

ORIGEN DE LAS CONCRECIONES MINERALES EN LAS CÉLULAS INTESTINALES DE COPÉPODOS PARÁSITOS. ESTUDIO MICROANÁLITICO Y ULTRAESTRUCTURAL

M. POQUET

Poquet, M., 1986. Origen de las concreciones minerales intestinales de copépodos parásitos. Estudio microanalítico y ultraestructural. *Misc. Zool.*, 10: 121-128.

Origin of the mineral concretions of the midgut cells of parasitic copepods. A microanalytic and ultrastructural study.— A certain cell type exists in the midgut of parasitic copepods denominated the vacuolated cells, characterized by a reduction in the microvilli. The vacuoles of the apical area are extremely polymorphic and numerous intracytoplasmic mineral concretions are observed as being part of them. The vesicles of the rough endoplasmic reticulum and occasionally the mitochondria and the Golgi complex constitutes the organic matrix of the spherocrystals. The elemental composition of the mineral concretions in their stage of maximum consolidation was studied using the energy-dispersive X-ray microanalysis techniques. The most abundant constituent elements observed were Ca, Mg, Na, P, Fe and Zn. The interrelationship between the spherocrystals and the vacuoles is discussed in this paper as is their possible functional significance. It may consist of a pathway to element storage for those elements which, like calcium, contribute to the formation of the new cuticle. On the other hand, it may have a strictly excretory significance, through inactivation of the different mineral elements whilst within the interior of these intestinal cells.

Key words: Ultrastructure, Microanalysis, Concretions, Midgut, Parasitic copepoda.

(Rebut: 7-1-86)

M. Poquet, Unitat 1 Biologia celular, Dept. de Bioquímica i Fisiologia, Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona, Avda. Diagonal 637-647, 08028 Barcelona, Espanya.

INTRODUCCIÓN

La pared del mesénteron de copépodos libres y parásitos está constituida por un epitelio cuyos elementos celulares llevan a cabo la absorción de nutrientes y síntesis de distintos enzimas. Un tipo de células muy especializadas, las células vacuoladas, se hallan de forma constante en el intestino de copépodos. Morfológicamente pueden asimilarse a las células B ("blisted cells") del hepatopáncreas de crustáceos decápodos (STANIER et al., 1968). Debido a la ausencia de glándulas digestivas en los copépodos, dichas células asumen una función similar a la que realizan en hepatopáncreas de crustáceos: digestión intracelular y eliminación de cuerpos residuales mediante procesos de secreción de naturaleza holocrina o macroapocrina (DURFORT, 1980; AR-

NAUD et al., 1980; POQUET, 1980).

En este tipo de células vacuoladas tienen lugar procesos de inactivación de sales minerales por acumulación y aislamiento de distintos tipos de iones, constituyendo concreciones minerales intracitoplasmáticas de número y morfología variable. De forma generalizada, este proceso de bioacumulación tiene lugar en distintos grupos de invertebrados, a nivel de células especializadas de los epitelios de revestimiento de las vías digestivas, si bien adoptan distintas características ultraestructurales y significados funcionales (GOURANTON, 1968; ABOLINS-KROGIS, 1970; GRAF & MICHAUT, 1980; HUMBERT, 1978; DURFORT, 1981; POQUET, (1982).

En el presente trabajo pretendemos profundizar en el significado funcional de las concreciones minerales de copépodos parási-

tos, a partir del análisis de su composición elemental y del estudio detallado de las distintas fases de precipitación del componente mineral en la materia orgánica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares estudiados son hembras adultas pertenecientes a la especie *Lernanthropus kroyerii* Van Beneden, que se halla en régimen parasitario en las branquias de la lubina. Los ejemplares proceden de Tossa de Mar (Prov. de Gerona) y su tasa de infección es del orden de un 60%.

