

R. 23161

T  
11  
99

Estudio del Hepatopáncreas de

Helix aspersa en situación

normal y tras ayuno

TOMO I

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>	
<b>GRANADA</b>	
Nº Documento	<u>619594860</u>
Nº Copia	<u>121174283</u>

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

Sección de Biológicas

Dpto. de Citología e Histología

ESTUDIO DEL HEPATOPANCREAS DE HELIX  
ASPERSA EN SITUACION NORMAL Y TRAS  
AYUNO

Trabajo presentado por  
Antonio M. Almendros  
Gallego, Licenciado en  
Ciencias Biológicas, para  
optar al grado de Doctor.

El Director del Departamento de Citología e Histología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral presentada por D. Antonio M. Almendros Gallego, con el título "Estudio del hepatopáncreas de *Helix aspersa* en situación normal y tras ayuno", ha sido dirigida por el Prof. Dr. D. Francisco Abadía Fenoll (Catedrático de Citología e Histología) y el Prof. Dr. D. José Aijón Noguera (Prof. Agregado de Citología e Histología), habiéndose realizado en el Dpto. de Citología e Histología de la Facultad de Ciencias de Granada.

A mis padres

A Conchi

A D. Estanislao.

Quiero expresar, en primer lugar, mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Francisco Abadía Fenoll, Catedrático y Director del Dpto. de Citología e Histología, por la dirección de esta tesis, así como por el gran interés mostrado durante el desarrollo y conclusión de la misma, poniendo a mi alcance todos los medios necesarios para su realización.

Asimismo, al Prof. Dr. D. José Aijón Nogueira, codirector de esta tesis, por sus acertados consejos y constante estimulación durante el transcurso de estos años.

Al Prof. Dr. D. Julio Navascués Martínez, por la valiosa ayuda que ha supuesto para mí durante todos estos meses, dedicándome generosamente su tiempo.

Por último, a todos los componentes del Departamento de Citología e Histología que, de una u otra forma, me prestaron su ayuda.

I N D I C E

I. INTRODUCCION .....	1
II. SITUACION BIBLIOGRAFICA .....	5
1. Sobre la constitución del hepatopáncreas de Helix .....	6
A. Constitución general de la glándula	6
B. Tipos celulares que constituyen el adenómero .....	8
C. Las células digestivas .....	11
D. Las células excretoras .....	20
E. Las células cálcicas .....	25
F. Las células delgadas .....	29
2. Sobre los cuerpos densos .....	31
A. Los cuerpos líticos en general ....	31
B. Los lisosomas en el hepatopáncreas	38
3. Sobre las mitocondrias .....	40
A. Aspectos generales .....	40
B. Las mitocondrias en las células hepatopancreáticas .....	44
4. Sobre los granos cálcicos .....	46
A. Aspectos morfológicos y estructu- rales .....	46
B. Gránulos relacionados con las esfé- rulas cálcicas .....	50
C. Origen y formación .....	52
D. Procesos fisiológicos en los que intervienen .....	53
III. MATERIAL Y METODOS .....	56
1. Fuente de experimentación .....	57

2. Clasificación del material .....	59
A. Caracoles con 10 días de ayuno ..	59
B. Caracoles con 30 días de ayuno ..	60
C. Caracoles con 100 días de ayuno ..	61
3. Preparación de las muestras .....	62
A. Fijación .....	63
B. Deshidratación .....	66
C. Inclusión .....	68
D. Corte de las piezas .....	71
E. Contraste de los cortes .....	73
F. Observación y fotografía .....	76
4. Estudios cuantitativos y sistemas de medida .....	77
IV. OBSERVACIONES Y RESULTADOS .....	79
1. Carácter general de la glándula .....	80
A. Situación macroscópica y disposi- ción tisular de los elementos com- ponentes .....	80
B. Estudios con microscopía electró- nica .....	82
2. Células propiamente glandulares .....	86
A. Células digestivas .....	86
B. Células excretoras .....	88
C. Células cálcicas .....	90
D. Células oxífilas .....	91
E. Distribución tridimensional .....	93
3. Caracteres de la superficie celular ...	95
A. Superficie apical .....	95
B. Contactos intercelulares .....	100
C. Elementos de la base .....	103

