

## DADES PRELIMINARS SOBRE LA LOCALITZACIÓ DE CÈL·LULES ENDOCRINES A L'INTESTÍ DE COPEPODES PARÀSITS

M. POQUET

*Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia.  
Universitat de Barcelona.*

*Rebut 12 febrer 1985*

### SUMMARY

Two species of parasite copepoda, *Caligus minimus* and *Lernanthropus kroyerii* have been found to have the intestine covered by an epithelium of absorbent cells, synthesis cells and digestive or bioaccumulative cells. On the posterior tract another cellular type is found, although it is less frequent. These cells measure about 10  $\mu\text{m}$  in height and they differ from others in their clear hyaloplasm and their high nucleo-cytoplasmatic ratio.

The granular endoplasmatic reticulum and the Golgi complex show different development degree in the different cell types, and they give rise to secretion granules which characterize these cells. The granules show a great diversity in shape, electron density and size (from 50 to 100 nm) in the different cells. These results allow us to define the existence of endocrine cells in the intestine of copepoda, similar to the ones we find in the gastrointestinal system of mammals and various invertebrate groups. Presumably, these cells are involved in the regulation of digestive processes in the rest of cellular elements which make up the intestinal tract, releasing intracellular proteins by means of exocytosis discontinuous processes.

*Key words:* endocrine cells, gut, secretory granules, crustacea.

### INTRODUCCIÓ

Des de la localització de les cèl·lules endocrines a la mucosa gàstrica de gos, realitzada per HEIDENHAIN (1879), aquest tipus cel·lular ha estat designat de formes molt diverses, tot atenent a les seves propietats tin-

torials i característiques morfològiques: cèl·lules enterocromafins, cèl·lules argentafins, cèl·lules de KULTSCHITZSKY. A la mucosa gastrointestinal de mamífers han estat identificats fins a dotze tipus diferents de cèl·lules de caràcter endocrí, les quals es diferencien essencialment per la forma, mida i

textura dels grans de secreció que posseeixen (11). L'aplicació de tècniques immunocitoquímiques ha permès posar en relleu una característica comuna en totes elles: la producció d'hormones de naturalesa peptídica, que caracteritza tots els tipus cel·lulars que integren el sistema APUD (5). Les diferents hormones intervenen en processos ben diversos relacionats amb les funcions digestives, com el peristaltisme intestinal o bé el nivell sanguini de diferents metabolits.

Així mateix, l'epiteli intestinal de cefalocordats ha estat objecte d'estudis, tant de caràcter histoquímic com ultrastructural, degut a que posseeix una població de cèl·lules endocrines de característiques similars a les que mostren les cèl·lules productores d'hormones polipeptídiques dels vertebrats (2, 13). L'estudi d'aquest grup cobra un especial relleu degut a la importància filogenètica d'algunes espècies i a l'aportació que suposen les dades obtingudes en la comprensió de l'evolució del sistema endocrí gastrointestinal pancreàtic (GEP) (9).

Les referències sobre l'existència d'aquest tipus cel·lulars a nivell dels invertebrats són força més reduïdes, degut principalment a l'escassetat de dades de caràcter citoquímic o fisiològic. En funció de llur localització i de les característiques ultrastructurals dels grans de secreció, CASSIER et al. (3) han descrit set tipus diferents de cèl·lules endocrines al mesenteron d'insectes que es troben en diferents fases de llur desenvolupament.

En aquest sentit, el coneixement de les cèl·lules endocrines en el grup dels crustacis és més reduït encara, degut fonamentalment a la major reducció que manifesta el tram intestinal, a on es localitzen aquest tipus de cèl·lules. Únicament ha estat descrit un tipus de cèl·lules «clares» en els cecs posteriors de l'intestí d'amfípodes (7).

El present treball constitueix un estudi preliminar de caràcter morfològic de les cèl·lules endocrines que es localitzen en el tram mesentèric posterior de copèpodes paràsits. La tipificació d'aquestes cèl·lules mitjançant les

dades aportades per la microscòpia electrònica de transmissió, permetrà d'establir uns criteris inicials de caracterització dels esmentats tipus cel·lulars dins d'aquest grup de crustacis.

