

LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE *PALAEMONETES ZARIQUIEYI* (CRUSTACEA, CARIDAE). ESTUDIO MORFOMÉTRICO

E. SAGRISTÀ

Sagristà, E., 1988. La glándula digestiva de *Palaemonetes zariquieyi* (Crustacea, Caridae). Estudio morfométrico. *Misc. Zool.*, 12: 89-95.

The digestive glandula of Palaemonetes zariquieyi (Crustacea, Caridae). A morphometric study.—Semithin sections of the hepatopancreas of *Palaemonetes zariquieyi* were studied by light microscopy and scanning electron microscopy in backscattered electron mode. Four different morphological cells types were detected in the epithelial layer: embryonic (E cells), resorptive (R cells), fibrillar (F cells) and blister-like cells (B cells). Morphometric analysis of different parameters of the cellular types shows that B-cells have a maximum and minimum cell diameter which are statistically different to the other cellular types.

Key words: Hepatopancreas, Morphometry, Scanning electron microscopy, Backscattered electron mode.

(Rebut: 13 II 89)

E. Sagristà, Unitat de Biologia Cel·lular, Dept. de Bioquímica y Fisiologia, Fac. de Biologia, Avda. Diagonal 637-647, 08028 Barcelona, Espanya.

INTRODUCCIÓN

La glándula digestiva en los decápodos está constituida por numerosos túbulos. Los túbulos están formados por una capa de células epiteliales, prismáticas que descansan en una lámina basal. Externamente una red de fibras musculares, con disposición circular y perpendicular posibilita la existencia de movimientos peristálticos.

Los estudios histológicos realizados a principios de siglo en la glándula digestiva de *Astacus leptodactylus* establecieron cuatro modelos celulares epiteliales en el hepatopáncreas de los decápodos (JACOBS, 1928; HIRSCH & JACOBS, 1930). Estos tipos celulares han sido posteriormente identificados en la mayoría de trabajos realizados en diversas especies de decápodos (BUNT, 1968; DAVIS & BURNETT, 1964; LOIZZI, 1968, 1971; FINGERMAN et al., 1967; SESMA et al., 1982; STANIER et al., 1968). Los distintos modelos celulares y sus características morfológicas han sido relacionados con una diferente funcionalidad:

células proliferativas (células E), células absorbentes (células R), células sintetizadoras de enzimas digestivos (células F) y células absorbentes y secretoras (células B) (LOIZZI, 1971; STANIER et al., 1968; SAGRISTÀ, 1987). La caracterización de los distintos modelos celulares epiteliales que constituyen los túbulos hepatopancreáticos ha sido realizada estableciendo criterios diferenciales de tipo morfológico. Algunos trabajos añaden criterios relativos a tamaño, refiriéndose a las células E (embrionarias) como células pequeñas o células B (vacuoladas) de gran tamaño (BAFFONI, 1965; BUNT, 1968; LOIZZI, 1971; LYON & SIMKISS, 1984). Ello sugiere la posibilidad de que los tipos celulares caracterizados hasta el momento puedan ser diferenciados según valores morfométricos.

Los estudios histológicos se realizan al observar cortes o secciones de los órganos, y por tanto de las células. Dichas secciones pueden ser más o menos representativas dependiendo de la forma de las células. Este hecho puede inducir a error si se deducen características

morfométricas celulares a partir de un número reducido de células. Es necesario efectuar un estudio exhaustivo realizando mediciones de los parámetros en un número representativo de la población celular.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio en el hepatopáncreas de *Palaemonetes zariquieyi* (Decapoda, Caridae), especie endémica del levante ibérico. Una vez establecidos y caracterizados los tipos celulares en esta especie se ha llevado a cabo un estudio morfométrico de los mismos, analizándose estadísticamente las variables obtenidas. Con este estudio se pretende determinar la existencia de criterios diferenciales morfométricos válidos entre los distintos tipos de células epiteliales del hepatopáncreas de la especie en estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio histológico

Pequeños fragmentos de hepatopáncreas de varios ejemplares de *Palaemonetes zariquieyi*, capturados en el Delta del Ebro, han sido fijados con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído 2,5% en tampón Sörensen durante una hora. Tras un lavado en tampón fosfato 0,2 M (pH 7,4), fueron postfijados con tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1 M durante una hora, deshidratados con una serie de concentraciones crecientes de acetonas e incluidos en la resina Spurr (SPURR, 1969).