Microscopía electrónica de transmisión

La fijación de los ejemplares, enteros o fragmentados, se ha realizado siguiendo la técnica de la doble fijación con paraformaldehído (2%) y glutaraldehído (2,5%) tamponados con Sörensen manteniendo un pH de 7,3 y realizando una posterior fijación con tetróxido de osmio (1,5%). Después de una deshidratación en concentraciones crecientes de acetona, se ha procedido a la inclusión de la muestra en resina tipo SPURR que presenta el grado de viscosidad y penetrabilidad adecuadas para la textura del material. Los cortes ultrafinos han sido contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963). Las observaciones se han efectuado con microscopio electrónico Philips modelos EM200 y EM301 del Servicio de Microscopía de la Universidad de Barcelona.

Estudio microanalítico

Los ejemplares objeto de esta vía de estudio han sido fijados únicamente mediante los aldehídos mencionados tamponados con Sörensen, con el fin de evitar las interferencias que supone la osmificación en el proceso de análisis cualitativo.

El proceso de detección de los elementos minerales se ha realizado sobre cortes de 3 μm de grosor, del material incluido en Spurr. Se han utilizado "stubs" de grafito y película "Mylar" para sustentar los cortes. Se ha omi-

tido el metalizado con oro, aunque se han recubierto los cortes con carbono. También se ha aplicado el microanálisis a la sección de bloques previamente piramidados, de los que se habían obtenido previamente cortes semifinos de control.

Se han utilizado un microscopio electrónico de barrido Cambridge modelo S-4 y uno de tipo Philips (PSEM-500) que lleva incorporado un sistema de dispersión de rayos X EDAX-ECON Si/Li del Dept. de Metalurgia de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona. En la obtención del espectro de energías hemos trabajado con ventana de berilio, bajo una tensión de aceleración de 25 kV.

RESULTADOS

La característica más relevante de las células vacuoladas de *Lernanthropus kroyerii* la constituyen la presencia de un borde apical altamente vacuolado y la presencia de esferocristales, así como la escasez de orgánulos citoplasmáticos.

En los distintos tramos del intestino medio se localizan tres estadios de las células B (B_1 , B_2 , B_3) que se caracterizan por el progresivo desarrollo del aparato vacuolar constituido por vesículas de endocitosis y vacuolas. Las células B_1 no alcanzan la luz intestinal y poseen un retículo endoplasmático muy poco desarrollado. En un estadio más avanzado, las células B_2 adoptan un aspecto caliciforme y alcanzan una altura de unos 10 μm (fig. 1). Las vacuolas de la zona supranuclear inician un proceso de fragmentación y en las áreas intervaculares se localizan mitocondrias, algún dictiosoma y vesículas de retículo endoplasmático rugoso, que presentan zonas de fragmentación y desorganización. En los distintos estadios, el núcleo posee 4,2 μm de diámetro y un patrón de heterocromatina dispersa. El nucléolo es conspicuo y claramente esférico con diámetro de 1,5 μm .

En el estadio B_3 se incrementan el número de vesículas de micropinocitosis y de vacuolas de contenido heterogéneo, que después de fusionarse pueden medir unos 1,2 μm . Algu-

nas vacuolas presentan la morfología de "litosomas", es decir, de vacuolas que albergan concreciones minerales.

Origen de los esferocristales.

El acusado polimorfismo que presentan los esferocristales implica un proceso de formación en el que participan diversos orgánulos celulares. Se aprecian dos etapas bien diferenciadas en dicho proceso: un estadio inicial de formación y uno o más estadios de consolidación.

La fase inicial se observa preferentemente en las células de tipo B₂ y de forma más es-

casa en las células B₃. Las concreciones no sobrepasan los 0,15 µm y se hallan en el interior de vesículas elípticas. La textura de la concreción se condensa progresivamente y adquiere un aspecto estratificado.

