

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

La estructura y formación de la cápsula de los huevos de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata = Planorbidae)

Nahabedian, Daniel Eduardo
1992

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

TESIS DOCTORAL

TITULO:

La estructura y formación de la
cápsula de los huevos de
Biomphalaria glabrata
(Mollusca: Pulmonata:
Planorbidae).

AUTOR:

Lic. DANIEL EDUARDO NAHABEDIAN

DIRECTOR:

Dr. HUMBERTO J. A. MORETTO

LUGAR DE TRABAJO:

Laboratorio de Invertebrados
Departamento de Ciencias
Biológicas

La presente tesis es presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas.

1992

Tesis.
2485.
g.2.

a Hebe,

Luciano y

Leandro

FE DE ERRATAS

| REFERENCIAS | DICE | DEBE DECIR |
|---------------------------------------|--------------|--------------|
| Página 8, Párrafo 1, Renglón 3. | Paranaíba | Paraíba |
| Página 33, Párrafo 2, Renglón 7. | basales; | basales. |
| Página 88, Párrafo 1, Renglón 7. | (Fig. 5 G) | (Fig. 5 E) |
| Página 101, Items: 12, 13, 14, 16, 17 | metacromacia | metacromasia |
| Item 17, Columna 1. | azul (-) | púrpura (+) |
| Columna 2. | púrpura (+) | azul (-) |
| Página 102, Item 13, Columnas 1, 2, 3 | azul | púrpura |
| Item 14, Columna 1. | azul | púrpura |
| Item 15, Columnas 1 y 3. | azul | púrpura |
| Items: 16, 17, 18, 19 | intercambiar | columnas 2y3 |
| Página 111, Item 3, | APAT | APYAT |

Indice

| | |
|---|----|
| Prefacio: | . |
| Introducción: | 2 |
| Materiales y métodos: | |
| a) Metodología general. | 3 |
| b) Metodología para las cápsulas de los huevos. | 19 |
| | |
| I. El sistema reproductor en <u>Biomphalaria</u> : | |
| 1. Organografía del sistema reproductor de <u>Biomphalaria</u> <u>glabrata</u> . | 21 |
| 2. Organografía general del sistema reproductor en <u>Biomphalaria</u> . | 48 |
| | |
| II. Las cápsulas de los huevos en <u>Biomphalaria</u> : | |
| 1. Morfología de la cápsula de los huevos. | 59 |
| 2. Puesta. | 74 |

| | |
|---|-----|
| III. Biología de las células nodrizas del sistema reproductor de <u>Biomphalaria glabrata</u> : | |
| 1. Las células nodrizas (trofocitos) del ovotestis. | 76 |
| 2. Los pigmentos vinculados al ovotestis. | |
| Células pigmentadas. | 78 |
| 3. La "masa caótica". | 85 |
| 4. Ciclo de los trofocitos. | 92 |
| IV. Funcionamiento del tracto genital hembra en <u>Biomphalaria glabrata</u> : Formación de la cápsula de los huevos: | |
| 1. Secreciones del tracto genital hembra. | 96 |
| 2. Histoquímica del tracto genital hembra. | 98 |
| 3. Naturaleza y origen de las envolturas de las cápsulas. | 105 |
| Discusión y conclusiones: | 113 |
| Sumario: | 128 |
| Bibliografía: | 130 |
| Figuras: | 140 |

PREFACIO

El trabajo expuesto en esta memoria ha sido realizado en el Laboratorio de Invertebrados del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y dirigido por su Director el Dr. Humberto J. A. Moretto. Una vez más quiero expresar al Dr. Moretto mi gratitud por sus valiosos conceptos y los estímulos que no me ha dejado de prodigar. No podría olvidar que sin el Dr. Moretto este trabajo no hubiera visto la luz. Sus métodos de didáctica y de investigación fueron bien reconocidos por el egregio Profesor P.-P. Grassé, quien lo alentó a aplicarlos en Sudamérica. Y es su Laboratorio de Invertebrados, al cual me honro pertenecer, el centro de aplicación de esas ideas sobre la docencia y la investigación científica.

Al Dr A. Garrido, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Durand, al Dr J. Oscar Croxatto, Jefe del Departamento de Patología Ocular y Ultraestructura de la Fundación Oftalmológica Argentina "Jorge Malbran" y a la señorita Cecilia Noemi Rossner, les expreso mi gratitud por la gentil ayuda que me brindaron en el estudio de la sustancia amiloide.

Deseo manifestar mi agradecimiento al Centro de Virología Animal (CEVAN-CONICET) y a su técnico operador, el señor Natalio De Vincenzo, por la prestación del microscopio electrónico de transmisión; como así también al Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbran".

En homenaje póstumo, deseo dejar explícito mi recuerdo y gratitud al Dr. Juan F. R. Bejarano, ex-Director Nacional de Promoción y Protección de la Salud, por el apoyo que brindó en vida, a las investigaciones malacológicas iniciadas en el Laboratorio de Invertebrados y continuadas contra todo tipo de adversidad.

INTRODUCCION

En los Metazoa, desde el punto de vista filogenético, la teoría planuloide modificada indica que el pasaje de la prototrocófora a la vida reptante permanente, debería haberse efectuado por la tentativa de explotar una nueva fuente de alimento: la capa de microorganismos que se desarrolla en la superficie de las rocas o de las algas. Esto habría determinado que la prototrocófora abandonara la vida planctónica y luego optara a seguir fija y continuar con la microfagia o reptar con sus cilias ventrales raspando con la boca los microorganismos del sustrato rocoso. Los organismos pertenecientes al phylum Mollusca serían el resultado de la opción por esta segunda vía, con la adición de una concha dorsal protectora, indispensable en un animal lento que ventralmente ya estaba protegido por el soporte rocoso. El pasaje al nuevo tipo de alimento fué posible por la aparición, en el grupo, de un aparato raspador: la rádula, utilizada primero para la captura de los microorganismos que vivían en la superficie de algas y luego para la ingestión de las algas mismas. La rádula se fue transformando para nuevos tipos de alimentación (Moretto & Nahabedian, 1983, 1989).

La evolución de los moluscos es un caso de radiación adaptativa. De una forma ancestral evolucionaron en múltiples direcciones, ocupando nichos ecológicos diversos y

explotando fuentes distintas de alimento.

A seis formas sintéticas pueden ser adjudicadas las probablemente alrededor de 20.000 especies conocidas (Morton, 1979). Aquellas especies que se reducen a la forma sintética definitoria de la clase **Gastropoda**, poseen un órgano musculoso de reptación: el pie; una concha no dividida, inicialmente en forma de escudo cónico y luego enroscándose sobre sí misma. Estos tipos de moluscos evolucionaron dentro de la clase, por radiación adaptativa, lo que los llevó a una neta macrofagia a expensas de algas o la depredación. Algunas ramas retornaron a la vida pelágica transformando el pie en órgano de natación, otras perdieron la concha, algunas colonizaron las tierras emergidas y las aguas dulces. A estas últimas pertenecen las formas de la subclase **Pulmonata**.

Los **Pulmonata** tuvieron su origen en el Carbonífero. Ellos muestran una tendencia general a la reducción del manto y a la desaparición de la concha. Cuando esto último ocurre, el cuerpo tiene un aspecto limaciforme con simetría bilateral casi perfecta.

En la evolución de su sexualidad y de su sistema reproductor, los **Pulmonata** adquirieron el hermafroditismo, que es la mejor solución para una más eficiente condición de sexualidad en animales que se mueven tan lentamente (Moretto & Nahabedian, 1982). La condición hermafrodita está determinada por la posesión de una gonada hermafrodita única, el ovotestis. En la evolución del sistema

reproductor se encuentra la tendencia de los ductos que desagotan productos sexuales desde el ovotestis, en unirse en un ducto común que desemboca en un órgano selector de gametas femeninas y masculinas. De dicho órgano selector parten el oviducto y el espermiducto, para desagotar al exterior, por sendos gonoporos o en un atrio genital común que se abre por un gonoporo único.

A este esquema general, a lo largo de los ductos se constituyen otras estructuras anexas al aparato reproductor, tales como: vesículas seminales, glándula del albumen, glándula prostática, bursa copulatrix, etc. (Moretto & Nahabedian, 1980, 1987).

Los pulmonados tienen generalmente desarrollo directo, a excepción de algunas especies marinas costeras con estados larvales, como **Oncidiidae** que tienen larva veliger, pelágica, con concha y opérculo que se pierden en el adulto, y los **Ellobidae** con larva trocófora.

Los **Pulmonata** fueron capaces de colonizar las tierras emergidas y esta capacidad fue posible gracias a ciertas adaptaciones entre las cuales recordaremos:

1) adelgazamiento de la concha que pesa menos, puesto que fuera del agua los animales no tienen el auxilio de las fuerzas hidrostáticas;

2) la pérdida de agua es muy reducida por la abundante secreción mucosa, por la excreción de ácido úrico no soluble y por la tendencia a la vida inactiva durante el verano acompañado del cierre de la concha mediante un

epifragma;

3) la desaparición de la branquia y el cierre de la cavidad paleal, a excepción de una abertura, el pneumostoma, formándose así un saco con paredes muy vascularizadas o "pulmón". En Janella, una forma de la región australiana, del saco pulmonar irradian invaginaciones tubulares, semejantes a las tráqueas de los artrópodos, las cuales llegan hasta los senos sanguíneos. El intercambio del aire está asegurado por las dilataciones y contracciones de la cavidad paleal y al abrirse y cerrarse rítmicamente del pneumostoma.

Los **Basommatophora** constituyen un orden de Pulmonata que presenta un par de tentáculos contráctiles, no evaginables, en la base de los cuales están situados los ojos. Los más primitivos viven a lo largo de la zona marina costera o las riberas de los ríos; son acuáticos, semiacuáticos o terrestres. Los más evolucionados son decididamente de agua dulce, mantienen el "pulmón" y salen a la superficie del agua para respirar y lo complementan o lo sustituyen con la pseudobranquia; la concha siempre está presente.

Los **Pianorbidae** son basomatóforos que viven en las aguas dulces, a las cuales se han adaptado secundariamente: ellos respiran con el aire atmosférico, captado desde la superficie del cuerpo de agua. Poseen concha externa senestra, enrollada en hélice, muy aplanada, con ombligo ancho; el lóbulo inferior de su manto está

transformado en una branquia adventicia. El plasma sanguíneo puede contener hemoglobina.

Los planorbidos pertenecientes al género Biomphalaria abundan en las aguas dulces del Africa y Sudamérica (Moretto & Nahabedian, 1980, 1982, 1987). Pueden llegar a ser hospedadores intermediarios de helmintos, con incidencia muy importante en problemas sanitarios (Moretto, 1980). Algunos sirven de soporte a metazoos metaméricos epibiontes (Moretto & Nahabedian, 1985).

El objetivo de nuestras investigaciones, es conocer aspectos de la fisiología del ovotestis y del tracto genital hembra de Biomphalaria glabrata, un molusco dulciacuícola sudamericano, con importancia en la malacología médica. Ensayaremos en el presente estudio dilucidar el problema de la formación de la cápsula de los huevos de esta especie, información que podría tener interés pragmático para el control de ciertas parasitosis humanas.

MATERIALES Y METODOS

a) Metodología general:

Los especímenes de Biomphalaria glabrata, que se estudiaron descendían de una población salvaje recolectada, en su oportunidad, en el valle del río Paranaíba do Sul, Estado de São Paulo, Brasil.

En nuestro Laboratorio, los animales son criados en peceras de 17 y 40 litros de capacidad, con agua estacionada y aireada permanentemente. La temperatura del agua es mantenida entre 20 y 24 °C, y los animales son alimentados con hojas lavadas, sin nervadura central, de Lactuca sativa (Moretto & Nahabedian, 1980, 1982, 1987).

Con el objeto de establecer la morfología del sistema reproductor en Biomphalaria, estudiamos comparativamente los sistemas reproductores de B. glabrata, B. peregrina y B. tenagochila. Los especímenes de estas dos últimas especies pertenecían a poblaciones criadas en nuestro Laboratorio (Moretto & Nahabedian, 1982).

El número de animales utilizados en nuestros estudios, el parámetro promedio de sus conchas y sus varianzas, se detallan en el Cuadro I.

Cuadro I:

| ESPECIES | NUMERO DE ANIMALES | CONCHAS (en mm) | | | |
|-----------------------|--------------------------|-----------------|----------|--------|----------|
| | | DIAMETRO | | ALTURA | |
| | | MEDIA | VARIANZA | MEDIA | VARIANZA |
| <u>R. glabrata</u> | 132 | 24,79 | 1,09 | 7,96 | 0,42 |
| <u>R. peregrina</u> | 126 | 10,25 | 1,45 | 3,37 | 0,56 |
| <u>B. tenacophila</u> | 118 | 14,31 | 0,46 | 5,66 | 0,18 |

Los animales de cada especie fueron separados de sus conchas de acuerdo a las técnicas indicadas en Moretto & Nahabedian (1987). Otra técnica utilizada para la disección de órganos, fué realizada narcotizando a los animales con mentol en alcohol 96°.

Como fijadores histológicos fueron utilizados, el Bouin - Hollande, el de Zenker, el de Helly, el de Hamazaki. Para los ensayos histoquímicos, los líquidos de Baker, de Gendre, de Ciaccio y el formol neutro al 4% (Gabe, 1968; Pantin, 1968).

La inclusión para microscopía de luz se realizó en parafina 56 - 58 °C. Luego se cortó a los animales en forma seriada y completa en secciones de 6 u 8 μ m de espesor.

Para los ensayos histoquímicos se los incluyó en parafina 56 - 58 °C y se los cortó en secciones de 8 a 10 μ m de espesor. Otros especímenes, preparados para los estudios de lípidos, se fijaron e incluyeron siguiendo la técnica de Backer, con un tiempo de poscromización de un mes y cortados con micrótomo de congelación, también en secciones de 8 a 10 μ m de espesor.

Para el MET, los órganos fueron fijados en glutaraldehído al 3% en 0,25 M de cacodilato de sodio, buffer a pH 7,3. Luego postfijados en tetroxido de osmio al 1% en 0,25 M de cacodilato de sodio, con 0,12 M de sucrosa, por una

hora y embebidos en resina de Spurr. Se realizaron cortes finos seriados, que fueron observados en los microscópios electrónicos: Zeiss, modelo EM109 y JEOL, modelo JEM-100C, luego de colorearlos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Otros cortes semifinos fueron observados con el microscópio de luz.

Las tinciones utilizadas fueron: 1) hematoxilina de Carazzi - eosina; 2) tricrómico de Masson, variante de Goldner; 3) método de Van Gieson; 4) safranina - verde luz; 5) triple contraste de Hollande; 6) método de Mallory; 7) tricrómico de Gomori; 8) azan de Heidenhain; 9) tricrómico en un tiempo o de Gabe - Martoja; 10) método de Unna; 11) coloración panóptica de Pappenheim; 12) método de Freeborn; 13) método de Gregg y Puckett y 14) reacción nuclear de Feulgen y Rossenbeck (Gabe, 1968; Pantin, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970; Gray, 1975; Locquin & Langeron, 1978).

Histoquímica:

LIPIDOS:

Para ensayos de lípidos se fijaron e incluyeron los animales de acuerdo a la técnica de Baker (Pantin, 1968), con un mes de poscromización y cortados con micrótomo de congelación en secciones de 8 a 10 μ m de espesor. Las técnicas utilizadas fueron: 1) negro Sudan B a temperatura

ambiente (lípidos líquidos) (Gabe, 1968; Pantiny, 1968); 2) negro Sudan B a 60 °C (lípidos sólidos) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 3) método de Feyter o coloración por montaje con tionina - ácido tartárico (lípidos ácidos) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 4) método de Lison, por autooxidación (lípidos no saturados) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 5) método de Pearse o APAS (lípidos no saturados) (Pearse, 1968 - 1972); 6) método de Pearse, variante de Lillie o APFS (lípidos no saturados, fosfolípidos y cerebrósidos) (Pearse, 1968 - 1972); 7) método de Hayes (lípidos con grupos acetálicos) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 8) método de Lorrain - Smith, variante de Cain (lípidos con grupos electronegativos) (Gabe, 1968).

Los lípidos ligados a proteínas, fueron "desenmascarados" por: 1) fenol al 1%; 2) metanol - cloroformo; 3) lavado abundante en agua; 4) ácido acético al 25% y 5) ácido oxálico al 10% (Martoja & Martoja-Pierson, 1970). Todos los métodos fueron, con posterioridad, revelados con negro Sudan B.

CROMOLIPOIDES:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) prueba para fluorescencia con luz U. V. (Pearse, 1968 - 1972); 2) negro Sudan B a temperatura ambiente (Pearse, 1968 - 1972); 3) tionina al 0,5%, pH 4,2 (Pearse, 1968 - 1972); 4) azul de toluidina al 0,2%, pH 4,2 (Pearse, 1968 - 1972); 5) reacción argentafin clásica de Masson con el líquido de Fontana

(Pearse, 1968 - 1972); 6) reacción de Schmorl (reducción del ferricianuro) (Gurr, 1960; Pearse, 1968 - 1972); 7) reacción de Perls (azul de Prusia) (Pearse, 1968 - 1972); 8) método de Hueck con azul de Nilo sulfatado (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 9) método de Lillie, con azul de Nilo (Pearse, 1968 - 1972); 10) método de Gomori (hematoxilina al cromalumbre) (Pearse, 1968 - 1972); 11) método de Feyter o coloración por montaje (lípidos ácidos) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 12) método de Lorrain - Smith, variante de Cain con azul de Nilo concentrado y diluido (carácter ácido) (Gabe, 1968); 13) método de Ziehl - Neelsen con fucsina básica - alcohol ácido (acidoresistencia); (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 14) método de Hayes o reacción plasmal con sublimado - reactivo de Schiff (acetalfosfátidos o plasmalógenos) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 15) método de Lison, por autooxidación con oxígeno atmosférico - reactivo de Schiff (lípidos no saturados) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

MUCOSUSTANCIAS:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) reactivo de Schiff (Gabe, 1968); 2) APS (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 3) APAS (Pearse, 1968 - 1972); 4) APFS (Gabe, 1968); 5) método de Salazar (glicoproteínas y mucosustancias ácidas y neutras) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 6) método de Hale (mucosustancias ácidas) (Gabe, 1968; Martoja &

Martoja-Pierson, 1970); 7) método de Steedman, variante de Mowry y de Spicer (mucosustancias ácidas) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 8) método de Feyter, deslipidizado con piridina, técnicas de Baker y de Keilig (mucosustancias ácidas) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 9) método de Halmi y Davies o de la fucsina - paraaldehído sin oxidación (mucosustancias sulfatadas y carboxiladas) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 10) azul de toluidina al 0,2%, pH 4,4 con tampón cítrico - fosfato montado en medio acuoso y bálsamo de Canadá (radicales ionógenos: carboxilo, sulfatos y fosfatos) (la metacromasia no resiste la deshidratación, especialmente la mucosustancia ácida sulfatada) (Gabe, 1968); 11) azul de toluidina al 0,2%, pH 3,4 con tampón cítrico - fosfato (radicales ionógenos: sulfatos y fosfatos) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 12) metilación (alcohol metílico - ácido clorhídrico) y metacromasia (obtención de resultados negativos) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 13) metilación, saponificación (alcohol etílico - hidróxido de potasio) y metacromasia (radical ionógeno: carboxilos) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 14) azul de toluidina al 0,01%, pH 3,4 con tampón diluido cítrico - fosfato adicionado con nitrato de uranilo N/1000 (radical ionógeno: sulfatos) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 15) método del carmín de Best (polisacaridos, glucógeno) con control de digestión por saliva (ptialina) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 16) esterificación sulfúrica (ácido sulfúrico al 50% en eter etílico) y metacromasia

(mucoides) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 17) método de Gomori o de la fucsina paraldehído con oxidación (mucinas) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

AMILOIDE:

Los métodos utilizados fueron: 1) método de Landrum con Dahlia (Pearse, 1968 - 1972); 2) método de Bancroft con violeta de metilo (Pearse, 1968 - 1972); 3) método de Bennhold con rojo Congo, modificaciones de Highman y de Puchtler (Gurr, 1960; Puchtler, Sweat & Levine, 1962; Lillis, 1965; Pearse, 1968 - 1972) y 4) métodos con rojo Congo y birrefringencia (Pearse, 1968 - 1972; Glenner, 1980). Por comparación se colorearon preparados de córnea humana afectada con amiloidiasis.

MELANINAS:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) decoloración por permanganato de potasio al 0,1% y al 0,25% (Bolles Lee & Hanneguy, 1887; Böhm & Opel, 1907; Langeron, 1934; Pearse, 1968 - 1972); 2) decoloración por ácido peryódico (Pearse, 1968 - 1972); 3) decoloración por ácido peracético (Pearse, 1968 - 1972); 4) decoloración por ácido crómico (Pearse, 1968 - 1972); 5) decoloración por ácido nítrico (Pearse, 1968 - 1972); 6) decoloración por peróxido de hidrógeno (Böhm & Opel, 1907; Langeron, 1934; Pearse, 1968 - 1972); 7) decoloración por el método de Gomori (mezcla

permangánica - sulfúrica) (Böhm & Opel, 1907; Pearse, 1968 - 1972); 8) decoloración por el método de Mayer (cloro nascente) (Böhm & Opel, 1907; Pearse, 1968 - 1972); 9) basofilia con tionina al 0,5%, pH 4,2 (Gabe, 1968); 10) reacción de Masson o argentafin clásica, con el líquido de Fontana (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972); 11) reacción de Schmorl (reducción del ferricianuro) (Gurr, 1960; Pearse, 1968 - 1972); 12) método de Perls (azul de Prusia) (Pearse, 1968 - 1972); 13) método de Lillie, con el hierro ferroso (Pearse, 1968 - 1972); 14) método de Hueck con azul de Nilo sulfatado (Pearse, 1968 - 1972; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 15) método de Lillie, con el azul de Nilo (Pearse, 1968 - 1972); 16) APS (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 17) APAS (Pearse, 1968 - 1972) y 18) APPS (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

CAROTENOIDES:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) líquido de Lugol (Gabe, 1968) y 2) solución de ácido sulfúrico (Gabe, 1968).

ACIDOFILIA:

El método utilizado fue el de Deitch (grupos electronegativos totales) (Gabe, 1968).

BASOFILIA:

Los métodos utilizados fueron: 1) tionina 0,5%, pH 4,2 (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 2) azul de toluidina 0,2%, pH 4,2 (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

METACROMACIA:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) azul de toluidina al 0,2%, pH 4,4 y 3,4 de tampon acetato; (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 2) metilación (alcohol metílico - ácido clorhídrico) y metacromasia (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 3) metilación, saponificación (alcohol etílico - hidróxido de potasio) y metacromasia (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

PROTEINAS:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) método de Hartig - Zacharias (proteínas "siderófilas") (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 2) método de Salazar (proteínas combinadas "tanófilas") (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 3) método de Deitch (grupos electropositivos totales) (Gabe, 1968); 4) método de Morel y Sisley, variante de Lillie (tirosina) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 5) método de Chèvremont y Frédéric (grupos tioles, SH) (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 6) bloqueo de grupos tioles, por sublimado y por yodo, con posterior

revelado (obtención de resultados negativos) (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 7) reducción de grupos tioéteres (S-S) a tioles con sulfuro de amonio y posterior revelado (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 8) detección de grupos tioéteres por comparación entre revelado de grupos tioles (5) y revelado de grupos tioles y tioéteres (7), siempre con verificación por bloqueo (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 9) método de Adams y Sloper o APFAA (grupos tioéteres, S-S) (Pearse, 1968 - 1972; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 10) método de Adams y Sloper, variante de Lillie o APAAA (grupos tioéteres, S-S) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 11) APYAT (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 12) APAAT (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 13) APFAT (las oxidaciones seguidas por metacromasia con azul de toluidina ponen de manifiesto sustancias con grupos tioles y tioéteres) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 14) método de Pearse o APAS (grupos tioéteres, S-S) (Pearse, 1968 - 1972); 15) método de Pearse, variante de Lillie o APFS (grupos tioéteres, S-S) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 16) método de Somori o fucsina parahaldeído con oxidación (grupos tioéteres, S-S y grupos tioles, S-H) (Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

QUITINA:

Las técnicas utilizadas fueron: 1) método de Schulze, en preparados pretratados con hidróxido de potasio al 50 % o ácido clorodioxiacético (diaphanol) y luego

coloreados con la solución de cloruro de zinc - yodo - yoduro de potasio (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972) y 2) variante del método de Schulze, en preparados pretratados de igual manera que en el caso anterior y coloreados con la solución de líquido de Lugol - solución diluida de ácido sulfúrico (Gabe, 1968; Pearse, 1968 - 1972).

CALCIO: (forma iónica)

Las técnicas utilizadas fueron: 1) método de von Kossá, por sustitución con nitrato de plata (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970); 2) método con negro de eriocromo T (Pearse, 1968 - 1972); 3) método de Dahl y McGee Russel, con rojo de alizarina S (Gabe, 1968; Martoja & Martoja-Pierson, 1970) y 4) descalcificado con ácido clorhídrico al 0,5 % en alcohol absoluto o citrato de amonio al 10 % (Martoja & Martoja-Pierson, 1970).

b) Metodología para las cápsulas de los huevos:

Las cápsulas de los huevos son puestas por los animales preferentemente en las superficies orgánicas (hojas de lechuga, etc.). Es por ello que introducíamos en el cultivo, láminas de 5 cm de lado y 0,5 mm de espesor de polietileno, para recoger las capsulas. Láminas y cápsulas eran fijadas juntas, y para ayudar la penetrabilidad de los líquidos fijadores se efectuaban, con un escarpelo, cortes paralelos al eje mayor de la cápsulas.

Los fijadores utilizados fueron: los líquidos de Baker, de Helly, de Diaccio y formol neutro 4%. Las cápsulas se incluyeron según las técnicas de Carayon, doble inclusión de Peterfi y celoidina - parafina de Apathy (Gabe, 1968). Fueron cortadas en forma total y seriada en cortes de 8 a 10 μ m de espesor, para ser éstos coloreados con el tricrómico de Masson, hematoxilina de Carazzi - eosina y tri-APS. Para el estudio de su morfología, otras cápsulas fueron montadas "in toto" en medios acuosos con acetato de potasio: de Schultze, de Highmann y de Wellings (Gray, 1975), alcohol polivinílico y goma - jarabe de Apathy, previa coloración con hematoxilina de Carazzi, hematoxilina de Groat, hematoxilina ácida de Eherlich y carmin bórico de Grenacher (Langeron, 1934; Gabe, 1968).

Con el objeto de ensayar en las cápsulas, las sustancias encontradas en las secreciones del tracto genital hembra, se realizara en ellas la misma metodología de preparación y detección que en el tracto hembra.

Para el estudio ultraestructural, las cápsulas fueron tratadas como se indica en la metodología general.

I - El sistema reproductor en Biomphalaria.

1 - Organografía del sistema reproductor de B. glabrata.

Los órganos reproductores de Biomphalaria glabrata forman parte de tres sistemas: 1) el sistema hermafrodita; 2) el sistema hembra y 3) el sistema macho.

El sistema hermafrodita comprende el ovotestis y el ducto hermafrodita con las vesículas seminales.

El sistema hembra está integrado por la glándula del albumen y su ducto; la cámara hembra o bolsa de fertilización del "carrefour"; el oviducto diferenciado en tres regiones: 1) la región pre-ootecal; 2) la glándula ootecal y 3) la región post-ootecal; la vagina, con el ciego vaginal y su anexo, la bursa copulatrix con su ducto.

Al sistema macho pertenecen: el vas efferens o espermiducto; la glándula prostática; el vas defferens y el complejo penial (Fig. 1 A).

Los sistemas hembra y macho, también llamados vías o ductos hembra y macho respectivamente, nacen y corren juntos desde el "carrefour", para abrirse cada uno al exterior por sendos gonoporos, situados el macho por detrás y arriba de la base del tentáculo izquierdo del animal y el hembra por sobre el gonoporo macho.

La vía masculina se diferencia en su

extremidad distal en un aparato copulador macho o complejo penial (Moretto & Nahabedian, 1980).

El "carrefour" es la región en donde se efectúa la selección de los productos sexuales, hacia la vía correspondiente al comportamiento sexual del individuo.

A - Ovotestis:

Está formado por pequeños sacos o folículos, expansiones de una cavidad colectora común o atrio, que es posterior. Los sacos de la región ventral del órgano se abren en grupos de amplios divertículos anteriores al atrio, constituyendo la parte más gruesa del ovotestis. En la región dorsal, cada saco se abre en el atrio directamente. El atrio se continúa distalmente en el preatrio, parte más dilatada donde no desemboca saco alguno.

En la entrada de cada saco está localizado el epitelio germinativo, cuyo borde es más alto que el resto del epitelio del atrio y que fue llamado anillo germinal epitelial por Joosse & Reitz (1969). Casi todo el saco no posee epitelio propio, sino que su pared está constituida por la capa de Ancel (Ancel, 1902; Aubry, 1954a y b; Pan, 1958), no por un epitelio pavimentoso como señalan Barth & Jansen (1959).

Nuestro análisis de la capa de Ancel determina que es una muy delgada capa de tejido conectivo fibroso formado por:

a) fibroblastos: células fusiformes con núcleos ovales claros, con cromatina en gránulos, distribuidos irregularmente y nucléolo visible;

b) fibrocitos células fusiformes con núcleos elipsoidales oscuros con gránulos de cromatina grandes. La relación entre fibroblastos y fibrocitos es de 9:1.

c) células pigmentadas:

I) células con pigmento negro:

Están ubicadas formando exteriormente, un estrato regular en la pared del saco, son células estrelladas con núcleo oscuro excéntrico.

II) células con pigmento ocre:

Forman grupos por fuera del estrato de las células con pigmento negro, entre los divertículos. Poseen forma irregular, a veces esféricas, dando la apariencia de poseer movimientos ameboidales y sus núcleos son periféricos y claros.

En la capa fibrosa de la pared de los folículos, los métodos de Van Gieson, de Mallory y de Unna ponen de manifiesto una trama muy cerrada de fibras colágenas, que resultan APG positivas. Con el MET se demuestra la presencia de una lámina basal (Fig. 8 E).