## MATERIAL I MÈTODES

Les dues espècies estudiades, *Caligus minimus* i *Lernanthropus kroyerii* són copèpodes que es troben en règim parasitari a la mucosa bucal i a les brànquies de *Dicentrarchus labrax*. Els exemplars estudiats provenen del litoral mediterrani i el grau d'infestació varia d'una espècie a l'altra, essent d'un 70 % en el cas de *Caligus* i del 55 al 60 % per *Lernanthropus*.

El processat del material ha estat l'habitual que s'aplica a les mostres que han d'ésser estudiades al microscopi electrònic. La fixació s'ha realitzat per immersió, dels exemplars fragmentats, en paraformaldehid (2 %)-glutaraldehid (2,5 %) segons KARNOVSKY, tamponat amb fosfat sòdic al 0,1M i pH 7,3, durant 90-120 minuts. Després d'un rentat amb la mateixa solució tampó, durant uns 30 minuts, s'ha efectuat una segona fixació amb tetròxid d'osmi (1,5 %) amb la solució tampó, durant 90 minuts. Aquestes etapes han estat realitzades a una temperatura de 4 °C.

Després de la deshidratació de les mostres mitjançant la sèrie progressiva d'acetones, a temperatura ambient, s'ha procedit a la inclusió del material mitjançant resina SPURR (12) que per la seva baixa viscositat i lent procés de polimerització és la que presenta una penetració òptima en el material.

Els talls ultrafins han estat obtinguts mitjançant un ultramicrotòtom Ultracut (Reichert-Jung), essent posteriorment contrastats amb acetat d'uranil i citrat de plom (10).

Les observacions han estat realitzades amb un microscopi electrònic Philips, model EM200 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

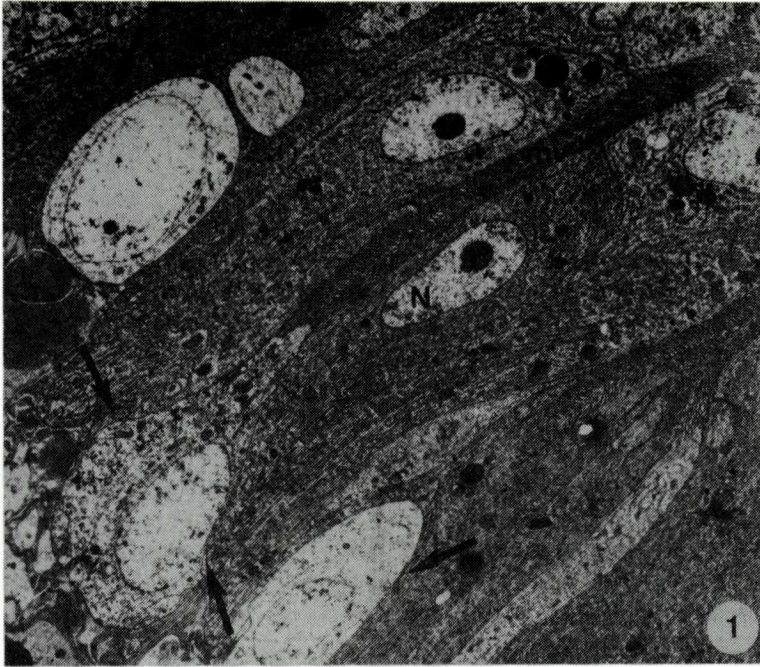


Fig. 1. Fragment de l'epiteli intestinal de *L. kroyerii*. Les cèl·lules endocrines es destaquen per la seva situació al fons de la cripta (fletxes). mv: microvilli; N: nuclis. 97.000X  
Fragment of the intestinal epithelium of *L. kroyerii*. Endocrine cells can be seen depth in the crypt (arrows). mv: microvilli; N: nuclei.

## RESULTATS

El tub digestiu de les dues espècies de copèpodes estudiades, es troba revestit per cèl·lules epitelials de funció absorbent i sintetitzadora (8). El tram posterior del mesènteron es caracteritza per la presència de criptes intestinals, on es localitzen amb una freqüència relativament baixa (8 al 10 %) un tercer tipus cel·lular que destaca per la reduïda electrodensitat del seu hialoplasma (Figs. 1 i 2).

La mida i la forma de les cèl·lules varia d'una espècie a l'altra, ja que a *Lernanthropus* adopten un aspecte piriforme, amb la meitat superior més estreta que a *Caligus*, on les dimensions són més regulars. Tal com en la resta de l'epiteli, les cèl·lules de *L. kroyerii* presenten una alçada considerable, de l'ordre de  $10,5 \mu\text{m}$  i assoleixen uns  $2 \mu\text{m}$  d'amplada en la regió equatorial. Les cèl·lules de *Caligus* no ultrapassen els  $8 \mu\text{m}$ .