En la fase de consolidación el incremento de volumen y la progresiva compactación del material se debe al aporte de componentes membranosos de distintos orgánulos celulares. De forma esporádica se ha observado la desorganización interna de mitocondrias y la asociación de su membrana con la membrana vesicular (fig. 2). Asimismo, se ha detectado un estrecho contacto entre las membranas de vesículas golgianas y la membrana del litoso-

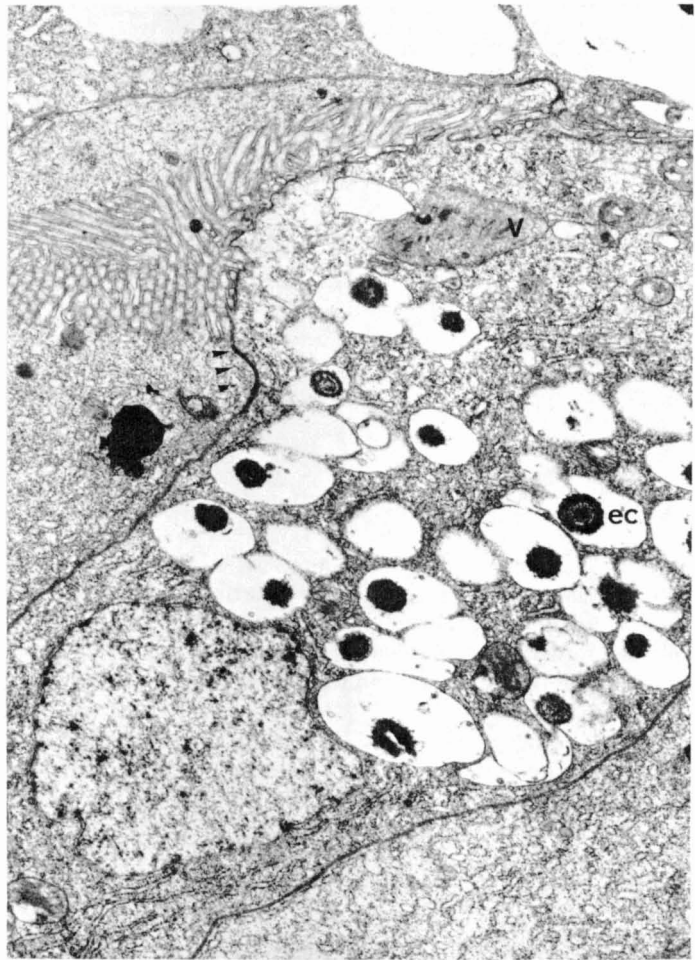


Fig. 1. Célula tipo B₂ con esferocristales (ec) y algunas vacuolas heterofágicas (V), que ensanchan la región apical. Se observan algunos restos de retículo endoplasmático alrededor del núcleo, las puntas de flecha indican una unión septada de tipo liso. 24300X.

B₂ type cell with sphaerocrystals and some heterophagic vacuoles, some endoplasmic reticulum residues around the nucleus can be observed, the arrows show a smooth septate contact. 24300X.

