

Estructura y ultraestructura del tegumento de *Mytilicola intestinalis*, Steuer (Crustacea Copepoda)

POR

M. DURFORT (1)

Mytilicola intestinalis es un copépodo de la familia de los Clausidae que se halla preferentemente parasitando la glándula digestiva de mejillones y ostras, debido a su pigmentación rojiza destaca fácilmente al disociar el hepatopáncreas del huésped. Como la mayoría de los copépodos, *Mytilicola* es unisexual y presenta un cierto dimorfismo que se manifiesta principalmente en el mayor tamaño de las hembras, éstas tienen de 10 a 12 mm. de longitud, mientras que los machos no sobrepasan los 5 mm. de longitud. Así mismo, los ejemplares hembras maduros están dotados de dos sacos ovígeros que cuelgan a ambos lados de la furca caudal.

Hemos hallado dicho copépodo en un 60 a 65 % de los ejemplares de mejillones examinados, siendo mucho más frecuente su presencia en los de vivero que en los de roca. El número de parásitos por huésped varía considerablemente, siendo normalmente de 3 a 5, sin embargo ANDREU (1963) en mejillones de las rías gallegas cita casos en los que ha llegado a encontrar 47 por ejemplar; en estos casos extremos de infestación los mejillones no presentan la masa visceral excesivamente alterada, a pesar de que no sólo se halla parasitada la glándula digestiva, sino también las gónadas.

Tras unas observaciones previas al microscopio óptico y al electrónico hemos considerado interesante hacer un estudio detallado de dicho copépodo (aparato digestivo, reproductor, etc.), dado que es un material fácil de obtener y por las particularidades estructurales que presenta.

Material y métodos

Los ejemplares de *Mytilicola intestinalis* estudiados han sido extraídos de la glándula digestiva de *Mytilus edulis* y se han sometido a distintas técnicas de fijación atendiendo a los posteriores medios de observación a que iban destinados, por lo que describiremos escuetamente las tres modalidades seguidas:

a) Los ejemplares destinados a ser estudiados con el microscopio óptico han sido preferentemente fijados con formol al 6 %, con líquido

(1) Departamento de Morfología Microscópica y Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

de Carnoy (2), con Halmi y con líquido de Pampel (este último muy adecuado para la fijación de estructuras quitinizadas).

Tras una permanencia de 24 horas en los líquidos fijadores se ha procedido a la inclusión en parafina; en algunos casos se ha utilizado el dioxano como agente intermediario de la parafina, en sustitución del cloroformo, a fin de facilitar la penetración del medio de inclusión a través de la cutícula, en otros casos y con la misma finalidad se han dejado los ejemplares previamente fijados en alcohol butílico absoluto durante unas dos semanas consiguiéndose óptimos resultados.

Una vez obtenidos los cortes histológicos se han sometido a las clásicas técnicas de tinción insistiendo en las que ofrecen imágenes panorámicas como los métodos tricrómicos de AZAN, GALLEGO y MALLORY, así como con técnicas específicas, como son el ALCIAL AZUL y el método del PAS (3).

b) Los ejemplares destinados a ser estudiados con el microscopio electrónico han sido sometidos a la doble fijación convencional: glutaraldehído al 3 % tamponado con Sörensen, seguido de una postfijación con tetraóxido de osmio al 1 % igualmente tamponado con Sörensen, el pH en ambas fijaciones ha sido ajustado a 7,2 - 7,4, trabajándose a 4°C.

Después de una lenta y cuidadosa deshidratación, empezando por el alcohol de 30° se llega al alcohol absoluto, haciendo entonces dos lotes de ejemplares, los que debían ser observados con el microscopio electrónico de barrido (b.1) y los que se reservan para ser estudiados con el microscopio electrónico de transmisión (b.2)