4. Carácter general de los núcleos .....	110
5. Las mitocondrias .....	113
6. El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi .....	116
7. Formaciones granulares y esferulares ...	119
A. Las gotas lipídicas .....	119
B. Tipos de granos densos .....	120
C. Los gránulos cálcicos .....	129
8. Estudio comparativo de los elementos del hepatopáncreas en sucesivas etapas de ayuno .....	132
A. Comparación de la situación a los 10, 30 y 100 días .....	132
9. Estudio cuantitativo sobre la disposición de gotas de lípidos y gránulos cálcicos tras diverso tiempo de ayuno .....	136
A. Estudio cuantitativo en las gotas lipídicas .....	136
B. Estudio cuantitativo en los gránulos cálcicos .....	155
V. COMENTARIO .....	171
1. Sobre la constitución general de la glándula .....	172
2. Sobre la estructura general del adenómero	178
3. Sobre la situación mitocondrial .....	185
4. Sobre las observaciones de cuerpos densos	189
5. Sobre los granos cálcicos .....	194
6. Sobre las modificaciones inducidas por el ayuno .....	196
VI. CONCLUSIONES .....	200
VII. BIBLIOGRAFIA .....	204

## I. INTRODUCCION

Las células constitutivas del hepatopáncreas de Moluscos Gasterópodos han sido estudiadas, tanto a microscopía óptica (Krijgsman, 1925, 1928; Thiele, 1954; Nakazima, 1956; Abolins-Krogis, 1961; Sumner, 1965a) como a microscopía electrónica (Bani, 1962; David y Götzze, 1963; Abolins-Krogis, 1965; Sumner, 1966a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). Estos estudios han demostrado la existencia de varios tipos celulares en los adenómeros de la citada glándula. Todos esos tipos celulares presentan una intensa actividad metabólica, que se traduce en notables cambios morfológicos y síntesis de diversas estructuras a lo largo de su ciclo vital.

Prácticamente todas las células de la referida glándula digestiva se encuentran implicadas en procesos de carácter digestivo, en los que intervienen de manera decisiva toda una diversidad de cuerpos líticos. Por otra parte, las mitocondrias pueden mostrar una gran variación de unos tipos celulares a otros, ofreciendo diversidad de forma, tamaño, localización y estructura interna, variación que incluso puede llegar a observarse dentro de un mismo tipo celular hepatopancreático en distintos estados metabólicos. Toda esta variedad de aspectos morfológicos de lisosomas y mitocondrias, hacen de la glándula digestiva de Gasterópodos un material especialmente apto para el estudio de posibles peculiaridades estruc-

turales y funcionales de tales orgánulos.

Además, algunas células hepatopancreáticas se encuentran íntimamente relacionadas con el metabolismo del calcio, sintetizándose en su citoplasma unos componentes específicos, los llamados granos cálcicos, cuya estructura, origen e implicaciones funcionales han atraído nuestra atención.

Por último, los tipos celulares del hepatopáncreas muestran una gran sensibilidad frente a estados de inanición, ofreciendo en estas condiciones una amplia gama de variaciones estructurales, que afectan a diversos componentes citoplasmáticos, variaciones que también han sido objeto de nuestro estudio.

Por lo tanto, el hepatopáncreas de Gasterópodos reúne una amplia gama de cualidades que lo convierten en un modelo muy adecuado para el estudio de aspectos ultraestructurales y funcionales de diversos orgánulos citoplasmáticos, fundamentalmente mitocondrias y lisosomas. Sobre estos puntos de la investigación citológica todavía permanecen muchas incógnitas y aspectos confusos, por lo que, tratando de profundizar en el conocimiento de esos aspectos, nos hemos decidido a tomar como modelo de estudio el ya reseñado órgano digestivo. La especie

elegida ha sido el caracol *Helix aspersa*, puesto que se trata de un animal cuya adquisición no ofrece dificultades, por estar muy extendido en nuestro entorno ecológico, y cuyo mantenimiento y crianza resultan relativamente sencillos.

Así pues, en el trabajo que constituye la presente tesis doctoral hemos prestado una especial atención a las mitocondrias, cuerpos densos líticos y granos cálcicos de las células del gasterópodo *Helix aspersa*, tanto en condiciones normales como en estados de ayuno, haciendo asimismo referencia a todas aquellas particularidades que hayamos estimado de interés de los restantes componentes celulares.

## II. SITUACION BIBLIOGRAFICA

## 1. SOBRE LA CONSTITUCION DEL HEPATOPANCREAS DE HELIX

### A. Constitución general de la glándula.-

La glándula digestiva de los Gasterópodos, y en concreto de las especies correspondientes al género *Helix*, se encuentra constituida por una gran cantidad de adenómeros tubulares (Barfurth, 1883; Billet y McGee-Russell, 1955; Krijgsman, 1925; Walker, 1970) que desembocan en pequeños conductillos excretores, los cuales se reúnen en conductos de mayor calibre. Estos últimos confluyen finalmente en un conducto excretor principal, que viene a desembocar en el tubo digestivo, a nivel del intestino medio (Gardiner, 1978).