Los cortes semifinos de 0,5 μm a 1 μm obtenidos, previamente teñidos sobre una placa calefactora a 60°C con una solución de azul de toluidina al 1% - borax 1%, fueron examinados con un microscopio Dialux Leitz.

Para conseguir una mayor resolución, cortes de 1 a 1,5 μm de grosor se procesaron para observarlos en microscopía de barrido. Los cortes, depositados sobre plástico inerte Mylar y utilizando como soporte un portaobjetos, fueron colocados sobre una placa calefactora a 56°C para facilitar su adhesión. Posteriormente el plástico Mylar se montó utilizando plata coloidal en un porta muestras (stub).

Con el fin de hacer la muestra más conductora, los cortes fueron recubiertos con carbono. Tras este procesado las muestras se observaron en un microscopio de barrido JEOL JSM.840. La imagen se formó a partir de electrones retrodispersados (backscattered). Las condiciones de observación fueron: 6 mm de distancia de trabajo; entre 8 a 10 kV de potencial de aceleración y una corriente de sonda del orden de $0,4 \times 10^{-9}$ A. El contraste de la imagen obtenida fue invertido electricamente.

Estudio morfométrico

Se seleccionaron treinta secciones semifinas de hepatopáncreas de distintos ejemplares para el estudio morfométrico. Un total de 306 células de los diferentes tipos epiteliales del hepatopáncreas se dibujaron utilizando una cámara clara de tipo Zeiss de la marca LEITZ incorporada a un microscopio Dialux o bien a partir de microfotografías obtenidas con los microscopios óptico o electrónico de barrido. Únicamente se escogieron las secciones de células que presentaban núcleo y eran fácilmente tipificadas atendiendo a criterios morfológicos. Las réplicas o calcas obtenidas se agruparon según el tipo celular y según la sección, considerándose secciones longitudinales exclusivamente las que presentaban región basal y apical en el mismo corte y secciones transversales todas las restantes. Las réplicas fueron utilizadas como imagen de partida para su digitalización con una cámara de TV tipo PLUMBICON. Con un analizador de imagen KONTRON modelo IBAS II, se evaluaron los siguientes parámetros morfométricos: diámetro máximo y mínimo de la célula y núcleo, y área núcleo/área célula. De cada una de las variables morfométricas evaluadas y para cada modelo celular y tipo de sección se ha calculado la media, la desviación típica y el coeficiente de variación. En los casos en que el coeficiente de variación no era elevado, se ha planteado un diseño de análisis de la varianza de dos factores con interacción, manteniendo individualizado tanto el tipo celular como el corte.

Todos los cálculos han sido realizados utilizando el programa 7D del paquete estadístico BMDP instalado en el ordenador del Centre d'Informàtica de la Universitat de Barcelona.

RESULTADOS

El hepatopáncreas o glándula digestiva está constituida por numerosos túbulos rodeados todos ellos por una capa conjuntiva. Dicha capa delimita un espacio hemal entre los túbulos en el que distinguimos células hemolinfáticas (fig. 1).

En la capa epitelial que forma los túbulos

hepatopancreáticos de *P. zariquieyi* se distinguen cuatro tipos celulares. Las características morfológicas de dichos tipos celulares son las siguientes:

Células embrionarias (células E): células poco diferenciadas y proliferativas. Presentan el núcleo con abundante heterocromatina. Ocupan preferentemente la región distal de los túbulos hepatopancreáticos (fig. 2).