Desde el borde proximal del epitelio germinativo funcional se desprenden las células que darán origen a la línea masculina y femenina de gametas y que

maduran desplazándose hacia el fondo de cada saco (Merton, 1930; Richter, 1935; Bretschneider & Raven, 1951; Barth & Jansen, 1962; Joosse & Reith, 1969) (Fig. 1 B).

La línea masculina aparecería en el borde del epitelio germinativo, como una célula de mayor tamaño y que soporta a otras menores en talla: la célula soporte es una célula nodriza y las pequeñas, las espermatogonias (Fig. 1B).

En el primer estadio o estado en "roseta" la célula nodriza comienza a desplazarse hacia el fondo del saco manteniéndose unida a las espermatogonias (Fig. 1 B). A medida que aumenta el número de células sexuales machos, la célula nodriza móvil se achata y cuando lleva 64 espermatogonias y ya ha recorrido unas 2/3 partes del largo del saco, el conjunto celular se denomina estado "epitelioide" (Figs. 1 A y 3 A). En él las células superiores germinales, juntas tienen el aspecto de un epitelio cúbico simple; hasta este momento las seis divisiones fueron mitóticas. En lo que resta de su trayecto hasta el fondo del saco, el grupo de espermatogonias se transforman en espermatocitos primarios. Al aumentar su volumen y aclararse su núcleo, entrando todas sincrónicamente a la primera división meiótica o de maduración. Luego, sin cambio de volumen, pasan a la segunda división de maduración, para formar un grupo de 256 espermátidas. Los estadios meióticos no presentan diferencias con lo expuesto por Patterson & Burch (1978).

Cuando las espermátidas van transformándose

en espermatozoides, la célula nodriza se expande y se hace redonda. Una vez aparecidos los espermatozoides, la célula nodriza presenta vacuolas, que se interpretan como material fagocitado, proveniente del citoplasma de las espermatíidas en transformación (Barth & Jansen, 1960). Al final de la espermatogénesis los espermatozoides típicos presentan sus cabezas implantadas en el citoplasma de las células nodrizas (Fig. 1 B). Esta célula, en su biología, sufre un proceso de citólisis, lo que produce la liberación del paquete isogénico de espermatozoides maduros el cual pasa al atrio del ovotestis. La célula nodriza antes de su destrucción presenta un núcleo muy picnótico, llevando en su citoplasma vacuolas con un contenido de color amarillo, sustancia que será liberada en forma de esferas amarillas luego de la destrucción de la célula. El ciclo que cumple esta célula se asemeja mucho al ciclo de las células de Sertoli de los vertebrados (Aubry, 1954a).

Los estadios del desarrollo de las gametas hembras, son similares a los observados por Griffond & Bonzoni-Sungur, (1986) en Helix aspersa y Jong-Brink, Wit, Kraal y Boer (1976), en Biomphalaria glabrata. En el epitelio germinativo, las ovogonias se presentan formando grupos de cuatro a seis células (Fig. 1 B). Ellas poseen núcleos claros, ovales, con cromatina en granos muy pequeños y con un nucléolo relativamente pequeño. Las ovogonias, recubiertas, cada una, por 2 a 8 células nodrizas, se transforman en ovocitos jóvenes. Cada conjunto se desplaza al fondo del folículo,

convirtiéndose, la gameta, en el llamado ovocito previtelino, con un nucléolo bien visible (Figs. 1 B y 3 A). Una vez allí, se detiene, observándose la formación de un espacio folicular (Abdel Malek, 1954), que puede quedar virtual (Fig. 3 D). Luego, el ovocito completa la etapa vitelogénica.

Los ovocitos maduros, prontos a ser evacuados de los folículos, son redondos, con núcleos muy claros y nucléolos relativamente pequeños, material APS positivo aparece en su citoplasma, tomando muy poco el azul Alcian, detectándose, con las técnicas adecuadas, glucógeno y gotas muy pequeñas de lípidos.

Con el MET, en el citoplasma se observan numerosas mitocondrias pequeñas, entre las cuales se disponen gránulos de vitelo, con un cuerpo cristalino regular en su interior (Figs. 3 B y 3 C). También se presentan una cantidad de pequeños aparatos de Golgi y cisternas del retículo endoplasmático liso y muchas del granular. Periféricamente, en el citoplasma del ovocito se presentan annulate lamellae, especialmente en la zona vecina a la pared del folículo. La pared del ovocito maduro, presenta pocas microvellosidades espaciadas hacia el espacio folicular (Fig. 3 D).

En el fondo de los folículos, se encuentran ovocitos creciendo rodeados por sus células nodrizas; otras células nodrizas con su carga de células sexuales macho en maduración y células o restos de células nodrizas, tanto de la línea hembra como macho. Junto con estos elementos, se

distingue un acúmulo de sustancia granular llamada, por Barth & Jansen (1962), "chaotischen Masse" ("masa caótica"). Cada uno de los folículos del ovotestis, es llamado por nosotros, saco de maduración (Fig. 1 B).

La "masa caótica" está formada por: a) una matriz granular - globular; b) cuerpos positivos a los estudios para la basofilia (cuerpos basófilos); c) esferas amarillas, que aumentan su coloración con la coloración de Mann - Dominici y se tiñen en verde con la de Gomori (Moretto & Nahabedian, 1962). Las esferas se ubican en la matriz, hacia la luz del saco. Por consiguiente, la "masa caótica" está formada por la matriz, los cuerpos basófilos y las esferas amarillas (Fig. 5 C).

La "masa caótica" confinada en el fondo sacular delimita la localización de las anteriores células. Es así que podemos considerar al saco o divertículo del ovotestis, dividido en tres zonas: 1) una zona de generación de gamogonias (epitelio germinativo); 2) una zona de maduración propiamente dicha, en la que los ovocitos y las células nodrizas de la línea macho, posan directamente sobre la pared del divertículo y 3) una zona más interna en donde se acumula la "masa caótica" (Fig. 1 B). Algunas esferas amarillas pueden ser encontradas en la luz del atrio o preatrio.

Ocupando el fondo del saco visceral y rodeando el ovotestis y la glándula digestiva, se encuentra el

llamado tejido vesicular (Blasenzellen) de Baecker (1932) y nominado por Carriker & Bilstad (1946) y Pan (1950). Es considerado un tejido de reserva. Sus células son muy grandes, elipsoidales, con núcleo excéntrico, con citoplasma que presenta glóbulos intensamente APS positivos.

Se observó que los ovocitos que se encuentran en los sacos de maduración más largos y ramificados de la parte ventral, son los más numerosos y maduran más pronto. Esa región del ovotestis es limítrofe con la glándula digestiva, lo que sugiere una relación con la vitelogenénesis. (Jocosa & Reitz, 1969).

El atrio del ovotestis es el colector de los productos gonadales maduros generados en los sacos de maduración. Está revestido por un epitelio en donde se encuentran dos tipos celulares: un tipo con cilias y otro no ciliado. Las células ciliadas predominan hacia el preatrio y son escasas cerca del anillo germinal epitelial. Las células no ciliadas poseen núcleos basales, de redondos a ovales, con cromatina en gránulos gruesos; en el citoplasma se encuentra glucógeno, en la zona central y gotitas de lípidos, en la zona basal.

Una túnica delgada, formada por tejido conjuntivo, algunas fibras musculares y células con pigmento negro, recubre exteriormente a todos los órganos del sistema reproductor (Moretto & Nahabedian, 1987).

La pared del preatrio puede distenderse. En el epitelio de su parte ventral son más numerosas las células ciliadas. Estas poseen cilias más largas que las del atrio y constituyen un gonostoma o embudo que comunica con el ducto hermafrodita. El revestimiento conectivo es similar al que posee el atrio, pero con una presencia mayor de fibras musculares.

En el lumen del preatrio pueden observarse paquetes isogénicos de espermatozoides autóctonos, ovocitos maduros y también grandes esferas amarillas. A estas últimas las hemos observado tanto en animales vírgenes, como en los animales que han copulado. En los animales con espermatozoides foráneos, se observó, que éstos estaban asociados a las esferas amarillas, con sus cabezas incluidas en la sustancia de las esferas y sus colas en el exterior.

B - Ducto hermafrodita:

El ducto hermafrodita u ovispermático tiene un primer tramo sinuoso muy corto, para luego agrandar su diámetro formando divertículos laterales (las vesículas seminales), en la región media y detrás de la glándula digestiva.

El primer tramo, corto y sinuoso del ducto hermafrodita es el responsable de la formación de tejido neogonádico, capaz de la restitución de la fertilidad en individuos pre-púberes castrados, no así la zona de las

vesículas seminales (Vianey-Liaud, 1972). Este hecho señala que el primer tramo del ducto, posee elementos celulares con potencialidad en la neoformación de la gonada.

El epitelio de las vesículas no es ciliado, sus células son prismáticas, bajas, posee núcleos basales con cromatina en gránulos medianos y un nucléolo. Este no es un epitelio sincicial, como la afirmaron otros autores (Aubry, 1956, 1961). En el conectivo, fibras musculares acompañan la base del epitelio de los divertículos.

El epitelio del resto del ducto hermafrodita es ciliado. Es un epitelio simple de células angostas, con núcleo a media altura, claros, con gránulos de cromatina de tamaño mediano a grande; el citoplasma es finamente granulado y con glucógeno, también se observan largas raíces ciliares. En individuos maduros las vesículas seminales, siempre llevan espermatozoides.

El ducto continúa hacia la parte ventral, haciéndose cilíndrico y angosto, presentando un epitelio cúbico - ciliado, semejante al ciliado del primer tramo sinuoso y una capa conectiva de similares características que los ya descritos.

C - Glándula del albumen:

Esta glándula posee una estructura tubular

compuesta, formada por adenómeros cortos que desembocan en tractos glandulares, para coincidir todos éstos, en un ducto excretor ciliado por el cual pasa la secreción al "carrefour".

El epitelio simple de los adenómeros y el de los tractos glandulares está formado por células secretoras y entre éstas, en número muy reducido, se encuentran células ciliadas.

En las células secretoras se diferencian los estadios del ciclo secretor, estudiado por Alaphilippe (1959). En el estado de restitución, la célula se presenta cúbica con núcleo basal, un nucléolo y su cromatina dispuesta en gránulos de tamaño mediano contra la carioteca. La célula ya restituida presenta un núcleo obscuro y polimorfo por la compresión de la secreción; ésta es fuertemente APS positiva, no se colorea con tionina, ni con azul de toluidina. Estas células secretan galactógeno (von Brand & Files, 1947).

Las células ciliadas adoptan una configuración de pirámide invertida con el vértice comprimido y prolongado hasta la base del epitelio, son las llamadas células tetraédricas (Moretto & Mahabedian, 1978). La base de la pirámide lleva las cilias, su núcleo es claro y distal, con pocos gránulos de cromatina y se observan gránulos de glucógeno. Estas células son llamadas células centrotubulosas (cellules centrotubuleuses) por Cavalieri & Beylot (1902) y descritas por Baecker (1932) y Nieland & Goudsmit (1969) para *Stilomatophora*; Helm (1946) y Alaphilippe (1955) las describen llamándolas centroacinosas para *Basommatophora* y

fueron nombradas como células de soporte (supportive cell) por Pan (1958) para Biomphalaria. Otras células ciliadas se presentan entre las células glandulares, son las filiformes, formadas por un tallo citoplasmático que recorre la altura epitelial y presentan un núcleo a media altura de similares características que el anterior, pero más comprimido. Apicalmente está diferenciada en un pequeño tetraedro ciliado. El órgano está rodeado por un tejido conjuntivo lacunar.

El ducto de desagote de la glándula está tapizado con un epitelio simple y ciliado, con núcleos a media altura que son ovales. Su cromatina está concentrada. Por debajo del epitelio se encuentran fibras musculares, longitudinales internas y otras circulares externas.

D - "Carrefour":

Se llama así a la región en donde tiene salida el ducto principal de la glándula del albumen y el ducto hermafrodita y nacen el oviducto y el vas efferens o espermiducto. Consiste en un saco dilatado situado contra la superficie ventral de la glándula del albumen. Está constituido por la cámara hembra o "saco de fertilización" y en comunicación con ella la cámara macho o selectora. En estado de no dilatación ambas cámaras son semitubulares. La cámara hembra recibe dorsalmente al ducto excretor de la glándula del albumen. Ventralmente y desde su lado izquierdo

se prolonga en la cámara macho o selectorá la cual se hace anterior e izquierda. El ducto hermafrodita desemboca desde atrás y tangencialmente en la cámara macho. El vas efferens nace en la misma cámara, en la conexión con el ducto hermafrodita y emerge de la región izquierda. El oviducto se proyecta desde la cámara hembra, ventralmente y corre paralelo al vas efferens, hacia la cabeza del animal (Fig. 6 A).

El epitelio de la cámara hembra es simple, ciliado con células prismáticas, los núcleos claros, ubicados a media altura, con gránulos de cromatina de tamaño mediano, dispuestos irregularmente. Las cilias batan en una secreción APS positiva. Otras células, típicamente mucosas, se encuentran entre las ciliadas, poseen núcleos oscuros y basales; Dos tipos de células mucosas son distinguidas con el tricrómico de Masson, una con cisternas que aparecen en azul y otras en rojo.

El epitelio que tapiza la unión de la cámara macho con la cámara hembra y el oviducto es similar al descrito anteriormente, pero unas cuatro veces mas alto. Observamos en su zona basal, células piriformes intraepiteliales, con núcleos grandes que llevan cromatina en gránulos medianos homogéneamente distribuidos (Fig. 5 A). En otros pulmonados, a estas células se le atribuyó una innervación catecolaminérgica como del sistema aminérgico y las llamamos paraneuronas del tipo I y II (Brisson & Collin, 1977; Brisson, Régnaud & Collin, 1977; Brisson & Collin, 1980; Hartwig, Brisson, Lyncker & Collin, 1980; Brisson, 1982).

Brisson (1922) sugiere un juego entre un sistema intrínseco formado por las células intraepiteliales y más particularmente por las paraneuronas bipolares (Tipo III) receptoras y un sistema extrínseco constituido por células neurotransisoras de la túnica conjuntiva - muscular.

La cámara macho o selectore está tapada por un epitelio simple ciliado, de células prismáticas con núcleos a media altura, obtusos. Este epitelio aumenta su altura hacia la cámara hembra.

Una musculatura constituye por fibras longitudinales internas y circulares externas, forma parte de la pared de los sacos. Esta cubierta muscular permite la dilatación del saco. La cámara hembra, cuando dilatada, toma una forma elipsoidal.

E - Oviducto:

El oviducto es el ducto, que naciendo en la cámara hembra o saco de fertilización llega hasta la vagina, presentando en su recorrido un epitelio simple ciliado y glandular, relativamente muy alto, en el que predomina uno u otro tipo celular según sus regiones.

Las células ciliadas son de dos tipos: las tetraédricas y las filiformes. Las primeras se ubican solas o en pequeños grupos entre las extremidades distales de las

células glandulares, visualizándose el citoplasma restante como un trazo desde la base del epitelio. Los núcleos, claros y ovales, con cromatina finamente granulada, se sitúan en la parte de la pirámide invertida. Las filiformes tienen un citoplasma delgado, visible también como un simple trazo entre las células glandulares, se expanden algo en el borde externo del epitelio, en donde lleva cilios. Sus núcleos, poseen las mismas características que los anteriores pero son más alargados y están en la mitad del trazo citoplasmático. En concordancia con lo expuesto por Pan (1958) y Jong-Brink (1969), estas células ciliosas llevan glucógeno en el citoplasma. Moscoso nunca encontró tampoco, que ellas presentan gotitas de lípidos (Fig. 61). Estas células y especialmente las del primer tipo, fueron denominadas células sustentaculares por Parsons & Deelands (1955), Duncan (1960b) las llama células intersticiales.

Las células glandulares presentan tres aspectos. Unas, columnares, con secreción intracitoplasmática amorfa o granular, con núcleos sub-basales y nucléolos acéntricos. Otras, globosas - elipsoidales, con citoplasma finamente trabeculado sin secreción figurada y con una estructura nuclear a menudo muy modificada. Y las últimas, ovoidales, sin secreción intracitoplasmática y semejante a las anteriores.

El oviducto presenta distintas regiones caracterizadas por su estructura y el epitelio glandular

predominante, a las cuales nosotros denominamos: a) región pre-coctecal; b) glándula coctecal y c) región post-coctecal.

A) Región pre-coctecal:

Es un ducto cilíndrico que aumenta de sección hacia la parte ventral. Dos tramos se diferencian por sus distintos epitelios glandulares. El primero se extiende desde el "carrefour" hasta el codo del oviducto pre-coctecal, donde aumenta abruptamente su sección, representando el primer cuarto del trayecto total de esta región, mientras que, las tres cuartas partes restantes presentan otro tipo de epitelio glandular.

El primer epitelio está formado por células glandulares columnares con núcleos ovales, distribuidos en posición basal hasta media altura. Su cromatina está concentrada en gránulos medianos dispuestos apretadamente y poseen un nucléolo acéntrico, el citoplasma se presenta vacuolado y se tiñe con un vivo color con la fucsina básica (magenta) del tricrómico de Hollande.

En las últimas tres cuartas partes del ducto, además de células columnares se presentan células globosas elipsoidales. Estas células tienen núcleos ubicados a media altura, muy modificados, polimorfos, dando formas a menudo estrellados y picnóticos, el citoplasma es finamente vacuolado, sin secreción figurada (Fig. 6 C). Por debajo del epitelio en el tejido conectivo se ubican una o dos fibras

musculares helicoidales.

B) Glándula cotelal:

Tiene configuración de bolsa muy desarrollada en su parte proximal y presenta aspecto infundibuliforme en su parte distal, organizándose en un tubo trilobulado irregular en corte transversal.

El epitelio presenta células glandulares columnares en toda su extensión, observándose células globosas en la porción más dilatada de la glándula (Fig. E F).

Hacia la parte más ventral de la glándula, en un corte transversal el lóbulo más pequeño y posterior presenta un área de células ciliadas que ocupa su vértice como un surco ciliado. El vértice del lóbulo más grande está tapizado por células ovoidales formando un angosto surco no ciliado. El surco ciliado está acompañado por una vaina muscular carenada, formada por una relativamente fuerte musculatura longitudinal interna y una débil circular externa. La circular se prolonga por debajo de la superficie glandular del órgano.

El surco ciliado presenta un epitelio con células ciliadas elongadas y finas, con núcleos basales a media altura, claros, con algunos grumos de cromatina, el citoplasma es eosinófilo y las cilias son largas y numerosas; a veces están acompañadas por una o dos células no ciliadas, ovoidales, las que no muestran secreción intracitoplasmática.

Las células ovoidales del surco no ciliado tampoco presentan secreción intracitoplasmática aparente y hacen recordar el mismo aspecto que las células globosas. Las células glandulares columnares en su mayoría llevan glóbulos de secreción eritrófila. Entre las células epiteliales antes descritas, se intercalan típicas células ciliadas tetraédricas y filiformes. Se observa una capa conectiva similar a la ya descrita para el oviducto pre-ootecal.

C) Región post-ootecal:

Su sección transversal es elíptica, con dos surcos ciliados situados en los extremos de su eje mayor (anterior - posterior con respecto al cuerpo del animal). Estos surcos tienen la misma estructura histológica que el surco ciliado de la glándula ootecal, que se prolongan en la región post-ootecal. El surco de la glándula ootecal, con células ovoidales, hacia la mitad de la región post-ootecal se transforma en un surco ciliado. Una capa muscular continua rodea la base del epitelio del lumen del órgano y está formada por una gruesa musculatura longitudinal interna y otra relativamente débil circular externa.

El epitelio del órgano es ciliado - glandular y va disminuyendo de altura hasta la vagina. Está constituido por células glandulares, células ciliadas, las tetraédricas y las filiformes y otras células en la que no se observa secreción aparente. Los dos surcos ciliados separan

dos poblaciones celulares con distintos tipos de secreción. La pared del lado izquierdo del tubo oviductal lleva un epitelio constituido por células glandulares columnares, con un núcleo oval sub-basal o a media altura, nucléolo central y la cromatina se presenta en acúmulos cubriendo todo el núcleo, observándose en su citoplasma secreción globular gruesa (Fig. 6 H).

El epitelio de la pared derecha del tubo oviductal posee un tipo de células secretoras columnar y otra sin secreción aparente. La primera posee núcleos basales, de ovales a esféricos con cromatina en gránulos medianos, dejando un espacio más claro excéntrico. El otro tipo celular es similar a la células ovoidales ya descritas. Tiene núcleos ovales, algo deformados, la cromatina es medianamente gruesa cubriendo todo el núcleo (Fig. 6 G).

En la región distal de esta zona, las células glandulares van desapareciendo hacia la vagina.

La musculatura de la pared del tracto, -que se observa débil en la mitad de la región post-cotaca!,- forma ya cerca de la vagina capas musculares bien desarrolladas.

F - Bursa copulatrix y su ducto:

El ducto de la bursa copulatrix nace en el lado derecho y posterior de la vagina, en la zona de los pliegues, prolongándose en un saco elipsoidal, la bolaa copulatrix, que se extiende hasta la altura de la región de la

glándula cotelal.

La bursa copulatrix se observa tapizada por un epitelio simple, prismático bajo, posee células con núcleos basales con cromatina en pocos grupos medianos, dejando un fondo claro con un nucléolo. Nuestros ensayos detectaron glucógeno en la zona apical y gotitas de lípidos en la zona basal de estas células. La superficie libre celular presenta un ribete en cepillo muy conspicuo. El epitelio posee una muy fina membrana basal. Por debajo corren algunas fibras musculares, longitudinales internas y circulares externas. El ducto de la bursa copulatrix posee una estructura parecida a la vagina, con células ciliadas que desaparecen gradualmente entre el primer y segundo tercio ascendente de su longitud.

En la luz de la bursa copulatrix se distinguen espermatozoides y secreciones. Alaphilippe (1955) señala que estos espermatozoides serían digeridos. Esto estaría confirmado en Biomphalaria glabrata, por Jong-Brink (1969), Kitajima & Paraense (1983) y Rogers & Reeder (1987).

G - Vagina y ciego vaginal:

La pared de la vagina presenta tres pliegues en la zona del nacimiento del ciego vaginal. Este nace en el lado derecho y anterior de la vagina.

Los lúmenes de estas estructuras, están tapizados por un epitelio simple formado por tres tipos

celulares: uno ciliado, otro glandular y un tercero intersticial. Las células ciliadas son prismáticas, con núcleos ovales y algo claros donde se pueden observar algunos gránulos de cromatina y presenta largas ciliias. Las células glandulares son muy orangeófilas (tricroómico de Mallory); sus núcleos son algo ovales, con cromatina en gránulos medianos y nucléolo bien visible. Las intersticiales aparecen muy espaciadas, con núcleos basales y claros. Este epitelio reposa sobre una muy conspicua membrana basal. En la vecindad del gonoporo, la vagina posee una musculatura formada por una capa interna y otra externa de fibras musculares longitudinales. Entre ambas se encuentra una capa de fibras circulares. Las 3/4 partes restantes de la longitud del órgano presentan solamente una bien desarrollada capa interna de fibras longitudinales y otra débil externa de fibras circulares.

En el tejido conjuntivo, que rodea a la vagina, se observan células con pigmento ocre y otras células globosas con núcleo oval, que puede llevar 2 nucléolos, con cromatina en gránulos gruesos y cuyo citoplasma es APS positivo pero no metacromático con tionina o azul de toluidina. Estas últimas son reconocidas como células mucosas y también señaladas por Baecker (1932), Carriker & Bilstad (1946) y Pan (1958). También observamos otro tipo celular, similar al anterior, pero con citoplasma APS positivo y β-metacromático con tionina o azul de toluidina. Se trata de las llamadas células de Leydig por Alaphilippe (1956). Estos tipos

celulares se encuentran también rodeando al "carrefour".

H - Vas efferens:

El vas efferens corre junto al oviducto y al llegar a la región media de la glándula ootecal se transforma en glándula prostática. Nace en la cámara macho del "carrefour", en el lado opuesto a la desembocadura del ducto hermafrodita. Se origina como un delgado canalículo, incluido en la pared del "carrefour". Su parte libre en el hemocoele es un grueso ducto.

Ambas partes no tienen la misma estructura histológica y el pasaje de un tipo epitelial al otro no es gradual. El canalículo posee su lumen tapizado por un epitelio ciliado con células prismáticas con núcleos en posición media, ovales y algo oscuros. Sus cilias son largas. El epitelio del lumen de la parte libre y gruesa es ciliado-glandular. Se distinguen dos tipos de células ciliadas: las tetraédricas y las filiformes. En las células glandulares, detectamos proteínas ácidas, lípidos, lípidos enmascarados y mucosustancias ácidas carboxiladas. Por debajo del epitelio corren pocas fibras musculares, con orientación circular.

I - Glándula prostática:

Está constituida por evaginaciones, del vas efferens que pueden bifurcarse. El vas efferens, funciona como

ducto colector de la glándula.

El epitelio de los divertículos prostáticos es ciliado-glandular similar al del vas efferens. Las células ciliadas son en su mayoría del tipo filiforme. Las glandulares con núcleo basales, poseen un citoplasma con secreción globular. Histoquímicamente podemos distinguir tres tipos de células. Un tipo está ubicado en el canal colector. Su secreción es protéica con grupos tioéteres. Los otros dos tipos restantes están localizados en los divertículos. Uno de esos tipos ocupa la zona basal de los divertículos y el otro, la zona distal de los mismos. Las células glandulares localizadas en la zona basal secretan una mucosustancia neutra. Aquellas de la zona distal, secretan una proteína con aminoácidos aromáticos.

Pocas fibras musculares circulares (de 2 a 4), forman parte de la pared del órgano.

J - Vas defferens :

El vas defferens es la parte de la vía macho que va desde la glándula prostática hasta el complejo penial. A lo largo de su trayecto no presenta el mismo aspecto. En su unión con la glándula prostática es achatado y con poca musculatura, para transformarse, a medida que se acerca hacia el complejo penial, en cilíndrico y robusto por el desarrollo de su musculatura longitudinal externa.

El epitelio que tapiza el lumen es ciliado

y disminuye su altura hacia el complejo penial, los núcleos son elipsoidales con cromatina en gránulos gruesos y dispuestos irregularmente. Las ciliias son largas y densas. Este epitelio posee una delgada membrana basal que aumenta de espesor hacia la parte distal. La capa muscular varía desde unas 2 a 3 fibras circulares, cerca de la glándula prostática, hasta convertirse en dos capas de fibras musculares bien constituidas, la interna circular y la exterior longitudinal. Los núcleos de las fibras musculares son claros con cromatina en gránulos grandes. La reacción APS y la del carmín de Best, demuestran la presencia de glucógeno en las células musculares.

K - Complejo penial:

En la posición de reposo, del complejo penial, el gonoporo macho da acceso a una bolsa musculosa, diferenciada en dos regiones: la distal o prepucio y la proximal o vaina del penis. El límite entre estas dos regiones está señalado por una constricción, con una zona interna diferenciada: el diafragma. En el fondo de la vaina, se eleva el penis como continuación de su pared.

El prepucio posee su luz tapizada por un epitelio de células prismáticas, con núcleos basales elipsoidales y cuyos ejes mayores son paralelos a los lados mayores de sus células. La cromatina de estos núcleos está agrupada en gránulos de tamaño grande y mediano, dispuestos

irregularmente. El nucléolo se encuentra rodeado por 3 ó 4 gránulos medianos de cromatina. El epitelio prepucial es fuertemente ciliado, llevando cilias largas y está asentado sobre una conspicua membrana basal.

El sistema muscular prepucial comprende: a) una débil capa circular exterior, semejante a la del tegumento del animal; b) una longitudinal, mucho más desarrollada que la correspondiente tegumentaria y c) una capa interna de aparente tipo circular (trocoideal).

El prepucio, cuando está envainado, presenta dos pilares, el derecho y el izquierdo, siendo este último menos desarrollado que el primero. La musculatura retractora - directora del saco prepucial se compone de ocho músculos, cinco anteriores (derechos) y tres posteriores (izquierdos).

El diafragma está formado por un pequeño cilindro hueco, cuyo límite libre está escotado por catorce digitaciones que se proyectan en la luz del prepucio, permitiendo la comunicación entre los dos sacos del complejo penial. Las digitaciones están revestidas interiormente por un epitelio con ribete en cepillo, que prosigue en la superficie interna no dividida del cilindro, llegando a tapizar un reborde formado internamente por la vaina del penis. El epitelio interno del diafragma presenta células con núcleos ovoidales, basales, con sus ejes mayores paralelos al ribete en cepillo y la cromatina en gránulos gruesos, dispuestos

irregularmente. Por debajo del epitelio, llenando el cuerpo de las proyecciones, corren fibras musculares longitudinales.

El epitelio de la vaina del penis no presenta la misma altura en distintos niveles. En el casquete es bajo, para ir aumentando hacia la vecindad del diafragma. En este nivel se alcanza a observar un ribete en cepillo. En el epitelio se distinguen dos tipos de núcleos, ambos en posición basal. El primero es redondo y el segundo es elíptico; en ambos casos sus dimensiones varían según la región de la vaina donde se encuentran. En el casquete los redondos siempre llevan nucléolos, mientras que en la zona vecina al diafragma, los núcleos redondos presentan solamente cromatina en gránulos gruesos, dispuestos irregularmente. Se detecta una membrana basal fina que cambia de grosor, siendo mas ancha cerca del diafragma.

La pared muscular de la vaina del penis está formada por fibras musculares circulares, entre las que se disponen fibras musculares longitudinales hasta unas $4/5$ partes del largo de la vaina por arriba de la constricción, no detectándose fibras longitudinales en el $1/5$ restante superior. En esta zona, las fibras musculares circulares se encuentran en número pequeño (una docena). En el casquete de la vaina del penis la musculatura no está dispuesta en capas con orientaciones bien definidas.

El epitelio del casquete de la vaina del penis se prolonga en el penis, constituyendo al epitelio

penial exterior, que aumenta su altura hacia su extremo en una forma similar al epitelio de la vaina del penis. Es un epitelio simple, cúbico bajo, con núcleos elipsoidales algo oscuros, con gránulos de cromatina gruesos con disposición irregular. La membrana basal se presenta muy notoria y disminuye de espesor hacia la punta del penis.