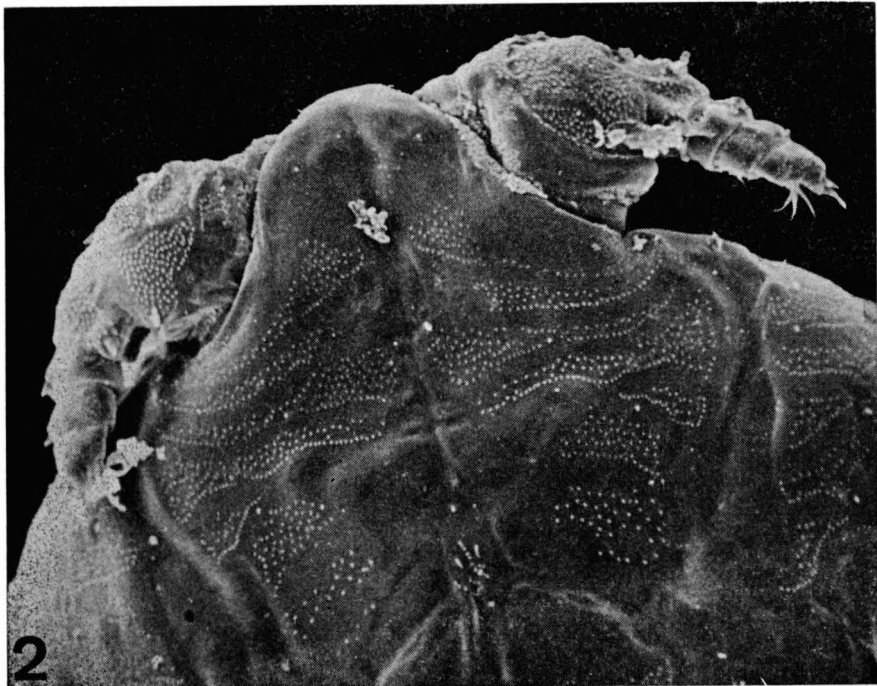
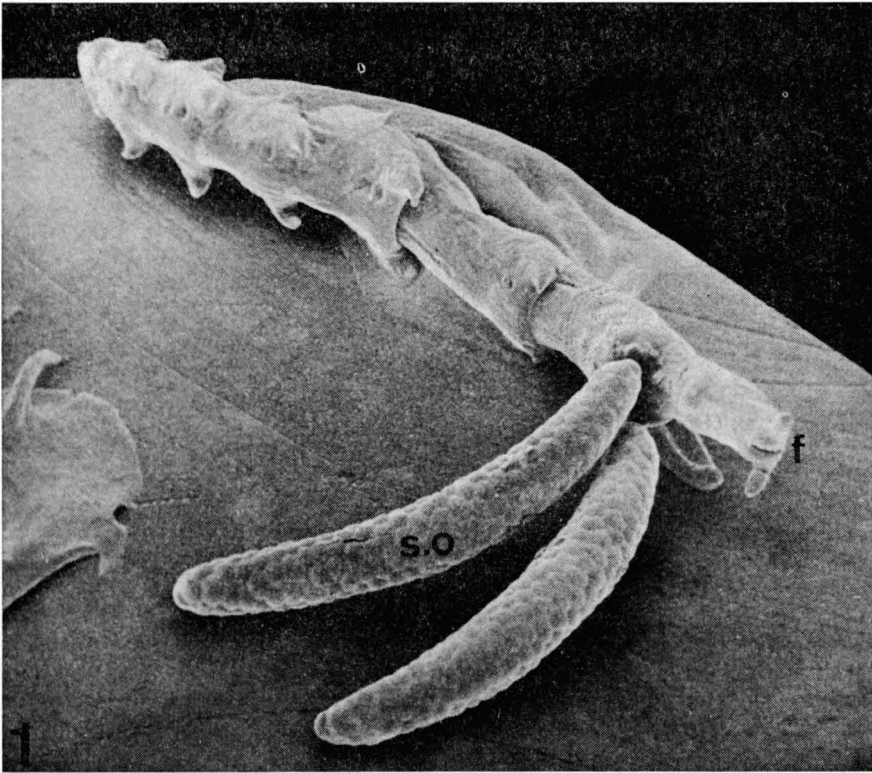
b.1) Cuando los ejemplares han estado sometidos a la acción del alcohol absoluto, se pasa por varias fases de acetato de amilo y alcohol absoluto (1:3., 2:2., 3:1) y finalmente en acetato de amilo puro. A continuación se han sometido a la técnica del punto crítico, para metalizarlos posteriormente con oro. Tras este proceso, muy habitual en estos tipos de observación, el material está preparado para su estudio al microscopio electrónico de barrido. Hemos trabajado con un microscopio Cambridge del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Barcelona.