Ambdós tipus cel·lulars es comuniquen amb la llum intestinal mitjançant una vora apical molt reduïda, amb microvilli d'uns  $0,9 \mu\text{m}$ . a  $1,2 \mu\text{m}$  de llargada, que es distribueixen densament apretats i en l'espècie *Caligus* adopten un aspecte bifurcat molt característic (Fig. 3). Les zones de contacte amb les restants cèl·lules epitelials són del tipus de la unió septada de tipus llis (*zonula continua*) que assoleixen uns  $1,2 \mu\text{m}$ . de llargada (Fig. 6). La resta de la membrana lateral presenta profundes interdigitacions, algunes del tipus «hernia». Així mateix la membrana basal presenta invaginacions poc profundes. Aquestes cèl·lules descansen total o parcialment a la làmina basal, de manera que, en alguns casos, les cèl·lules adjacents engloben parcialment la zona basal de cada cèl·lula clara.

A la regió perinuclear i àrees laterals de la cèl·lula es localitza l'aparell vesiculo-

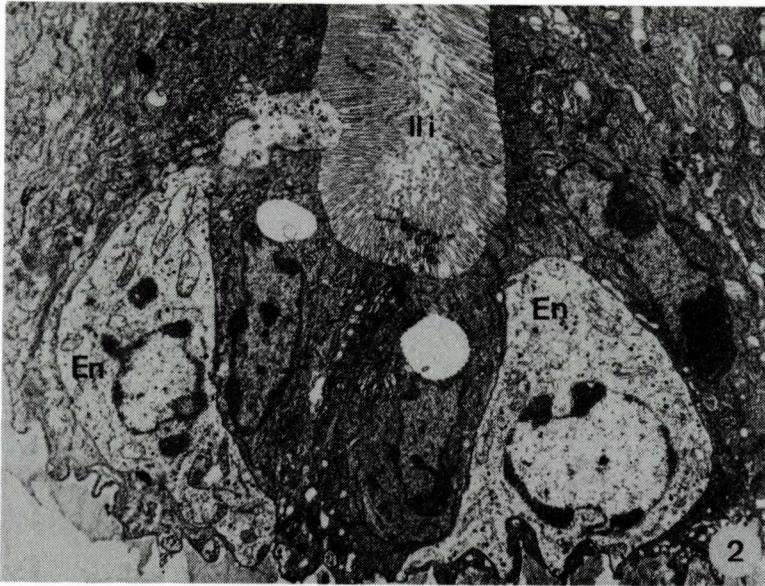


Fig. 2. Visió de dues cèl·lules endocrines (En) del mesènteron de *Caligus minimus*. Observeu el tamany dels nuclis i les seves indentacions. Ili: Llum intestinal. 8.400X  
A view of the mesenteron of *Caligus minimus* with the endocrine cells (En). The size of the nuclei and their entries can be observed. Ili: lumen of gut.

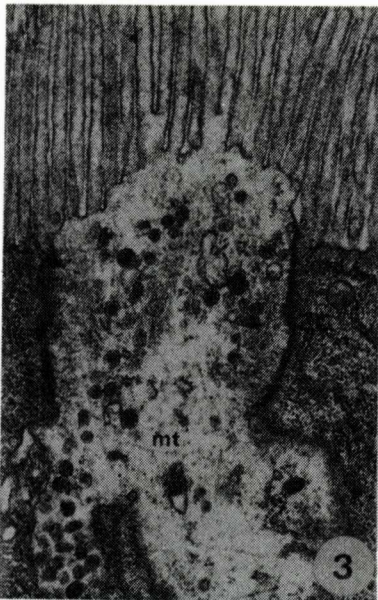


Fig. 3. Regió apical d'una cèl·lula endocrina amb microvellositats rígides i bifurcades. S'observen alguns microtúbuls (mt) entre els grans de secreció. zc: zónula contínua. 34.400X  
Apical zone of an endocrine cell with rigid and bifurcated microvilli. Some microtubules (mt) among the secretory granules are shown.