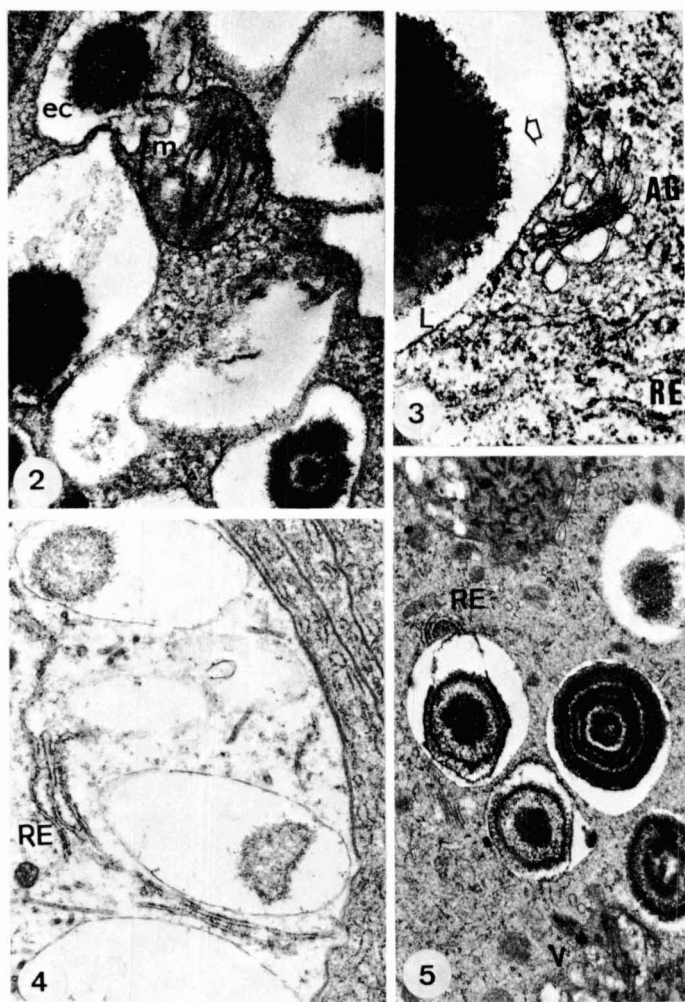


Fig. 2-5. 2. Proceso de formación de un esferocristal (ec) con aporte de material mitocondrial (m), 52000X; 3. Etapa inicial de compactación del material granuloso que constituye el esferocristal (flecha); Membrana del lisosoma, A.G. Complejo de Golgi; RE. Retículo endoplasmático rugoso, 23500X; 4. Fragmentos del retículo endoplasmático (RE), 24700X; 5. Conexión membranosa entre las vesículas del retículo endoplasmático (RE) y la concreción mineral que se halla en proceso de formación, 25500X.

2. *Growing of a sphaerocrystal with contribution of the matrix mitochondrial material (m), 52000X; 3. Early stage of compaction of granule material, which constitute the concretion (arrow), Golgi vesicles are proximate of lysosome (L) membrane; AG. Golgi complex; RE. rough endoplasmatic reticulum, 23500X; 4. Endoplasmic reticulum residues, 24700X; 5. Membranous connexion between R.E. vesicles and mineral concretions, which are forming, 25500X.*

ma (fig. 3). El proceso más frecuente consiste en la aportación de materia orgánica a partir de las membranas y del contenido de las vesículas del retículo endoplasmático rugoso que sufren un proceso de dilatación y pérdida de ribosomas (figs. 4, 5). Una vez se han constituido los esferocristales, se observa una clara disminución en el contenido de ergastoplasma de la célula. Las distintas etapas del proceso quedan esquematizadas en la figura 6.

Composición cualitativa de los esferocristales

Se ha estudiado células en estadio B₃, cuyos

cristales poseen un tamaño y un grado de consolidación que permite un mayor nivel de detección. Aplicando la técnica del "mapping" al área celular donde se agrupan de 15 a 20 esferocristales, se ha determinado la presencia y distribución de los dos elementos más abundantes, el calcio y el fósforo. Este último presenta una mayor densidad de distribución en la zona estudiada, si bien el resultado se halla parcialmente enmascarado debido a la utilización de tampón Sørensen que puede haber introducido nuevos niveles de fósforo en los tejidos (figs. 7, 8, 9).

Posteriormente se han detectado los ele-

mentos de cada concreción realizando un análisis de tipo puntual y hemos obtenido el espectro de energías que aparece en la gráfica de la figura 10. La magnitud de los niveles de energía alcanzados por el calcio y el fósforo se ha puesto claramente de manifiesto, ya que se habían eliminado previamente los elementos más contaminantes (osmio y oro) situados en niveles energéticos muy próximos. Las pequeñas cantidades de los elementos metálicos detectados son constantes en todos los análisis efectuados, si bien el pico de emisión del hierro presenta variaciones de un análisis a otro. El nivel energético correspondiente al zinc presenta una mayor constancia en las distintas detecciones efectuadas.

DISCUSIÓN

Las concreciones minerales detectadas de las células intestinales de *L. kroyerii* adoptan una morfología comparable a la de esferocristales de epitelios de crustáceos y de invertebrados en general. Si bien todas las estructuras minerales intracitoplasmáticas presentan el mismo aspecto estratificado de las concreciones de *Lernanthropus*, en esta especie el grado de compactación y la elevada osmiofilia de distintas regiones de la concreción indican la presencia de abundante materia orgánica, que motiva la intensa reactividad frente a la técnica del P.A.S.

