

MICROANÁLISIS DE LAS CONCRECIONES INTESTINALES DE *CYCLOPS STRENUUS* FISCH. (CRUSTACEA, COPEPODA). ESTUDIO PRELIMINAR

M. DURFORT

Durfort, M., 1980 (1982). Microanálisis de las concreciones intestinales de *Cyclops strenuus* Fisch. (Crustacea, Copepoda). Estudio preliminar. *Misc. Zool.* 6: 27-32. Barcelona.

The Qualitative and Quantitative Electron Probe Microanalysis on spherulites found in type B cells of the intestinal epithelium *Cyclops strenuus* revealed the presence of magnesium, potassium and calcium phosphates in the concentrically laminated concretions.

M. Durfort, Dpto. de Morfología Microscópica, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Los esferocristales o concreciones¹ halladas en determinadas células del tubo digestivo, en las células bioacumuladoras de calcio del hepatopáncreas de Moluscos y Crustáceos y en las células de los tubos de Malpighi de numerosas especies de artrópodos, pueden tener un significado que a grandes rasgos se resumen en dos:

a. Significado de reserva, para la consolidación de la concha o del tegumento en las fases preexuviales y durante el crecimiento, DRACH (1937), RENAUD (1949), HUSON (1952), CHAISEMARTIN (1967), NATH (1972), DURFORT (1981).

b. Significado osmoregulador (excretor). Tienen este carácter, entre otras, las formaciones descritas por MEYER (1957), RAZET (1960), GOURANTON (1968), GRAF (1966, 1969), LHONORÉ (1971), HUMBERT (1971), WAKU & col. (1971), en células de los tubos de Malpighi de insectos y en células de los ciegos intestinales de crustáceos, principalmente Amfípodos.

1. Diversos son los nombres hallados en la bibliografía para denominar formaciones intracitoplasmáticas laminares concéntricas, morfológicamente similares a las que describimos en la presente nota. Entre ellos caben destacar: esferitos (GOURANTON, 1968; ABOLINS-KROGIS, 1970; JEANTET, 1971), esferas laminares (WIGGLESWORTH, 1965), litosomas (ANDRÉ & FAURÉ-FREMIET,

Ocasionalmente se han descrito esferocristales en células del cuerpo graso de insectos (LHONORÉ, 1977), así como en oocitos de Miriápodos (PETIT, 1970), de insectos (CANTACUZÈNE & MARTOJA, 1968) y de Crustáceos (ZERBIB, 1980). En este último tipo celular su significación es altamente dudosa si bien no se excluye un papel en la regulación de las síntesis de vitelogenina y su posterior participación en la vitelogénesis (DURFORT, 1981).

El aspecto ultraestructural de dichas concreciones es en todos los casos muy parecido, una zonación concéntrica de capas de distinta densidad a los electrones, dispuestas alrededor de una masa central o núcleo de material granuloso-fibroso, de extensión y densidad variable.

El origen de los litosomas, es decir de las vesículas en cuyo interior se ubicarán las concreciones es muy variable, incluso en una misma especie pueden darse distintos orígenes (DURFORT, 1982). Se han descrito esferocristales de origen golgiano, como los hallados por ABOLINS-KROGIS (1970) en Mo-

1967), globoides (MELLO & BOZZO, 1969), esférulas (LAVALLARD, 1967), esferocristales (BALLAN-DUFRAŒAIS, 1972), calcosferitos (WAKU & SUMIMOTO, 1972), esferitos (GOURANTON, 1968; ABOLINS-KROGIS, 1970; JEANTET, 1971), concreciones laminares (TURBECK, 1974).

lucos y por SOHAL (1977) en Dípteros. BARGMANN & col. (1960), WIGGLESWORTH & col. (1962), HUMBERT (1978) encuentran en diversos grupos de la escala zoológica, el origen de estas formaciones en los condriosomas.

En otras ocasiones provienen de grandes dilataciones adoptadas por el retículo endoplasmático en sus dos modalidades (ANDRÉ & col., 1967; FAURÉ-FRÉMIET & col., 1968; BALLAN-DUFRAŒAIS, 1972); HUMBERT, 1973; LAUGA-REYREL, 1979; DURFORT, 1981) o bien se forman a partir de los lisosomas (GOURANTON, 1968; JEANTET & col., 1980; DURFORT, 1982).