El epitelio que tapiza el ducto del penis es continuación del epitelio del vas deferens y va decreciendo en altura a lo largo de todo el penis. Es un epitelio simple, mas o menos plano, ciliado con núcleos elipsoidales con cromatina en grupos grandes distribuidos irregularmente, el citoplasma es claro, reticulado y con raices ciliares bien visibles, las cilias son largas pero de densidad menor que en el vas deferens. La membrana basal es notoria.

La pared muscular del penis, en toda su longitud posee una cavidad a la cual se la denominó en Biomphalaria peregrina, seno penial (Moretto & Nahabedian, 1980) y que está en comunicación directa con el hemocèle por poros situados en el casquete muscular. Una arteriola penetra a esta altura al seno penial y lo recorre hasta cerca de su extremo distal. Las fibras musculares longitudinales predominan en el nacimiento del penis, para ir desapareciendo hacia la punta de este órgano. Lo inverso se observa respecto a las fibras circulares. En la región del penis donde se encuentran ambos tipos de fibras bien desarrollados, la capa longitudinal está junto a la capa circular externa y separada de la circular interna por el seno penial.

2 - Organografía general del sistema reproductor en

Biomphalaria.

Los sistemas reproductores de Biomphalaria glabrata, B. peregrina y B. tenacophila presentan el mismo modelo de organización (Fig. 1 A). Las dimensiones de células, tejidos y órganos, varían en las tres especies, como indican las tablas del 1 al 20.

Tabla 1: Dimensiones de las células del tejido conectivo y células pigmentadas.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | | <u>B. peragrina</u> n = 25 | <u>B. tenacochala</u> n = 25 | <u>B. olabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|---------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| fibroblastos | tamaños | 2,1 por 7,9 (0,71 - 2,95) | 2,7 por 11,0 (1,03 - 4,05) | 2,4 por 11,2 (0,58 - 4,32) |
| | núcleos | 1,8 por 4,1 (0,66 - 1,56) | 2,1 por 4,8 (1,97 - 1,63) | 2,3 por 5,2 (0,69 - 1,87) |
| fibrocitos | tamaños | 1,5 por 7,0 (0,42 - 2,61) | 2,5 por 8,9 (0,91 - 3,07) | 2,1 por 9,6 (0,60 - 3,27) |
| | núcleos | 1,4 por 3,8 (0,57 - 1,33) | 2,3 por 4,1 (0,77 - 1,53) | 1,9 por 4,8 (0,82 - 1,35) |
| células con pigmento negro | tamaños | 2,0 por 20,3 (0,75 - 5,87) | 1,8 por 20,1 (0,73 - 6,23) | 2,6 por 25,8 (1,39 - 7,29) |
| | núcleos | 1,9 por 4,6 (0,67 - 1,65) | 1,5 por 4,0 (0,57 - 1,51) | 2,5 por 5,7 (0,92 - 2,11) |
| células con pigmento ocre | tamaños | 18,2 por 11,7 (6,22 - 4,07) | 21,9 por 16,7 (6,85 - 7,86) | 16,3 por 22,7 (5,47 - 7,98) |
| | núcleos | 2,2 por 3,8 (1,03 - 1,26) | 2,5 por 3,8 (0,83 - 1,37) | 3,9 por 4,4 (1,31 - 1,51) |

Tabla 2: Dimensiones de las células de la línea germinal macho del ovotestis.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | <i>B. peregrina</i> n = 25 | <i>B. tenacophila</i> n = 20 | <i>B. olabrata</i> n = 25 |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| espermatogonias anchos | 4.1 (1.36) | 5.0 (1.68) | 7.6 (2.13) |
| estado alturas | 8.8 (2.97) | 9.1 (3.02) | 12.3 (4.46) |
| "roseta" núcleos | 3.9 (1.28) | 4.9 (1.88) | 5.8 (1.92) |
| espermatocitos anchos | 6.3 (2.39) | 6.8 (1.66) | 9.3 (2.67) |
| estado alturas | 9.2 (3.01) | 10.1 (3.17) | 14.5 (4.86) |
| "epiteloide" núcleos | 5.1 (1.74) | 5.8 (2.24) | 6.6 (2.22) |
| cél. nodrizas alturas | 4.5 (1.14) | 3.2 (3.24) | 4.6 (4.65) |
| en "roseta" núcleos | 3.7 por 8.9 (1.27 - 3.15) | 3.5 por 13.7 (1.10 - 4.93) | 3.7 por 15.8 (1.21 - 4.41) |
| cél. nodrizas alturas | 3.7 (1.66) | 3.4 (1.56) | 3.7 (1.39) |
| en "epiteloide" núcleos | 2.5 por 10.3 (0.68 - 1.86) | 3.8 por 15.8 (0.24 - 3.09) | 3.9 por 16.2 (1.57 - 3.13) |
| cél. nodrizas alturas | 16.3 (4.37) | 15.8 (3.61) | 20.0 (2.78) |
| est. con núcleos | 6.8 por 10.2 (2.14 - 3.66) | 6.7 por 11.7 (1.65 - 2.77) | 7.8 por 14.5 (4.61 - 2.51) |
| espermatidas nucléolos | 3.6 (0.73) | 1.5 (1.02) | 2.1 (0.85) |
| espermatozoides | 1.5 por 3.2 (0.56 - 1.77) | 1.5 por 3.7 (0.63 - 1.52) | 1.9 por 4.7 (0.23 - 1.72) |
| esferas amarillas en células nodrizas | 9.0 por 13.5 (2.31 - 5.85) | 12.1 por 16.9 (2.50 - 7.21) | 11.6 por 17.4 (3.38 - 6.89) |

Tabla 3: Dimensiones de las células de la línea germinal hembra del ovotestis.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. glabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| ovogonia | diámetros | 5,1 (1,23) | 7,2 (1,32) | 11,6 (2,36) |
| | núcleos | 2,3 (1,78) | 2,3 (1,32) | 5,1 (1,62) |
| | nucleólos | 0,4 (0,35) | 0,5 (0,25) | 0,9 (0,38) |
| ovocito joven | diámetros | 5,2 (1,30) | 9,5 (2,62) | 9,1 por 14,7 (2,64 - 3,56) |
| | núcleos | 2,9 (1,54) | 4,6 (1,32) | 7,6 (2,61) |
| | nucleólos | 0,5 (0,20) | 0,6 (0,29) | 1,1 (0,29) |
| ovocito previtelino | diámetros | 19,9 por 28,0 (3,89 - 4,11) | 20,3 por 27,4 (4,61 - 4,85) | 22,2 por 32,4 (5,42 - 6,17) |
| | núcleos | 9,7 (2,13) | 10,4 (2,37) | 12,3 (2,31) |
| | nucleólos | 5,0 (1,28) | 4,2 (1,03) | 6,2 (0,67) |
| ovocitos maduros | diámetros | 46,8 por 76,7 (15,16-29,76) | 58,3 por 62,5 (22,34-19,03) | 56,6 por 79,7 (17,86-28,44) |
| | núcleos | 27,4 por 51,1 (5,82 - 11,96) | 24,2 por 24,7 (5,98 - 7,41) | 20,0 por 44,4 (7,62 - 15,08) |
| | nucleólos | 18,5 (5,88) | 9,8 (3,76) | 13,6 (3,06) |
| cél. nodrizas | núcleos | 6,8 por 19,5 (1,95 - 6,75) | 5,4 por 10,3 (1,19 - 2,98) | 6,7 por 10,5 (2,20 - 2,63) |
| "masa caotica" matriz | | 3,7 a 5,9 (- - - -) | 3,2 a 7,2 (- - - -) | 4,7 a 10,4 (- - - -) |
| | cuerpos basófilos | 4,1 a 10,0 (- - - -) | 6,9 a 11,3 (- - - -) | 8,8 a 15,5 (- - - -) |
| | esferas amarillas | 36,5 a 68,4 (- - - -) | 41,2 a 65,3 (- - - -) | 59,1 a 78,3 (- - - -) |
| cél. tej. vesicular | diámetros | 19,8 por 60,3 (7,40 - 22,41) | 28,7 por 71,6 (11,11-21,65) | 37,8 por 75,6 (13,17-27,83) |

Tabla 4: Dimensiones de las células epiteliales del atrio y del preatrio del ovotestis.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. olabrata</u> n = 25 |
|--|---------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <u>atrio</u> | alturas | 5,8 (0,79) | 6,9 (1,38) | 7,2 (1,22) |
| <u>células</u> | anchos | 6,7 (0,81) | 8,1 (0,97) | 8,5 (2,89) |
| <u>no ciliadas</u> | núcleos | 2,7 por 4,9 (1,10 - 1,27) | 1,6 por 3,6 (0,23 - 0,53) | 2,4 por 4,8 (1,06 - 1,81) |
| <u>atrio</u> | alturas | 5,8 (2,13) | 6,9 (1,75) | 7,2 (2,23) |
| <u>células</u> | anchos | 8,4 (2,56) | 10,7 (3,90) | 11,1 (4,17) |
| <u>ciliadas</u> | núcleos | 2,3 por 4,4 (0,59 - 1,66) | 2,5 por 3,8 (1,02 - 1,15) | 3,8 por 5,4 (1,43 - 1,92) |
| | cilias | 5,2 (2,82) | 6,1 (2,62) | 6,3 (3,23) |
| <u>preatrio</u> | alturas | 4,5 (1,17) | 5,9 (1,83) | 6,8 (0,79) |
| <u>células</u> | anchos | 7,6 (0,97) | 8,8 (3,47) | 9,0 (1,36) |
| <u>no ciliadas</u> | núcleos | 2,3 por 3,9 (0,95 - 0,69) | 2,4 por 3,7 (0,61 - 1,33) | 2,7 por 4,9 (0,77 - 1,88) |
| <u>preatrio</u> | alturas | 4,5 (0,96) | 5,9 (0,83) | 6,8 (2,63) |
| <u>células</u> | anchos | 8,6 (2,38) | 10,5 (3,70) | 11,6 (2,93) |
| <u>ciliadas</u> | núcleos | 2,4 por 4,0 (0,74 - 1,16) | 1,6 por 3,6 (0,35 - 1,14) | 2,4 por 4,8 (0,91 - 1,39) |
| | cilias | 9,5 (4,39) | 12,4 (5,56) | 10,9 (5,06) |

Tabla 5: Dimensiones de las células epiteliales del ducto hermafrodita.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacohila</u> n = 25 | <u>B.glabrata</u> n = 25 |
|--|---------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| epitelio del gonostoma | alturas | 5,7 (1,52) | 6,8 (0,79) | 10,4 (2,57) |
| | anchos | 2,8 (0,81) | 3,0 (0,35) | 3,3 (1,3) |
| | núcleos | 2,7 por 3,9 (1,33 - 1,16) | 2,1 por 2,8 (0,41 - 0,38) | 2,9 por 5,7 (1,79 - 1,34) |
| | cilias | 9,5 (4,83) | 10,9 (5,08) | 12,4 (5,44) |
| vesículas seminales epitelio ciliado | alturas | 5,7 (1,85) | 6,6 (1,68) | 9,5 (2,20) |
| | anchos | 2,2 (0,58) | 2,6 (0,69) | 3,8 (1,03) |
| | núcleos | 1,9 por 3,3 (0,35 - 1,17) | 2,5 por 3,4 (0,78 - 0,86) | 2,5 por 3,8 (0,84 - 0,82) |
| | cilias | 4,2 (1,72) | 3,8 (1,41) | 4,7 (2,01) |
| vesículas seminales epitelio no ciliado | alturas | 9,5 (3,58) | 11,4 (3,72) | 12,3 (2,77) |
| | anchos | 7,6 (1,22) | 8,6 (3,23) | 10,1 (3,05) |
| | núcleos | 2,3 por 6,6 (0,85 - 0,96) | 6,3 (1,51) | 6,6 (2,38) |
| ducto hermafrodita | alturas | 4,1 (1,11) | 5,7 (1,41) | 10,4 (2,39) |
| | anchos | 3,8 (0,57) | 4,7 (0,82) | 3,3 (1,04) |
| | núcleos | 4,2 (1,19) | 3,4 (1,19) | 2,8 por 3,8 (1,09 - 1,81) |
| | cilias | 3,8 (1,73) | 3,8 (1,21) | 5,7 (2,32) |

Tabla 6: Dimensiones de las células epiteliales de la glándula del albumen.

| MEDIA en μm VARIANZAS (...) | | <i>B. peregrina</i> n = 25 | <i>B. tenacophila</i> n = 25 | <i>B. olabrata</i> n = 25 |
|---|---------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <u>glándula del</u> | alturas | 16,2 (4,60) | 19,4 (6,06) | 21,8 (6,12) |
| <u>albumen</u> | anchos | 18,1 (6,11) | 21,7 (6,95) | 28,5 (8,26) |
| <u>células</u> | núcleos | 6,3 por 9,0 (2,46 - 3,51) | 6,8 (2,34) | 7,6 (2,11) |
| <u>glandulares</u> | | | | |
| <u>tetraédricas</u> | núcleos | 2,1 por 2,2 (0,55 - 0,60) | 2,1 por 2,3 (0,54 - 0,66) | 2,8 por 3,3 (0,80 - 0,92) |
| <u>filiformes</u> | núcleos | 1,1 por 7,5 (0,27 - 2,17) | 1,4 por 8,9 (0,40 - 2,24) | 1,6 por 9,5 (0,46 - 2,47) |
| <u>epitelio del</u> | alturas | 9,7 (2,45) | 11,4 (3,26) | 18,6 (5,70) |
| <u>ducto</u> | anchos | 4,3 (1,28) | 2,1 (0,62) | 2,3 (0,77) |
| <u>excretor</u> | núcleos | 3,8 (1,09) | 1,9 por 2,8 (0,54 - 0,75) | 1,9 por 5,2 (0,66 - 1,88) |
| | cilias | 6,7 (3,38) | 5,6 (3,54) | 6,7 (2,88) |

Tabla 7: Dimensiones de las células epiteliales del "carrefour".

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacophila</u> n = 20 | <u>B.glabrata</u> n = 20 |
|--|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <u>"carrefour"</u> | alturas | 16,7 (5,67) | 22,9 (3,72) | 43,2 (10,52) |
| epitelio de | anchos | 3,8 (0,81) | 5,6 (1,57) | 11,2 (3,42) |
| la cámara | núcleos | 1,9 por 5,7 (0,52 - 1,36) | 2,5 por 7,8 (1,85 - 1,77) | 4,9 por 15,7 (1,72 - 5,58) |
| macho | cilias | 8,5 (4,39) | 11,8 (4,15) | 24,5 (10,77) |
| <u>"carrefour"</u> | alturas | 7,6 (2,37) | 10,5 (2,93) | 22,5 (5,39) |
| epitelio bajo | anchos | 3,8 (1,17) | 4,3 (1,87) | 10,2 (2,45) |
| de la cámara | núcleos | 1,9 por 2,8 (0,55 - 0,87) | 2,8 por 3,6 (2,02 - 0,38) | 8,7 por 10,4 (2,13 - 2,91) |
| hembra | cilias | 2,1 (0,47) | 2,8 (0,98) | 6,6 (3,14) |
| <u>"carrefour"</u> | alturas | 28,5 (7,61) | 40,2 (10,83) | 85,1 (20,88) |
| epitelio alto | anchos | 4,7 (1,29) | 6,7 (2,33) | 15,0 (2,97) |
| de la cámara | núcleos | 2,8 por 5,7 (0,62 - 1,25) | 3,6 por 7,7 (2,22 - 0,79) | 7,5 por 16,4 (2,48 - 3,42) |
| hembra | cilias | 7,6 (0,95) | 10,2 (3,89) | 22,0 (5,86) |
| células | diámetros | 7,5 por 15,0 (1,82 - 3,08) | 10,3 por 20,5 (2,21 - 6,64) | 16,7 por 32,6 (3,77 - 5,96) |
| neuro- | núcleos | 5,1 por 10,3 (1,75 - 3,58) | 6,8 por 13,9 (2,12 - 4,32) | 13,6 por 30,8 (3,97 - 6,56) |
| epiteliales | | | | |

Tabla 8: Dimensiones de las células epiteliales del oviducto pre-otecal.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 20 | <u>B.tenacophila</u> n = 25 | <u>B.glabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <u>oviducto</u> | alturas | 71,6 (24,19) | 95,3 (28,50) | 154,6 (49,89) |
| <u>pre-otecal</u> | anchos | 11,1 (4,14) | 12,6 (4,58) | 12,4 (4,29) |
| células columnares | núcleos | 2,7 por 6,3 (0,87 - 2,34) | 3,4 por 6,9 (1,12 - 2,77) | 4,2 por 6,8 (1,25 - 2,08) |
| células globosas | anchos | 14,2 (5,28) | 15,6 (4,68) | 22,4 (7,18) |
| | núcleos | 3,3 por 6,5 (0,85 - 2,17) | 3,9 por 7,7 (1,30 - 2,57) | 4,8 por 12,0 (1,64 - 12,0) |
| tetraédricas | núcleos | 2,2 por 2,9 (0,66 - 0,93) | 2,4 por 3,4 (0,80 - 1,13) | 2,9 por 4,1 (1,08 - 1,03) |
| filiformes | núcleos | 1,9 por 10,2 (0,59 - 3,15) | 2,2 por 11,6 (0,66 - 3,72) | 1,6 por 8,8 (0,52 - 2,78) |

Tabla 9: Dimensiones de las células epiteliales de la glándula cotechal.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 20 | <u>B.tenacochila</u> n = 25 | <u>B.olabrata</u> n = 25 |
|--|----------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <u>oviducto</u> | alturas | 78.8 (32.32) | 112.8 (33.98) | 208.9 (70.06) |
| <u>glándula</u> | anchos | 7.2 (2.21) | 8.3 (2.34) | 10.8 (3.42) |
| <u>cotechal</u> | núcleos | 3.8 por 5.7 (1.48 - 1.69) | 4.0 por 7.3 (1.15 - 2.52) | 4.1 por 8.2 (1.31 - 2.57) |
| | cél. columnares | | | |
| | células anchos | 9.1 (2.63) | 11.9 (4.00) | 12.1 (3.71) |
| | globosas núcleos | 3.1 por 5.8 (1.04 - 2.03) | 4.2 por 6.4 (1.33 - 2.32) | 4.0 por 7.2 (1.19 - 2.10) |
| | tetraédricas núcleos | 1.8 por 2.9 (0.55 - 0.80) | 2.6 por 3.4 (0.69 - 0.94) | 3.1 por 4.1 (0.86 - 1.09) |
| | filiformes núcleos | 0.8 por 5.8 (0.22 - 1.62) | 1.0 por 7.9 (0.34 - 2.35) | 0.8 por 9.2 (0.26 - 3.10) |

Tabla 10: Dimensiones de las células epiteliales del oviducto post-ootecal.

| MEDIAS en μm VARIANZA (...) | | <i>B.peregrina</i> n = 25 | <i>B.tenacochila</i> n = 20 | <i>B.olabrata</i> n = 25 |
|---|----------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <u>oviducto</u> | alturas | 59,3 (19,97) | 71,3 (19,52) | 132,8 (34,06) |
| <u>post-ootecal</u> | anchos | 5,9 (1,48) | 5,3 (1,63) | 6,8 (1,76) |
| <u>glándular</u> | núcleos | 3,2 por 3,6 (1,19 - 1,01) | 4,0 por 5,4 (1,05 - 1,65) | 6,4 por 4,8 (1,79 - 1,49) |
| | cél. columnares | | | |
| | células anchos | 9,1 (2,36) | 11,9 (3,44) | 12,0 (3,11) |
| | ovoidales núcleos | 3,1 por 5,8 (1,09 - 1,72) | 4,2 por 6,4 (1,17 - 1,66) | 4,0 por 7,2 (1,34 - 2,30) |
| | tetraédricas núcleos | 2,3 por 2,4 (0,73 - 0,69) | 2,7 por 2,9 (0,76 - 0,97) | 3,2 por 4,1 (1,01 - 1,06) |
| | filiformes núcleos | 3,1 por 6,3 (0,80 - 1,82) | 1,7 por 10,8 (0,48 - 3,02) | 1,6 por 9,6 (0,46 - 2,71) |

Tabla 11: Dimensiones de las células epiteliales de la bursa copulatrix y de su ducto excretor.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacochila</u> n = 20 | <u>B.glabrata</u> n = 20 |
|--|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <u>bursa</u> | alturas | 4,8 (1,34) | 6,7 (1,73) | 9,7 (3,24) |
| <u>copulatrix</u> | anchos | 6,2 (1,79) | 5,8 (1,57) | 8,5 (2,93) |
| y su | núcleos | 3,4 por 3,6 (0,87 - 1,00) | 3,2 por 3,8 (0,82 - 0,95) | 4,2 por 6,2 (1,57 - 2,17) |
| ducto excretor | espesores chapa estriada | 1,2 (0,33) | 1,2 (0,33) | 1,6 (0,21) |
| membrana basal | espesores | 0,8 (0,22) | 1,0 (0,25) | 0,8 (0,23) |

Tabla 12: Dimensiones de las células epiteliales de la vagina y ciego vaginal.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacochila</u> n = 20 | <u>B.olabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|---------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| vagina y | alturas | 15,7 (4,40) | 17,2 (4,88) | 27,5 (7,71) |
| ciego | anchos | 6,5 (2,17) | 6,8 (2,08) | 12,8 (3,93) |
| vaginal | núcleos | 3,2 por 6,8 (1,07 - 2,18) | 3,4 por 7,8 (0,95 - 2,19) | 6,0 por 12,5 (1,50 - 3,24) |
| | cilias | 7,2 (3,06) | 8,5 (3,65) | 13,2 (5,74) |
| membrana basal | | 2,0 (0,56) | 2,2 (0,60) | 2,7 (0,73) |

Tabla 13: Dimensiones de las células epiteliales del vas efferens.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacochila</u> n = 20 | <u>B. clabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <u>vas efferens</u> | alturas | 15,8 (4,85) | 17,8 (5,49) | 34,0 (10,13) |
| canalículo | anchos | 4,7 (1,31) | 5,2 (1,46) | 9,6 (2,70) |
| ciliado | núcleos | 3,5 por 5,0 (1,08 - 1,49) | 4,1 por 5,6 (1,12 - 1,72) | 7,8 por 8,1 (2,50 - 2,20) |
| | cilias | 7,8 (3,12) | 8,6 (3,20) | 13,9 (5,91) |
| <u>vas efferens</u> | alturas | 61,7 (16,82) | 70,6 (20,41) | 125,4 (47,58) |
| tramo | anchos | 8,5 (2,61) | 9,7 (2,50) | 17,2 (5,55) |
| glandular | núcleos | 5,6 (1,61) | 6,6 (2,02) | 11,6 (3,56) |
| tetraédricas | núcleos | 3,8 por 5,2 (1,06 - 1,42) | 4,9 por 5,8 (1,37 - 1,85) | 7,2 por 10,5 (2,23 - 2,85) |
| filiformes | núcleos | 1,1 por 3,7 (3,34 - 1,15) | 1,9 por 4,7 (0,52 - 1,44) | 2,0 por 7,6 (0,63 - 2,16) |

Tabla 14: Dimensiones de las células epiteliales de la glándula prostática.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacophila</u> n = 20 | <u>B.clabrata</u> n = 25 |
|--|---------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| glándula prostática | alturas | 32,3 (8,86) | 36,8 (12,41) | 66,0 (23,05) |
| | anchos | 10,4 (3,33) | 11,7 (3,73) | 21,6 (7,54) |
| | núcleos | 6,6 (2,03) | 7,4 (2,36) | 13,2 (4,61) |
| filiformes | núcleos | 1,8 por 5,8 (0,64 - 2,10) | 2,1 por 6,8 (0,65 - 2,08) | 3,7 por 12,6 (1,29 - 4,41) |
| tetraédricas | núcleos | 3,6 por 4,9 (1,46 - 1,76) | 5,1 por 6,2 (1,56 - 1,94) | 6,9 por 10,2 (1,78 - 3,16) |

Tabla 15: Dimensiones de las células epiteliales del vas deferens y sus capas musculares.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. glabrata</u> n = 20 |
|--|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <u>vas deferens</u> alturas | 7,6 (2,33) | 8,3 (2,22) | 14,2 (3,94) |
| comienzo del anchos | 3,7 (1,13) | 4,3 (1,24) | 6,7 (1,73) |
| ducto núcleos | 2,7 por 3,9 (0,82 - 1,93) | 3,4 por 4,7 (0,95 - 1,31) | 5,6 por 7,7 (1,79 - 1,73) |
| proximal cilias | 6,4 (2,47) | 7,7 (3,26) | 11,8 (4,28) |
| espesores musc. circ. | 4,1 (1,52) | 4,4 (1,71) | 7,4 (2,88) |
| <u>vas deferens</u> alturas | 7,0 (2,15) | 7,6 (1,95) | 12,6 (3,64) |
| final del anchos | 5,5 (1,68) | 6,3 (2,01) | 9,5 (2,69) |
| ducto núcleos | 4,1 por 4,6 (1,18 - 1,45) | 4,4 por 5,1 (1,40 - 2,01) | 7,1 por 8,1 (2,05 - 2,59) |
| proximal cilias | 6,3 (2,49) | 5,9 (2,33) | 10,8 (4,26) |
| espesores musc. circ. | 36,1 (14,08) | 40,3 (15,32) | 63,2 (29,85) |
| <u>vas deferens</u> alturas | 6,7 (2,05) | 7,5 (2,41) | 12,4 (3,62) |
| comienzo del anchos | 6,8 (2,08) | 7,2 (2,10) | 12,9 (4,13) |
| ducto núcleos | 3,7 por 3,9 (1,03 - 2,08) | 3,0 por 4,7 (0,87 - 1,33) | 5,5 por 7,9 (1,76 - 2,50) |
| distal cilias | 6,1 (2,41) | 6,4 (2,45) | 11,3 (4,42) |
| espesores musc. circ. | 17,2 (6,53) | 19,6 (7,64) | 31,7 (12,93) |
| espesores musc. long. | 23,5 a 40,4 (- - - -) | 26,5 a 45,8 (- - - -) | 43,1 a 72,9 (- - - -) |
| <u>vas deferens</u> alturas | 4,0 (1,24) | 4,7 (1,44) | 6,6 (2,13) |
| final del anchos | 7,1 (2,19) | 10,6 (3,00) | 16,9 (5,19) |
| ducto núcleos | 2,6 por 5,8 (0,82 - 1,79) | 2,8 por 6,4 (0,85 - 1,96) | 4,4 por 10,0 (1,43 - 3,19) |
| distal cilias | 6,6 (2,64) | 7,4 (2,92) | 12,8 (5,05) |
| espesores musc. circ. | 13,7 (4,97) | 15,7 (5,24) | 24,1 (8,75) |
| espesores musc. long. | 21,8 a 36,1 (- - - -) | 24,7 a 40,5 (- - - -) | 30,0 a 42,5 (- - - -) |

Tabla 16: Dimensiones de las células epiteliales del prepucio y sus capas musculares.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. clabrata</u> n = 25 |
|--|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| prepucio | | | |
| alturas | 10,3 (2,89) | 13,6 (3,74) | 10,3 (5,24) |
| anchos | 3,6 (1,01) | 4,0 (1,23) | 4,3 (1,18) |
| núcleos | 2,6 por 5,7 (0,72 - 1,59) | 2,1 por 7,1 (0,65 - 1,21) | 2,1 por 8,1 (0,52 - 2,48) |
| cilias | 16,1 (6,56) | 18,1 (7,36) | 20,2 (8,23) |
| espesores mam. basal | 3,0 (0,92) | 3,8 (1,17) | 4,3 (1,12) |
| espesores | | | |
| musc. circular int. | 10,8 (4,82) | 13,6 (5,54) | 18,9 (7,70) |
| musc. longitudinal | 68,1 (30,53) | 78,7 (37,02) | 108,9 (51,22) |
| musc. circular ext. | 18,1 (7,86) | 20,4 (7,95) | 29,7 (11,78) |

Tabla 17: Dimensiones de las células epiteliales de la zona del diafragma y sus capas musculares.

| MEDIAS (en μm) | | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. clabrata</u> n = 25 |
|----------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| diafragma | alturas | 6,4 (1,96) | 7,2 (2,14) | 10,1 (2,88) |
| | anchos | 2,9 (0,89) | 3,2 (0,92) | 4,7 (1,44) |
| | núcleos | 1,9 por 4,5 (0,58 - 1,38) | 2,2 por 5,0 (0,67 - 1,50) | 3,1 por 7,2 (0,99 - 2,40) |
| espesores ch. estriada | 2,2 (0,66) | 2,5 (0,77) | 3,6 (1,10) | |
| espesores musc. circ. | 6,6 (2,61) | 7,4 (2,81) | 10,2 (4,21) | |
| espesores musc. long. | 90,2 (35,79) | 105,5 (40,11) | 143,4 (59,18) | |

Tabla 18: Dimensiones de las células epiteliales de la vaina del penis y sus capas epiteliales.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | <u>B. peregrina</u> n = 25 | <u>B. tenacophila</u> n = 20 | <u>B. olabrata</u> n = 25 |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| vaina del penis | | | |
| alturas | 5,8 (1,35) | 6,0 (1,73) | 8,5 (2,60) |
| anchos | 7,0 (2,18) | 7,1 (2,17) | 10,1 (2,84) |
| nivel cerca del casquete | | | |
| núcleos | 3,1 (0,72) | 3,3 (0,83) | 3,7 (0,77) |
| núcleolos | 0,8 (0,33) | 0,0 (0,27) | 1,1 (0,38) |
| espesores mem. basal | 2,9 por 3,8 (0,88 - 1,17) | 3,1 por 4,3 (0,81 - 1,37) | 4,2 por 5,3 (1,34 - 1,69) |
| espesores musculatura | 0,3 (0,08) | 0,4 (0,11) | 0,7 (0,21) |
| vaina del penis | | | |
| alturas | 16,7 (4,68) | 17,4 (5,56) | 22,6 (7,23) |
| anchos | 3,0 (0,92) | 3,2 (1,02) | 4,1 (1,18) |
| nivel cerca del diafragma | | | |
| núcleos | 2,8 por 5,6 (0,90 - 1,83) | 3,2 por 6,4 (0,96 - 1,92) | 4,1 por 8,8 (1,25 - 2,56) |
| espesores mem. basal | 0,6 (0,18) | 0,6 (0,18) | 0,7 (0,21) |
| espesores musc. | 24,1 (9,84) | 21,0 (9,29) | 27,4 (10,32) |

Tabla 19: Dimensiones de las células epiteliales del penis a la altura del diafragma y de las capas musculares.

| MEDIAS en μm VARIANZAS (...) | <i>B. perscorina</i> n = 25 | <i>B. tenacophila</i> n = 20 | <i>B. glabrata</i> n = 25 |
|--|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| penis cerca alturas | 4,0 (1,23) | 4,5 (1,36) | 6,3 (2,03) |
| del casquete anchos | 7,1 (2,17) | 8,0 (2,42) | 10,6 (3,41) |
| epitelio núcleos | 2,0 por 4,3 (0,61 - 1,32) | 2,6 por 4,7 (0,78 - 1,42) | 3,6 por 6,8 (1,16 - 2,19) |
| del cilias | 6,0 (2,44) | 6,1 (1,84) | 8,2 (3,33) |
| lumen espesores mem. basal | 1,2 (0,36) | 1,3 (0,39) | 1,8 (0,60) |
| espesores musc. circular int. | 6,7 (2,91) | 6,5 (2,64) | 8,7 (3,78) |
| seno penial | 16,6 (7,21) | 19,2 (7,81) | 25,5 (11,08) |
| musc. longitudinal | 10,6 (4,60) | 11,2 (4,56) | 14,9 (6,47) |
| musc. circular ext. | 4,3 (1,86) | 4,6 (1,87) | 6,4 (2,78) |
| penis alturas | 2,3 (0,70) | 1,9 (0,55) | 3,2 (0,90) |
| epitelio anchos | 6,0 (1,92) | 6,2 (2,06) | 8,3 (2,35) |
| que lo núcleos | 1,8 por 4,9 (0,57 - 1,58) | 2,0 por 5,2 (0,57 - 1,45) | 2,5 por 6,8 (0,86 - 2,17) |
| recubre espesores mem. basal | 1,4 (0,43) | 1,6 (0,59) | 1,8 (0,57) |

Tabla 20: Dimensiones de las células epiteliales del penis a la altura del diafragma y de sus capas musculares.

| MEDIAS en μ m VARIANZAS (...) | <u>B.peregrina</u> n = 25 | <u>B.tenacophila</u> n = 20 | <u>B.olabrata</u> n = 25 |
|---|--|--|--|
| penis cerca alturas del diafrag. anchos epitelio núcleos del ciliae lumen espesores mem. basal | 2,1 (0,58) 7,7 (2,36) 1,0 por 6,9 (0,28 - 2,11) 6,1 (2,38) 0,1 (0,03) | 2,3 (0,64) 8,4 (2,61) 1,1 por 7,8 (0,33 - 2,41) 6,8 (2,09) 0,1 (0,03) | 3,3 (1,00) 12,3 (3,77) 1,6 por 10,7 (0,49 - 3,18) 8,7 (4,04) 0,1 (0,02) |
| espesores musc. circular int. seno penial musc. longitudinal musc. circular ext. | 3,7 (1,48) 12,3 (4,92) 2,8 (1,12) 13,7 (5,48) | 4,1 (1,56) 12,8 (5,32) 3,2 (1,24) 15,4 (5,92) | 5,6 (2,24) 20,5 (7,75) 4,3 (1,79) 20,8 (8,46) |
| penis alturas epitelio anchos que lo núcleos recubre espesores mem. basal | 3,1 (0,95) 5,0 (1,41) 2,0 por 3,0 (0,61 - 0,92) 0,8 (0,32) | 3,5 (0,98) 5,7 (1,59) 2,2 por 3,6 (0,61 - 1,25) 0,9 (0,35) | 4,9 (1,37) 8,0 (2,24) 3,1 por 4,8 (0,95 - 1,34) 1,2 (0,33) |

II. La cápsula de los huevos en Biomphalaria:

1 - Morfología de la cápsula de los huevos.