La intervención de las distintas áreas citoplasmáticas en el proceso de formación de concreciones varía en las células bioacumuladoras de las distintas especies. Aunque en un mismo modelo celular pueden coexistir distintas vías, como ocurre en *L. kroyerii* (fig. 6), la intervención del retículo endoplasmático rugoso constituye el mecanismo más frecuente de aportación de materia orgánica. Este proceso se da de forma generalizada en insectos y crustáceos (BALLAN-DUFRANCAIS, 1972; HUMBERT, 1974; DURFORT, 1981). La localización estratégica de los profundos pliegues de la membrana basal de las células B_3 de *Lernanthropus* posibilita de forma adicional un transporte iónico en la base de la célula mediante la intervención de vesículas de

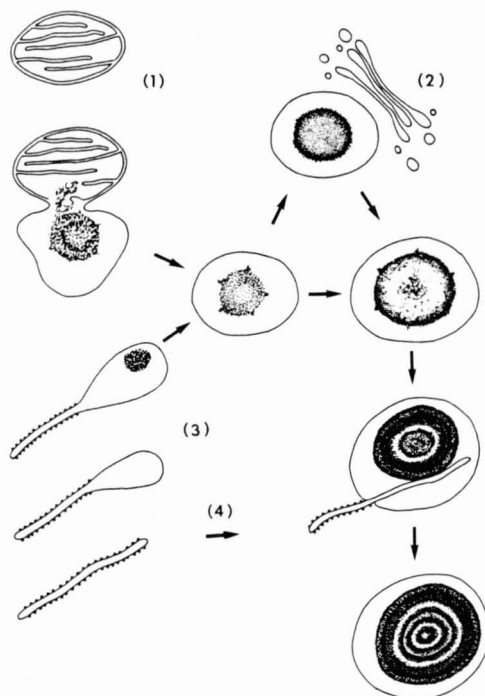


Fig. 6. Esquema de las posibles vías de formación de esferocristales en las células B (1,2,3). Una vez configurada la concreción mineral puede existir un nuevo aporte de material membranoso procedente del retículo endoplasmático rugoso (4).

Scheme of possible pathways of formation of sphaerocrystals in B cells. After formation of mineral concretions may be a new contribution of membranous material from rough endoplasmic reticulum (4).

retículo endoplasmático rugoso (HUMBERT, 1978).

Las acumulaciones de materia mineral entre las vesículas del complejo de Golgi únicamente han sido citadas en relación con células intestinales de insectos por WAKU & SUMIMOTO (1965) y SOHAL et al. (1977). En la especie que hemos estudiado, interpretamos la intervención de dictiosomas en la formación de las concreciones como un aporte de sustrato orgánico no exclusivamente membranoso, sino también de sustancias sintetizadas por la célula, de naturaleza glucoproteica. No se excluye la posibilidad de la presencia de otras sustancias, especialmente de origen lisosómico, que puedan favorecer el proceso de mineralización (MARTOJA & TRUCHET, 1983).

