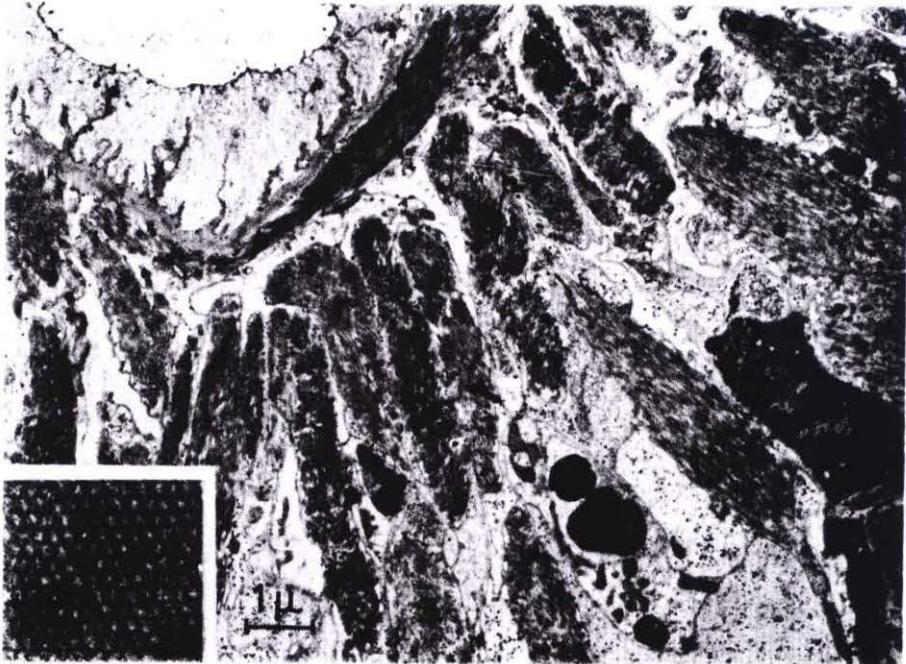
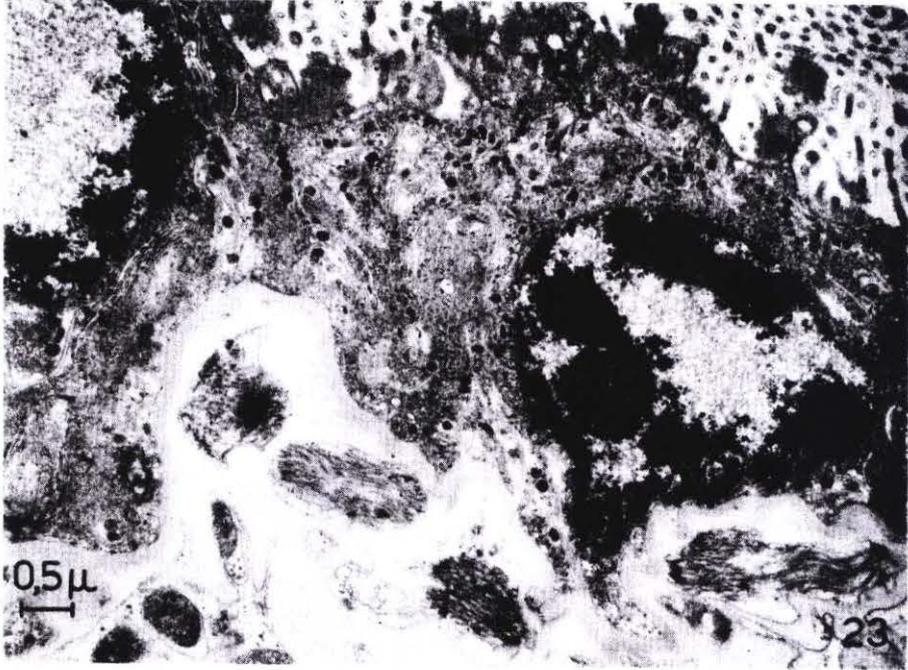


Fig. 26. — *D. dendriticum*: particolare di una cellula di una ventosa.

Fig. 27. — *Fasciola hepatica* fissata in glutaraldeide e osmio e inclusa in araldite: sezione dell'epitelio intestinale. Notare l'enorme quantità ed estensione dei microvilli.