En Hygrophila, las cigotas pasan al medio ambiente, protegidas por envolturas originadas en el tracto hembras del animal.

Cuando la cigota pasa por el "carrefour" y el tracto hembra, es rodeada por la secreción proveniente de la glándula del albumen y las distintas envolturas, denominadas terciarias (Bondesén, 1950).

La cigota y el albumen están rodeados por la envoltura terciaria de primer orden, llamada **membrana interna** (Nekrassow, 1928a, 1928b, 1929), que es general en todos los pulmonados dulciacuícolas. En los Physidae y Lymnaeidae, puede existir una **membrana externa** o envoltura terciaria de segundo orden. La cigota con el albumen y la membrana interna, constituye el ovum o huevo. Estos, están incluidos en una **sustancia gelatinosa** fundamental, limitada por una membrana terciaria de tercer orden, la **membrana** o **pared capsular** (Fig. 7 A). Todo el conjunto puede llamarse **cápsula**, la capsulae verae de acuerdo a Nekrassow (1928a, 1928b, 1929). En los Physidae y Lymnaeidae, una cubierta gelatinosa externa (pallium gelatinosum), se forma durante la puesta. En los Planorbidae ha sido encontrada una zona

membranosa externa que no llega a formar una envoltura y es posiblemente formada por secreciones del pie (Bondesen, 1950). Envolturas cuaternarias, formadas por la secreción del pie del animal que ovopone, solo ha sido demostrada en los Ancyliidae y Acroloxiidae. Estas presentan una estructura vesicular hialina, que rodea como cápsula externa a la membrana capsular, en este caso la cápsula entera.

En todos los pulmonados dulciacuicolas está presente la "cola terminal" o exitus terminalis. La cápsula puede quedar así, más o menos prolongada en un pico, un tubo o un lóbulo aplanado.

El exitus terminalis es cerrado y libre en Physidae y Acroloxus lacustris, pero en esta última especie, está cubierto por la envoltura cuaternaria. En los Lymnaeidae es generalmente abierto y libre, mientras que en los Planorbidae y Ancylus fluviatilis, es cerrado y gira más o menos hacia la masa central de la cápsula (condición adnate). El exitus terminalis adnate, es aquel que reposa sobre la masa central.

Según Bondesen (1950), se pueden realizar diagnósis por observación de las cápsulas de los huevos, mediante:

- 1) aspecto de la cápsula (consistencia gelatinosa o firme);
- 2) si es cerrada o no;
- 3) el número, forma y tamaño de los huevos;
- 4) si los huevos poseen o no una membrana interna y

externa:

5) el sentido de giro del conjunto de huevos cuando se forma la cápsula;

6) la estructura de la membrana externa y

7) disposición de los huevos.

Las cápsulas de los Planorbidae son ovaladas o rectangulares y planas. El exitus terminalis frecuentemente es adnate, raramente libre. Los huevos no poseen membrana externa. La cápsula se forman con torsión espiral, sin envolturas cuaternarias.

A lo largo del límite convexo de la cápsula corre la sutura operculata, una zona de menor resistencia que se extiende sobre la cápsula ya sea siguiendo el margen o dentro de éste (Figs. 7 C y 7 D); esta sutura opercular, según Bondesen (1950), sería producida por la presión del pie durante la formación de la cápsula. Los huevos normalmente están dispuestos en una capa. Ellos tienen sólo la membrana interna que es sólida y firme. Por la rotura del surco opercular se abre la cápsula y los jóvenes emergen en poco tiempo (Bondesen, 1950).

Un ovum o huevo de los Biomphalaria, está formado por la cigota, rodeada por un fluido perivitelino o albumen, encerrado todo en una membrana perivitelina o membrana interna. Una cierta cantidad de huevos son reunidos dentro de una sustancia gelatinosa y cubiertos por la pared de la cápsula ó membrana terciaria de tercer orden (Fig. 7 A). El conjunto es llamado cápsula de los huevos (Fig. 3 B).

Las envolturas y la sustancia gelatinosa sirven:

1) como un suplemento energético para el desarrollo del embrión;

2) mantienen un adecuado balance hídrico;

3) dan soporte mecánico;

4) posibilitan intercambiar algunos solutos con el entorno;

5) disminuyen la probabilidad de los ataques de predadores y parásitos y

6) no permiten que excesos en los límites de tolerancia de la temperatura perjudiquen a los embriones (Bayne, 1966).

Entre las especies estudiadas, aquéllas que sus cápsulas presentan, relativamente el mayor número de huevos, es Biomphalaria glabrata. Ver Cuadro II.

Los Biomphalaria glabrata poseen cápsulas ovoidales con exitus terminalis corto y ampliamente adnate. La sutura opercular corre en el margen de la cápsula, no cubriendo a los huevos. Estos son poligonales dispuestos en zigzag. El límite externo de los huevos, a menudo marca una línea ondulada en la sustancia gelatinosa (Fig. 3 B).

Las cápsulas de las otras dos especies son semejantes.

Cuadro II: Número de huevos, sus dimensiones y las de las cápsulas, en las tres especies.
Media (varianza).

| (en mm) | | <u>B.peregrina</u> n = 38 | <u>B.tenacophila</u> n = 25 | <u>B.clabrata</u> n = 42 |
|------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| número de huevos | | 1 a 35 | 4 a 40 | 5 a 80 |
| huevos | diámetro mayor | 0,70 (0,25) | 0,80 (0,28) | 0,97 (0,31) |
| | diámetro menor | 0,61 (0,27) | 0,64 (0,19) | 0,81 (0,27) |
| cápsula | largo | 6,87 (2,34) | 7,15 (2,39) | 8,73 (2,99) |
| | ancho | 4,12 (1,32) | 4,33 (1,47) | 5,29 (1,78) |
| | alto | 0,82 (0,22) | 0,88 (0,35) | 1,05 (0,35) |

2 - Puesta.

La puesta de la capsula de los huevos es llevada a cabo de una forma particular y bajo condiciones especiales.

De acuerdo a nuestras observaciones, el animal, detenido en un lugar apropiado, comienza la puesta dejando salir de su gonoporo hembra, un cilindro con extremos romos, que lleva los huevos en una hilera helicoidal (cápsula no flexionada) (Fig. 3 A 1). El cilindro se desliza por sobre el pie, hasta el sustrato y por su extremo se fija a él (Fig. 3 A 2). El animal gira y con el pie modela la forma final de la cápsula, dándole un límite (Fig. 3 A 3). Los Biomphalaria tiene su orificio genital hembra, en su lado izquierdo, por ser un animal sinistrorso. Durante la puesta el animal gira a la derecha y el tubo gira en el sentido de las agujas del reloj curvándose en espiral (Fig. 3 A 4). El animal pasa sobre la cápsula y le da su forma definitiva, dentro de la misma, los huevos quedan dispuestos en zigzag (Fig. 3 A 5). La membrana de la cápsula se esclerotiza, observándose una mayor resistencia a ser perforada con una aguja. De acuerdo a la concentración de oxígeno disuelto en el agua, entre 45 y 75 minutos, queda esclerotizada la membrana capsular.

Experimentalmente, la puesta está condicionada por distintos factores ambientales:

a) luz: favorece la disminución de la intensidad lumínica, es por esto que los animales ponen en la oscuridad o por la noche:

b) temperatura: un descenso de la temperatura en un lapso muy corto, por ejemplo de 6 grados centígrados en 5 minutos, induce la puesta:

c) concentración de sustancias orgánicas: un aumento en la concentración de la materia orgánica, disminución al mismo tiempo de la concentración de oxígeno en el agua y del pH, favorecen la puesta.

Nuestras observaciones también indican que existe una selección del lugar para fijar las cápsulas:

1) hay una estrecha relación con la concentración del oxígeno disponible en el lugar. En acuarios sin aeración, donde el gradiente de disminución del oxígeno va disminuyendo hacia el fondo del recipiente, las cápsulas son puestas cerca de la superficie del agua. Con aeración, no existe preferencia de lugar y el animal pone las cápsulas sin preferencia de lugar, incluyendo el fondo.

2) El sustrato debe ser el adecuado, esto es, toda superficie orgánica, (hojas de lechuga que le sirve de alimento, conchas de animales vivos o muertos) o en la película de bacterias y algas (bioderma) formada sobre superficies de vidrio de los acuarios. Comprobamos también que superficies de cemento plástico de origen Epóxi, son excelentes sustratos, y por ello las utilizamos para nuestros experimentos.

III - Biología de las células nodrizas del sistema reproductor de Biomphalaria glabrata.

1 - Las células nodrizas (trofocitos) del ovotestis.

Las células nodrizas del ovotestis o trofocitos son células acompañantes de las gametas y que elaboran el alimento apropiado y necesario para las mismas.

Los espermatozoides se desarrollan sobre un trofocito con motilidad propia (trofocito móvil). El desarrollo de los ovocitos se cumple mediante una capa (folículo) de trofocitos (trofocitos foliculares) que recubre a la gameta hembra en crecimiento.

Los trofocitos móviles, observados con el MET, presentan sus núcleos con sustancia osmeófila periférica, dejando un centro claro en el cual se destaca el nucléolo. En algunos trofocitos se observan dos núcleos. En el citoplasma se visualizan muchas mitocondrias, distribuidas entre cisternas osmeófilas, gotas de lípidos y gránulos de glucógeno; aparatos de Golgi; retículo endoplasmático granular; lisosomas primarios, con un material finamente granuloso, poco osmeófilo de hasta 0.9 μm de diámetro, situado en la vecindad del núcleo y lisosomas secundarios con gránulos gruesos osmeófilos. Estas células se encuentran unidas a las espermatogonias por uniones citoplasmáticas y desmosomas.

Durante las fases de la espermatogénesis se

observan figuras mielínicas en la zona apical del trofocito móvil. Cuando el trofocito es dejado por sus espermatozoides, esa zona muestra gránulos de 1,4 μ m de diámetro, formados por una membrana elemental, laminillas concentricas y gotas lipídicas.

Los trofocitos foliculares con microscópio de luz presenta núcleos ovoides con gránulos medianos de cromatina y comunmente con más de un nucléolo y citoplasma con finas granulaciones eosinófilas. Con el MET, se observan en la carioteca lóbulos y vesículas en formación hacia el citoplasma. Este posee abundantes mitocondrias, aparato de Golgi, gránulos de glucógeno, un laberinto basal y lisosomas secundarios (Figs. 8 E y 8 F).

2 - Los pigmentos vinculados al ovotestis.

Células pigmentadas.

No existe una definición de pigmento que satisfaga a la vez al bioquímico y al histólogo. Para el bioquímico, un pigmento es una sustancia coloreada, de naturaleza diversa, a menudo proteica, que confiere una coloración al tejido que la contiene. Para el histólogo los pigmentos son estructuras particulares, en general muy finas y a veces agrupadas formando acúmulos, que se encuentran en los tejidos al estado natural y/o patológico, en la célula o por fuera de ella (Ganter y Jollés, 1969 - 1970).

Los pigmentos presentes en este sistema, poseen una coloración natural que va desde el amarillo claro al pardo oscuro, casi negro, característica que comparten las melaninas y los cromolipoides, éstos últimos integrados por los pigmentos lipofucsínicos y los ceroides. Otro carácter en común entre las melaninas y los cromolipoides, es la insolubilidad en los solventes orgánicos utilizados en las preparaciones histológicas, por lo que se conservan en los cortes a la parafina.

Las células pigmentadas se encuentran en el tejido conectivo del animal, en especial modo aquel que recubre al sistema reproductor y en aquellos que limitan a cavidades. La membrana conectiva fibrosa delgada con células pigmentadas que constituye la pared de los sacos de maduración

del ovotestis, es considerada por nosotros como integrante del sistema reproductor. En este tejido describimos las células con pigmento negro y otras con pigmento ocre, células que encontramos de igual manera en el conectivo general.

Definimos a las melaninas como pigmentos de tintes variados, que van del amarillo pálido al negro, conociéndose muchas variedades de composición química vecina, dotadas de propiedades comunes (Ganter y Jollés, 1969 - 1970). En cortes histológicos las melaninas se presentan en general bajo la forma de granulaciones de tamaño variable que van del límite de la visibilidad (2 / 10 μ m) hasta grupos de varios micrómetros. El aspecto ultraestructural de los gránulos de melanina en células de invertebrados no artrópodos fue precisado por Moretto, Sanchez & Vernet (1988) en Nemertea, siendo similar a los gránulos de melanina que presentan los vertebrados.

Desde el punto de vista químico, las melaninas son polímeros nitrogenados, cuyos monómeros de base es, muy probablemente, un indol sustituido, pero como la estructura puede ser irregular y las melaninas naturales están a menudo conjugadas con proteínas, una definición química precisa no es posible. Por otra parte, una determinación exacta de la composición elemental es muy difícil, porque la separación de las melaninas al estado nativo a partir de los pigmentos y las proteínas que las envuelven, es extremadamente delicada.

Algunos autores efectuaron ensayos

sintéticos a partir de la tirosina, por medio de la tirosinasa y por autooxidación, lo que permite llegar a modelos experimentales que dan una idea de la estructura de las melaninas (Bullock & Harley-Mason, 1951), pero estos ensayos no representan una reproducción exacta de la melanogénesis natural. Las relaciones entre las melaninas naturales y las sintéticas, queda en discusión.

La aparición de colores muy diferentes es debida, en gran parte, a los grados diversos de oxidación del pigmento, pero la estructura misma y la sustitución de ciertas porciones, tendría un rol en la coloración de las melaninas, como lo sugieren las experiencias de síntesis a partir de derivados de la dihidroxifenilalanina (DOPA) y del dihidroxi,5-6,indol, cuyas porciones bien definidas están bloqueadas por el grupo metilo. Se obtiene así, según el emplazamiento de las sustituciones, pigmentos de coloración diferentes (Cromartie & Harley-Mason, 1957).

En Biomphalaria glabrata, las células con pigmento negro, al MET, muestran un núcleo con poca actividad. En su citoplasma se observan algunas mitocondrias, un retículo endoplasmático granular y un cuerpo de Golgi rodeado por premelanosomas. Los melanosomas promedian 0.5 μ m de diámetro, formando esferas casi perfectas (Fig. 8 G). Las células con pigmento ocre muestran un núcleo con su membrana nuclear lobulada. En su citoplasma, gran cantidad de mitocondrias, un retículo endoplasmático granular grande, distribuido en gran parte de la célula, y cuerpos de Golgi.

Cercano a éstos, son observados premelanosomas y melanosomas, poseyendo los maduros, entre 0,4 y 0,8 μm de diámetro. La membrana plasmática presenta pinocitosis.

Los métodos empleados para investigar las propiedades físicas y las histoquímicas de los pigmentos negro y ocre presentes en las células del tejido conectivo, determinan la presencia de melaninas (Cuadro III). Estas se caracterizan por su resistencia a los solventes orgánicos, su propiedad de decolorarse mediante ciertos oxidantes, su basofilia y su argirofilia; ser positivas a las reacciones de Schmorl y al método de Lillie con hierro ferroso; colorearse de igual manera con el método de Lillie con azul de Nilo, en preparados hidratados y deshidratados, y por sus resultados negativos en las pruebas para fluorescencia; para lípidos y en el método de Hueck.

Las diferencias observadas entre los dos tipos de células pigmentadas son:

a) en los distintos tiempos de decoloración, siendo el pigmento negro el más resistente;

b) en los resultados positivos obtenidos en las células con pigmento ocre, para los métodos del APS, APAS y APFS, que pueden deberse a la producción de aldehídos que algunas melaninas pueden generar por una oxidación de lípidos insaturados a los cuales están asociadas (Pearse, 1968 - 1972) y

c) la demostración de precursores del pigmento

melánico mediante la reacción de Schmorl en el citoplasma no pigmentado de las células con pigmento ocre. El método de Morel y Sisley, para proteínas con alta proporción de tirosina, confirma estos precursores melánicos, en los mismos sitios donde se demuestran con el método de Schmorl (Fig. 5 B).

Cuadro III: Análisis histoquímico de las melaninas.

| Metodos empleados | Células con pigmento ocre | Células con pigmento negro |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| En blanco, en cortes por congelación | ocre | negro |
| En blanco, en cortes a la parafina | ocre | negro |
| Decoloración por permanganato 0,1% | 24 horas | 24 horas |
| Decoloración por permanganato 0,25% | 20 minutos | 30 minutos |
| Decoloración por ácido peryódico | 2 horas | 3 horas |
| Decoloración por ácido peracético | 3 horas | 3 a 4 horas |
| Decoloración por ácido crómico | 5 horas | 6 horas |
| Decoloración por ácido nítrico | 1 hora | 3 horas |
| Decoloración por peróxido de hidróg. | 24 horas | 24 horas |
| Decoloración por el método de Gomori | en minutos | en minutos |
| Decoloración por el método de Mayer | 24 horas | 24 horas |
| Prueba para fluorescencia | negativo (-) | negativo (-) |
| Método para lípidos (tem. ambiente) | ocre (-) | negro (-) |
| Método para lípidos (a 60 C°) | ocre (-) | negro (-) |
| Prueba de basofilia con tionina | azul (+) | negro azulado (+) |
| Reacción argentafín clásica | negro (+) | negro (+) |
| Reacción de Schmorl | azul (+) | azul negruzco(+) |
| Método de Perle | ocre (-) | negro (-) |
| Método de Lillie (hierro ferroso) | verde (+) | azul oscuro(++) |
| Método de Hueck | no aparece | no aparece |

Cuadro III: Análisis histoquímico de las melaninas.

| Metodos empleados | Células con pigmento ocre | Células con pigmento negro |
|--|---------------------------|----------------------------|
| Método de Lillie con azul de Nilo A (hidratado) | azul verdoso (+) | azul obscuro (+) |
| Método de Lillie con azul de Nilo A (deshidratado) | azul verdoso (+) | azul obscuro (+) |
| Reactivo de Schiff | ocre (-) | negro (-) |
| APS | púrpura (+) | negro (-) |
| APAS | púrpura (+) | negro (-) |
| APFS | púrpura (+) | negro (-) |

3 - La "masa caótica"

En el fondo de cada una de los sacos de maduración del ovotestis de Biomphalaria glabrata, así como en las otras especies estudiadas para referencia, se encuentra la "masa caótica" ya descrita en apartado I.

En cortes histológicos obtenidos ya sea por congelación, ya sea a la parafina y en blanco, la "masa caótica" se visualiza coloreada desde el amarillo brillante al amarillo parduzco.

Hemos definido a la "masa caótica" como formada por una matriz, con cuerpos basófilos y esferas amarillas. La localización de los cuerpos basófilos y de las esferas amarillas difieren: los primeros se encuentran generalmente, contra la pared del órgano, mientras que las segundas están situadas hacia la luz del saco de maduración. La matriz está formada por gránulos de distintos diámetros, término medio 7,5 μm . Los cuerpos basófilos consisten en acúmulos de gránulos, de 12,1 μm ; mientras que algunas esferas amarillas promedian 68,7 μm de diámetro. En su interior se observan puntuaciones granulares más oscuras de 11,3 μm .

Las lipofuscinas son pigmentos definidos casi exclusivamente por caracteres morfológicos e histoquímicos, que son esencialmente los siguientes:

- a) pigmentos granulares pardo amarillentos;

b) resistencia a los solventes utilizados durante las inclusiones en parafina;

c) no dan resultados positivos con el método de Perls;

d) con azul Nilo se colorean de azul y

e) con luz ultravioleta presentan una fluorescencia de amarilla a parda.

Las lipofuscinas pertenecen a un grupo heterogéneo de sustancias pigmentadas y representan productos de oxidación de precursores lipídicos o lipoproteínas, pero su carácter histoquímico presenta variaciones en función del origen, del lugar y del modo de formación del pigmento, así como también su grado de oxidación.

Los ceroides son cromolipoides que se definen por un conjunto de caracteres histoquímicos muy cercanos a aquellos que definen a las lipofuscinas, y con características particulares como ser:

a) forman granulaciones amarillentas con afinidad por los colorantes de las grasas;

b) resisten los solventes en las preparaciones a la parafina;

c) dan resultados negativos con el método de Perls;

d) con azul Nilo toman un color de azul a púrpura;

e) fluorescencia amarilla a pardo claro y

f) fuerte ácidosresistencia.

Morfológicamente los ceroides se presentan bajo el aspecto de granulaciones de 1 a 20 μ m de diámetro. Pearse (1968 - 1972), considera que los ceroides, no representan nada más que una fase precoz de la constitución de los lípidos lipofuscínicos, caracterizados por una oxidación poco pronunciada. El depósito de pigmentos ceroides en el organismo, está considerado como un estado de deficiencia, en los tejidos, de factores autooxidantes liposolubles. Un estado tal podría estar ligado a variaciones de composición de los lípidos, a la presencia de factores peroxidantes tales como en el metabolismo proteico o a una tasa pequeña de autooxidantes tisulares (Witting, 1965).

El análisis ultraestructural de la "masa caótica" revela gránulos cuya estructuración no los caracteriza como de melaninas, pero sí de gránulos de lipofuscinas. Estos son redondos, con un contenido osmiófilo y sin membrana.

El análisis histoquímico no detectó pigmentos melánicos, ni carotenoides. El Cuadro IV, indica los resultados positivos, solamente para los cuerpos basófilos y la matriz, cuando se estudian los lípidos (Figs. 5 F y 5 G), la basofilia y la argirofilia, y se aplica la fluorescencia. Se demuestra también, la naturaleza lipofuscínica y de pigmento cerolide con los métodos de Schmorl (Fig. 5 H), de Hueck y de Lorrain - Smith.

La matriz y los cuerpos basófilos se diferencian histoquímicamente, entre sí. Los cuerpos basófilos dan positivo con los procedimientos que detectan lipofuscinas: el método de Lillie con azul Nilo en preparaciones hidratadas, y el método de Gomori. Los pigmentos ceroides, se detectan en la matriz, mediante el método de Feyter para los lípidos ácidos. La reacción plasmal (método de Hayes) (Fig. 5 G) y el método de Ziehl - Neelsen (Fig. 5 D), los señalan, a éstos últimos, como sustancias derivadas de la oxidación de lípidos no saturados y con una alta ácidosresistencia.

La matriz de la "masa caótica" sometida a la luz fluorescente toma un color pardo dorado (pigmento ceroide) y los cuerpos basófilos, un color naranja (sustancia lipofuscínica), lo que confirma nuestros resultados histoquímicos.

Los métodos de Lison, APAS y APFS, revelan un mayor resultado positivo en los cuerpos basófilos que en la matriz, lo que interpretamos como una acentuada concentración de lípidos insaturados (fosfolípidos insaturados). La reacción positiva del APS demuestra el estado intermedio de oxidación de lípidos insaturados.

La basofilia aumenta con el grado de oxidación (pigmento ceroide --- (oxígeno) ---> lipofuscina), como nos indican los métodos empleados de la tionina y el azul de toluidina.

En general las esferas amarillas no reaccionaron con los métodos histoquímicos utilizados. En

ciertos casos se observó en el interior de algunas esferas amarillas, un material granular con reactividad similar a la matriz, lo que indicaría que esos gránulos estarían constituidos por pigmentos ceroides (Fig. 5 G).

Cuadro IV: Análisis histoquímico de los pigmentos cromolipoides.

| Métodos empleados | Esferas amarillas | Cuerpos basófilos (lipo-fucina) | Matriz (pigmento ceroide) |
|---|-------------------|---------------------------------|---------------------------|
| En blanco, en cortes por congelación | amarillo claro | amarillo brillante | amarillo pardusco |
| En blanco, en cortes a la parafina | amarillo claro | amarillo brillante | amarillo pardusco |
| Decoloración por peróxido | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Decoloración por ác. crómico | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Decoloración por ác. peryódico | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Prueba para fluorescencia | negativo(-) | naranja(+) | pardo dorado(+) |
| Mét. para lípidos (tem. amb.) | amarillo(-) | negro (+) | negro (+) |
| Mét. para lípidos (a 60 C°) | amarillo(-) | negro (+) | negro (+) |
| Mét. para lípidos (desenmasc.) | amarillo(-) | negro (+) | negro (+) |
| Basofilia: tionina | amarillo(-) | azul (++) | celeste (+) |
| Basofilia: azul de toluidina | amarillo(-) | azul (+) | amarillo(-) |
| Reacción argentafin clásica | marrón (-) | negro (++) | negro (+) |
| Método de Schmorl | amarillo(-) | azul (+) | celeste(+) |
| Método de Perlé | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Mét. de Lillie (hierro ferroso) | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Método de Hueck | amarillo(-) | azul (++) | celeste(+) |
| Mét. Lillie azul de Nilo A (hidratado) | amarillo(-) | azul (+) | amarillo(-) |
| Mét. Lillie azul de Nilo A (deshidratado) | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Método de Gomori | amarillo(-) | azul (+) | amarillo(-) |
| Reactivo de Schiff | amarillo(-) | rosado (+) | amarillo(-) |

Cuadro IV: Análisis histoquímico de los pigmentos cromolipoides.

| Métodos empleados | Esferas amarillas | Cuerpos basófilos (lipo-fucina) | Matriz (pigmento ceroide) |
|---|-------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Método de Hayes | amarillo(-) | violáceo(+) | púrpura(++) |
| Método de Lison | amarillo(-) | púrpura(+) | rosado(+/-) |
| APS | amarillo(-) | púrpura claro (+/-) | púrpura(+) |
| APAS | amarillo(-) | púrpura(++) | púrpura(+) |
| APFS | amarillo(-) | púrpura(++) | púrpura(+) |
| <u>CAROTENOIDES</u> | | | |
| Líquido de Lugol | amarillo(-) | amarillo(-) | amarillo(-) |
| Solución de ácido sulfúrico | amarillo(-) | rojo tenue (+) | rojo tenue (+) |
| <u>ACIDORESISTENCIA</u> | | | |
| Método de Ziehl - Neelsen | amarillo(-) | amarillo(-) | violeta(+) |
| <u>LIPIDOS CON CARACTER ACIDO</u> | | | |
| Método de Lorrain - Smith | amarillo(-) | azul (+) | violáceo(+) |
| <u>LIPIDOS ACIDOS Y MUCOSUSTANCIAS ACIDAS</u> | | | |
| Método de Feyter | verdoso(-) | celeste(-) | violeta(+) |

4 - Ciclo de los trofocitos.