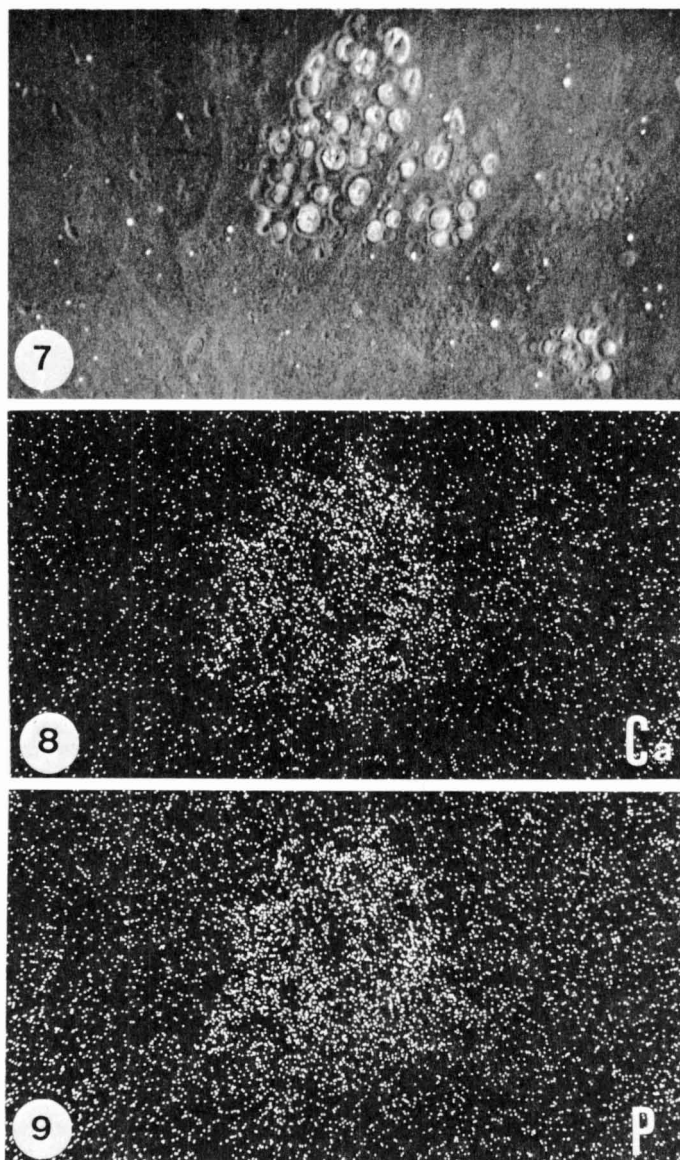


Fig. 7-9. 7. Agrupación de esferocristales en una célula vacuolada del mesénteron de *Lernanthropus kroyerii*, microscopio electrónico de barrido, 9500X; 8, 9. Determinación del calcio y fósforo mediante la técnica del "mapping" en el área ocupada por las concreciones minerales de la misma célula.

7. Association of sphaerocrystals in vacuolated cells in the midgut of *Lernanthropus kroyerii*, Scanning Electron Microscope, 9500X; 8, 9. Detection of Calcium and Phosphorous with mapping technique in the region where mineral concretions are located.

El origen mineral de las concreciones únicamente ha sido descrito en insectos por WIGLESWORTH & SALPETER (1962) y en copépodos por DURFORT (1980). El proceso de vesiculación detectado en *L. kroyerii* implica un mayor grado de destrucción de las membranas y crestas mitocondriales, si bien podría tratarse de etapas distintas de un único proceso de incorporación de material lípido protei-

co, para constituir la porción orgánica de la concreción. Es bien conocida la importancia de los procesos de incorporación de calcio a la matriz mitocondrial que tiene lugar en las células de distintos tejidos, principalmente de mamíferos. Sin embargo, no parece probable que el calcio intramitocondrial intervenga de forma masiva en el proceso de biomineralización, sino que la membrana mitocondrial úni-

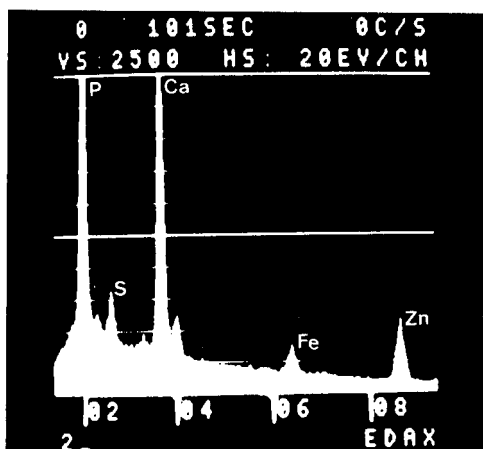


Fig. 10. Espectro obtenido del análisis de un esferocristal, utilizando un analizador EDAX-ECON Si/Li, con ventana de berilio. La situación de los picos de los distintos elementos corresponde a la energía emitida por cada uno, expresada en KeV. El análisis se ha realizado sobre el corte de 3 μm , de una muestra sin osmificar, depositado sobre soporte de grafito.