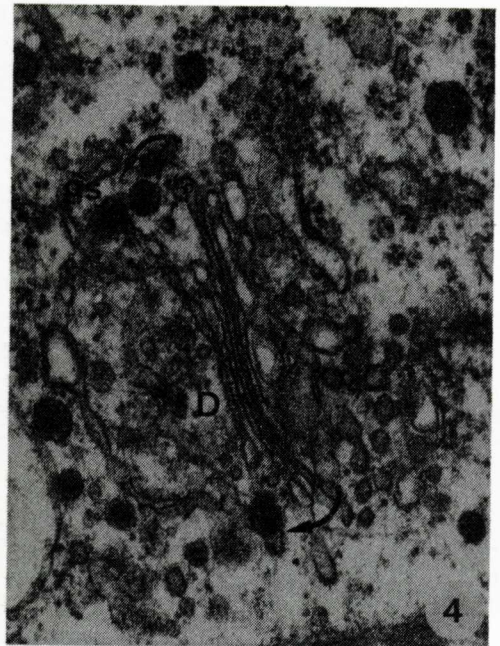


Fig. 4. Els grans de secreció (gs) constituïts a partir d'un dictiosoma (D, fletxes) apareixen envoltats d'un halo menys dens als electrons. 69.200X  
Secretory granules from a dictyosome with a halo less electron dense.

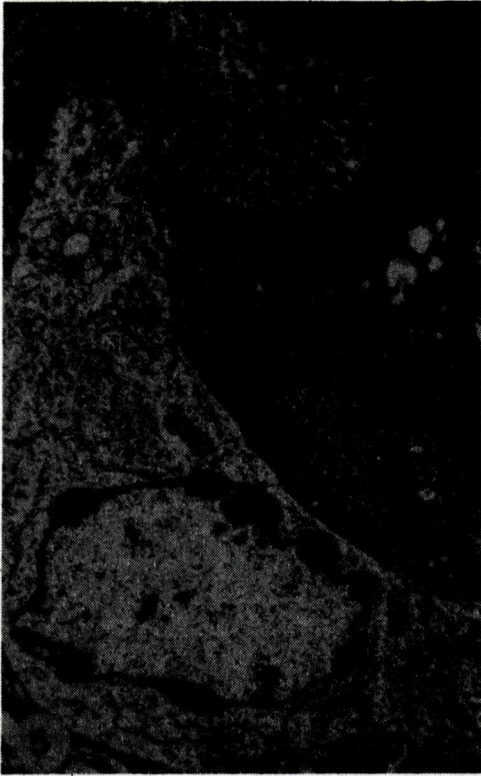


Fig. 5. Cèl·lula endocrina de tipus «obert», en la qual els grans de secreció s'acumulen principalment a la seva regió basal. 11.300X

“Open” endocrine cell with secretory granules placed mainly in its basal region.

membranós amb diferent grau de desenvolupament en les cèl·lules d'una i altra espècie. Les cèl·lules de *Caligus* presenten un o dos dictiosomes ben diferenciats, en els quals s'observa la formació de grans de secreció a partir dels extrems dilatats de les cisternes (Fig. 4). En *Lernanthropus*, en canvi, és el reticle endoplasmàtic rugós el que assolix un acusat desenvolupament, si bé la distribució dels ribosomes és irregular al llarg de les vesícules. Aquestes presenten processos de dilatació i també grans de secreció a la seva proximitat. Les nombroses granulacions i vesícules membranoses que caracteritzen aquestes cèl·lules es distribueixen de forma irregular per tot el citoplasma. A cada un

TAULA I.  
Tipus de grànuls secretors existents  
a les cèl·lules endocrines de cada espècie.

Especie	Freqüència cèl·lules endocrines	Granuls		
		Diàmetre (nm.)	Forma	Densitat als electrons
<i>L. kroyerii</i>	+	60-75	esfèrica	dens
<i>C. minimus</i>	++	70-80	irregular	nucli/ dens
		90-100	esfèrica	dens

dels models cel·lulars es poden detectar diferents tipus de grans de secreció que s'identifiquen per llur contingut, diàmetre i grau d'electrodensitat (Taula I).