El trofocito móvil con su carga de células sexuales macho, se desplaza por sobre la pared del saco de maduración recibiendo los nutrientes, desde el líquido hemocélico que pasa desde el otro lado de la pared. Las espermatogonias desprendidas del epitelio germinativo, se dividen en dos células, la basal, se transforma en trofocito móvil, mientras que las divisiones y transformaciones sucesivas de la otra superior, darán los espermatozoides. Cuando las espermatidas se transforman en espermatozoides, el citoplasma remanente pasa al trofocito. Una vez que se liberan los espermatozoides, el trofocito se autoliza, dejando en libertad sustancias que van a integrar la "masa caótica".

Los ovocitos previtelinos, por medio de un movimiento ameboidal, se desplazan, desde el epitelio germinativo hasta un lugar determinado de la pared del saco de maduración, junto a la "masa caótica". Allí, se detienen y rodeado por los trofocitos foliculares, da comienzo a su vitelogénesis. Cuando el ovocito maduro deja su folículo, los trofocitos que forman a éste, degeneran y pasan a aumentar la "masa caótica" del saco de maduración.

Los ensayos histoquímicos señalan que en los trofocitos, tanto móviles como foliculares, se encuentra gran cantidad de lípido. Por los métodos de Lison, APAS y

APFS, se detectan, en ellos, sustancias lipídicas insaturadas. Los métodos de Feyter y de Lorrain - Smith, señalan que estas son ácidas, mientras que los métodos de Hayes y APFS, nos indican que son sulfatadas y fosfatadas. Respecto a las proteínas, están presente en forma libre y son más abundantes en los trofocitos móviles que en los foliculares.

Las esferas amarillas, las cuales derivan de los trofocitos móviles, están constituidos por mucosustancias ácidas (Hale) (Fig. 5 I) y proteínas que forman precipitados con soluciones de ferricianuro y de tannino.

Todos estos resultados se demuestran en el Cuadro V.

Las oxidaciones progresivas de los lípidos en la evolución de los dos tipos de trofocitos producen los cromolipoides de la "masa caótica". Esto es, la "masa caótica" tiene el carácter de una excreta. A esta zona donde se acumula la "masa caótica" se podría llamar excretófora.

Las esferas amarillas se encuentran en el preatrio. Esto nos indicaría que ellas constituirían un complejo nutricional utilizable por los espermatozoides foráneos, puesto que éstos se ven relacionados a las esferas amarillas, en esa región.

Cuadro V: Análisis histoquímico de los trofocitos.

| Métodos empleados | trofocitos línea hembra | trofocitos línea macho |
|---|-------------------------------|------------------------------|
| Método para lípidos (tem. ambiente) | negro (++) | negro (++) |
| Basofilia: tionina | celeste(-) | azul (+) |
| Basofilia: azul de toluidina | celeste(-) | azul (+) |
| Método de Schmorl | normal (-) | celeste(-) |
| Método de Perls | normal (-) | normal (-) |
| Método de Lillie (hierro ferroso) | normal (-) | celeste(-) |
| Método de Hueck | celeste(-) | celeste(-) |
| Reacción argentafin clásica | gris (-) | negro (+) |
| Método de Lillie, azul de Nilo (hidrat.) | normal (-) | normal (-) |
| Método de Lillie, azul de Nilo (deshid.) | normal (-) | normal (-) |
| Método de Gomori | normal (-) | celeste(+) |
| Reactivo de Schiff | normal (-) | normal (-) |
| Método de Hayes | rosa (+-) | rosa (+-) |
| Método de Lison | normal (-) | rosado (+) |
| APS | púrpura tenue (+- | púrpura tenue (+- |
| APAS | púrpura(++) | púrpura(++) |
| APFS | púrpura(++) | púrpura(++) |
| <u>ACIDORESISTENCIA</u> | | |
| Método de Ziehl - Neelsen | normal (-) | violeta(+) |
| <u>LIPIDOS CON CARACTER ACIDO</u> | | |
| Método de Lorreain - Smith | celeste(+) | azul (++) |
| <u>LIPIDOS ACIDOS Y MUCOSUSTANCIAS ACIDAS</u> | | |
| Método de Feyter | violeta(++) | violeta(++) |

Cuadro V: Análisis histoquímico de los trofocitos.

| Métodos empleados | trofocitos línea hembra | trofocitos línea macho |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <u>MUCOSUSTANCIAS ACIDAS</u> | | |
| Método de Feyter (deslipidizado) | violeta(+) | violeta(+) |
| Método de Hale | celeste(+) | azul (++) |
| Método de Steedman, var. Spicer | celeste(+) | celeste(+) |
| <u>PROTEINAS</u> | | |
| Método de Hartig - Zacharias | celeste(+) | azul (++) |
| Método de Salazar | gris (+-) | negro (+) |
| Método de Deitch | amarillento (+-) | amarillo(+) |

IV - Funcionamiento del tracto genital hembra en

Biomphalaria glabrata.

Formación de la cápsula de los huevos.

1 - Secreciones del tracto genital hembra.

Los ovocitos maduros son fecundados en el atrio o preatrio por los espermatozoides foráneos (entrecruzamiento) o en las vesículas seminales por los espermatozoides autóctonos (hermafroditismo). La cigota pasa por el ducto hermafrodita hasta el "carrefour", en donde es derivada desde la cámara macho hasta la cámara hembra, siendo envuelta por la secreción de la glándula del albumen.

El extremo distal de las células secretoras de la glándula del albumen, en Biomphalaria glabrata contiene glóbulos APS positivos, en donde el galactógeno está localizado (von Brand & Files, 1947; Correa, Dmytraczenko & Duarte, 1967). Además, se encontró glucógeno en su epitelio glandular, pero no así, en las cápsulas de los huevos, considerando a esta sustancia como una reserva material para el metabolismo de las células glandulares (McMahon, von Brand & Nolan, 1957).

En los pulmonados, el albumen es un fluido complejo conteniendo además de galactógeno, proteínas, glicoproteínas, algunos aminoácidos libres (Bayne, 1966) y

calcio (Morrill, 1963; Morrill, Norris & Smith, 1964; Bayne, 1966).

La cigota con su cubierta de albumen entra en el oviducto. Este genera, según sus regiones, las sustancias que entraran en la formación de las envolturas de la cápsula de los huevos.

De acuerdo a Jong-Brink (1967) y Duncan (1975), en los Basommatophora, el oviducto secreta fundamentalmente mucosustancias.

2 - Histoquímica del tracto genital hembra.

Las distintas secreciones encontradas por nosotros en las células secretoras del tracto hembra, diferencian distintos tipos celulares, según las regiones del tracto.

Región pre-otecal:

Las sustancias detectadas en el epitelio de esta región son mucosustancias ácidas, proteínas y lipoproteínas (Cuadro VI).

En las células secretoras columnares o tipo celular A, de la primera porción de este tramo (Fig. 6 B), se encuentra una mucosustancia ácida sulfatada, notoria por su γ -metacromasia que resiste bajo pH, deshidratación y concentración de nitrato de uranilo de 0,001N y proteínas con aminoácidos aromáticos (= tirosina), grupos tioéteres y tioles. En el resto de la región, se encuentran los tipos celulares B y C (Fig. 6 D). El primer tipo celular es columnar y secreta una mucosustancia ácida carboxilada con β -metacromasia, que no resiste bajo pH, deshidratación y concentraciones de nitrato de uranilo de 0,001N. El tipo celular C es globoso y secreta lipoproteínas (Fig. 6 E).

Glándula cotelal:

En esta glándula existe alta proporción de mucosustancias ácidas carboxiladas y baja cantidad de mucosustancias ácidas sulfatadas. Se encuentran proteínas, con baja reacción a la tirosina y a los puentes disulfuro (tioéteres). No se detectó lípidos ni lipoproteínas. (Cuadro VI).

El tipo celular D, de la glándula cotelal, es columnar y se distribuye a lo largo del cuerpo principal del órgano, secretando mucosustancias ácidas sulfatadas. El tipo celular E, es ovoidal y se encuentra en la parte más dilatada de la glándula y en su extremo distal secreta una mucosustancia ácida carboxilada. El tercer tipo celular, es el F, columnar, con una secreción protéica con poca reactividad a los aminoácidos aromáticos y con grupos tioéteres sin grupos tioles.

Región post-cotelal:

Esta región se distingue por sus dos epitelios el de la pared izquierda y el de la derecha.

El epitelio de la pared izquierda, está constituido por el tipo celular G, columnar, en el cual se detecta la presencia de mucosustancias neutras. En la porción basal de esas células se detectaron lípidos (Cuadro VI) (Fig. 6 I).

El epitelio de la pared derecha, está formado, por dos tipos celulares el E y el F, pertenecientes a la glándula cotecal y que se prolongan en esta región post-cotecal. El tipo E, secreta mucosustancias ácidas y el tipo F, proteínas. El tipo celular F, de esta región posee una mayor proporción de aminoácidos con grupos tioles y tioéteres y sin aminoácidos aromáticos (Cuadro VI).

Vagina:

Las células secretoras que se presentan en este tramo, dan positiva la reacción para mucoides (esterificación sulfúrica - metacromasia).

En ninguna de las tres regiones del oviducto se encontraron niveles de calcio iónico, detectable con los métodos histoquímicos empleados (Cuadro VI).

En el Cuadro VII y en la Fig. 2, se comparan los distintos tipos celulares, de acuerdo a sus secreciones y su distribución.

Cuadro VI: Análisis histoquímico del oviducto.

| Metodos empleados | región pre-ootecal | glándula ootecal | región post-ootecal |
|--|------------------------|------------------|---------------------|
| Mét. para lípidos (tem. amb.) | no toma(-) | no toma(-) | gris (+-) |
| Mét. para lípidos (60 C°) | no toma(-) | no toma(-) | gris (+-) |
| Mét. para lípidos (desenmasc.) | gris (+-) | no toma(-) | gris (+-) |
| <u>LIPIDOS</u> | | | |
| Método de Feyter | violeta(+) | violeta(+) | azul (-) |
| Método de Feyter (desenmasc.) | violeta(++) | violeta(+) | azul (-) |
| <u>MUCOSUSTANCIAS ACIDAS</u> | | | |
| Método de Feyter (deslipid.) | violeta(+) | violeta(+) | azul (-) |
| Método de Salazar | negro (++) | gris (+-) | gris (+-) |
| Método de Hale | azul (+) | azul (+) | no toma(-) |
| Método de Halmi y Davies | púrpura(+) | púrpura(+) | púrpura(+) |
| Mét. de Steedman, var. Mowry | azul (++) | celeste(+) | no toma(-) |
| Mét. de Steedman, var. Spicer | azul (++) | celeste(+) | no toma(-) |
| Metacromacia, azul de toluid. pH 4,4 en medio acuoso | púrpura(++) | púrpura(++) | púrpura(++) |
| Metacromacia, azul de toluid. pH 4,4 en bálsamo | algo violáceo (+--) | violáceo (+-) | celeste(-) |
| Metilación + metacromacia | azul (-) | celeste(-) | celeste(-) |
| Met. + saponificación + metac. | violeta(+) | violeta(+) | violeta(+) |
| Metacromacia, azul de toluid. pH 3,4 en medio acuoso | púrpura(+) | púrpura(+) | celeste(-) |
| Metacromacia, azul de toluid. pH 3,4 + nitrato de uranilo, en medio acuoso | azul (-) | púrpura(+) | celeste(-) |
| Reactivo de Schiff | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |
| APS | púrpura(++) | púrpura(+) | púrpura(++) |

Cuadro VI: Análisis histoquímico del oviducto.

| Metodos empleados | región pre-cotecal | glándula cotecal | región post-cotecal |
|--|--------------------|------------------|---------------------|
| APAS | púrpura(++) | púrpura(+) | púrpura(++) |
| APFS | púrpura(+) | rosado (-) | púrpura(+) |
| <u>PROTEINAS</u> | | | |
| Método de Hartig - Zacharias | azul (++) | azul (+) | azul (++) |
| Método de Deitch | amarillo(+) | no toma(-) | amarillo(+) |
| Método de Morel y Sisley | rosa (++) | rosado (+) | no toma(-) |
| Mét. de Chèvremont y Frédéric | celeste(+) | no toma(-) | azul (++) |
| Método de la fucs. paraldehído con oxidación | púrpura(+) | celeste(-) | púrpura(+) |
| Método de Adams y Sloper | azul (+) | celeste(+/-) | azul (+) |
| Reducción + Chèvremont y Frédéric | azul (++) | celeste(+) | azul (++) |
| Bloqueo (sublimado) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |
| Bloqueo (iodo) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |
| Bloqueo + reducc. + Chèvremont y Frédéric | azul (+++) | celeste(+) | azul (+++) |
| APYAT | azul (++) | azul (+) | azul (++) |
| APAAT | azul (++) | celeste(-) | celeste(-) |
| APFAT | azul (++) | celeste(-) | azul (+) |
| <u>AMILOIDE</u> | | | |
| Método de Lebrum | celeste(-) | celeste(-) | rosado(+/-) |
| Método de Bancroft | verdoso(-) | verdoso(-) | rosado(+/-) |
| Método de Bennhold: variante de Highman | no toma(-) | no toma(-) | rosado(+/-) |
| variante de Puchtler | no toma(-) | no toma(-) | rojo (+) |

Cuadro VI: Análisis histoquímico del oviducto.

| Metodos empleados | región pre- cotecal | glándula cotecal | región post- cotecal |
|---|------------------------|---------------------|-------------------------|
| Birrefringencia posterior al tratamiento con rojo Congo | negativa | negativa | negativa |
| <u>CALCIO</u> | | | |
| Método de von Kossà | gris (-) | gris (-) | gris (-) |
| Método con negro eriocromo T | azul (-) | azul (-) | azul (-) |
| Método de Dahl y McGee-Russel | no toma(-) | no toma(-) | rojo (+) |
| Descalcificado + Dahl y McGee-Russel | no toma(-) | no toma(-) | rojo (+) |

Cuadro VII: Distribución de los tipos celulares y su naturaleza histoquímica.

| REGIONES DEL TRACTO HEMBRA | TIPOS CELULARES | NATURALEZA HISTOQUIMICA |
|----------------------------|-----------------|--|
| oviducto pre-ootecal | A | Mucosustancias ácidas sulfatadas y proteínas con aminoácidos aromáticos y con grupos tioles y tioéteres. |
| | B | Mucosustancias ácidas carboxiladas. |
| | C | Lipoproteínas. |
| glándula ootecal | D | Mucosustancias ácidas sulfatadas. |
| | E | Mucosustancias ácidas carboxiladas. |
| | F | Proteínas con baja reacción a los aminoácidos aromáticos y a los grupos tioéteres. |
| oviducto post-ootecal | G | Mucosustancias neutras y proteínas con aminoácidos con grupos tioles y tioéteres. |
| vagina | H | Mucoide. |

3 - Naturaleza y origen de las envolturas de la cápsula.

1) Fluido perivitelino o albumen:

El galactógeno se encuentra en la secreción de la glándula del albumen y por consiguiente en el albumen que rodea a los huevos fertilizados. (Duncan, 1975).

En nuestro caso, presenta β -metacromasia, es APS positivo y se tiñe con el carmín de Best, lo que confirma la regla general.

Las reacciones para lípidos y lipoproteínas nos mostraron que ellos existen en baja cantidad en el albumen. También demostramos la presencia de bajas concentraciones de mucosustancias ácidas y pocas proteínas ácidas, pobres en aminoácidos aromáticos, grupos tióles y tioéteres (Cuadro VIII).

2) Membrana interna o perivitelina.

Se tiñe ligeramente con la hematoxilina y es APS positiva. No permite el pasaje de los colorantes, sólo en el caso de estar dañada.

Está formada por proteínas que presentan aminoácidos aromáticos y uniones de tipo disulfuro, y mucosustancias ácidas sulfatadas. No se encuentran ni lípidos ni lipoproteínas (Cuadro VIII).

Su aspecto ultraestructural es el que se muestra en la Figura 9 A, teniendo un espesor de 0,2 μ m.

Se forma en la zona anterior de la región pre-cotecal del oviducto.

3) Sustancia gelatinosa:

La sustancia en la cual están incluidos los huevos o sustancia gelatinosa, muestra una red fibrilar APS positiva que se observa en las Figuras 7 B y 7 E. Los ensayos de metacromasia (método de Bancroft, método de Lendrum) dan resultados positivos (β -metacromacia) (Cuadro VIII).

Sospechando que esa sustancia tuviera una naturaleza amiloideasea, se realizó el método de Bennhold, variantes de Higmann y Puchtler, utilizando rojo Congo y la ulterior prueba de birrefringencia (Fig. 7 F). En todos estos ensayos se obtubieron resultados positivos, por lo que se demostraría la presencia de una sustancia de tipo amiloide. Esto fue corroborado por comparación mediante el ensayo simultaneo con preparados de córnea humana afectada con amiloidiasis.

Para esclarecer la naturaleza de la sustancia gelatinosa realizamos el estudio de su ultraestructura. En el MET esta sustancia muestra una estructura de haces entrelazados irregularmente, formado cada uno por microfibrillas de aproximadamente 23 nm de espesor (Figs. 9 A, 9 B y 9 C). Este tipo de microfibrillas observado

correspondería a uno de los constituyentes morfológicos característicos de las variedades de amiloidiasis humanas.

En la sustancia gelatinosa detectamos una pequeña cantidad de una lipoproteína y una mucosustancia ácida carboxilada, algo sulfatada. También se puso en evidencia una proteína que carece de aminoácidos aromáticos y posee grupos tioles (Cuadro VIII).

La sustancia gelatinosa se forma en la zona posterior de la región pre-ootecal, en la glándula ootecal y en la pared derecha de la región post-ootecal.

4) Pared capsular :

Su grosor no es uniforme: la región de contacto con el sustrato es delgada de 1,2 μm a 1,5 μm ; la otra, va aumentando de grosor hacia su parte superior, en donde llega a tener de 3,2 μm a 4,8 μm .

La imagen al MET son las que muestran las Figs. 9 C y 9 D.

La pared capsular tiene una reactividad fuertemente APS positiva. Los restos de cápsulas ya ecllosionadas y viejas son detectadas por la fuerte reactividad APS positiva de la pared, lo que sirve como indicador de la localización de restos de puestas difícilmente reconocibles.

La pared capsular está formada por una mucosustancia neutra y una proteína, con aminoácidos con grupos tioéteres, sin aromáticos (tirosina), no encontrándose lípidos ni lipoproteínas.

Los ensayos del APS, del cloruro de zinc iodado y del líquido de Lugol - ácido sulfúrico, propios de la identificación de la quitina, dieron reactividad positiva (Cuadro VIII) (Fig. 7 E).

Esta envoltura se forma en la pared izquierda de la región post-cotecal.

En toda la cápsula de los huevos, no se encontró calcio iónico, detectable por los métodos histoquímicos utilizados (Cuadro VIII).

En la Fig. 4, se encuentra representada la correlación entre las distintas regiones del tracto hembra y las distintas envolturas de la cápsula de los huevos, formadas con las sustancias por ellas secretadas.

Cuadro VIII: Análisis histoquímico de las envolturas de los huevos.

| Metodos empleados | fluido peri-vitelino | membrana peri-vitelina | sustancia gelatinosa | membrana capsular |
|---|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Basofilia: azul de toluidina | celeste (+-) | azul (++) | celeste (+-) | azul (++) |
| Prueba para lípidos (tem. ambiente) | negruzco (+-) | gris (-) | gris (-) | gris (-) |
| Prueba para lípidos (a 60 °C) | negruzco (+-) | gris (-) | gris (-) | gris (-) |
| Prueba para lípidos desenmascaramiento | negro (+) | gris (-) | negruzco (+-) | gris (-) |
| <u>LIPIDOS</u> | | | | |
| Método de Feyter | rosa (+-) | rosa (+-) | violeta(+) | celeste(-) |
| Método de Feyter (desenmasc.) | rosa (+-) | rosa (+-) | violeta(+) | celeste(-) |
| <u>MUCOSUST. ACIDAS</u> | | | | |
| Método de Feyter (deslipidizado) | rosa (+-) | rosa (+-) | violeta(+) | celeste(-) |
| Método de Salazar | gris (+-) | gris (+-) | negro (++) | gris (-) |
| Método de Hale | amarillo(-) | amarillo(-) | celeste(+) | amarillo(-) |
| Método de Halmi y Davies | rosado (+-) | violáceo (+) | violáceo (+) | rosado (+-) |
| Método de Steedman: var. de Mowry | celeste (-) | azul claro (+) | azul (++) | celeste (-) |
| Método de Steedman: var. de Spicer | celeste (-) | celeste (-) | azul (+) | celeste (-) |
| Metacromacia pH 4,4 azul de toluidina mont. med. acuoso | violáceo (+) | violeta (++) | violeta (++) | violeta (++) |
| Metacromacia pH 4,4 azul de toluidina mont. balsamo | celeste (-) | azul (-) | violáceo (+) | azul (-) |
| Metilación - metac. | celeste(-) | celeste(-) | celeste(-) | celeste(-) |

Cuadro VIII: Análisis histoquímico de las envolturas de los huevos.

| Metodos empleados | fluido peri-vitelino | membrana peri-vitelina | sustancia gelatinosa | membrana capsular |
|---|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Met. - saponificación - metac. | celeste (-) | celeste (-) | violáceo (+) | celeste (-) |
| Metacromacia pH 3,4 azul de toluidina | violáceo (+) | azul (-) | violáceo (+) | azul (-) |
| Metacromacia, azul de toluidina, pH 3,4 + nitrato de uranilo, en medio acuoso | celeste(-) | azul (-) | púrpura(+) | azul(-) |
| Reactivo de Schiff | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |
| APS | violáceo(+) | violáceo(+) | violáceo(+) | púrpura(++) |
| APAS | violáceo(+) | púrpura(++) | violáceo(+) | púrpura(++) |
| APFS | no toma(-) | violáceo(+) | violáceo(+) | púrpura(++) |
| <u>PROTEINAS</u> | | | | |
| Método de Hartig - Zacharias | celeste(+) | azul (++) | celeste(+) | azul (+++) |
| Método de Deitch | amarillo claro (-) | amarillo(+) | no toma(-) | amarillo(-) |
| Método de Morel y Sisley | rosado tenue(+/-) | rosa(+++) | rosado (+) | no toma(-) |
| Mét. de Chevremont y Frederic | celeste(+/-) | azul (+) | no toma(-) | azul (+) |
| Método de Gomori | no toma(-) | violeta(++) | violáceo(+) | violeta(++) |
| Método de Adams - Sloper | celeste(+/-) | celeste(+/-) | no toma(-) | azul (+) |
| Reducción - Chevremont y Frederic | celeste(+/-) | celeste(+/-) | celeste(+/-) | celeste(+/-) |
| Bloqueo (sublimado) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |

Cuadro VIII: Análisis histoquímico de las envolturas de los huevos.

| Metodos empleados | fluido peri-vitelino | membrana peri-vitelina | sustancia gelatinosa | membrana capsular |
|---|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| Bloqueo (yodo) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) |
| Bloqueo - reducción - Chevrement y Frederic | celeste (+-) | azul (+) | celeste (+-) | azul (+) |
| APAT | violáceo(+) | violeta(++) | violáceo(+) | violeta(++) |
| APAAT | violáceo(+) | violeta(++) | violáceo(+) | violeta(++) |
| APFAT | violáceo(+) | violeta(++) | violáceo(+) | violeta(++) |
| <u>AMILOIDE</u> | | | | |
| Método de Lendrum | violáceo(+) | celeste(-) | violáceo(+) | celeste(-) |
| Método de Bancroft | violáceo(+) | verdoso(-) | violáceo(+) | verdoso(-) |
| Método de Highman | naranja(-) | naranja(-) | rojo (+) | anaranjado (-) |
| Método de Puchtler | anaranjado (-) | anaranjado (-) | rojo (++) | rosado (+) (en parte) |
| Birrefringencia posterior al trat. con rojo Congo | negativo | negativo | verde claro (+) | negativo |
| <u>QUITINA</u> | | | | |
| Método de Schulze (zinc - iodado) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | violeta(+) |
| Método de Schulze (Lugol - sulfúrico) | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | marrón(+) |
| <u>CALCIO</u> | | | | |
| Método de von Kossá | gris (-) | gris (-) | gris (-) | gris (-) |
| Método de negro eriocromo T | azul (-) | no toma(-) | no toma(-) | azul (-) |
| Método de Dahl y McGee-Russel | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | rosado(+) |

Cuadro VIII: Análisis histoquímico de las envolturas de los huevos.

| Metodos empleados | fluido peri-vitelino | membrana peri-vitelina | sustancia gelatinosa | membrana capsular |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Descalcific. + Dahl y McGee-Russel | no toma(-) | no toma(-) | no toma(-) | rosado(+) |

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

I - Sistema reproductor de Biomphalaria:

La morfología del sistema reproductor de los Basommatophora dulciacuícolas (Hygrophila), a excepción de los Acroloxidae, está caracterizada por la completa separación de los ductos hembra y macho desde el "carrefour". En el ducto macho, los vasa efferens llevan glándulas prostáticas, pero la próstata de los Lymnaeidae, tiene una histología diferente (Hubendick, 1947; Duncan, 1960b). Duncan (1960a; 1960b) subdivide al oviducto del ducto hembra en cuatro regiones, probablemente asociadas con la producción de las cápsulas de los huevos. De acuerdo con nuestros resultados histológicos e histoquímicos, nosotros preferimos dividir al oviducto de la familia Planorbidae en tres regiones: la pre-ootecal, la ootecal y la post-ootecal.

La organografía genital de los Biomphalaria es homogénea, presentando diferencias de tamaño relativas a cada especie. La cápsula de los huevos son semejantes y la de Biomphalaria glabrata se caracteriza por poseer aproximadamente el doble en cantidad de huevos, que los que presenta B. peregrina y B. tenacophila.

Los planorbidos se destacan de las otras familias de Hygrophila, en poseer un "saco de fertilización"

(Duncan, 1975), característica que se cumple en Biomphalaria. El "saco de fertilización" es considerado como una dilatación distal del ducto hermafrodita (Hylton Scott, 1957) o del ducto principal de la glándula del albumen (Pan, 1958). Sin embargo nosotros (Moretto & Nahabedian, 1987) comprobamos que su estructura histológica lo hace independiente de esos órganos. El epitelio ciliado - glandular de la cámara hembra y el ciliado de la cámara macho, indican que esas estructuras pertenecerían a la vía hembra y a la vía macho respectivamente. Una superposición morfológica desfigura esta separación que se pone de manifiesto cuando se interpreta el mecanismo de selección de los productos sexuales (Moretto & Nahabedian, 1987). Los estudios realizados por Paraense (1976) en Biomphalaria glabrata, utilizando marcadores radioactivos, sugerirían que la fecundación se lleva a cabo en el ovotestis a medida que se liberan los ovocitos maduros de sus folículos. Nosotros determinamos que el sitio de la fecundación es el atrio del ovotestis, puesto que en esa parte del órgano observamos en animales post-cópula (de 12, 24 y 48 horas), espermatozoides foráneos asociados a las esferas amarillas y otros rodeando a los óvulos. Los espermatozoides autóctonos se diferencian de los foráneos por presentarse en haces que se trasladarían hacia las vesículas seminales.

En el epitelio de la vesículas seminales, Jong-Brink (1969), describe un ciclo celular, en el cual, este epitelio fagocita espermatozoides. El mismo autor encuentra en este epitelio otras células, que él llama "secretoras", en

forma de bulbo hacia el lumen, especialmente en las cercanías del "carrefour" y lo vincula con un proceso de secreción apocrina. Nuestros estudios indican que este tipo epitelial está relacionado con la dilatación de las vesículas seminales, especialmente aquellas cercanas al "carrefour", que son las que poseen menor contenido de espermatozoides. Este tipo de epitelio se ha encontrado en otros invertebrados el llamado epitelio extensible de Sanchez & Moretto, (1988). Por consiguiente la presunta secreción y la naturaleza glandular de ese epitelio sería una mera interpretación de Jong-Brink (1969).

El sistema hembra produce las envolturas externas del huevo y permite la salida de la cápsula de los huevos al exterior. Moretto & Nahabedian (1987) explican el desplazamiento de los huevos con sus envolturas hacia el gonoporo. El pasaje es producido por: 1) la musculatura y ciliación del "saco de fertilización" o cámara hembra; 2) la ciliación y musculatura de la región pre-ootecal; 3) la musculatura y el surco ciliado de la región ootecal; 4) la musculatura y los dos surcos ciliados de la región post-ootecal y 5) la musculatura y ciliación de la parte diferenciada en vagina.

La sutura opercular de la cápsula de los huevos se forma en el surco ciliado del oviducto, que es acompañado por la carena muscular.

II - Evolución de los trofocitos:

El origen de los trofocitos según Archie (1941, citado por Duncan, 1975), es el epitelio germinativo. Una célula de este epitelio se divide y produce una gametogonia y una primera célula nodriza o trofocito. El folículo de cada ovogonia es el resultado de divisiones de ese primer trofocito. El trofocito que lleva a las espermatogonias no se divide y es móvil (Barth & Jansen, 1961).

El esbozo gonadal de los gastrópodos pulmonados basomatóforos es explicado por Brisson & Resse (1975) y Brisson & Regondaud (1977). Según estos autores el estudio ultraestructural, del esbozo gonadal de los embriones y del primer estadio juvenil, permitió ver que en la gonada se observaba, dos o cuatro gruesas células centrales y varias células más pequeñas que las rodeaban.

Estas células periféricas, con relación núcleo - citoplasma elevado se multiplican y envuelven a las células grandes centrales, aislándolas de las lagunas hemocélicas.

La evolución de estos dos tipos de células es distinta. Se observa un aumento del número de células centrales que muestran modificaciones citológicas. Estas células pueden ser consideradas como elementos iniciales de la verdadera línea germinal. Las células periféricas, cargadas de reserva, conservan en la gonada una disposición parietal y

representan verosímilmente, el origen de células nutricias o trofocitos.

Según Brisson & Regondaud (1977), los trofocitos presentan un núcleo cuneiforme con numerosas áreas densas de cromatina; tienen importantes reservas glicogénicas (partículas α) y gotitas lipídicas en el citoplasma. Estas células envían láminas citoplasmáticas que se insinúan entre las gruesas células centrales. Esto es, el epitelio germinativo, desde su esbozo embrionario está constituido por gametogonias y trofocitos. Estos últimos, actuarían como células nutricias para la maduración de las gametas hembra y macho. El alimento tomado del fluido hemocélico, a través de la pared del ovotestis, es elaborado por los trofocitos y cedidos a las gametas en maduración.