X-Ray spectrum of a concretion obtained with an EDAX-ECON Si/Li analyser, with Berilium window. The positions of the main peaks of the different elements (quantum energies expressed in KeV) are Phosphorous (2'01) Sulphure (2'30), Calcium (3'69), Iron (6'40), Copper (8'04). The analysis has been made on a semithin section of 3 μm of a non osmified sample, placed on graffit suport.

camente actúa como un mecanismo regulador en el transporte de calcio (MEYRAN et al., 1984).

La constancia en cuanto a la composición elemental de los esferocristales del intestino de copépodos parásitos se pone de manifiesto en las distintas especies de copépodos de vida libre, así como en otros grupos de crustáceos. Distintos autores han demostrado que la presencia de un mismo elemento puede dar lugar a distintas interpretaciones funcionales. Así ocurre con los dos elementos mayoritarios que integran las concreciones del epitelio intestinal de crustáceos: el fósforo y el calcio. GRAF (1966) estableció el ciclo de utilización de las reservas calcáreas en el intestino de anfípodos, que implica una progresiva vía de transporte transepitelial desde la etapa pre-exuvial, en las sucesivas etapas de la muda. Por otra parte, la presencia de fósforo y cloro

detectados en *Lernanthropus kroyerii* revela una proporción de sales en forma de fosfatos y cloruros ligeramente menor que la que presentan las concreciones intestinales de especies de vida libre. En función de las características de la cutícula de dichas especies y del contenido de elementos minerales de los esferocristales, DUFORT (1981) atribuye a las concreciones intestinales una función esencialmente almacenadora, durante las etapas previas a la muda.

El material de reserva no siempre implica una utilización directa de las sales de calcio en procesos de consolidación de las regiones calcáreas (ABOLINS-KROGIS, 1970). En algunos moluscos lamelibranquios, la inmovilización y reserva de calcio puede verse incrementada a nivel de las branquias, en períodos prolongados de hipoxia (SILVERMANN et al., 1983). En copépodos de vida libre, DUFORT (1981) ha estudiado el proceso de redisolución de esferocristales durante la etapa de la vitelogenesis en que se requieren cantidades variables de hormonas como la vitelogenina y aporte de iones calcio.

La existencia de esferocristales en células intestinales de insectos y arácnidos contribuye a la conservación del equilibrio osmótico. Dicho mecanismo bioacumulador posibilita una eliminación efectiva de sustancias tóxicas, procedentes de la alimentación (HUMBERT, 1978; SOHAL et al., 1977; GOYFFON et al., 1983). Se ha comprobado que el bloqueo de metales específicos en invertebrados marinos, bajo condiciones contaminantes, constituye un tipo de excreción por acumulación que contribuye a eliminar del organismo sustancias nocivas incorporadas (MARTOJA, 1983). Sin embargo, el significado de los elementos metálicos en las concreciones minerales de *L. kroyerii*, queda por establecer, ya que la presencia de los picos de emisión del hierro y el zinc podría atribuirse a la existencia de estos elementos en las partes metálicas de la cámara del microscopio, que generan radiaciones bajo la influencia de los electrones retrodispersados.

En los copépodos parásitos que hemos estudiado, la formación de concreciones se da

exclusivamente en las células de tipo B, que llevan a cabo un proceso de digestión intracelular (ARNAUD et al., 1980; POQUET, 1980). Mediante esta vía, algunas especies de moluscos lamelibranquios, sumamente filtradores concentran distintos elementos metálicos en el interior de células digestivas, a través de lisosomas (BALLAN-DUFRANÇAIS, et al., 1982). El régimen ectoparasitario de *Lernanthropus* implica activos mecanismos de endocitosis en las células B, que contribuirán al almacenamiento y acumulación temporal de determinados elementos minerales, adquiriendo un carácter excretor.

Únicamente las variaciones en el número y el grado de consolidación de los esferocristales de *L. kroyerii* en las distintas fases de la digestión, así como un estudio microanalítico de carácter cuantitativo, nos permitirá comprobar la validez de este hipotético significado excretor.