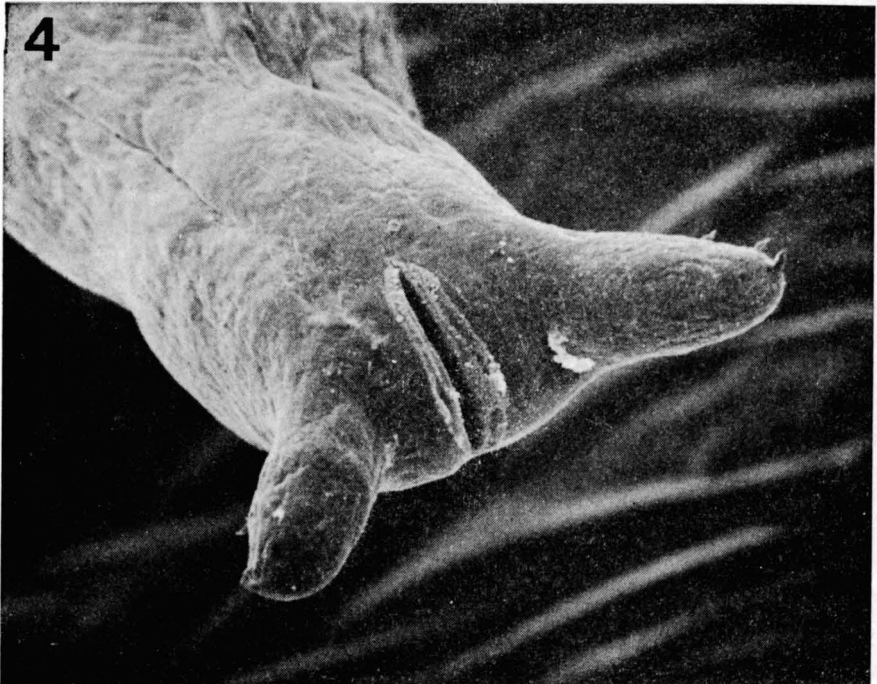
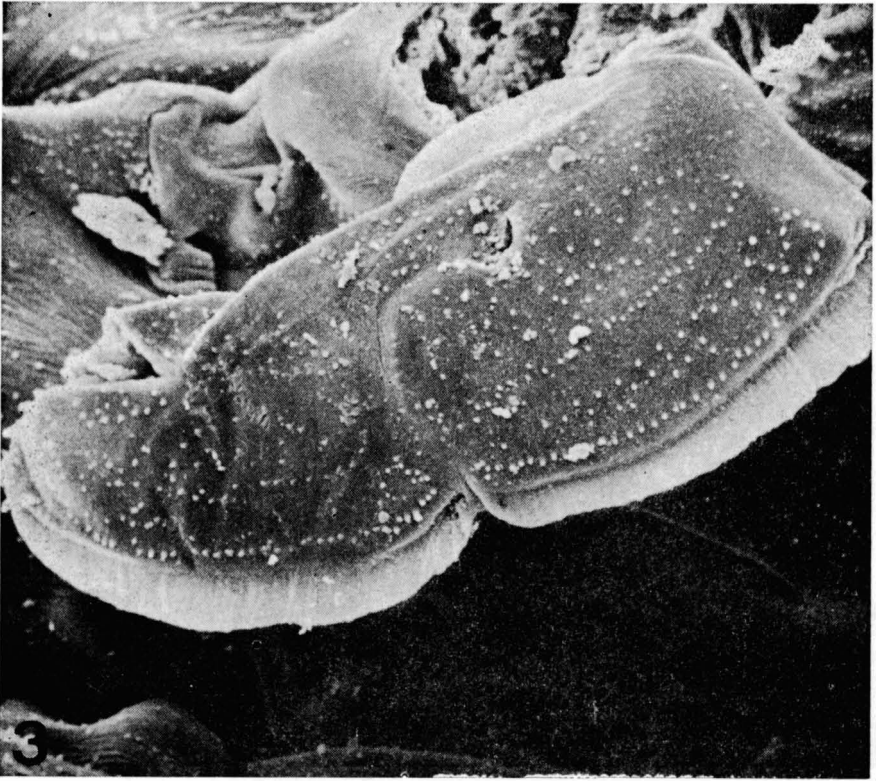
b.2) Después de la deshidratación de los ejemplares hasta el alcohol absoluto, el material se somete a varios pasos de óxido de propileno y alcohol absoluto (1:3., 2:2., 3:1) para pasar finalmente a óxido de propileno puro y proceder seguidamente a la inclusión en plástico, preferentemente hemos incluido en Araldita.

Tras la inclusión se han obtenido cortes ultrafinos, de unos 300 Å de grosor que tras su contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo, se han observado con un microscopio electrónico de transmisión Phillips 200 del Servicio anteriormente citado.