Células absorbentes (células R): células caracterizadas por la presencia en su citoplasma de inclusiones lipídicas, que pueden ocupar un considerable volumen citoplasmático. Otras características destacables son la bien desarrollada chapa estriada y la presencia de corpúsculos densos en la región apical. (Fig. 1).

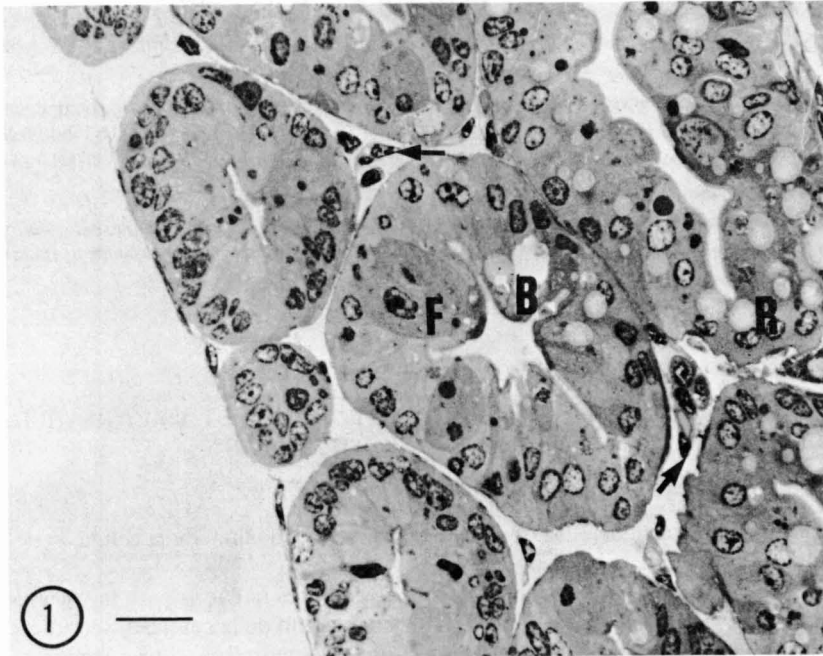


Fig. 1. Túbulos hepatopancreáticos de *Palaemonetes zariquieyi*. Se distinguen células vacuoladas (B), células absorbentes (R) y células F (F). Entre los túbulos, en el espacio hemal se distinguen vasos y distintos elementos celulares hemolinfáticos (flecha). (205x) barra = 40 μ m.

Photomicrograph of the hepatopancreas tubules of Palaemonetes zariquieyi. Some blister-like cells (B) and absorptive cells (R) and fibrillar cells (F) are visible. Some hemolymphatic cells and vessels (arrow) are found between tubules. (205x) bar = 40 μ m.