Concreciones o esferocristales se originan en ocasiones a expensas de vesículas de origen altamente dudoso (LHONORÉ, 1977; WOODING & col., 1978).

En la presente nota se describe la metodología empleada para efectuar el microanálisis de las concreciones halladas en las células de tipo B del tracto digestivo medio y posterior de *Cyclops strenuus* y se presentan los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares adultos de *Cyclops strenuus* recolectados en el lago de Banyoles (Girona), durante los meses de julio y octubre, fueron fijados preferentemente con glutaraldehído-paraformaldehído al 3,5%, convenientemente tamponado con cacodilato sódico o con Sørensen a pH 7,2-7,3, durante 2 horas a 4°C. Después de un lavado con tampón se procedió a la postfijación con tetraóxido de osmio al 1% igualmente tamponado, durante 1 h. 30 min. a 4°C. Tras un lavado con la solución tampón y cuidadosa deshidratación con una serie ascendente de etanol o acetona se procedió a la inclusión de los ejemplares con Spurr (plástico de escasa viscosidad), con Araldita o con Araldita-Epon.

Los cortes ultrafinos obtenidos con un ultramicrotomo Reichert OMU fueron convenientemente contrastados con acetato de uranilo en solución acuosa al 2% y con citra-

to de plomo, preparado según la técnica de Reynolds, previa observación con un microscopio electrónico de transmisión Philips 200 del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Barcelona.

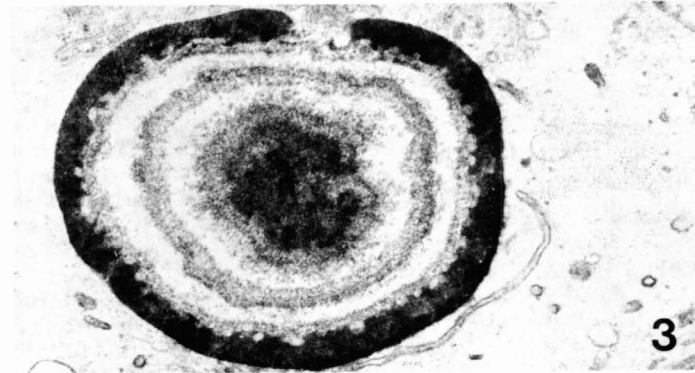
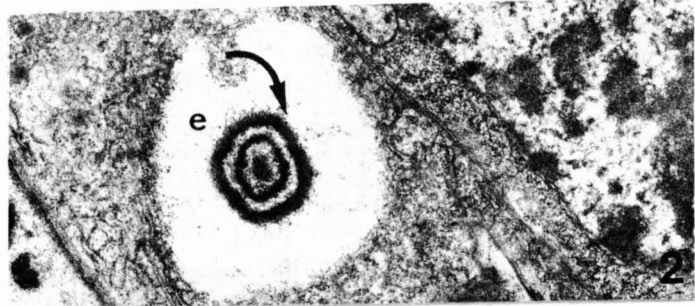
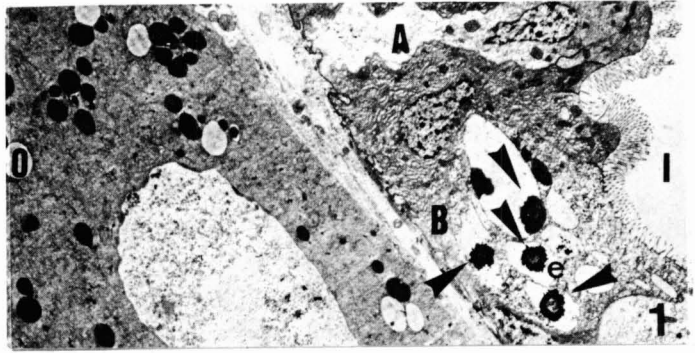
Cortes de unos 3 a 5 µm de grosor, montados sobre rejilla de cobre, con o sin película de formvar, fueron metalizados durante 3 minutos con oro. Siendo estos cortes observados con un microscopio electrónico de barrido Philips 500, portador de un equipo de microanálisis por difracción de rayos X, EDAX, modelo 711, perteneciente al Departamento de Metalurgia de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona.

Cabe subrayar que la propia naturaleza de las concreciones, su dureza y por consiguiente su fragilidad, determina que éste sea un material difícil de cortar, por lo que en múltiples ocasiones, al pasar el bloque por el filo de la cuchilla de vidrio, ésta arranca los esferocristales, quedando un agujero en el sitio previamente ocupado por la concreción.