(2) Tras una permanencia de un par de horas en el líquido de Carnoy (alcohol absoluto, cloroformo y ácido acético) los ejemplares pierden totalmente su coloración, habiendo habido una total extracción de pigmentos. Con un espectrofotómetro hemos hallado una gran riqueza en beta carotenos, pero sin lograr especificarlos ya que debe trabajarse con cantidades ingentes de mitilicolas.

(3) De hecho estas técnicas pueden ser aplicadas a cualquier tipo de artrópodo de pequeño tamaño.





Observaciones

Las observaciones efectuadas al microscopio electrónico de barrido nos han proporcionado una gran información sobre la morfología de la cutícula, observándose detalles que por su diminuto tamaño, se escapan del poder de resolución del microscopio óptico. Todo el tegumento está erizado simétricamente de denticulos que tienen de 500 a 1000 milimicras de longitud, ligeramente curvados hacia la parte posterior del cuerpo, por lo que deben intervenir en la adherencia del parásito dentro de los órganos del mejillón.

En algunos ejemplares se ha observado como gran parte de la superficie cuticular está totalmente cubierta de colonias bacterianas, de especies todavía indeterminadas.

Así mismo hemos obtenido interesantes imágenes de las antenas, enormemente simplificadas, de las patas atrofiadas, así como de la furca caudal (Figs. 1, 2, 3 y 4).

COMENTARIO DE LAS FIGURAS

- 1 — Imagen de la cara ventral de *Mytilicola intestinalis*, obtenida con el microscopio electrónico de barrido. Se trata de un ejemplar hembra, obsérvense los sacos ovígeros (sv). (20 x).
- 2 — Detalle de la parte anterior del cefalotórax y de las antenas. Nótese la disposición simétrica de los diminutos denticulos tegumentarios, así como su orientación hacia atrás. (300 x).
- 3 — Detalle de la tercera pata, con un típico aspecto de paleta. (1000 x).
- 4 — Imagen de la furca caudal, en el centro de la que se abre la oblonga abertura cloacal. (250 x).
- 5 — Corte del tegumento de *Mytilicola* observado con el microscopio electrónico de transmisión. Puede apreciarse la epicutícula (ep), la endocutícula (en), la flecha indica la membrana de separación existente entre la endocutícula y las células epiteliales. ER: ergastoplasma, M: mitocondria, g: glucógeno, L: inclusión lipídica. (41000 x).

Las fotografías 1, 2, 3 y 4 han sido obtenidas con un microscopio electrónico de barrido.