Los conductos y conductillos excretores se hallan limitados por un epitelio, cuya constitución ha sido observada a microscopía electrónica por Walker (1970). Según este autor, el mencionado epitelio es columnar y va disminuyendo de altura conforme su situación es más cercana a los adenómeros. Entre las diversas células epiteliales se disponen algunas de carácter glandular mucoso. Las células epiteliales, que pueden ser ciliadas o de superficie lisa, ofrecen un núcleo basal y un citoplasma que aparece más denso en el ápice, debido a la existencia en este nivel de depósitos de lípidos y de glucógeno. Estas células, así como las que se sitúan en los adenómeros, de cuya constitución citohistológica se dará una detallada referencia

bibliográfica más adelante, descansan sobre una lámina basal, por debajo de la cual se dispone una capa de tejido conectivo que envuelve a toda la glándula (Billet y McGee-Russell, 1955; Walker, 1970).

Entre el tejido conectivo, que contiene gran cantidad de fibras de colágeno, se localizan algunas células musculares lisas. En estas células, las miofibrillas se sitúan en la periferia del citoplasma (Rogers, 1968) y el retículo endoplasmático liso es escaso. Las mitocondrias, de forma irregular y con numerosas crestas transversales, se encuentran dispersas por todo el citoplasma, en el cual también aparecen ribosomas libres, aparato de Golgi, pequeñas vacuolas y gránulos de glucógeno. Dispuestos a lo largo de las células musculares, se pueden observar axones nerviosos de diámetros variados (Walker, 1970).

La glándula digestiva de Gasterópodos es contráctil (Nakazima, 1956), condición que debe a la existencia de las mencionadas células musculares. La posibilidad de contracción del hepatopáncreas es de gran importancia para el transporte de alimento hasta los adenómeros, así como para la conducción de la secreción desde los adenómeros hasta la luz intestinal, a través de los conductos excretores.

## B. Tipos celulares que constituyen el adenómero.-

La estructura citohistológica de los adenómeros tubulares del hepatopáncreas de Gasterópodos pulmonados ha sido objeto de numerosos estudios, tanto a microscopía óptica (Barfurth, 1883; Frenzel, 1885; Krijgsman, 1925, 1928; Carriker y Bilstad, 1946; Thiele, 1953; McGee-Russell, 1955; Nakazima, 1956; Abolins-Krogis, 1960; Rigby, 1963; Rosenbaum y Ditzion, 1963; Sumner, 1965a; Walker, 1970) como electrónica (Bani, 1962; David y Gotze, 1963; Abolins-Krogis, 1965; Sumner, 1966a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978).

La primera referencia sobre la constitución de las porciones secretoras de la glándula digestiva de Gasterópodos es la ofrecida por Barfurth (1883). Este autor describe tres tipos celulares en los túbulos secretores del hepatopáncreas de *Helix* y *Arion*, que denominó "kalkzellen", "leberzellen" y "fermentzellen", los cuales se corresponden respectivamente con las actualmente conocidas como células cálcicas, células digestivas y células excretoras. Posteriores investigadores han descrito estos mismos tipos celulares en varios géneros de Gasterópodos (Baecker, 1932; Van Weel, 1950; Fretter, 1952; Thiele, 1953; Nakazima, 1956; Sumner, 1965a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). Junto a estas tres clases de células se ha descrito un cuarto tipo, que se ha dado en llamar células

delgadas ("thin cells") (Sumner, 1965a, 1966a; Walker, 1970) u oxífilas (Aijón y col., 1978).

Parece posible que alguno de los cuatro tipos celulares mencionados no sea más que la manifestación morfológica de diferentes estados metabólicos de un mismo elemento. Al parecer, es probable que esta posibilidad sea cierta para las células digestivas y excretoras (Fretter, 1952; Billet y McGee-Russell, 1955; Aijón y col., 1978). Por lo tanto, según esta opinión, esos dos elementos celulares corresponderían a un mismo tipo en distintas etapas de actividad metabólica. Por otra parte, según otras hipótesis (Thiele, 1953; Sumner, 1965a), las células excretoras procederían de la degeneración de células cálcicas. Además, David y Gotze (1963) describen la misma estructura para el citoplasma de las células cálcicas y digestivas, aunque según la opinión de Sumner (1966a), probablemente la descripción que hacen aquellos autores solo corresponde a células digestivas. De cualquier modo, la existencia de cuatro tipos celulares en el adenómero del hepatopáncreas, ya sea como consecuencia de diferentes situaciones metabólicas, ya sean auténticas diferenciaciones estructurales, parece bien establecida en la literatura.