Para evitar justamente la pérdida de concreciones se procedió a metalizar "in toto" el bloque, convenientemente piramidado y desbastado hasta llegar a una zona, que previo estudio de cortes semifinos, se tuviera la certeza de tener células B cargadas de concreciones. Los resultados obtenidos con este procedimiento no fueron excesivamente satisfactorios por lo que se ha seleccionado como más adecuada la observación de los cortes semifinos para efectuar el microanálisis en cuestión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concreciones presentes en las células de tipo del tramo medio y posterior del intestino de *Cyclops strenuus* (figs. 1, 2 y 3) tienen de 2 a 4 µm de diámetro y su origen se halla en la mielinización adoptada por el retículo endoplasmático liso, el cual proviene del ergastoplasma, por pérdida de ribosomas (DURFORT, 1981). El microanálisis ofrece los resultados que aparecen en la tabla 1.



Figs. 1-3. 1. Imagen ultraestructural del intestino medio de *Cyclops strenuus*, en la que se aprecian los dos tipos de células: A y B. Las flechas señalan esferocristales (e) en formación. Nótese la proximidad de un oocito (O). 2.280 x; 2. Detalle de un esferocristal intestinal en formación 5.600 x; 3. Concreción o esferocristal ya bien consolidado. Nótese la zonación concéntrica, alrededor de un núcleo (n) de gran densidad a los electrones 22.000 x.

Para una interpretación correcta de los resultados deberíamos disponer del análisis de mayor número de concreciones, pertenecientes a una muestra más amplia de ejemplares de una misma población, a la vez que estos ejemplares deberían proceder de recolecciones llevadas a cabo en distintas épocas, dado que existe en el agua una considerable fluctuación de iones estacional, más o menos importante según las características del lago. Al respecto cabe recordar que el lago de Banyoles es alcalino, rico en sulfatos, princi-

palmente magnésicos, con un pH de 7,2 a 7,6 (PLANAS, 1973).

Por todo ello, los datos aportados deben considerarse como un avance previo de un estudio más exhaustivo, que se tiene pensado llevar a cabo no solamente en distintas especies de Copépodos libres y parásitos, sino también en Decápodos recolectados en hábitats de distinta salinidad.

Tras el estudio de estos datos preliminares podemos considerar que las sales predominantes de las concreciones analizadas son

Tabla 1. Cada columna corresponde al análisis de una área de 15 μm tras una exposición de 100 segundos trabajando a 25 KV. Cabe señalar que el cobre que se registra procede de la rejilla sobre la que están depositados los cortes.

CALCIO	4.751 %	5.629 %	5.302 %
COBRE	34.935 %	28.290 %	29.482 %
FOSFORO	45.417 %	47.880 %	46.820 %
HIERRO	1.068 %	1.458 %	1.316 %
MAGNESIO	8.466 %	9.795 %	9.208 %
POTASIO	5.417 %	6.215 %	6.124 %
SODIO	0.555 %	0.631 %	0.598 %

fosfatos, principalmente magnésicos, potásicos y cálcicos. Lo cual no concuerda con nuestra inicial interpretación, en la que suponíamos una naturaleza eminentemente calcárea.

Cabe señalar que el análisis o diagnóstico citoquímico es altamente difícil dado que los mucopolisacáridos que constituyen la matriz orgánica de la concreción enmascaran considerablemente la parte inorgánica de la misma, por lo que el presentar negativa una u otra reacción no permite desechar ninguna de las restantes posibilidades. Es por ello que consideramos interesante insistir en el análisis por difracción de rayos X para estudiar las variaciones cualitativas y cuantitativas de los iones presentes en las concreciones de *Cyclops strenuus*, comparándolos con los que se hallan a nivel del tegumento.