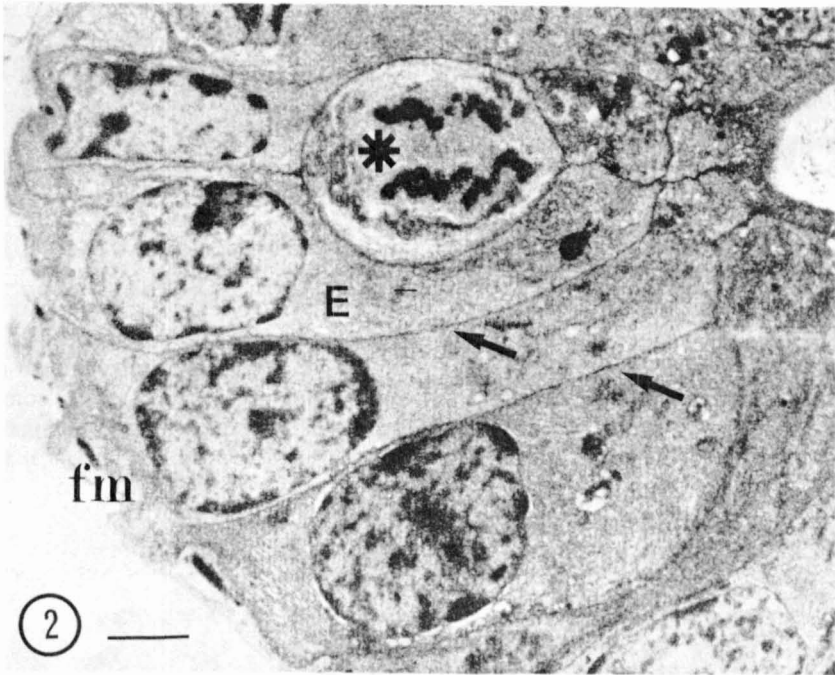


Fig. 2. Región distal de un túbulo de hepatopáncreas observado al microscopio de barrido. La imagen se ha formado a partir de electrones retrodispersados. Obsérvese la mayor resolución alcanzada detectándose claramente las membranas celulares (flecha). En la región distal se hallan las células E (E) que presentan un núcleo con heterocromatina abundante. Célula en mitosis (asterisco) Fibras musculares (fm). (1800x), barra = 5 μ m.

Scanning electron micrograph of the distal zone of a hepatopancreas tubule. The contrast of backscattered electron images is electrically reversed. Note that high resolution allows the detection of plasma membrane (long arrows). In the distal region of tubules, embryonic cells (E) in mitosis (asterisk) and muscular fibers are observed (fm). (1800x) bar = 5 μ m.

Células fibrilares (células F): presentan en conjunto una disminución de su polo apical, motivada tanto por una menor anchura de la región apical como por una menor altura de su chapa. Con cierta frecuencia, se observan gránulos de secreción en su región apical. El citoplasma, basófilo, presenta en la región perinuclear zonas vacuoladas claras. (Fig. 1).

Células vacuoladas (células B): tienen una forma globulosa con el citoplasma altamente vacuolado (fig. 1). El núcleo, picnótico, se halla ubicado en la región basal. En el borde apical se observa una menor altura de las microvellosidades que constituyen la chapa, contrastando por ello con los otros tipos celulares.

ESTUDIOS DE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Diámetro máximo de la célula

Los valores hallados para la variable diámetro máximo de la célula en secciones longitudinales según los tipos celulares son los siguientes: células E: 33 μ m \pm 16; células R: 49 μ m \pm 13; células F: 33 μ m \pm 16; células B: 37 μ m \pm 13. En las secciones trasversales los valores de la media del diámetro máximo celular son los siguientes: células E: 29 μ m \pm 12; células R: 28 μ m \pm 10; células F: 31

$\mu\text{m} \pm 12$; células B: $40 \mu\text{m} \pm 14$. El análisis estadístico de la variable diámetro máximo de la célula permite afirmar que existen diferencias significativas entre los distintos tipos celulares ($P \leq 0,001$) y entre las secciones longitudinales y transversales ($P \leq 0,001$).

El análisis de la varianza de dos factores con interacción realizado para establecer entre qué tipos celulares hay diferencias ha permitido detectar diferencias entre el diámetro máximo de las células E respecto a las células R ($P \leq 0,001$); entre las células B y las células E ($P \leq 0,001$) y entre las células B respecto a las células R ($P \leq 0,001$).

Diámetro mínimo de la célula

Esta variable presenta los siguientes valores: células E: $15 \mu\text{m} \pm 5$; células R: $14 \mu\text{m} \pm 6$; células F: $17 \mu\text{m} \pm 6$; células B: $23 \mu\text{m} \pm 7$. La variable considerada es independiente del tipo de sección considerada pues estamos midiendo la anchura de la célula en ambos casos.