De acuerdo con nuestras observaciones, los trofocitos son células de gran actividad, durante todo el ciclo de maduración de las gametas y presentan abundantes lisosomas primarios, así como una gran cantidad de lisosomas secundarios y de "figuras mielínicas". Dentro de estas últimas se producen las oxidaciones que terminan formando los gránulos de lipofucsina. Un ejemplo similar se da en las células de alto rendimiento (hepatocitos, neuronas) que en sus citoplasmas muestran gránulos de lipofucsina. Las lipofuscinas son entonces, el exponente de la actividad y la vejez de las células.

Todos los lípidos en su primer estadio de oxidación reaccionan como los pigmentos ceroides (Pearse, 1968

- 1972). La oxidación final produce las lipofuscinas.

Según Lüsüs (1961, 1962), Arion ater rufus (Stilommatophora), se encuentran células de pigmento oscuro en los tejidos conectivos de la túnica, alrededor y entre los acinos de la glándula hermafrodita. Este autor por métodos histoquímicos concluye, que no se trata de melaninas, sino de sustancias lipofuscínicas, sugiriendo que el pigmento es un producto de excreción. En el conectivo de Biomphalaria (Basommatophora), a los pigmentos con esa localización, nosotros los identificamos como melaninas, mientras que los restos de las oxidaciones lipídicas las encontramos dentro de los "acinos" (sacos de maduración) y son productos de excreción final producidos en el ciclo de los trofocitos.

La necrosis de los trofocitos libera pigmentos cercoides, lipofuscinas y las esferas amarillas. A las proteínas ácidas, que constituyen las esferas amarillas, pueden considerarselas como un residuo proteico. Se tratarían de globulinas o albuminas. Como los espermatozoides foráneos según Vianey-Liaud, Nessi, Lancastré & Dupouy (1989), se estacionarían durante un tiempo determinado en el ovotestis, antes de fecundar a los ovocitos maduros, nosotros proponemos una función de las esferas amarillas, esto es que ellas entrarían nuevamente en la fisiología del sistema reproductor como acondicionadores de los espermatozoides foráneos, en espera de la fecundación.

Los pigmentos ceroides y las lipofuscinas encontradas en Biomphalaria glabrata, tienen el caracter de excreta, acumulándose en el fondo del divertículo. Nuestras observaciones señalan que cuanto más viejo es el animal, mayor es la cantidad de "masa caótica", acumulada. La "masa caótica" no entra en la formación de la cápsula de los huevos y se liberaría con la muerte del animal.

Los ensayos de detección de cromolípidos y las figuras que nos presenta el MET, indican la existencia de productos de la oxidación progresiva de lípidos en la evolución final de los trofocitos.

III - Fisiología secretora del oviducto:

Los huevos al pasar por el oviducto son envueltos por secreciones de los distintos tramos del mismo, las que originan capas definidas, que constituyen la cápsula.

En Lymnaea stagnalis, las grandes células glandulares de la región pre-cotecal del oviducto, secretan mucopolisacáridos ácidos, mientras que las pequeñas producen mucopolisacáridos sulfatados y dos zonas son distinguibles en la glándula cotecal, de acuerdo a las propiedades de los mucopolisacáridos que ellas producen (Fantin & Vigo, 1968).

Rangarao (1963a, 1963b) señala que las secreciones características de la parte hembra del espermooviducto de Nanina sp., son mucopolisacáridos ácidos, mientras que en Philomycus sp. se detectaron mucopolisacáridos ácidos y neutros (Kugler, 1965).

Smith (1965) describe, en animales maduros, la estructura del tracto reproductivo de Arion sp., a los efectos de tener una base morfológica para la investigación histoquímica. Las secreciones del tracto hembra, en estos animales son complejas y parecen ser polisacáridos fuertemente ácidos, polifenóles, fenilaminas, detectándose además, calcio. Estas sustancias también son detectadas en la membrana interna de la cápsula del huevo; su capa externa es muy calcificada. El calcio está asociado con una capa de lípidos caso que no se

encuentra en otros Pulmonata (Bayne, 1968). El atrio genital de Arion sp., está rodeado por la glándula "esponjosa", cuya secreción según Smith (1965) es casi lípido puro. Su rol sería contribuir a formar la capa más externa de la masa especializada de huevos de esta especie.

En Agriolimax, de la porción superior del tracto hembra se extrajeron aminoácidos y azúcares, correspondiendo estos datos con la composición de la sustancia gelatinosa de la masa de huevos y confirmándose que esta sustancia se secreta en esa región del oviducto. De la parte superior del tracto hembra, se obtuvo poca fucosa, mientras que es común en la porción inferior del tracto y en la pared de la cápsula. Esto indica que esta pared es secretada por la porción inferior del ducto (Bayne, 1967; 1968). En Succinea putris los mucopolisacáridos ácidos de la gelatina y capas de la cápsula de los huevos, son productos de las secreciones de mucopolisacáridos ácidos del tracto hembra (George & Jura, 1958; Jura & George, 1958). Según Meenakshi & Scheer (1968), en Agriolimax, la hidrólisis de los mucopolisacáridos del tracto hembra producen galactosa, fructosa y glucosamina.

Los componentes de la cápsula de los huevos de los Pulmonata son en general mucopolisacáridos, mucoproteínas y complejos proteína - polisacáridos y mucoproteínas (Duncan, 1975).

La fisiología secretora del tracto hembra de Biomphalaria glabrata, determina las características de la

cápsula de los huevos de esta especie.

De acuerdo a la naturaleza histoquímica de las secreciones producidas a lo largo de los epitelios del tracto hembra, pudimos distinguir ocho tipos celulares secretores, que lo denominamos: A, B, C, D, E, F, G y H.

Jong-Bring (1969), en Biomphalaria glabrata y utilizando las técnicas de AB - AY, sin oxidación (Ravetto, 1964) y con oxidación (Peute & van de Kamer, 1967), encontró nueve tipos de células secretoras, de las cuales la 4 y la 7 serían semejantes histoquímicamente y ultraestructuralmente. Nuestro tipo C, no tiene correspondencia alguna con los tipos de Jong-Bring (1969). El tipo C, secreta una lipoproteína. El tipo F, podría corresponder al tipo 4 y 7 de Jong-Brink (1969), puesto que en, sus secreciones, dominan los grupos ácidos no sulfatados.

Las sustancias amiloides se acumulan como depósitos intercelulares en el hombre y en los animales, determinando patologías, ya desde hace mucho tiempo reconocidas en general como "enfermedades amiloides". La sustancia amiloide se presenta como depósitos lisos, brillantes, cerosos de aspecto "atocinado", firmes más bien que duros, pegajosos de una manera particular al cuchillo que corta al órgano que las contienen.

En cortes histológicos la sustancia amiloide se presenta como un material homogéneo, insoluble en agua, alcohol, eter, ácidos diluidos, tomando fácilmente los

colorantes ácidos (eosina, azul de anilina, verde luz). Cuando los depósitos son abundantes, a menudo, tienen un aspecto estriado en el sentido del ataque del cuchillo o al corte con la navaja, debido a una cierta rigidez de la sustancia.

Su aspecto al microscópio electrónico es la de un conjunto de finas fibrillas dispersas, entrecruzadas o agrupadas en haces. A estas fibrillas se unen frecuentemente finas partículas granulares (Cohen & Calkins, 1959; Blader, Nylen & Glenner, 1966; Hashimoto & Young Onn, 1971).

La constitución química y la configuración molecular de la sustancia amiloide varían según el origen de los depósitos y la edad del organismo. Ellas están constituidas por: 1) un elemento constante que es una glicoproteína fibrosa, conteniendo grupos aminos esencialmente sulfatados; 2) un cierto número de otras sustancias y en particular una proteína sérica, adsorbida sobre el elemento fibrilar. Esta proteína sérica con propiedad distinta, según los depósitos, parece ser el elemento variable que determina lo que se engloba bajo el término genérico de "amiloide" y que da cuenta del comportamiento distinto en los estudios clínicos, histológicos e histoquímicos de las diferentes variedades de los depósitos amiloides. Por otra parte, la sustancia del elemento glicoproteico fibrilar, debida cuenta del aspecto ultraestructural constante de todas las variedades de amiloide, aspecto que representa actualmente el único criterio diagnóstico verdaderamente específico de los amiloides. Esta estructura fibrilar característica explicaría

un número de propiedades físicas y químicas de esta sustancia.

La materia amiloide puede ser considerada como un complejo proteína - glicoproteína muy hidrófila. Esta hidrofilia condiciona muchas propiedades físicas del amiloide.

Bioquímicamente, de acuerdo con Lillie (1965) y Pearse (1968-1972), la sustancia amiloide es un complejo de mucopolisacáridos ácidos del tipo del ácido condroitin - sulfúrico y prótidos.

La coloración electiva del rojo Congo, por la sustancia amiloide, ha sido frecuentemente utilizada en medicina clínica para reconocer la enfermedad amiloidea (Glenner, 1960). Sin embargo, esta coloración no es específica. El rojo Congo se fija también sobre fibras elásticas, sobre los haces de colágenos densos y bajo ciertas condiciones, sobre ciertas células queratinizadas y granulaciones de células eosinófilas.

Las reacciones histoquímicas de la sustancia amiloide más interesante en la práctica son aquellas que conciernen a la fracción glucídica, esto es la reacción APS, la reacción de los glúcidos con grupos ácidos, y la metacromasia. Las diferencias e intensidades del APS según la variedad de amiloides sugiere una diferencia en la composición química de estas sustancias.

Los colorantes metacromáticos (colorantes del tipo violeta de metilo) dan una metacromasia franca, en las condiciones habituales de la técnica.

Respecto a la reacción de la fracción de

la proteína, los datos son contradictorios, si bien las reacciones histoquímicas "de grupo" de las proteínas o reacciones específicas de los ácidos aminados, confirman la presencia de la fracción proteica de la sustancia amiloide.

En cuanto a las observaciones histoquímicas sobre el contenido en lípidos de la sustancia amiloide son muy fragmentarias, pero en su conjunto, se concluye en la ausencia de lípidos figurados. Algunos autores describen lípidos, pero estos son inconstantemente encontrados y deben ser considerados como muy contingentes y no pertenecen a la sustancia amiloide propiamente dicha, es decir al elemento fibrilar observado al MET (Ganter & Jolles, 1969-1972).

La comparación con una reacción tipo para la determinación de la amiloidiasis humanas, así como nuestros ensayos y la ultraestructura observada, nos hace considerar que la sustancia gelatinosa, está formada fundamentalmente por una sustancia de tipo amiloide, cuyas microfibrillas están dispuestas en capas entrelazadas, en donde la orientación de las microfibrillas en cada capa es constante, pero varía de capa en capa. Esta estructuración determina un tramado que actúa como soporte mecánico de los huevos, dentro de la cápsula. Por otra parte, las propiedades de la sustancia amiloide (alta higroscopía), favorece al balance hídrico, intercambio de solutos y mantiene la temperatura constante.

El epitelio de la pared izquierda de la región post-ootecal, formada por células del tipo G, secreta una mucosustancia neutra. Las características de la pared

capsular nos indica que se formaría en esa región del oviducto.

La pared capsular presenta reactividad APS positiva y dá positivas las reacciones de Schulze, utilizadas para la determinación de quitinas.

La reactividad de la quitina ha sido controvertida. Es probable que el estado de maduración de las quitinas juegen un papel importante. Las quitinas jóvenes, "blandas", parecen ser más fácilmente APS positivo que aquellas tanizadas y "duras". La estructura de la cadena glicosídica de la quitina, sin duda, es diferente de un caso a otro. Jeanloz & Forchielli (1960) indican que sólo los grupos terminales de la quitina reaccionan con el ácido peracético: es entonces posible que las únicas quitinas reactivas, sean sustancias constituidas por cadenas cortas o que posean una estructura ramificada.

Algunos autores suponen que la quitina no es APS positiva (Ganter & Jolles, 1969-1970) y que los responsables son los grupos fenólicos. En nuestro caso no detectamos aminoácidos aromáticos con grupos fenólicos (tirosina).

Si bien la pared de la cápsula mostró reactividad positiva con las técnicas de Schulze, éstas no son específicas para la quitina (Pearse, 1968-1972).

La presencia de quitina en estructuras protectoras es señalada en otros invertebrados no artrópodos,

tales como en la cápsula de los huevos de Brachionus leydigii Cohn y otros rotíferos (Depoortere & Magis, 1967), como así, en los quistes de Ciliata (Bussers & Jeuniaux, 1974; Bussers, 1976).

El aspecto ultraestructural de la membrana capsular lo muestran las Figs. 9 C y 9 D.

Las imágenes electrónicas de la pared de la cápsula en Biomphalaria glabrata, vagamente recuerdan a lo observado con el MET, a bajos aumentos y en secciones oblicuas de la capa interna de la procutícula de la cutícula de Acanthocyclops viridis (Jurine), un crustáceo copépodo (Bouligand, 1965).

La presunta naturaleza quitinosa de la pared de la cápsula, podría ser elucidada, utilizando la difracción de rayos X. Sería además interesante aplicar el método del complejo WGA - Oro, con el cual se puede diferenciar una sustancia quitinosa de otra formada por una glicoproteína con N-acetilglucosamina (Pont Lezica & Quesada-Allué, 1990).

SUMARIO

El sistema reproductor de Biomphalaria glabrata no presenta diferencias fundamentales con los sistemas reproductores de Biomphalaria peregrina y Biomphalaria tenacophila. Sus cápsulas de huevos respectivas difieren en sus dimensiones y en el número y en el tamaño de los huevos.

En la formación de las envolturas de la cápsulas de los huevos, de Biomphalaria glabrata, intervienen ocho tipos histoquímicos de células secretoras con localización precisa a lo largo del tracto genital hembra. Los tipos A, B y C, se encuentran en el oviducto pre-ootecal; los tipos D, E y F, en la glándula ootecal; el tipo celular G, en el oviducto post-ootecal y el tipo celular H en la vagina. Las secreciones del tipo celular A consisten en mucosustancias ácidas sulfatadas y proteínas libres con aminoácidos aromáticos y grupos tioles y tioéteres. Las del tipo celular B, secretan mucosustancias ácidas carboxiladas. Las del tipo celular C, lipoproteínas. Las del tipo celular D, mucosustancias ácidas sulfatadas. Las del tipo celular E, mucosustancias ácidas carboxiladas. Las del tipo celular F, proteínas libres con pocos aminoácidos aromáticos y grupos tioéteres. Las del tipo celular G, mucosustancias neutras y proteínas libres con grupos tioles y tioéteres. Las del tipo

celular H, mucóide.

En cada envoltura de la cápsula de los huevos, se detectan algunas de estas sustancias, las que nos señalan la región del tracto genital hembra en que esas envolturas se formarían. La cápsula contiene los huevos rodeados cada uno por el albumen. Este se origina en la glándula del albumen y consiste en galactógeno, lípidos, lipoproteínas y mucosustancias ácidas y pocas proteínas libres ácidas. La membrana interna estaría originada por las células del tipo A, del oviducto pre-ootecal. La sustancia gelatinosa, de naturaleza amiloide resultaría de las secreciones originadas por los tipos celulares B, C, D, E y F. Las células del tipo G, de la región post-ootecal producirían la pared capsular. Las células tipo H, de la vagina, con su secreción facilitarían la expulsión de las cápsulas (Fig. 4).

Los trofocitos del ovotestis terminan sus ciclos en restos formados por cromolipoides, que se acumulan en el órgano, como excreta.



Bibliografía

- ABDEL-MALEK, E. T., 1954. Morphological studies on the family Planorbidae (Mollusca: Pulmonata) II. The genital organs of Biomphalaria boissyi (subfamily Planorbidae, H. A. Pilsbry, 1934). Trans. Amer. Micros. Soc., 73:285-296.
- ALAPHILLIPE, F., 1955. Altération des spermatozoïdes dans la poche copulatrice chez Planorbarius corneus (L.). C. R. Acad. Sc., 241:1225-1227.
- ALAPHILLIPE, F., 1959. Contribution à l'étude anatomique et histologique des voies génitales de Planorbis (Planorbarius) corneus L. (Gastéropode Pulmoné). Bull. Biol., 93:206-287.
- ANCEL, P., 1902. Histogénèse et structure de la glande hermaphrodite d'Helix pomatia. Arch. Bio., 19:389-452.
- ARCHIE, V. E., 1941. The histology and developmental history of the ovotestis of Limnaea stagnalis lillianae. Tesis Univ. Wisconsin.
- AUBRY, R., 1954a. La structure de l'acinus et la lignée femelle dans la glande hermaphrodite de Limnaea stagnalis L. adulte. C. r. Séanc. Soc. Biol., 148:1498-1500.
- AUBRY, R., 1954b. Les éléments nourriciers dans la glande hermaphrodite de Limnaea stagnalis adulte. C. R. Soc. Biol., 148:1626-1629.
- AUBRY, R., 1956. La structure du canal hermaphrodite chez Limnaea stagnalis adulte. C. R. Soc. Biol., 150:1786-1789.
- AUBRY, R., 1961. Etude de l'hermaphroditisme et de l'action pharmacodynamique des hormones de vertébrés chez les gastéropodes pulmonés. Archs. Anat. microsc. Morph. Exp. (suppl.), 50(4):521-602.
- BAECKER, R., 1932. Die Mikromorphologie von Helix pomatia und einigen anderen Stylommatophoren. Ztschr. Ges. Anat. Abt. III, Ergeb. Anat. und Entw., 29:449-585.

- BAKER, F. C., 1954. *The moluscan family Planorbidae*. Univ. Illinois Press, Urbana, Illinois, 530 pp.
- BARTH, R. & G. JANSEN, 1959. Contribuições ao estudo da gametogênese dos Planorbídeos. 1ª parte: Célula nutridora e sua função. *An. Acad. Brasil. Ci.*, 31:429-445.
- BARTH, R. & G. JANSEN, 1960. Ueber den Begriff "Kinoplasma" in der Spermiogenese von Australorbis olabratus livaceus (Mollusca, Pulmonata, Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 58:209-228.
- BARTH, R. & G. JANSEN, 1961. Ueber die Formveraenderungen der Golgi-Apparates waehrend der Spermiogenese von Australorbis olabratus olivaceus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 59:83-114.
- BARTH, R. & G. JANSEN, 1962. Beobachtungen ueber die Entwicklung und Ernahrung der Eizellen von Australorbis olabratus olivaceus (Gastropoda, Pulmonata, Planorbidae). *Ann. Acad. Brasil. Cienc.*, 34:381-389.
- BAYNE, C. J., 1966. Observations on the composition of the layers of the egg of Aporiolimax reticulatus, the grey field slug (Pulmonata, Stylomatophora). *Comp. Biochem. Physiol.*, 19:317-328.
- BAYNE, C. J., 1967. A comparative study of the desiccation rates of some gastropod eggs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23:761-773.
- BAYNE, C. J., 1968. Histochemical studies on the egg capsules of eight gastropod molluscs. *Proc. malac. Soc. Lond.*, 38:199-212.
- BLADEN, H. A.; M. U. NYLEN & G. G. GLENNER, 1966. The ultrastructure of human amyloid as revealed by the negative staining technique. *J. Ultrastruct. Res.*, 14:449-459.
- BÖHM, A. & A. OPPEL, 1907. *Manuel de technique microscopique*. Quatrième édition française, Vigot Frères, Paris, 498 pp.
- BOLLES LEE, A. & F. HENNEGUY, 1887. *Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique*. Octave Doin, Paris, 488 pp.

- BONDESEN, P., 1950. A comparative morfological - biological analysis of the egg capsules of freshwater pulmonates gastropods. *Hygrophila, Basommatophora, Pulmonata. Nat. Jutland.*, 3:1-208.
- BOULIGAND, Y., 1965. Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes. *C. R. Séances Acad. Sc., Paris*, 261:4570-4574.
- BRETSCHNEIDER, L. H. & C. P. RAVEN, 1951. Structural and topochemical changes in the egg cells of Limnaea stagnalis L. during oogenesis. *Archs. Néerl. Zool.*, 10:1-31.
- BRISSEON, MM. P., 1982. Etude radioautographique des éléments aminergiques de la région du carrefour génital chez un gastéropode. *Malacologia*, 22(1-2):151-157.
- BRISSEON, MM. P. & C. BESSE, 1975. Etude ultrastructurale de l'ébauche gonadique chez l'embryon de Limnaea stagnalis L. (Gastéropode Pulmoné Basommatophore). *Bull. Soc. Zool. France*, 100(3):345-349.
- BRISSEON, MM. P. & J. P. COLLIN, 1977. Systèmes aminergiques des Gastéropodes pulmonés. I. Etude en microscopie de fluorescence et électronique des cellules aminergiques du canal de la glande à albumine chez Bulinus truncatus. Audouin. *Biol. Cellulaire*, 29:159-166.
- BRISSEON, MM. P. & J. P. COLLIN, 1980. Systèmes aminergiques des Gastéropodes pulmonés. IV. Paraneurones et innervation catécholaminergique de la région du carrefour des voies génitales; étude radioautographique. *Biol. Cellulaire*, 38:211-220.
- BRISSEON, MM. P. & J. REGONDAUD, 1971. Observations relatives à l'origine dualista de l'appareil génital chez quelques Gastéropodes Pulmonés Basommatophores. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 273:2339-2341.
- BRISSEON, MM. P.; J. REGONDAUD & J. P. COLLIN, 1977. Systèmes aminergiques des Gastéropodes pulmonés. II. Mise en évidence au carrefour des voies génitales par la méthode FIF. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 17:1077-1086.

- BU'LOCK, J. & J. HARLEY-MASON, 1951. Melanin and its precursors. II. Model experiments on the reactions between quinones and indoles, and consideration of a possible structure for the melanin polymer. *J. Chem. Soc. [London]*, 1951(3):703-712.
- BUSSERS, J. C., 1976. Structure et composition du kiste de résistance de 4 Protozoaires Ciliés. *Protistologica*, 12:87-100.
- BUSSERS, J. C. & Ch. JEUNIAUX, 1974. Recherche de la chitine dans les productions métaplasmatiques de quelques Ciliés. *Protistologica*, 10:43-46.
- CARRIKER, M. R. & N. M. BILSTAD, 1946. Histology of the alimentary system of the snail Limnaea stagnalis adpressa Say. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 65:250-275.
- CAVALIE, M. M. & L. BEYLOT, 1902. Sur la glande albuminipare de l'escargot. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 54:297-298.
- COHEN, A. S. & E. CALKINS, 1959. Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, 183:1202-1203.
- CORREA, J. B. C.; A. DMYTRACZENKO & J. H. DUARTE, 1967. Structure of a galactan found in the albumen gland of Biomphalaria glabrata. *Carbohydrate Res.*, 3(4):445-452.
- CROMARTIE, R. I. T. & J. HARLEY-MASON, 1957. Melanin and its precursors. 8. The oxidation of methylated 5,6-dihydroxyindoles. *Biochem. Jour.*, 66(4):713-720.
- DEPOORTERE, H. & N. MAGIS, 1967. Mise en évidence, localisation et dosage de la chitine dans la coque des oeufs de Brachionus leydigii Cohn et d'autres Rotifères. *Ann. Soc. Roy Zool. Belg.*, 97:187-195.
- DUNCAN, C. J., 1960a. The evolution of the pulmonate genital system. *Proc. Zool. Soc. London*, 134:601-609.
- DUNCAN, C. J., 1960b. The genital system of the freshwater Basommatophora. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 135:339-356.

- DUNCAN, C. J., 1975. **Reproduction**. In: **Pulmonates**, Vol. 1 Functional Anatomy and Physiology, (V. Fretter & J. Peake, ed.), Academic Press, London and N. Y., 309-365.
- FANTIN, A. M. B. & E. VIGO, 1968. Histochemistry of the glands associated with the reproductive tract of Lymnaea stagnalis. **Histochemie**, 15:300-311.
- GABE, M., 1968. **Techniques histologiques**. Masson ed., Paris, 1113 pp.
- GANTER, P. & G. JOLLES, 1969-1970. **Histochimie Normale et Pathologique**. Gauthier-Villars, Paris, 1904 pp.
- GEORGE, J. C. & C. JURA, 1958. A histochemical study of the capsule of the egg of a land snail Succinea putris. **Proc. kon. ned. Akad. Wet.**, 61:598-603.
- GLENNER, G. G., 1980. Amyloid deposits and amyloidosis. **N. England J. Med.**, 302:1283-1292.
- GRAY, P., 1975. **The microtome's formulary and guide**. Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 794 pp.
- GRIFFOND, B. & D. BOLZONI-SUNGUR, 1986. Stages of oogenesis in the snail, Helix aspersa: cytological, cytochemical and ultrastructural studies. **Reprod. Nutr. Develop.**, 26(2A):461-474.
- GURR, E., 1960. **Methods of analytical histology and histochemistry**. Williams & Wilkins ed., Baltimore, 327 pp.
- HARTWIG, H. G.; MM. P. BRISSON; I. LYNCKER & J. P. COLLIN, 1980. Aminergic systems in Pulmonate Gastropod Molluscs. III. Microspectrofluorometric characterization of the reproductive system monoamines. **Cell. Tissue Research**, 210:223-234.
- HASHIMOTO, K. & LL. YOONG ONN, 1971. Lichen amyloidosis: electron microscopic study of atypical case and review. **Arch. Dermatol.**, 104:648-667.
- HOLM, L. W., 1946. Histological and functional studies on the genital tract of Lymnaea stagnalis appressa Say. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, LXV(4):45-68.
- HUBENDICK, B., 1947. Phylogenetic relation between the higher limnic Basommatophora. **Zool. Bidrag. Uppsala**, 25:141-164.

- HYLTON SCOTT, M. L., 1957. Anotaciones sobre la morfología de Tropicorbis peregrinus (D'Orbigny). *Rev. Museo La Plata (n.s.)*, VIII zool., 50:1-22.
- JEANLOZ, R. & E. FORCHIELLE, 1950. Recherches sur l'acide hyaluronique et les substances apparentées. III. La détermination de la structure de la chitine par oxydation avec l'ion periodate. *Helvetica Chim. Acta*, 33(6):1690-1697.
- JONG-BRINK, M. de, 1969. Histochemical and electron microscope observations on the reproductive tract of Biomphalaria glabrata, intermediate host of Schistosoma mansoni. *Z. Zellforsch.*, 102:507-542.
- JONG-BRINK, M. de; A. de WIT; G. KRAAL & H. H. BOER, 1976. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail Biomphalaria glabrata. *Cell. Tiss. Res.*, 171:195-219.
- JOOSSE, J. & D. REITZ, 1969. Functional anatomical aspects of the ovotestis of Limnaea stagnalis L. *Malacologia*, 9(1):101-109.
- JURA, C. & J. C. GEORGE, 1958. Observations on the jelly mass of the eggs of three molluscs, Succinea putris, Limnaea stagnalis and Planorbis corneus with special reference to matachromasia. *Proc. kon. ned. Akad. Wet.*, 61:590-594.
- KITAJIMA, E. W. & W. L. PARAENSE, 1983. The ultrastructure of the spermatheca of Biomphalaria glabrata (Gastropoda, Pulmonata). *J. Morphol.*, 176:211-220.
- KUGLER, O. E., 1965. A morphological and histochemical study of the reproductive system of the slug Philomycus carolinianus (Bosc.). *J. Morph.*, 116:117-132.
- LANGERON, M., 1934. *Précis de microscopie*. Masson y Cie., Paris, 1205 pp.
- LILLIE, R. D., 1960. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., New York 36, 715 pp.
- LOCRUIN, M. & M. LANGERON, 1978. *Manuel de microscopie*. Masson, Paris, 352 pp.

- LUSIS, O., 1961. Postembryonic changes in the reproductive system of the slug Arion ater rufus L. *Proc. Zool. Soc. London*, 137(3):433-468.
- LUSIS, O., 1962. Pigment of the hermaphrodite gland of Arion ater rufus L. *Nature*, 194:1191-1192.
- MARTOJA, R. & M. MARTOJA-PIERSON, 1970. *Técnicas de histología animal*. Totay-Masson, Barcelona, 350 pp.
- Mc MAHON, P.; T. von BRAND & M. O. NOLAND, 1957. Observations on the polysaccharides of aquatic snail. *J. cell. comp. Physiol.*, 50:219-239.
- MEENAKSHI, V. R. & B. T. SCHEER, 1968. Studies of the carbohydrates of the slug Agriolimax columbianus with special reference to their distribution in the reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26:1091-1097.
- MORETTO, H. J. A., 1980. Moluscos hospedadores de helmintos. *Ciencia e Investigación*, 36(1-2):3-13.
- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1980. El complejo penial de Biomphalaria peregrina (Planorbidae, Mollusca). *Ciencia e Investigación*, 36(1-2):28-34.
- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1982. Sobre la autofecundación en dos especies neotropicales de Planorbidae (Mollusca). *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, CCXIII:39-47.
- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1983. La rádula de Ampullaria canaliculata (Prosobranchia, Mollusca). *Comunicaciones M. A. C. N. "Bernardino Rivadavia"*, Hidrobiología, II (9):107-117.
- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1985. Un oligoqueto simbiote de Biomphalaria tenacophila (Planorbidae, Mollusca) del delta del Paraná. *Comunicaciones M. A. C. N. "Bernardino Rivadavia"*, Hidrobiología, II (15):159-166.
- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1987. Sobre el sistema reproductor de Biomphalaria peregrina (Gasteropoda, Pulmonata, Planorbidae). *Anal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat.*, 39:195-217.