Pero la presencia de esos cuatro tipos celulares en los túbulos hepatopancreáticos no es un carácter gene-

ral de todos los Moluscos, ya que en Lamelibranquios se han descrito tan solo dos: células digestivas y células basófilas (Sumner, 1966b, 1966c). Las células digestivas de este grupo de Moluscos son muy parecidas a las de Gasterópodos, mientras que las células basófilas parecen ser equivalentes a las células cálcicas, si bien estas últimas poseen granos cálcicos de las que carecen aquellas.

Las diversas células constitutivas de los túbulos secretores aparecen estrechamente unidas entre sí. Hacia la parte apical de la zona de unión de dos células adyacentes se aprecia a microscopía electrónica un material denso, que se dispone sobre la superficie interna de las respectivas membranas (Sumner, 1966a), estructura que, según este investigador, se corresponde con la barrera terminal descrita en el epitelio intestinal de Mamíferos por Palay y Karlin (1959).

En zonas más inferiores de la superficie de contacto entre células vecinas se pueden distinguir desmosomas septados (Sumner, 1966a), similares a los encontrados en células de otros Invertebrados, como Celentéreos (Wood, 1959) e Insectos (Tsubo y Brandt, 1962; Wiener y col., 1964; Locke, 1965). En este tipo de desmosomas, las membranas de células adyacentes se presentan asociadas mediante un material granular, observándose conexiones transver-

sales entre ambas membranas. Esta forma de mecanismos de unión han sido descritos también en Lamelibranquios (Sumner, 1966c). Además, en este grupo de Moluscos se han observado espacios intercelulares más o menos amplios hacia la base de la pared del adenómero, los cuales, en opinión de Sumner (1966c), permitirían la penetración de amebocitos entre las células de los túbulos, situación ya descrita por Graham (1931). Tales amebocitos tienen como misión el transporte de productos absorbidos por las células glandulares hacia otras regiones corporales (Yonge, 1926).

#### C. Las células digestivas.-

Al conocimiento de la estructura de las células digestivas del hepatopáncreas de Gasterópodos se ha llegado a través de numerosos trabajos, entre los que destacan los de Sumner (1965a, 1966a) y Walker (1970), que son los que fundamentalmente han proporcionado la información que se describe seguidamente.

Las células digestivas son las más abundantes de los cuatro tipos existentes en el adenómero. Son de forma columnar y sus dimensiones medias son 15  $\mu$  de anchura máxima y entre 44 y 61  $\mu$  de altura (Sumner, 1965a). Hacia la base se sitúa el núcleo, más o menos ovalado, que suele contener dos nucléolos.

El citoplasma tiene como característica fundamental su gran vacuolización, pudiéndose detectar, ya a microscopía óptica, cuatro tipos de vacuolas: apicales, con gránulos amarillos, con gránulos verdes y con gránulos proteicos (Sumner, 1965a).

Las vacuolas apicales se sitúan en la porción apical del citoplasma, con un diámetro de aproximadamente 1,5  $\mu$ . Tanto a microscopía óptica como electrónica, no ofrecen contenido visible en su interior (Sumner, 1965a, 1966a).

En la región citoplasmática situada inmediatamente por encima del núcleo aparece una gran vacuola con numerosos cuerpos en su interior, que han sido denominados gránulos amarillos. A veces, en esta gran vacuola, el espacio que queda entre los gránulos amarillos se muestra vacío, pero en otras ocasiones aparece ocupado por un material finamente granular (Walker, 1970). En algunas células digestivas, junto a la referida gran vacuola se pueden observar otras más pequeñas, que también contienen el mismo tipo de inclusiones.