BIBLIOGRAFIA

- ABOLINS-KROGIS, A., 1970. Electron Microscope Studies of the Intracellular Origin and Formation of Calcifying Granules and Calcium Spherites in the Hepatopancreas of the Snail, *Helix pomatia*, L. *Z. Zellforsch.*, 108: 501-515.
- ANDRÉ, J. & FAURÉ-FREMIET, E., 1967. Formation et structure des concrétions calcaires chez *Prorodon morgani*, Kahl. *J. Microscopie.*, 6: 391-398.
- BALLAN-DUFRAŃAIS, Ch., 1972. Ultrastructure de l'iléon de *Blatella germanica*. Localisation, genèse et composition des concrétions minérales intra-cytoplasmiques. *Z. Zellforsch.*, 133: 163-179.
- BALLAN-DUFRAŃAIS, C., JEANTET, A. Y. & MARTOJA, R., 1971. Composition ionique et signification physiologique des accumulations minérales de l'intestin moyen des Insectes. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 273: 173-176.
- BARGMANN, W. & KNOOP, A., 1960. Vakuolenbildung und Mitochondrien. *Z. Zellforsch.* 51: 456-462.
- CANTACUZÈNE, A.M. & MARTOJA, R., 1968. Origine des urates de l'ovocyte des zygenes (Lepidoptères) et évolution de ces composés au cours du développement embryonnaire. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 10: 455-462.
- CHAISEMARTIN, C., 1967. Contribution à l'étude de l'économie calcique chez les Astacidae. Influence du milieu de vie. *Thèse Doctorale Scien. Nat. Poitiers.*
- DRACH, P., 1937. L'origine du calcaire dans le squelette tégumentaire des Crustacés Décapodes. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 205: 1441-1443.
- DRACH, P. & LAFON, M., 1942. Etudes biochimiques sur le squelette tégumentaire des Décapodes Brachyours. Variations au cours du cycle d'intermue. *Arch. Zool. Expér. gén. Fr.*, 82: 100-118.
- DURFORT, M., 1981. Mineral concretions on the intestinal epithelium of *Cyclops strenuus*, Fisch (Crustacea, Copepoda). Ultrastructural study. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.* 47 (Sec. Zool., 4): 93-103.
- 1982. Las concreciones minerales del hepatopáncreas de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusca, Poliplacophora). Estudio ultraestructural. *Iberus*, 2: 1-17.
- FAURÉ-FREMIET, E., ANDRÉ, J. & GARNIER, M.C., 1968. Calcification tégumentaire chez les Ciliés du genre *Coleps* Nitzsch. *J. Microscopie.* 7: 693-704.
- GOURANTON, J., 1968. Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des Homoptères Cercopides. *J. Cell. Biol.*, 37: 316-328.
- GRAF, F., 1966. Preuve expérimentale de la sécrétion de concrétions calcaires et de leur dissolution par les caecums postérieurs d'*Orchestia* (Crustacé, Amphipode). Hypothèse de réabsorption. *C.R. Acad. Sc. Paris.* 263: 173-176.
- 1969. Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodés *Orchestia* (Talitridé) et *Niphargus* (Gammaridé hypogé). *Thèse Doctorale Sciences Nat.* Dijon. 1-216.
- HUMBERT, W., 1974. Localisation, structure et