- MORETTO, H. J. A. & D. E. NAHABEDIAN, 1989. On the radulae of three species of neotropical Pomacea (Mollusca: Mesogastropoda: Piliidae). Walkerana, 3(10):195-202.
- MORETTO, H. J. A.; M. SANCHEZ & G. VERNET, 1988. The colour pattern of Lineus atrocaeruleus (Nemertea). Hidrobiologia, 156:183-189.
- MORRILL, J. B., 1963. Bound aminoacids of egg albumen and free aminoacids in the larval and adult Limnaea palustris. Acta Embryol. Morph. exp., 6:339-343.
- MORRILL, J. B.; E. MORRIS & S. D. SMITH, 1964. Electro- and immunoelectrophoretic patterns of egg albumen of the pond snail Limnaea palustris. Acta Embriol. Morph. exp., 7:155-166.
- MORTON, H., 1930. Die Wanderungen der Geschlechtszellen in der Zwitterdruese von Planorbis. Z. Zellf. Mikro. Anat., 10:527-551.
- MORTON, J. E., 1979. Molluscs. Fifth edition, Hutchinson & Co. (Publishers) Ltd., London, 264 pp.
- NEKRASSOW, A. D., 1928a. Beobachtungend am Laich von Süßwassertieren, II. Vergleichende Morphologie des Laichs von Süßwassergastropoden. Rev. Zool. Russe. Moscou, 7.
- NEKRASSOW, A. D., 1928b. Beobachtungen am Laich von Süßwassertieren, IV. Laich der Gattung Lymanaea. Rev. Zool. Russe. Moscou, 8.
- NEKRASSOW, A. D., 1929. Vergleichend Morphologie der Laiche von Süßwassergastropoden. Zeitschr. F. Morphol. u ökol. D. Tiere Abt. A., Berlin 13:1-35.
- NIELAND, M. L. & E. M. GOLDSMIT, 1969. Ultrastructure of galactogen in the albumen gland of Helix pomatia. J. ultrastruct. Res., 29:119-140.
- PAN, C., 1958. The general histology and topographic microanatomy of Australorbis glabratus. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard College, 119(3):237-299.
- PANTIN, C. F. A., 1968. Técnicas microscópicas para zoólogos. Ed. Academia, León (España), 97 pp.
- PARAENSE, W. L., 1976. The sites of cross- and self-fertilization in planorbid snail. Rev. Brasil. Biol., 36(3):535-539.

- PARAENSE, W. L. & N. DESLANDES, 1955. Observations on the morphology of Australorbis glabratus. *Memo. Inst. O. Cruz.*, 53:87-103.
- PATTERSON, C. M. & J. B. BURCH, 1978. **Chromosomes of pulmonates molluscs**. En: Pulmonates, Vol. 2A, Systematics, Evolution and Ecology, (V. Fretter & J. Peake, ed.), Academic Press, London and N. Y., 171-217 pp.
- PEARSE, A. G. E., 1968 - 1972. **Histochemistry theoretical and applied**. Third edition, Churchill, London, 1518 pp.
- PEUTE, J. & J. C. VAN DE KAMER, 1967. On the histochemical differences of aldehyd-fuchsin positive material in the fibres of the hypothalamo-hypophysial tract of Rana temporaria. *Z. Zellforsch.*, 63:441-448.
- PONT LEZICA, R. & L. QUESADA-ALLUE, 1990. **Chitin** En: Methods in Plant Biochemistry. Vol. 2, Cap. 13, Academic Press, London and N. Y., 443-481 pp.
- PUCHTLER, H.; F. SWEAT & M. LEVINCE, 1962. On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, 10:355-363.
- RANGARAO, K., 1963a. The composition of egg capsules of the pulmonate snail Ariophanta liquilata. *Curr. Sci.*, 32:213-214.
- RANGARAO, K., 1963b. The polysaccharides of the reproductive system of the land snail Ariophanta liquilata in the formation of egg capsules. *J. Anim. Morph. Physiol.*, 10:158-163.
- RAVETTO, C., 1964. Alcian blue - Alcian yellow: a new method for identification of different acidic groups. *J. Histochem. Cytochem.* 12:44-51.
- RICHTER, E., 1935. Der Bau der Zwitterdrüse und die Entstehung der Geschlechtzellen bei Agriolimax agrestis L. *Jena. Z. Naturw. N. F.*, CXIX:507-533.
- ROGERS, S. H. & R. L. REEDER, 1987. Structure and function of the spermatheca in a snail host of schistosomiasis, Biomphalaria glabrata. *J. Morphol.*, 191:295-308.
- SANCHEZ, M. & H. J. A. MORETTO, 1988. A new genus of freshwater hoplonemertea from Chile. *Zool. J. Linnean Soc. London*, 92:193-207.

- SMITH, B. J., 1965. The secretion of the reproductive tract of the garden slug Arion ater. Annals N. Y. Acad. Sc., 118:997-1014.
- VIANEY-LIAUD, M. 1972. Etude du controle de la maturité des tractus génitaux et de la ponte par castration chirurgicale chez le planorbe Australorbis glabratus Say (Pulmoné, Basommatophore). Bull. Soc. Zool. France, 97(4):675-690.
- VIANEY-LIAUD, M.; H. NASSI; F. LANCASTRE & J. DUPGUY, 1989. Duration of pairing and use of allo sperm in Biomphalaria glabrata (Gastropoda: Planorbidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84(1):41-45.
- von BRAND, T. & V. S. FILES, 1947. Chemical and histological observations on the influence of Schistosoma mansoni infection on Australorbis glabratus. Jour. Parasit., 33:476-482.
- WITTING, L. A., 1965. Lipid peroxidation in vivo J. Amer. Oil Chem. Soc., 42(11):908-913.

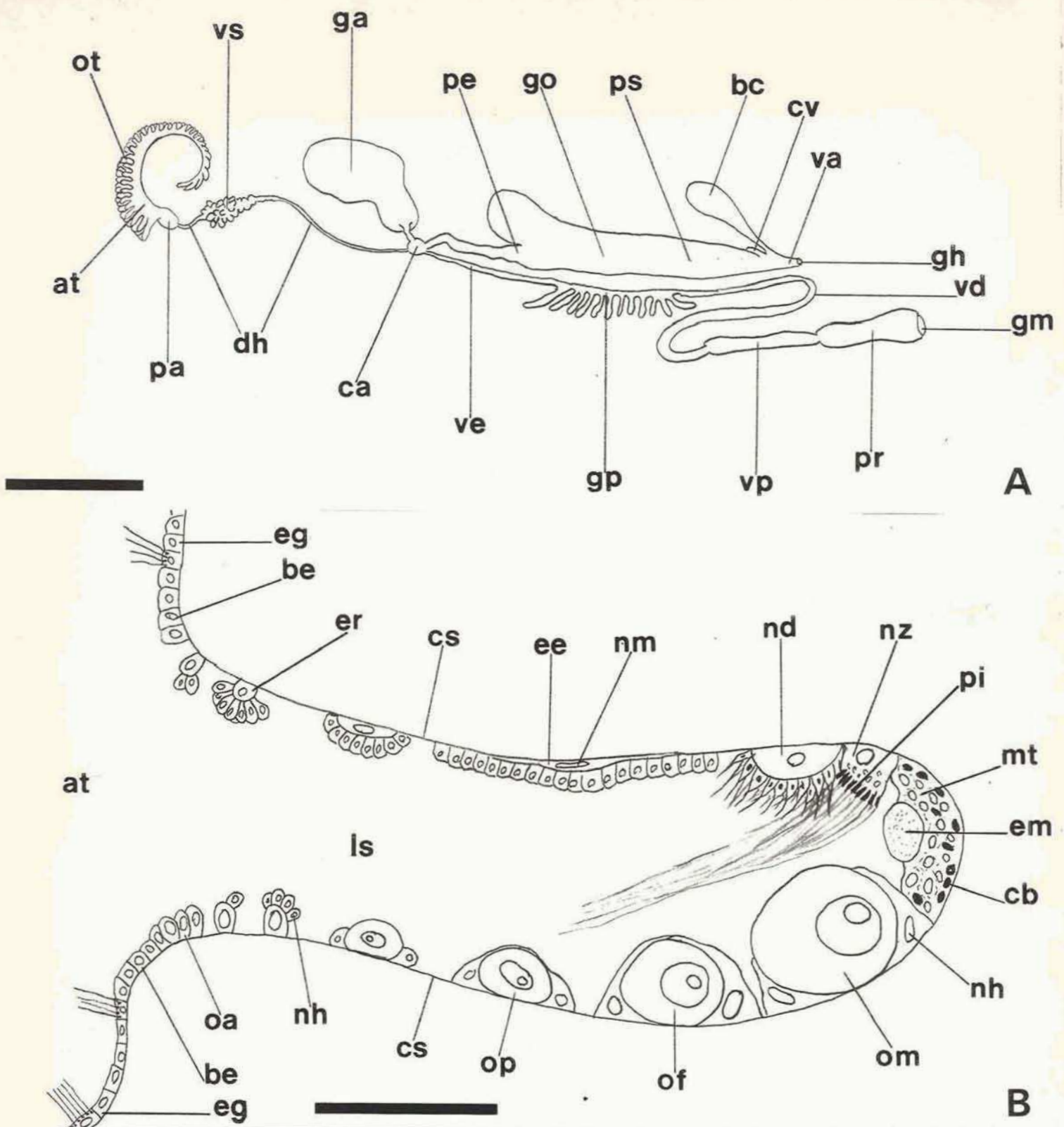


Figura 1 A - B: Sistema reproductor de *Biomphalaria*. A, aspecto general; B, saco de maduración; at= atrio, bc= bursa copulatrix, be= borde del epitelio germinal, ca= "carrefour", cb= cuerpo basófilo, cs= conectivo de la pared, cv= ciego vaginal, dh= ducto hermafrodita, ee= estadio "epiteloide", eg= epitelio germinal, em= esfera amarilla, er= "roseta", ga= glándula del albumen, gh= gonoporo hembra, gm= gonoporo macho, go= glándula ootecal, gp= glándula prostática, ls= lumen, mt= matriz, nd= nodriza con espermátidas, nh= núcleo de nodriza, línea hembra, nm= núcleo de nodriza, línea macho, nz= nodriza con espermatozoides, oa= ovogonias agrupadas, of= ovocito en folículo, om= ovocito maduro, op= ovocito previtelino, ot= ovotestis, pa= preatrio, pe= región pre-otecal, pi= paquete de espermatozoides, pr= prepucio, ps= región post-otecal, va= vagina, vd= vas deferens, ve= vas efferens, vp= vaina del penis y vs= vesículas seminales. Escalas: A, 5 mm; B, 100 μ m.

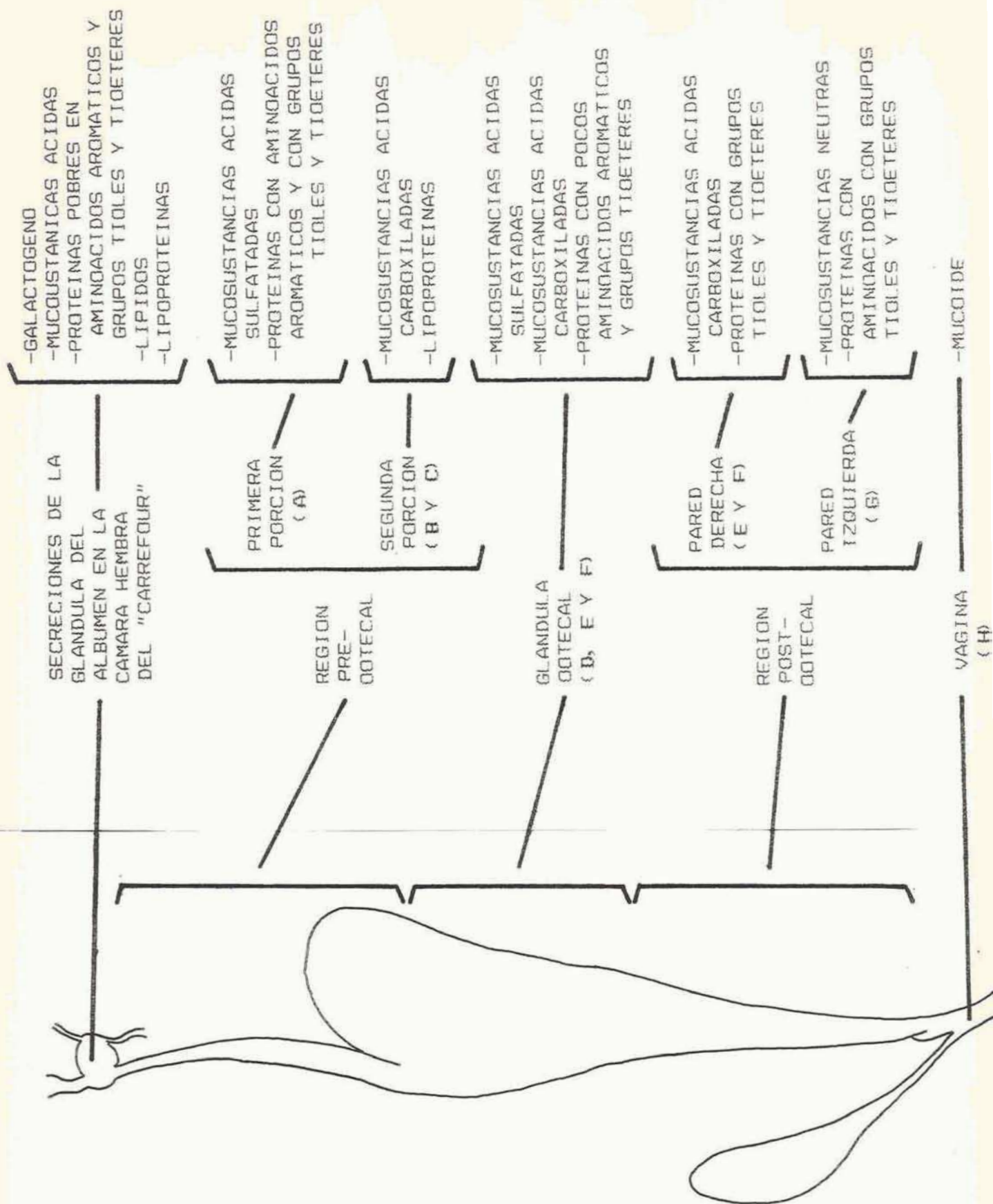


Figura 2: Distribución de las distintas secreciones en el tracto hembra de *Biomphalaria*; A, B, C, D, E, F, G y H = tipos celulares de acuerdo a sus secreciones.

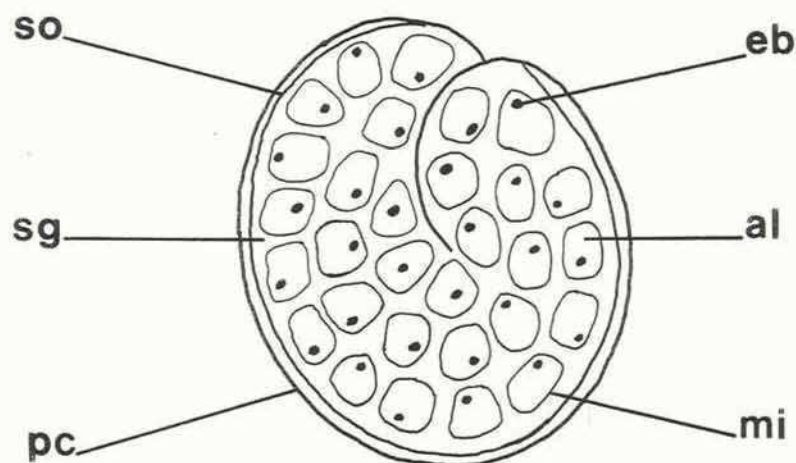
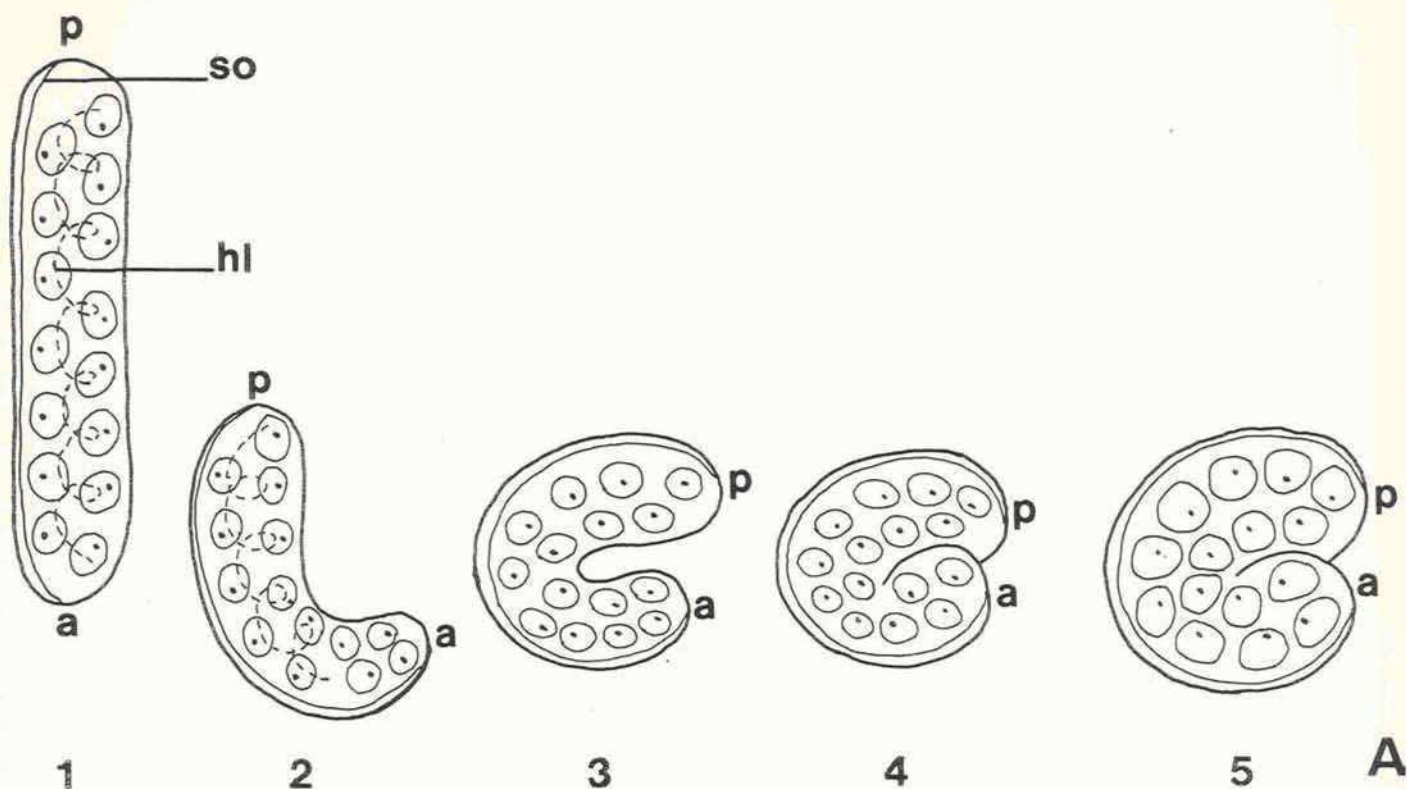


Figura 3 A - B: A, Secuencia en la ovodeposición de una cápsula de los huevos; B, Cápsula de los huevos de *Biomphalaria glabrata*. 1= cápsula de los huevos al salir del gonoporo hembra, con una disposición helicoidal de los huevos (hl); 2= cuando su extremo anterior (a) toma contacto con el sustrato y el posterior (p) sale del gonoporo hembra; 3= flexión de la cápsula por rotación del animal, hacia su derecha; 4= cápsula flexionada sobre el sustrato; 5= cápsula definitiva luego de que el animal se deslice sobre ella. Abreviaturas: al= fluido perivitelino o albumen; cp= comienzo de la cápsula; eb= embrión; fp= final de la cápsula; mi= membrana perivitelina o interna; pc= pared capsular; sg= sustancia gelatinosa y so= sutura opercular. Escala: 5 mm.

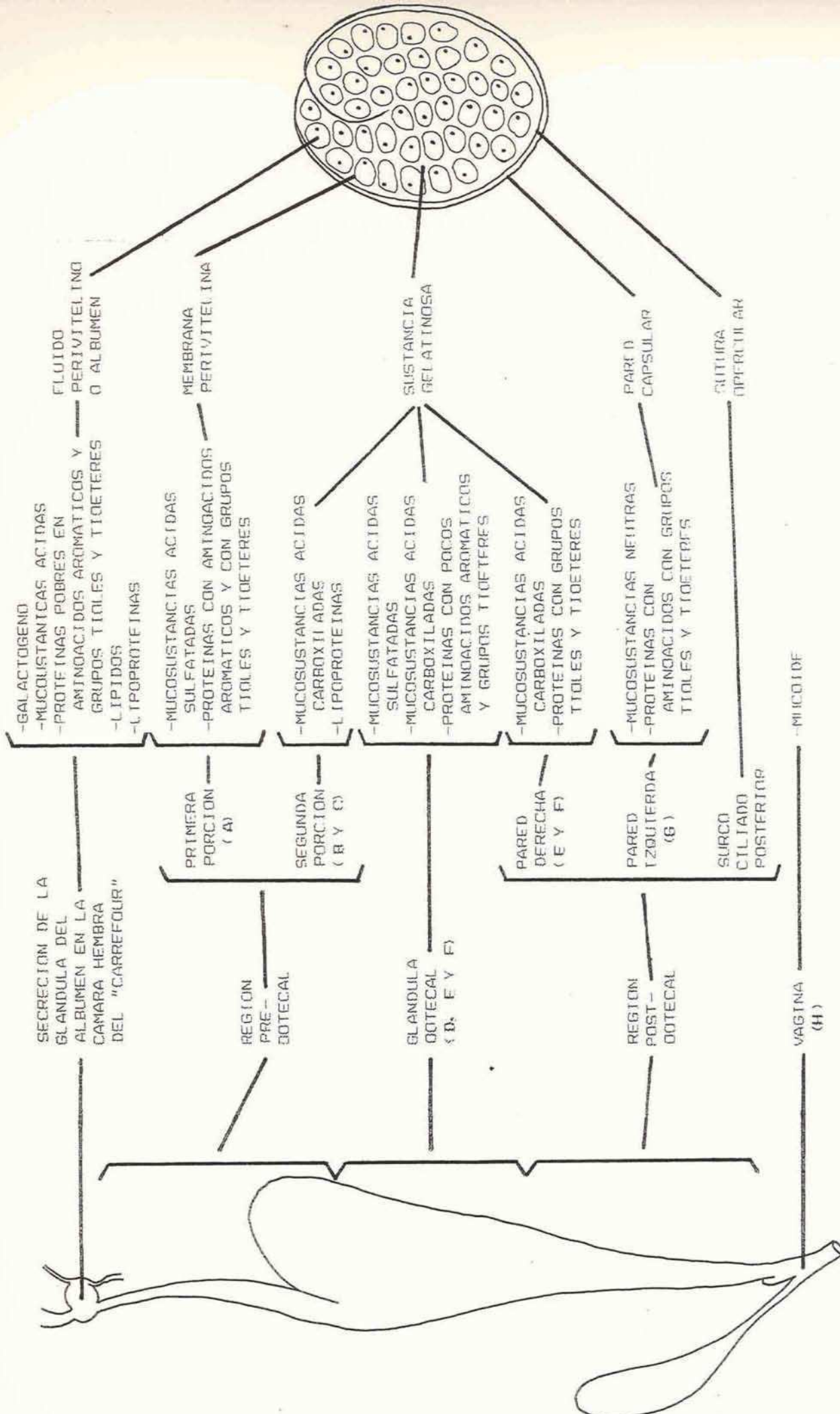


Figura 4: Relación de los distintos tramos del tracto hembra y sus secreciones, con las distintas partes de la cápsula de los huevos en *Biomphalaria*; A, B, C, D, E, F, G y H = tipos celulares de acuerdo a sus secreciones.

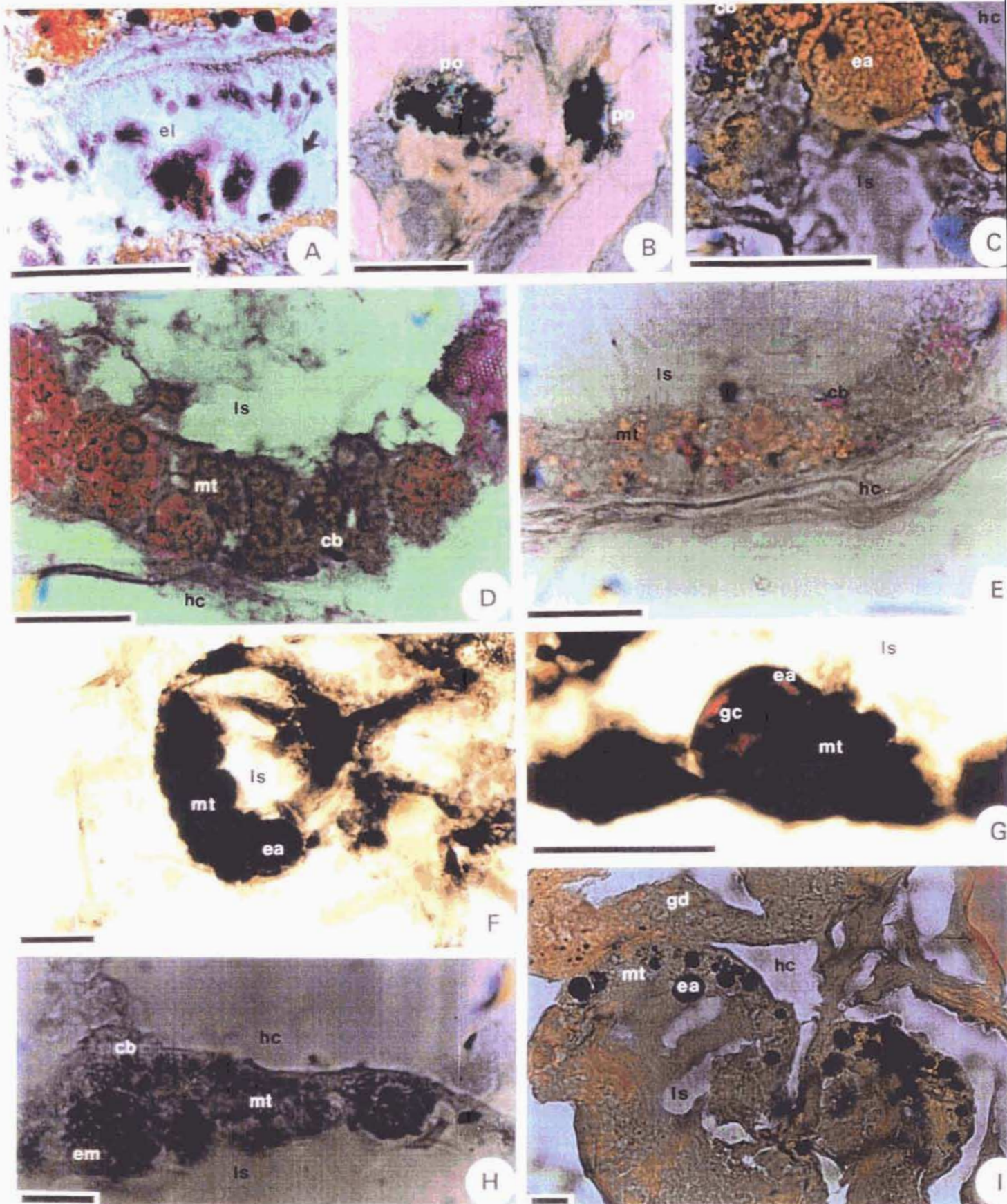


Figura 5 A - I: A. Paraneuronas (---->); B. Células pigmentadas ocre; C - I, "Masa ocrea" de *Biomphalaria glabrata*. A. Tri - APS. B y H. Método de Schmorl. C, Basofilia con azul de toluidina. D. Método de Ziehl - Neelsen. E, Método de Hayes. F y G. Negro Sudan B I. Hale; al= fluido perivitelino o albumen, cb= cuerpo basófilo, ea= esferas amarillas, el= epitelio de la cámara hembra. gc= gránulo de cromolipóide, gd= epitelio de la glándula digestiva, hc= hemocoele, ls= lumen de la cámara de maduración, mt= matriz y po= célula con pigmento ocre. Escalas: 50 μ m.