El análisis de la varianza de la variable diámetro mínimo de la célula detecta diferencias entre los tipos celulares ($P \leq 0,001$) y no entre el tipo de sección considerado ($P \geq 0,01$). El análisis posterior ha permitido detectar diferencias significativas en la variable diámetro mínimo en las células de tipo B respecto a los otros tipos epiteliales del hepatopáncreas: células E, R y F.

Diámetro máximo y mínimo del núcleo

Los valores hallados para la variable diámetro máximo y mínimo del núcleo en secciones longitudinales agrupándolos según los tipos celulares son los siguientes: células E: $12,7 \mu\text{m} \pm 6$, $7,9 \mu\text{m} \pm 4$; células R: $12,1 \mu\text{m} \pm 3$, $6,5 \mu\text{m} \pm 2$; células F: $11,4 \mu\text{m} \pm 3$, $6,2 \mu\text{m} \pm 2$; células B: $9,5 \mu\text{m} \pm 4$, $6,0 \mu\text{m} \pm 2$. En las secciones transversales los valores de la media del diámetro máximo y mínimo del núcleo son los siguientes: células E: $12,5 \mu\text{m} \pm 4$, $7,4 \mu\text{m} \pm 2$; células R: $11,0 \mu\text{m} \pm 3$, $6,0 \mu\text{m} \pm 2$;

células F: $10,5 \mu\text{m} \pm 3$, $6,4 \mu\text{m} \pm 2$; células B: $11,0 \mu\text{m} \pm 3$, $6,6 \mu\text{m} \pm 3$.

El análisis estadístico realizado en estas variables establece diferencias entre los tipos celulares ($P \leq 0,001$) y no entre el tipo de sección considerada ($P \geq 0,01$). Siendo los valores del diámetro máximo y mínimo del núcleo de las células E significativamente distintos respecto a las células B.

Area núcleo/área célula

Esta variable presenta una desviación típica y un coeficiente de variación muy elevados (80%), por lo que no se ha hecho análisis de la varianza.

DISCUSIÓN

La metodología utilizada para observar cortes de 1 a $1,5 \mu\text{m}$ de grosor al microscopio electrónico de barrido descrita por KUSHIDA & KUSHIDA (1982) y por KUSHIDA et al. (1982) y desarrollada en el Servei de Microscopia Electrònica de Barcelona ha resultado un método idóneo para el estudio realizado. La observación con microscopía de barrido permite alcanzar una mayor resolución y contraste al obtenido en microscopía fotónica, por lo que es una metodología particularmente útil en estudios que requieran resoluciones medias entre la microscopía óptica y las microscopía electrónica de transmisión. Esta técnica presenta como ventaja el poder realizar secciones de mayor superficie del tejido a estudiar, con lo que se puede obtener información de tipo general o panorámica similar a la del microscopio óptico con la ventaja de alcanzar una mayor resolución. En el presente trabajo ha resultado una metodología particularmente útil al obtener un mayor contraste en los límites celulares, facilitando la medición de los distintos parámetros.

Los cuatro tipos celulares descritos en el hepatopáncreas de *P. zariquieyi* presentan características comparables a las descritas en otras especies de decápodos y resumidas por GIBSON & BARKER (1979).

El estudio histológico realizado permite establecer que las células epiteliales hepatopancreáticas en *P. zariquieyi* presentan independientemente del modelo celular una forma ajustable a un prisma. Esta forma general prismática puede también ser interpretada a partir de los datos obtenidos de las variables morfométricas. De este modo la existencia de valores significativamente distintos entre el diámetro máximo de las células según la sección longitudinal o transversal, está justificada por la forma prismática que tienen las células epiteliales hepatopancreáticas.

Las células B en el hepatopáncreas de *P. zariquieyi* presentan valores de la variable diámetro máximo celular elevados. En este modelo celular (células B) el valor medio hallado en los cortes transversales para la variable diámetro máximo destaca por el hecho de ser más elevado que en los otros modelos celulares (E, R, F). Este hecho indica la forma globulosa de este modelo celular que motivó la denominación de células burbuja (blister like cell, B cell) (HIRSCH & JACOBS, 1930).