BIBLIOGRAFÍA

- ABOLIN-KROGIS, A., 1970. Electron microscope studies of the intracellular origin and formation of calcifying granules and calcium spherules in the hepatopancreas of the snail *Helix pomatia*. *Z. Zellforsch.*, 180: 501-515.
- ARNAUD, J., BRUNET, M. & MAZZA, J., 1980. Structure et ultrastructure comparées de l'intestin chez plusieurs espèces de Copépodes Calanoidea (Crustacea). *Zoomorphologie*, 95: 213-233.
- BALLAN-DUFRANÇAIS, C., 1972. Ultrastructure de l'iléon de *Blatella germanica*. Localisation, genèse et composition des concrétions minérales intracytoplasmiques. *Z. Zellforsch.*, 133: 163-179.
- BALLAN-DUFRANÇAIS, C., JEANTET, A.Y. & HALPERN, S., 1982. Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et métalloïdes dans la glande digestive d'un mollusque bivalve (*Pecten maximus*). Implications des processus de digestion. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 294: 673-678.
- DURFORT, M., 1980. Microanálisis de las concreciones intestinales de *Cyclops strenuus*, Fischer (Crustacea, Copepoda). Estudio preliminar. *Misc. Zool.*, 6: 27-32.
- 1981. Mineral concretions of the intestinal epithelium of *Cyclops strenuus*, Fischer (Crustacea, Copepoda). Ultrastructural study. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.*, 46 (Secc. Zool. 4): 93-103.
- GOURANTON, J., 1968. Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des nomoptères cercopides. *J. Cell Biol.*, 37(2): 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. Sci. Paris*, 263: 173-176.
- GRAF, F. & MICHAUT, Ph., 1980. Fine structure of the midgut posterior caeca in the crustacean *Orchestia* intermolt: recognition of two segments. *J. Morphol.*, 177: 1-23.
- HUBBERT, W., 1974. Localisation, structure et genèse des concrétions minérales dans le méséntéron des Collemboles Tomoceridae (Insecta, Collembola). *Z. Morph. Tiere.*, 78: 93-109.
- 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 Tissue Res*, 187: 397-416.
- MARTOJA, R. & TRUCHET, M., 1983. Rôle d'un omochrome dans l'excretion de métaux essentiels (Cu, Zn) et dans la détoxication à l'égard de contaminants métalliques (Ag, Cd) chez un insecte (*Locusta migratoria*, Orthoptère). *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 297: 219-224.
- MEYRAN, J.C., GRAF, F. & UNICAISE, G., 1984. Calcium pathway through a mineralizing epithelium in the crustacean *Orchestia* in pre-molt: ultrastructural cytochemistry and X-ray microanalysis. *Tissue & Cell*, 16(2): 269-286.
- POQUET, M., 1980. Contribución al estudio ultraestructural del aparato digestivo de *Caligus minimus* Otto, copépedo parásito de la lubina. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.)*, 78: 459-471.
- 1982. Datos ultraestructurales de las concreciones minerales en las células epiteliales del intestino medio de *Lernanthropus kroyerii* Van Beneden (Crustacea, Copepoda) parásito de *Dicentrarchus labrax*. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.)*, 80: 119-129.
- SILVERMANN, H., STEFFENS, W.L. & DIETZ, T.H., 1983. Calcium concretions in the gills of a freshwater mussel serve as a calcium reservoir during periods of hypoxia. *J. Exptl. Zool.*, 227: 177-189.
- SOHAL, R.S., PETERS, P.D. & HALL, T.A., 1977. Origin, structure, composition and age-dependance of mineralized dense bodies in the midgut epithelium of the adult housefly *Musca domestica*. *Tissue & Cell*, 9: 87-102.
- STANIER, J.E., WOODHOUSE, M.A. & GRIFFIN, R.L., 1968. The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (Decapoda, Branchyura). *Crustaceana*, 14: 56-66.
- WAKU, Y. & SUMIMOTO, K. I., 1965. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori*) with special reference to the calcium salts deposits in the cytoplasm. *Tissue & Cell*, 6: 127-136.
- WIGGLESWORTH, V.B. & SAPETER, M.M., 1962. Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera). *J. Insect Physiol.*, 8: 299-314.