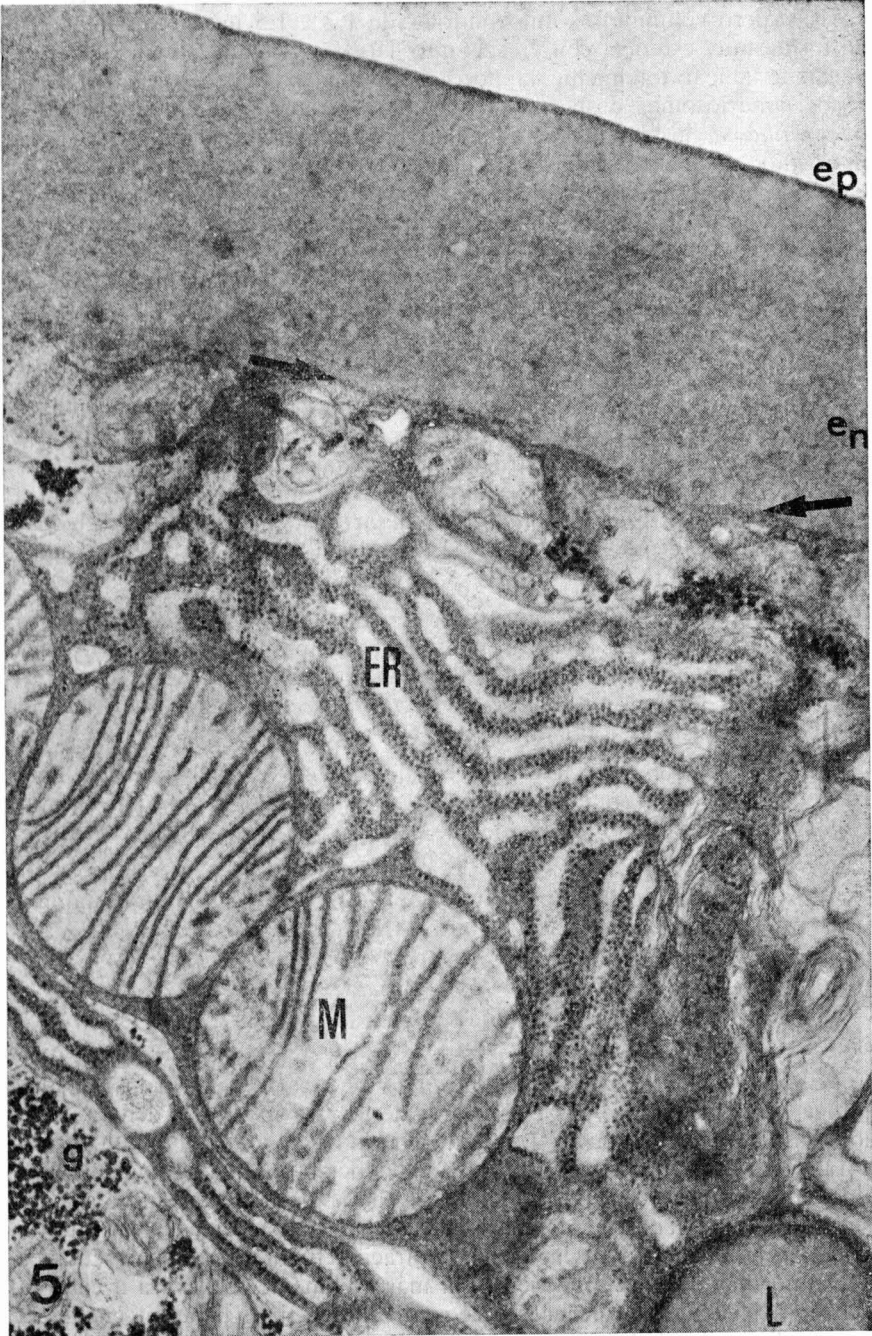
Al microscopio óptico se observa cómo el tegumento está formado por una capa homogénea que corresponde a la cutícula, de unas 1,5 a 2 micras de grosor, que se tiñe intensamente con la mayoría de los colorantes histológicos y en particular con el Orange G, el Alcian azul, dando reacción PAS positiva muy intensa, por lo que su naturaleza quitinosa queda totalmente evidenciada. Esta capa se apoya directamente sobre un epitelio monoestratificado de células cuboideas, que según la orientación del corte pasa desapercibida, viéndose como la cutícula está aparentemente en contacto con la musculatura estriada de la pared del cuerpo.

Al microscopio electrónico de transmisión puede observarse como la homogeneidad de la cutícula es sólo aparente, ya que puede distinguirse una *epicutícula* que presenta una gran densidad a los electrones y que es muy rica en mucopolisacáridos, teniendo una gran afinidad para el rojo de rutenio utilizado en el contrastado de los cortes ultrafinos. El grosor de esta epicutícula es de unas 20 a 30 milimicras, siendo un grosor muy constante, incluso en las zonas en que el tegumento presenta una formación denticular.

Viene una capa a continuación que corresponde a la *endocutícula* que tiene de 1,2 a 1,8 micras de grosor y está formada por un material granuloso-fibroso, que aunque tiene cierta afinidad para el rojo de rutenio, queda mucho menos contrastada que la epicutícula, siendo menos densa a los electrones (Fig. 5).

Esta endocutícula se apoya directamente sobre una lámina constituida por dos capas densas a los electrones de un grosor total de unos 100 Å.

Una o dos capas de células epiteliales, cúbicas y con núcleo prominente se hallan en la base de la cutícula, separándola de la musculatura adyacente. Entre dichas células epiteliales hemos encontrado contactos del tipo de las interdigitaciones, no habiéndose observado hasta el momento formaciones desmosómicas, como hubiera sido de preveer.



Entre las estructuras citoplasmáticas cabe destacar la presencia de escasas, pero voluminosas mitocondrias, de 1,2 a 1,5 micras de diámetro, de forma muy esférica, con crestas muy largas y bastante abundantes que llegan a tabicar totalmente la poco densa matriz mitocondrial (Fig. 5). Estos condriosomas destacan de los que se encuentran en otros tejidos de *Mytilicola*, justamente en este material se presenta un acusado polimorfismo, siendo frecuente la observación de imágenes anómalas, alteración que atribuimos lógicamente al régimen de vida parasitario del copépodo y a la anoxia a que están sometidos la mayoría de los tejidos. Sin embargo las mitocondrias del epitelio tegumentario son las más «normales», en el sentido que no hemos hallado en ellas figuras de involución de las membranas de la pared mitocondrial, hinchamiento de las mismas, bifurcaciones, etc., como se han hallado en las mitocondrias de otros tejidos (DURFORT, 1974).