El estudio de la variable diámetro mínimo no presenta diferencias respecto al tipo de sección, ello es debido a que el parámetro medido es siempre el de la anchura de la célula.

El presente estudio permite indicar que sólo las células B presentan valores, en las variables diámetro máximo y diámetro mínimo celular, diferenciables respecto a los otros tipos celulares. Así en cualquier estudio (citoquímicos o inmunocitoquímicos) en el que la determinación de modelos celulares siguiendo criterios previamente establecidos de tipo citológicos-morfológicos pueda resultar inoperantes, podremos diferenciar morfológicamente las células B de los otros tipos celulares epiteliales del hepatopáncreas (células E, R y F).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el asesoramiento de la Dra. M^a C. Ruiz de Villa en el estudio estadístico de los resultados obtenidos y la colaboración del Dr. R. Fontarnau en el desa-

rollo de las técnicas de microscopía electrónica. Así mismo agradezco a la Dra. M. Durfort el asesoramiento para la elaboración de este trabajo, así como la lectura crítica del original.

BIBLIOGRAFÍA

- BAFFONI, G.M., 1965. Il differenziamento cellulare nell'epatopancreas di crostacei decapodi. *Bollettino di Zoology*, XXXIII, Fasc. II: 509-523.
- BUNT, A.H., 1968. An ultrastructural study of the hepatopancreas of *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda, Astacidae). *Crustaceana*, 15: 282-288.
- DAVIS, L.E. & BURNETT, A.L., 1964. A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish. *Dev. Biol.*, 10: 122-153.
- FINGERMAN, M., DOMINCZAK, T., MIYAWEKI, OGURO, C. & YAMAMOTO, Y., 1967. Neuroendocrine control of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiol Zool.*, 40: 23-30.
- GIBSON, R. & BARKER, P.L., 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17: 285-346.
- HIRSCH, G. & JACOBS, C., 1930. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. II. Wachstum als primärer Faktor des Rhythmus eines polyphasischen organischen Sekretions systems. *Z. Wiss. Biol.*, 12: 524-558.
- JACOBS, W., 1928. Untersuchungen über die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. *Z. f. Zellforschung u. mikr. Anatomie*, 8: 1-62.
- KUSHIDA, H. & KUSHIDA, T., 1982. An improved method for both light and electron microscopy of identical sites in semi-thin tissue sections embedded in epoxy resin "Quetol 651". *J. Electron Microsc.*, 31: 206-209.
- KUSHIDA, H., KUSHIDA, T., NAGATO, Y. & OGURA, K., 1982. An improved method for both light and scanning electron microscopy in backscattered electron mode of identical sites in semi-thin tissue sections embedded in GMA and Quetol 523. *J. Electron Microsc.*, 31: 202-205.
- LOIZZI, R.F., 1968. Fine Structure of the Crayfish Hepatopancreas. *J. Cell Biol.*, 39: 82a.
- 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z. Zellforsch.*, 113: 420-440.
- LYON, R. & SIMKISS, K., 1984. The ultrastructure and metalcontaining inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of a crayfish. *Tissue & Cell*, 16: 805-817.
- SAGRISTÁ, E., 1987. Estudio de los tipos celulares del hepatopancreas de *Palaemonetes zariquieyi* (Crustacea: Decapoda). *Inv. Pesq.*, 51 (Supl. 1): 495-504.

- SESMA, P., VILLARO, A.C., AGOS, C. & VÁZQUEZ, J.J., 1982. Estudio microscópico del hepatopáncreas de *Antrapotamobius ballines* (Crustacea, Decapoda). *Morfología normal patológica, Sec. A*, 6: 239-250.
- SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.*, 26: 36-43.
- STANIER, J.E., WOODHOUSE, M.A. & GRIFFIN, R.L., 1968. The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (L) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*, 14: 56-66.