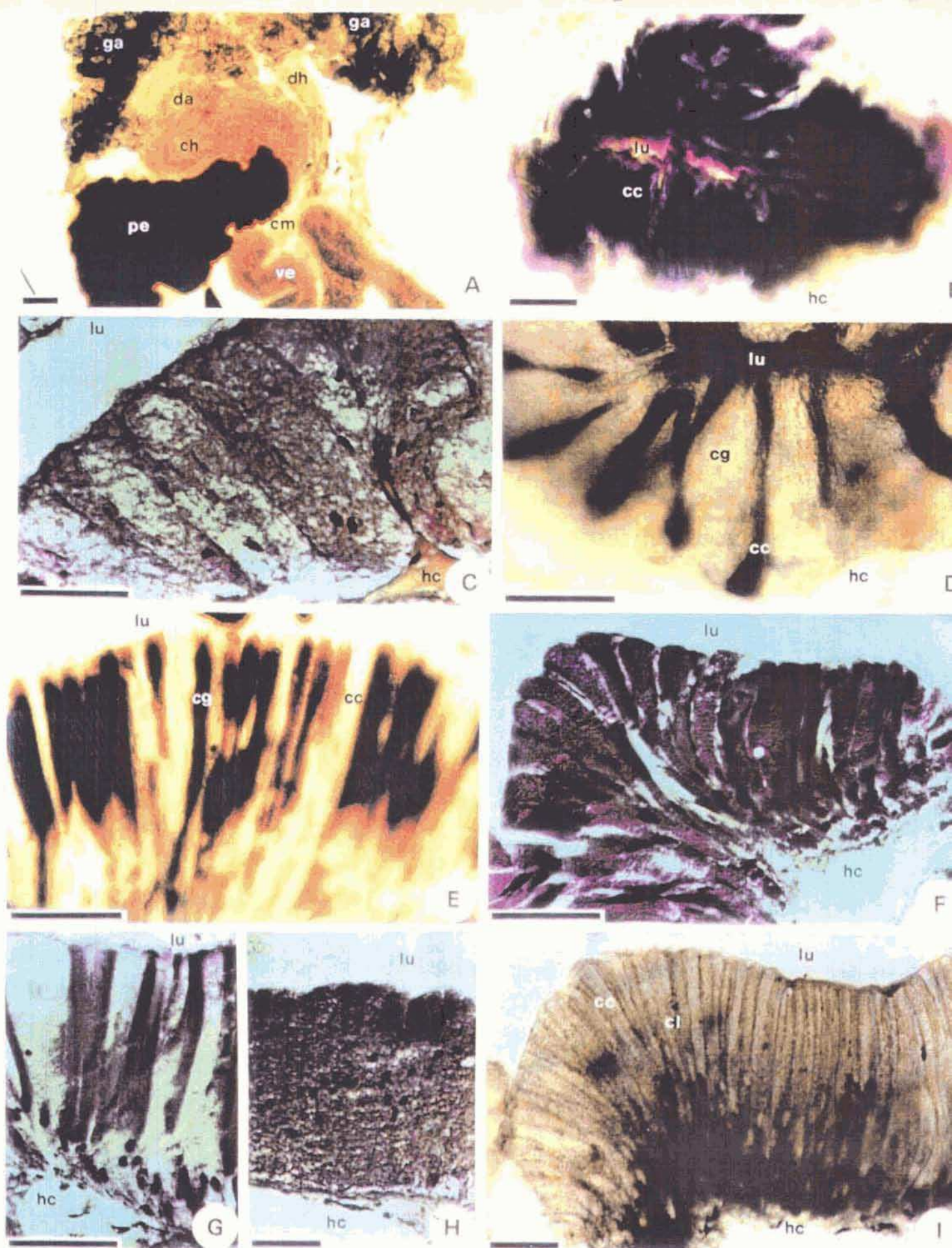


Figura 6 A - I: A. zona del "carrefour"; B - I. oviducto: B, pre-ootecal, primer tramo; C, D y E. pre-ootecal, segundo tramo; F, glándula ootecal; G. pared derecha, post-ootecal; H y I, pared izquierda, post-ootecal. *Blomphalaria glabrata*. A, B y D. Método de Feyter; C, F, G y H. Tri-APS; E. Lipoproteínas por "desenmascaramiento"; I Negro Sudan B. cc= célula columnar, cg= célula globosa. ch= cámara hembra. cl= célula cilindrada. cm= cámara macho. da= ducto excretor de la glándula del albumen. dh= ducto hermafrodita, ga= glándula del albumen. hc= hemocele. lu= lumen, pe= oviducto pre-ootecal y ve= vas efferens. Escalas: 50 μ m. I u

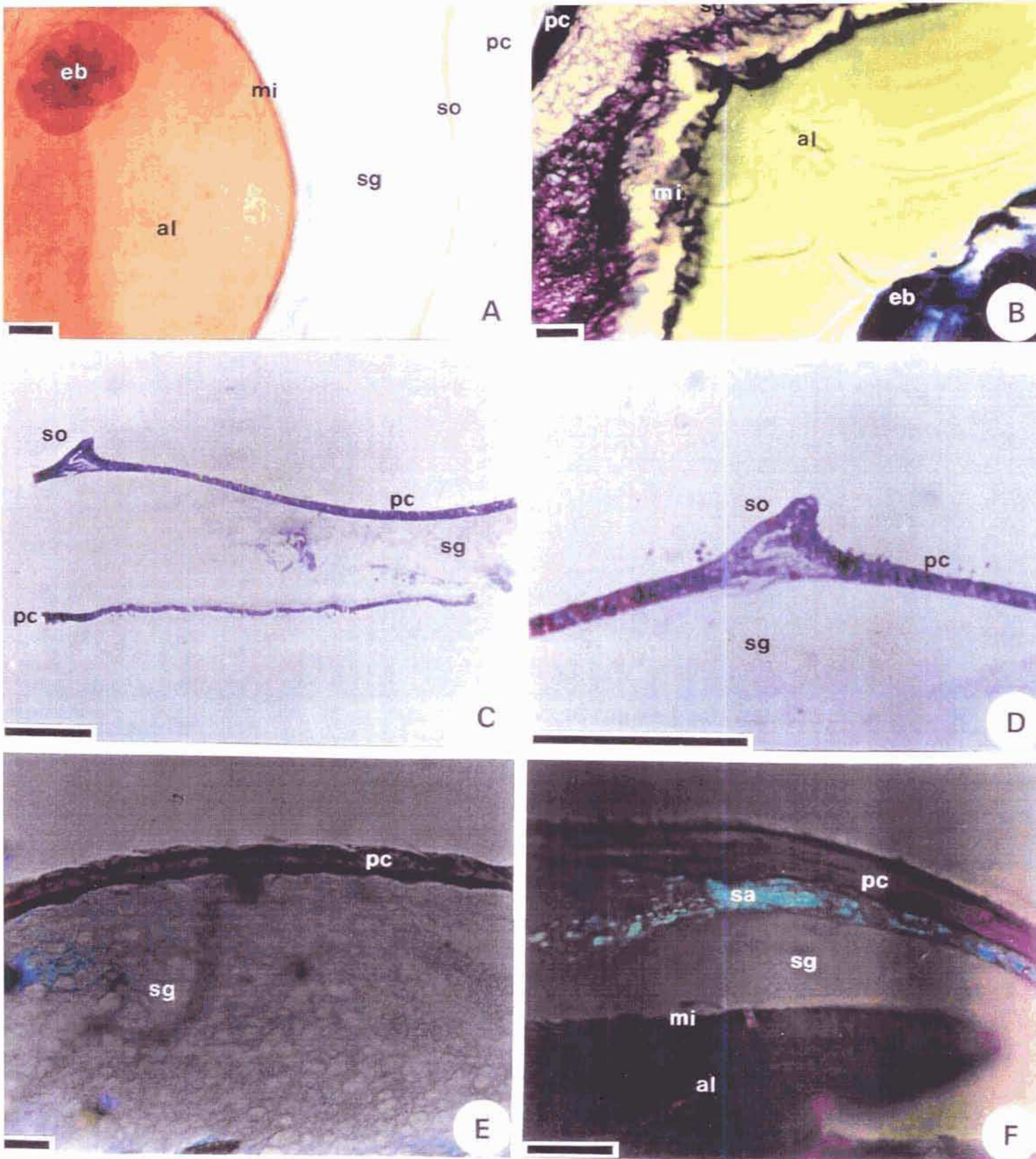


Figura 7 A - F: Cápsula de huevos de *Biomphalaria glabrata*. A. Natural; B, Metacromacia: azul de toluidina, pH 3,4 + nitrato de uracilo en medio acuoso; C y D, Corte fino del borde de la cápsula de los huevos, mostrando la sutura opercular, Fucsina básica - azul de toluidina; E, Método de Schulze (líquido de lupol - ácido sulfúrico) y método de Feyter; F, Método de Bennhold, variante de Puchtler + birrefringencia, demostrando la sustancia amiloide; al = fluido perivitelino o albumen, eb = embrión, mi = membrana perivitelina o interna, pc = pared capsular, sa = sustancia amiloide, sg = sustancia gelatinosa y so = sutura opercular. Escalas: 50 μ m.

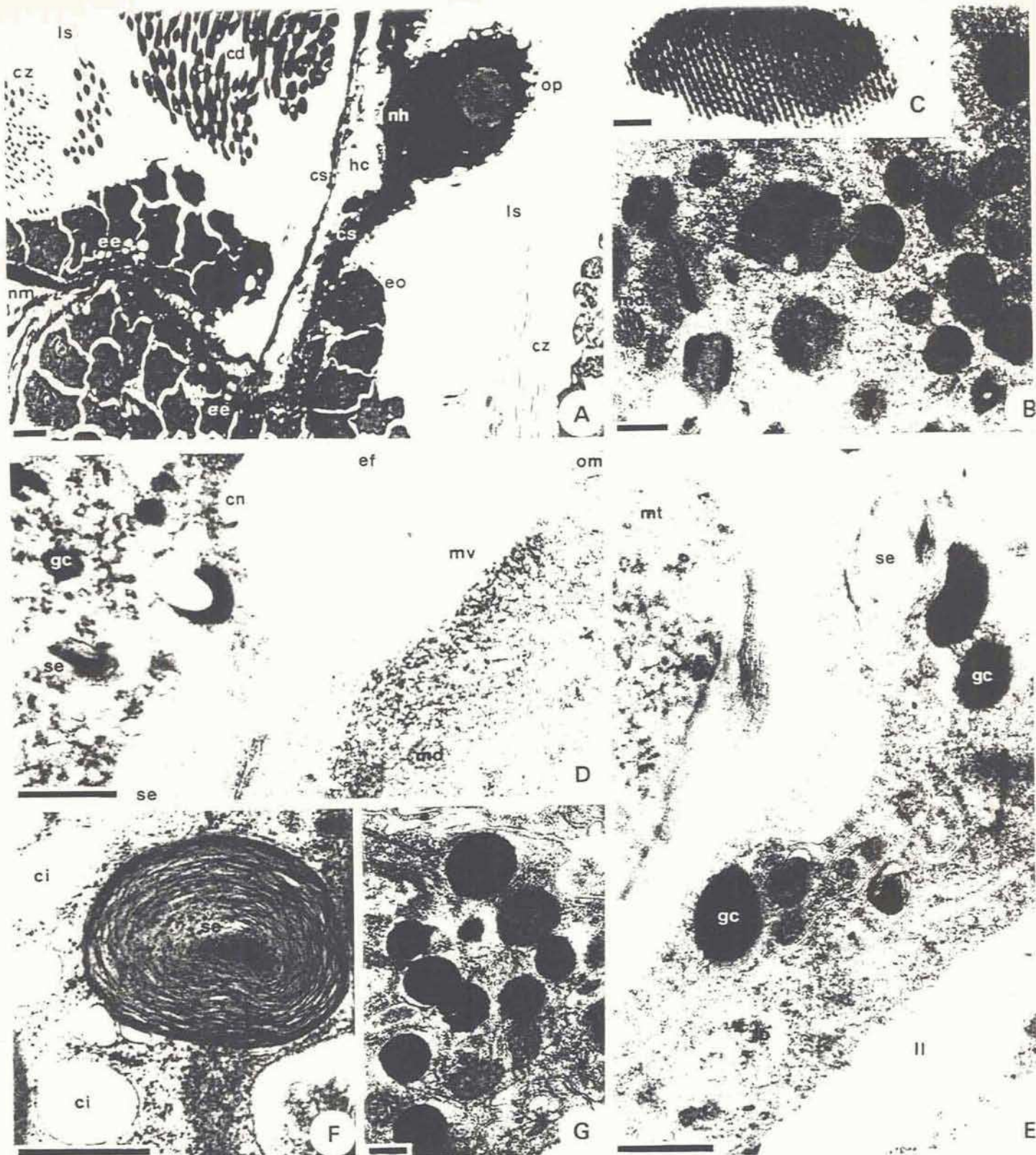


Figura 8 A - G: A, Ovocito en movimiento y estadios de espermatogonias; B, Gránulos de vitelo y mitocondrias en ovocito; C, Cristal de vitelo; D, Ovocito, espacio folicular y trofocito; E, Trofocito folicular con laberinto basal, junto a la "masa caótica"; F, Lisosomas secundarios en trofocito folicular; G, Gránulos de melanina en una célula con pigmento negro. *Biomphalaria glabrata*. A, corte fino. Azul de toluidina; B - G, MET; cd= colas de espermatidas, ci= cisternas periféricas, cn= célula nodriza de la línea hembra, cs= conectivo de la pared del saco de maduración, cz= colas de espermatozoides, ee= estadio "epiteloide", ef= espacio folicular, eo= espermatogonias, gv= gránulo de vitelo, hc= hemocelo, lb= laberinto basal, ls= lumen del saco de maduración, ll= lámina basal, md= mitocondrias, mt= matriz de la "masa caótica", mv= microvellocidades, nh= núcleo de la célula nutricia de la línea hembra, nm= núcleo de la célula nutricia de la línea macho, om= ovocito maduro, op= ovocito previtelino y se= lisosoma secundario. Escalas: A, 10 μ m; B, D, E, F y G, 1 μ m; C, 0.1 μ m.

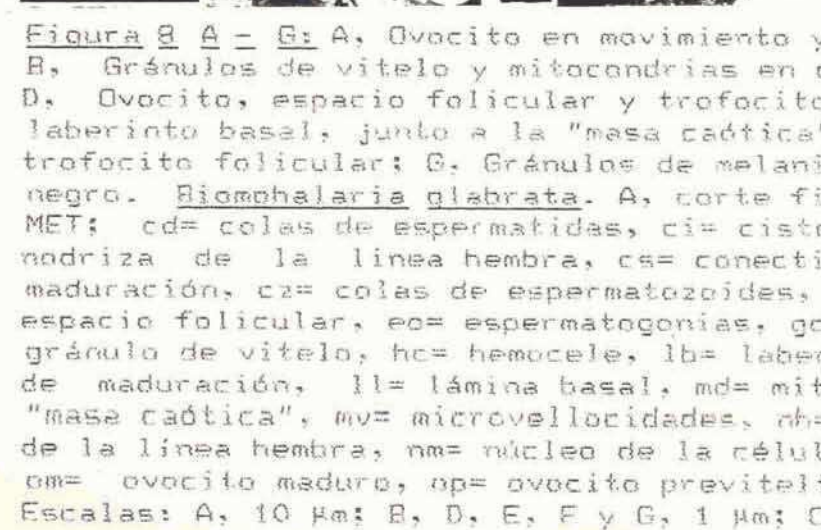
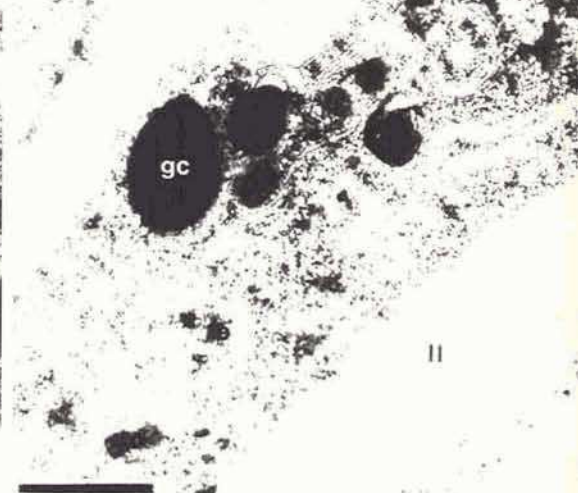
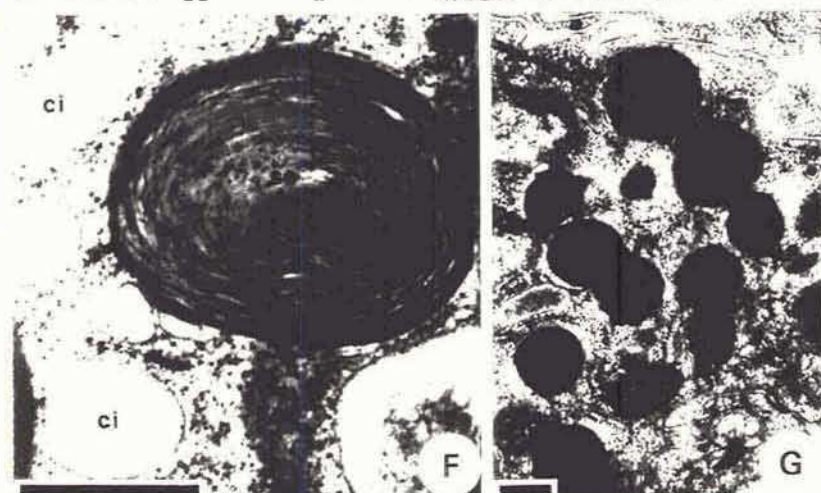
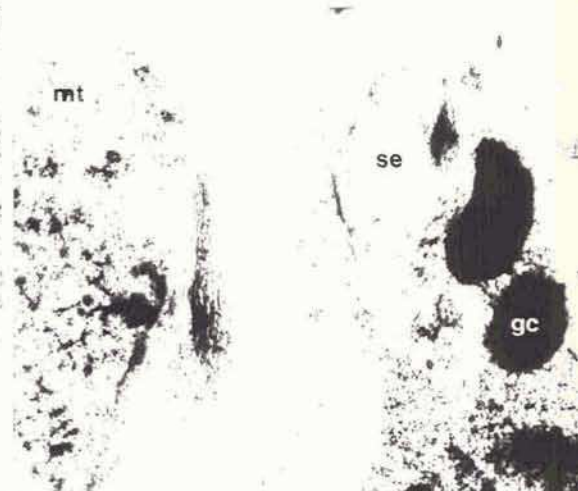
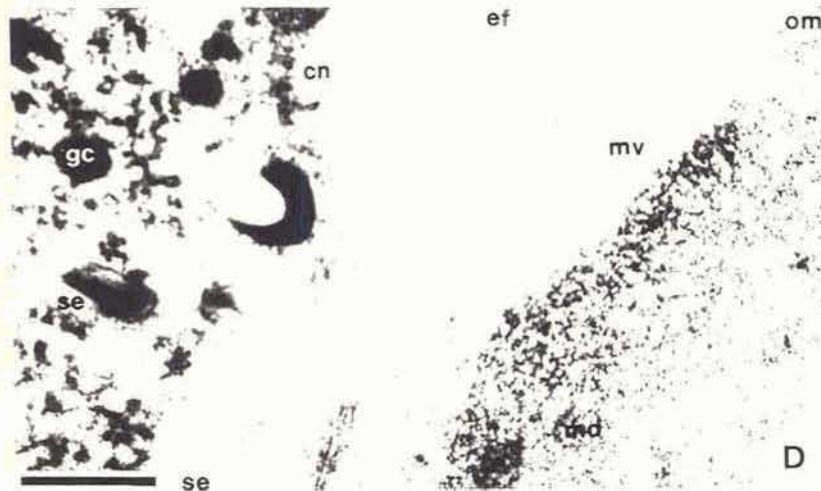
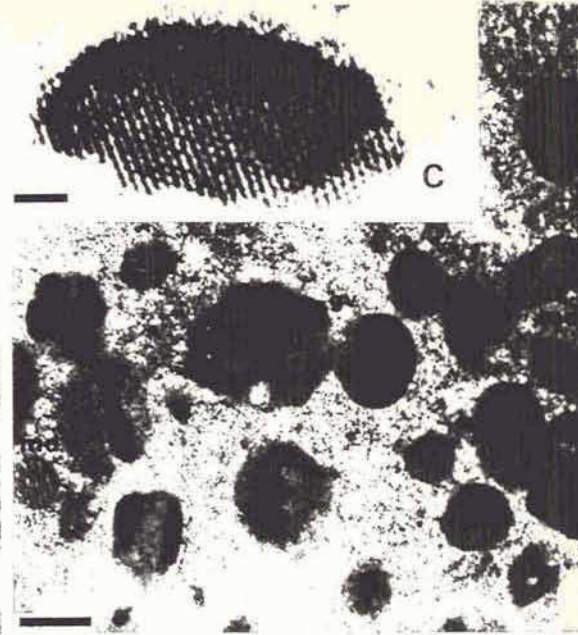
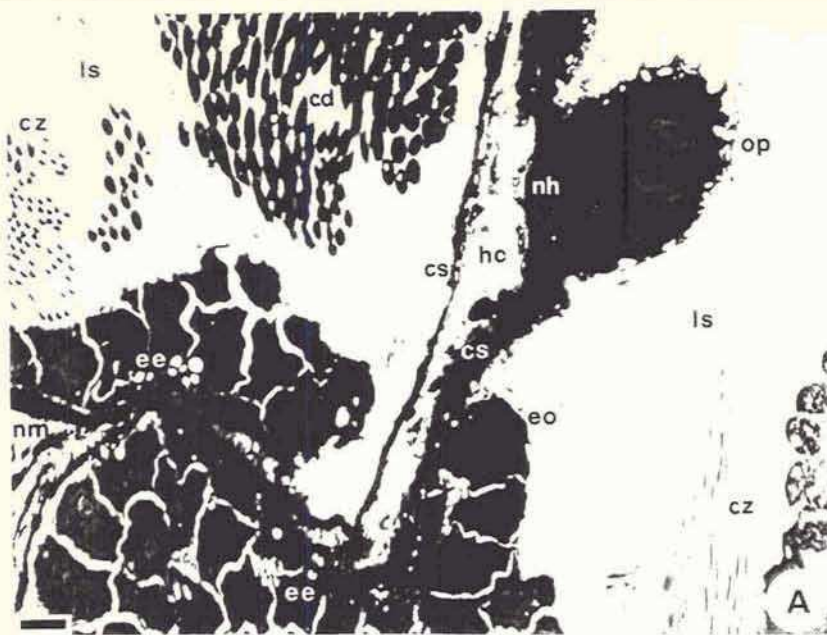


Figura 8 A - G: A, Ovocito en movimiento y estadios de espermatogonias; B, Gránulos de vitelo y mitocondrias en ovocito; C, Cristal de vitelo; D, Ovocito, espacio folicular y trofocito; E, Trofocito folicular con laberinto basal, junto a la "masa caótica"; F, Lisosomas secundarios en trofocito folicular; G, Gránulos de melanina en una célula con pigmento negro. *Biomphalaria glabrata*. A, corte fino. Azul de toluidina; B - G, MET; cd= colas de espermátidas, ci= cisternas periféricas, cn= célula nodriza de la línea hembra, cs= conectivo de la pared del saco de maduración, cz= colas de espermatozoides, ee= estadio "epiteloide", ef= espacio folicular, eo= espermatogonias, gc= gránulo de cromolipóide, gv= gránulo de vitelo, hc= hemocoelo, lb= laberinto basal, ls= lumen del saco de maduración, ll= lámina basal, md= mitocondrias, mt= matriz de la "masa caótica", mv= microvellocidades, nh= núcleo de la célula nutritiva de la línea hembra, nm= núcleo de la célula nutritiva de la línea macho, om= ovocito maduro, op= ovocito previtelino y se= lisosoma secundario. Escalas: A, 10 μ m; B, D, E, F y G, 1 μ m; C, 0,1 μ m.

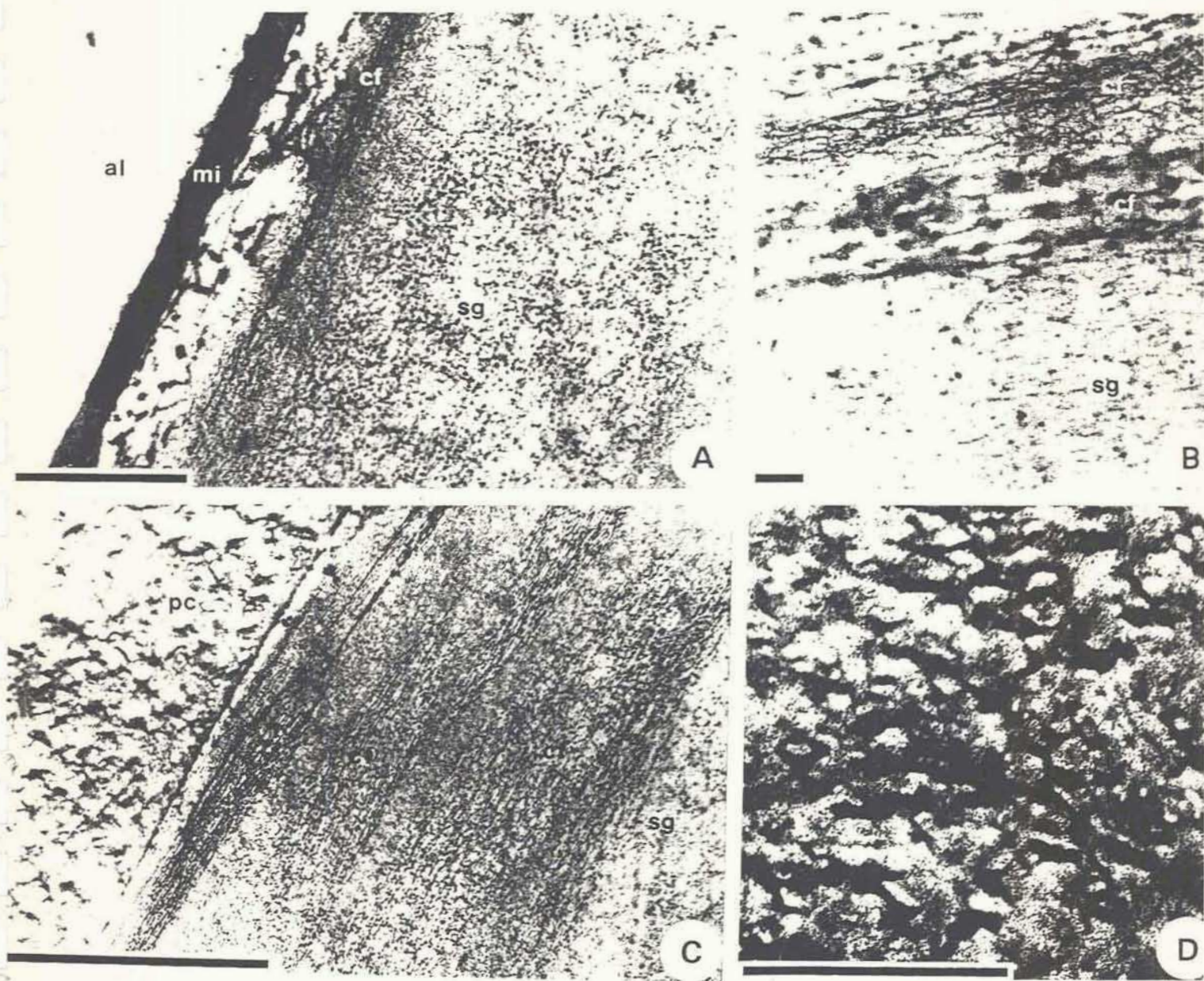


Figura 9 A - D: A. Membrana interna y sustancia gelatinosa de la cápsula de los huevos; B. Sustancia gelatinosa; C. Sustancia gelatinosa y pared capsular; D. Pared capsular. *Biomphalaria glabrata*. MET. al= fluido perivitelino o albumen, cf= capa de microfibras entrelazadas de igual orientación, mi= membrana perivitelina o interna, pc= pared capsular y sg= sustancia gelatinosa. Escalas: A y D, 1 μ m; B, 0,1 μ m; C, 10 μ m.

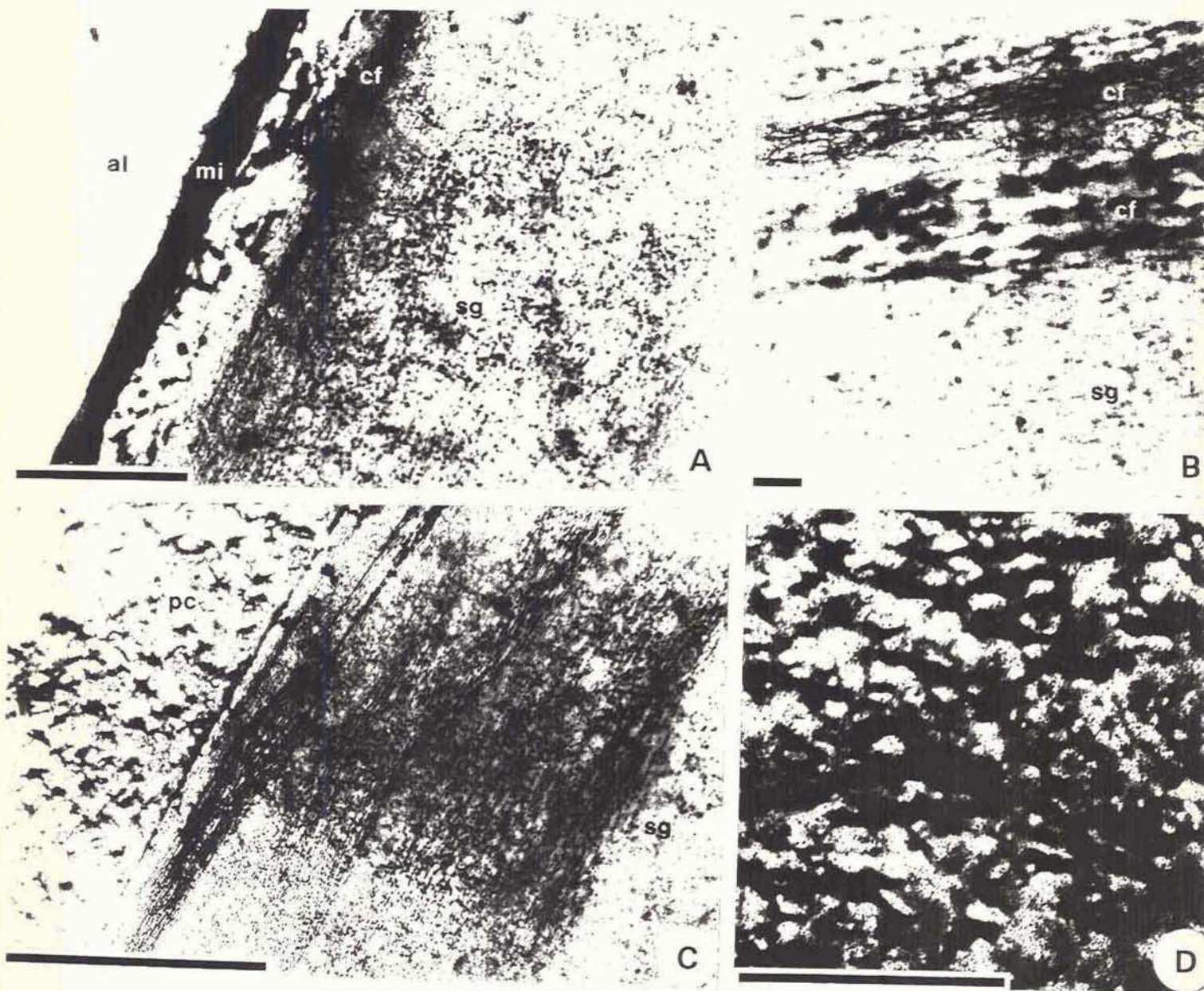


Figura 2 A - D: A. Membrana interna y sustancia gelatinosa de la cápsula de los huevos; B. Sustancia gelatinosa; C. Sustancia gelatinosa y pared capsular; D. Pared capsular. *Biomphalaria glabrata*. MET. al= fluido perivitelino o albumen; cf= capa de microfibras entrelazadas de igual orientación, mi= membrana perivitelina o interna, pc= pared capsular y sg= sustancia gelatinosa. Escalas: A y D, 1 μ m; B. 0,1 μ m; C. 10 μ m.