El retículo endoplasmático rugoso está muy desarrollado, presentando sáculos muy dilatados, con numerosas ramificaciones y anastomosis, por lo que suponemos que esta estructura interviene activamente en la síntesis del material que constituye la endocutícula. El aparato de Golgi, en las fases estudiadas se presenta muy poco desarrollado, posiblemente su máxima actividad se presente después de cada muda, es un hecho a estudiar más profundamente.

Al igual que en los restantes tipos celulares de *Mytilicola*, gran parte del citoplasma se halla invadido por grandes acúmulos de rosetas de glucógeno. Sabido es que los mejillones tienen una gran riqueza de glucógeno en todos sus tejidos, pues bien, *Mytilicola* posee, haciendo un recuento de tipo morfológico y topográfico, un 75 % más.

El núcleo ocupa una posición basal, presenta una distribución muy homogénea de su cromatina y destaca en general uno o dos grandes nucléolos; no presentando ningún detalle que sobresalga de las características generales de la ultraestructura de los núcleos.

Las células epiteliales se apoyan sobre una bien desarrollada lámina basal, que la separa de la musculatura estriada de la pared del cuerpo.

Resumen y conclusiones

El tegumento de *Mytilicola intestinalis* se presenta enormemente simplificado con respecto a los tegumentos de los artrópodos en general y de los crustáceos en particular (BARBIER, DENNELL, HACKMAN, LOUVET, NEVILLE, etc.). La epicutícula reviste una cutícula formada solamente por uno de los tres estratos habituales: la endocutícula; esta simplificación se debe indudablemente a una adaptación al régimen de vida parasitario, teniendo en cuenta que tienen una respiración fundamentalmente cutánea y cuanto más delgada sea la cutícula más fácilmente se llevará a cabo la difusión del oxígeno, lo cual es de gran interés si se tiene en cuenta la escasa disponibilidad que tienen de él, dentro del hepatopáncreas.

La presencia en las células del epitelio tegumentario de mitocondrias no alteradas confirma el hecho de que en ellas llega bien el oxígeno, mientras que a medida que nos alejamos del tegumento las mitocondrias van presentando formas alteradas, ya que en los tejidos más internos deben crearse condiciones próximas a la anoxia.

Pensamos completar este estudio de la cutícula de *Mytilicola* en ejemplares pertenecientes a distintas fases del crecimiento, ya que los estudiados hasta el momento son ejemplares adultos; pudiendo ser de gran interés la actividad de las células epiteliales en los períodos anteriores y posteriores a la muda.

SUMMARY

Ultrastructural study of the integument of the *Mytilicola intestinalis*, parasitic copepod of the mussels (*Mytilus edulis*). The cuticle have only one layer: the *endocuticle*, covered for one very thin layer of a dense material to electrons: the *epicuticle*. Study of the structures of the epithelial cells.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREU, B. — 1963. "Propagación del copépodo parásito *Mytilicola intestinalis* en el mejillón cultivado de las rías gallegas (NW de España)". *Investigación Pesquera.*, T. 24, 3-20.
- BARBIER, R. — 1968. "Etude expérimentale et observations, au microscope électronique du dépôt de l'endocuticule et de l'exocuticule chez la larve de *Galleria mellonella*, L. (Lépidoptere Pyralidae)". *Comp. Rend. Acad. Sc. Paris.*, T. 266, 1613-1620.
- DENNEL, R. — 1960. Integument and exoskeleton (En The physiology of Crustacea; Vol. 1 Metabolism and growth). *Academic Press*, New York, London.
- DURFORT, M. 1975. — "Dades ultraestructurales de les mitocondries d'un copèpode paràsit del musclo". *Butll. Soc. Catalana de Biologia* I(1), 65-70.
- FILSHIE, B. K. — 1970. "The fine structure and deposition of the larval cuticle of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*)". *Tissue and Cell.*, Vol. 2, 479.
- HACKMAN, R. H. — 1971. The integument of Arthropoda. *Chemical Zoology*, Vol. VI, part. B. *Academic Press*.
- LOUVET, J. P. — 1975. "Premières observations sur l'ultrastructure du pleuropode chez le criquet migrateur". *Comp. Rend. Acad. Sc. Paris*, T. 280, 1301-1304.
- NEVILLE, A. C. — Biology of the Artropod cuticle. Springer-Verlag, Berlin, 1975.