La relació nucleoplasmàtica és elevada, tot destacant els nuclis de les cèl·lules de *Caligus* per les seves indentacions (Figs. 2 i 5). Els diàmetres nucleals oscil·len entre els 5,5  $\mu\text{m}$  a *Lernanthropus* i 2,7  $\mu\text{m}$  a *Caligus*. En qualsevol cas, la heterocromatina és força escassa i es troba distribuïda a la perifèria, on l'embolcall nuclear es troba força dilatat (180 Å) i presenta nombrosos porus de 400 a 500 Å de diàmetre. El nucleol se situa en posició ex-cèntrica i és altament conspicuu i de forma esfèrica. El seu diàmetre no ultrapassa els 0,52  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSIÓ

La ubicació de les cèl·lules que acabem de descriure a nivell de les regions més profundes de l'epiteli o criptes constitueix una dada característica en les espècies de copèpodes estudiades, degut principalment a l'especial configuració de l'epiteli intestinal en copèpodes paràsits (8). En aquest mateix sentit, l'associació de cèl·lules de naturalesa endocrina que es troba en els «nius» de regeneració de l'epiteli intestinal d'insectes ha estat interpretada, des del punt de vista funcional, com a reguladora dels processos de renovació cel·lular que tenen lloc a aquestes regions epitelials (3).

El diferent grau de desenvolupament que manifesten els orgànuls membranosos en

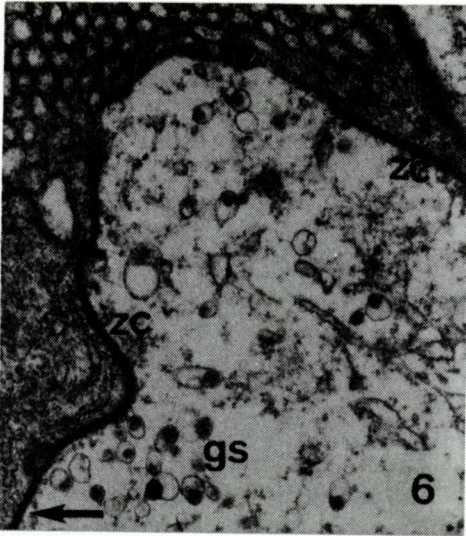


Fig. 6. Aspecte que adopten les granulacions secretores a *L. kroyerii*, amb un nucleoide excèntric i altament electrodens. S'observen dues zones de contacte (zc), on s'aprecien clarament els septes (fletxa). 30.600X  
 A view of the secretory granules in *L. kroyerii*. They present an excentric and electrodens material. Two junctional regions, with septa, can be observed.

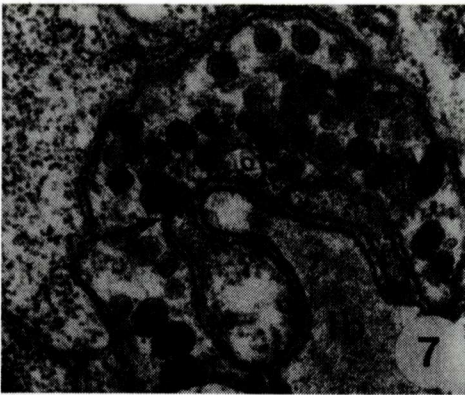


Fig. 7. Acumulació de grans de secreció a la zona basal de la cèl·lula. Observeu llur adhesió a diferents punts de la membrana (fletxa). lb: làmina basal. 48.500X  
 Accumulation of secretory granules in the basal zone of the cell. As it can be seen, they adhere to different points of the membrane (arrow).

una i altra espècie, impliquen tipus diferents de secreció a cada model cel·lular. La relació entre l'aparell de Golgi i els grans secretors queda ben patent a les cèl·lules de *Caligus*, de manera que el material que constitueix els

grans de secreció és parcialment sintetitzat i emmagatzemat a les cisternes d'aquest organel, d'una manera molt similar a la que ha estat descrita en cèl·lules endocrines de l'intestí d'un crustaci amfípod (7). D'altra banda, la diversitat ultraestructural dels grànuls de secreció, així com la distribució que adopten a diferents àrees d'una mateixa cèl·lula en els copèpodes estudiats, permet establir analogies morfològiques amb les cèl·lules endocrines de l'intestí de mamífers i altres vertebrats (11). S'admet la possibilitat que les granulacions secretores localitzades a una mateixa cèl·lula presentin diferents etapes d'un procés de degranulació, amb estadis intermitjos que manifesten variacions d'electrodensitat, amb la qual cosa la diversificació en quant als tipus de granulacions quedaria considerablement reduïda (6). Només l'aplicació de tests de caràcter citoquímic permetrà dilucidar aquest aspecte.