- genèse des concrétions minérales dans le mésenteron des Collemboles Tomoceridae (Insecta, Collembola). *Z. Morphol. Tiere*, 78: 93-109.
- 1977. The mineral concretions in the midgut of *Tomocerus minor* (Collembola): microprobe analysis and physioecological significance. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 14 (1): 71-80.
- 1978. Cytochemistry and X-Ray Microprobe Analysis of the Midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta, Collembola) with Special Reference to the Physiological Significance of the Mineral Concretions. *Cell. Tiss. Res.*, 187: 396-416.
- 1978. Intracellular and intramitochondrial binding of lanthanum in dark degenerating Midgut cells of a collembolan (Insect). *Histochemistry*, 59: 117-128.
- HUSSON, R., 1952. A propos du rôle des gastrolithes chez les Ecrevisses. *C.R. Acad. Sc. Fr.*, 235: 905-907.
- JEANTET, A.Y., 1971. Recherches histophysiologiques sur le développement post-embryonnaire et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). *Z. Zellforsch.*, 116: 405-424.
- JEANTET, A. Y., BALLANT-DUFRAÎÇAIS, Ch, & RUSTE, J., 1980. Quantitative Electron Probe Microanalysis on Insect Exposed to Mercury. II. Involvement of the Lysosomal System in Detoxication Processes. *Biol. Cellulaire*. 39: 325-334.
- JEANTET, A. Y., MARTOJA, R. & TRUCHET, M., 1974. Rôle des sphérocristaux de l'épithélium intestinal dans la résistance d'un Insecte aux pollutions minérales. Données expérimentales obtenues par utilisation de la microsonde électronique et du microanalyseur par émission ionique secondaire. *C.R. Acad. Sc. Paris*. 278: 1411-1444.
- LAUGA-REYREL, F., 1980. Analyse ultrasturale des modifications mésentériques liées à l'écomorphose chez *Hypogastrura tullbergi* (Collembola). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 291: 145-348.
- LAVALLARD, R., 1966. Ultrastructure des cellules prismatiques de l'épithélium intestinal de *Peripatus acacioi* Marcus et Marcus. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 264: 929-932.
- LHONORÉ, J., 1971. Données cytophysiologiques sur les tubes de Malpighi de *Gryllotalpa gryllotalpa* Latr. (Orthoptère Gryllotalpidé). *C.R. Acad. Sc. Paris*. 272: 2788-2791.
- 1973. Application conjointe des méthodes morphologiques, cytochimiques et d'analyse par spectrographie des rayons X à l'étude de l'appareil excréteur de *Gryllotalpa gryllotalpa* Latr. (Orthoptère Gryllotalpidae). *Arch. Zool. exp. gén.*, 114: 439-474.
- 1976. Données morphologiques et histochimiques sur les tubes de Malpighi des imagos de *Pieris brassicae* L. (Lépidoptère). *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 18 (3): 275-293.
- 1977. Données histophysiologiques sur les accumulations minérales et puriques au cours du développement post-embryonnaire de *Pieris brassicae* L. (Lépidoptère). *La Cellule*, 72 (1-2): 29-54.
- MELLO, M.L.S. & BOZZO, L., 1969. Histochemistry, refractometry and fine structure of excretory globules in larval Malpighian tubes of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apoidea). *Protoplasma*, 68: 241-251.
- MEYER, G.S., 1957. Elektronenmikroskopische untersuchungen an den Malpighi-Gefässen verschiedener insekten. *Z. Zellforsch.*, 47: 18-28.
- NATH, C.M., 1972. On the storage of calcium in *Spelaemyosis*, a subterranean mysid. *Crustaceana*, suppl 3: 351-353.
- PETIT, J., 1970. Sur la nature et l'accumulation de substances minérales dans les ovocytes de *Polydeamus complanatus* (L.). (Myriapode, Diplopode). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 270: 2107-2110.
- PLANAS, M.D., 1973. Composición, ciclo y productividad del fitoplancton del lago de Bañolas. *Oecologia*, 1: 3-106.
- RAZET, P., 1961. Recherches sur l'Uricolyse chez les Insectes. *Thèse Doctorale Sc. Nat.* Rennes.
- RENAUD, L., 1949. Le cycle de reserves organiques chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Oceanogr. Monaco*, 24: 259-357.
- RONDELAUD, D., CHAISEMARTIN, C. & BARTHE, D., 1976. Données histologiques et histo-chimiques sur le transfert de deux métaux (Fe Cu) chez *Lymnaea* (Galba) *truncatula* Muller (Mollusques, Gastéropodes Pulmonés). *Annls. Limnol.*, 12: 269-281.
- SOHAL, R.S., PETERS, P.D. & HALL, T.A., 1977. Origin, structure, composition and age-dependence of mineralized dense dobies (concretions) i the midgut epithelium of the adult mousefly, *Musca domestica*. *Tissue & Cell*, 9: 87-102.
- TURBECK, B.O., 1974. A study of the concentrically laminated concretions "spherites" in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae. *Tissue & Cell*, 6: 627-640.
- WAKU Y. & SUMIMOTO, K., 1972. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium deposits in the cytoplasm. I. Light microscopy. *Tissue & Cell*, 3: 127-136.
- 1975. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salts deposits in the cytoplasm. Electron microscopy. *Tissue & Cell*, 6 (1): 127-136.
- WIGGLESWOTH, V.B., 1965. The Principles of Insect Physiologi. 6 th. ed. *Methuen*, London.
- WIGGLESWORTH, V.B. & SALPETER, M.M., 1962. Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). *J. Insect. Physiol.*, 8: 299-307.

WOODING, F.B.P. & MORGAN, G., 1978. Calcium Localization in Lactating Rabbit Mammary Secretory Cells. *J. Ultrastr. Res.*, 63: 323-333.

ZERBIB, Ch., 1980. Ultrastructural observation of Oogenesis in the Crustacea Amphipoda *Orchestia gammarellus* (Pallas). *Tissue & Cell*, 12 (1): 47-62.