La dificultat en la localització d'imatges d'exocitosi a nivell de membranes de la cèl·lula ha estat assenyalada anteriorment per diferents autors (4), especialment en cèl·lules endocrines de l'epiteli intestinal d'insectes, en què els mecanismes de secreció es donen de forma quantificada, com a resposta a determinats estímuls que provoquen l'expulsió de substàncies proteiques intracel·lulars.

La presència de microvilli a l'extrem apical de les cèl·lules estudiades tant a *Caligus* com a *Lernanthropus*, permet assimilar-les a les cèl·lules de tipus «obert» de l'intestí de vertebrats (5). Les úniques cèl·lules de naturalesa endocrina de les que tenim referència a l'intestí de crustacis, han estat les cèl·lules «paracrines» de l'intestí d'amfípodes, que no presenten superfície de contacte amb la regió basal de l'epiteli (7). Les cèl·lules endocrines dels copèpodes estudiats, per tant, presentarien una funció parcialment absorbent, notablement disminuïda respecte a la resta de cèl·lules intestinals, que posseeixen una superfície d'absorció incrementada de 12 a 18 vegades.

La funció fonamental de les cèl·lules endocrines queda, encara, en el terreny hipotètic, degut al desconeixement sobre la naturalesa exacta de llur secreció. Tanmateix, l'estreta connexió topogràfica de la zona basal amb altres cèl·lules de l'epiteli intestinal i fibres musculars mesentèriques, suggereixen diferents nivells d'interacció del material contingut en els grans de secreció, ja sigui regulant les funcions de la resta d'elements cel·lulars que integren l'aparell digestiu (peristaltisme i secrecions enzimàtiques) o bé intervenint en processos de diferenciació de les cèl·lules intestinals que es localitzen en els nusos de regeneració de l'epiteli.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ANDRIES, J.C. 1976. *Présence de deux types cellulaires endocrines et d'un type exocrine au sein du mesenteron de la larve d'Aeshna cyanea Müller (Odonata, Aeshnidae)*. Int. J. Insect. Morphol. & Embryol., 5 (6):393-407.
2. BURIGHEL, P., C. MILANESI. 1977. *Fine structure of the intestinal epithelium of the colonial Ascidian Botryllus schlosseri*. Cell Tissue Res., 182:357-369.
3. CASSIER, P., J. ALIBERT, M.A. FAIN-MAUREL. 1972. *Sur la présence de cellules de type endocrine dans l'intestin moyen de Petrobius maritimus Leach (Insecte aptérygote, Thysanoure)*. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, 275:2691-2693.
4. ENDO, Y., J. NISHITSUTSUJI-UWO. 1982. *Exocytotic release of secretory granules from endocrine cells in the midgut of insects*. Cell Tissue Res., 222:515-522.
5. FUJITA, T., S. KOBAYASHI. 1977. *Structure and function of gut endocrine cells*. Int. Rev. Cytol. 6:187-233.
6. GODET, R., X. MATTEI, M. DUPE-GODET. 1984. *Alterations of endocrine pancreas B cells in a sahelian reptile (Varanus exanthematicus) during starvation*. J. of Morphology, 180:173-180.
7. GRAF, F. 1982. *Les cellules paracrines des caecums posterieurs de crustacé: un nouveau type cellulaire du système endocrine diffus du tube digestif*. C. R. Acad. Sci. Paris, 294, Sér. III:319.
8. POQUET, M. 1980. *Contribución al estudio ultraestructural del aparato digestivo de Caligus minumus, Otto, copépodo parásito de la lubina*. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.), 78:459-471.
9. REINECKE, M. 1981. *Immunohistochemical localization of polypeptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of Branchiostoma lanceolatum*. Cell Tissue Res., 219:445-456.
10. REYNOLDS, E.S. 1963. *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy*. J. Cell Biol., 17:208-212.
11. SOLCIA, E., C. CAPELLA, G. VASSALO, R. BUFFA. 1975. *Endocrine cells of the gastric mucosa*. Int. Rev. Cytol. 42:223-286.
12. SPURR, A.R. 1969. *A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy*. J. Ultrastr. Res., 26:36-43.
13. THORNDYKE, M.C., P.J.R. BEVIS. 1978. *Endocrine cells in the gut of the Ascidian Styela clava*. Cells Tissue Res., 187:159-165.