Los gránulos amarillos ofrecen un diámetro de 2  $\mu$  y su forma es bastante irregular. A microscopía óptica, mediante técnicas histoquímicas, se ha podido comprobar que su componente fundamental es la lipofuchina (Sumner,

1965a), aunque también presentan materiales de naturaleza polisacárida, como se desprende de su condición PAS positiva (Walker, 1970). A microscopía electrónica presentan una constitución muy densa a los electrones, estando integrados por un material constituido por la asociación de pequeños gránulos de 0,4 a 0,6  $\mu$ , cada uno de los cuales está formado, a su vez, por gránulos menores. Esta ultraestructura resulta similar a la de los granos de lipofuchina, descritos en varios tejidos de Mamíferos por Duncan y col. (1960), Essner y Novikoff (1960), Malkoff y Strehler (1963) y Goldfischer y Bernstein (1969), lo cual concuerda con la composición ya reseñada de los gránulos amarillos. Respecto al destino de estos elementos, Barfurth (1883) demostró que en las heces del caracol se pueden encontrar este tipo de cuerpos, en todo semejantes a los que aparecen en el interior de las células digestivas, por lo que Sumner (1965a) llega a afirmar que los gránulos amarillos son excretados al exterior por las células digestivas.

Un tercer tipo de vacuolas, que se disponen en la porción citoplasmática situada entre las vacuolas apicales y la gran vacuola de gránulos amarillos, presentan en su interior los llamados gránulos verdes, así llamados por Krijgsman (1928), debido a su fácil tinción con el verde luz. Las vacuolas de esta naturaleza presentan un único grano en el interior de cada una de ellas (Sumner, 1965a).

Los gránulos verdes son de un tamaño superior a los amarillos, ya que presentan un diámetro de 3 a 3,5  $\mu$  (Sumner, 1965a) y ofrecen un contorno más o menos irregular. Se encuentran constituidos por proteínas y polisacáridos (Walker, 1970). A microscopía electrónica estos granos son de una densidad notablemente menor que la ofrecida por los amarillos, y presentan una disposición homogénea y grisácea; en ocasiones, junto a la masa grisácea, pueden aparecer zonas de mayor densidad (Sumner, 1966a; Walker, 1970).

Los gránulos verdes, según Sumner (1965a) y Walker (1970), son acúmulos de material recientemente ingerido por las células digestivas, junto con residuos indigeribles. En favor de esta hipótesis habla el hecho de que las células digestivas toman partículas alimenticias que se acumulan en vacuolas similares a las que contienen los gránulos verdes (Jordon, 1918; Rosen, 1941; Walker, 1970). Pero, además de ésta, también hay otras hipótesis que vienen a explicar la procedencia de los granos verdes, como es la defendida por Krijgsman (1928) y Thiele (1953), que habla de un ciclo secretor, sincrónico en todas las células digestivas del adenómero, durante el cual los gránulos amarillos se transforman en gránulos verdes, que son expulsados al exterior. No obstan-

te, Sumner (1965a) rechaza esta suposición, basándose en la diferente composición de ambos tipos de granos, aunque este mismo autor (Sumner, 1966a) encuentra en *Succinea*, género de Gasterópodos bastante afín a *Helix*, una gran similitud entre la ultraestructura de los gránulos amarillos y verdes, lo cual vendría a favorecer la hipótesis de la procedencia de los gránulos verdes a partir de los amarillos. Sin embargo, parece más probable que esto no sea así, como defiende Walker (1970), argumentando las grandes diferencias, tanto estructurales como histoquímicas, entre ambos tipos de granos en la especie *Agriolimax reticulatus*, perteneciente también a los Gasterópodos pulmonados.

Dependiendo de la distinta concentración y distribución de las vacuolas con gránulos verdes y amarillos, Billet y McGee-Russell (1955) describen dos tipos de células digestivas en *Helix*: unas con gránulos verdes distribuidos por todo el citoplasma y otras con gránulos amarillos dispuestos basalmente y gránulos verdes en el ápice celular. Pero entre ambas clases de células se pueden encontrar todos los estadios intermedios, lo que viene a indicar que no se trata de auténticos tipos celulares diferentes (Sumner, 1965a).

Otras vacuolas que, aunque constatando su rareza en células digestivas, han sido descritas por Sumner (1965a),

son las que contienen en su interior los denominados gránulos proteicos. Estos gránulos son más abundantes en células cálcicas, pero cuando aparecen en células digestivas son de mayor tamaño que los de aquellas, distribuyéndose por cualquier región del citoplasma. A microscopía electrónica los gránulos proteicos están constituidos por un material amorfo y difuso, y, en cuanto a composición, muestran la presencia de proteínas y presentan una reacción positiva a los tests histoquímicos para la demostración de triptófano (Walker, 1970).

Además de los cuatro tipos vacuolares descritos, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática de la superficie apical, se ha podido detectar a microscopía electrónica la presencia de numerosas vesículas de 1000 a 4500 Å, limitadas por una membrana y con un contenido visible (Sumner, 1966a). Estas pequeñas bolsas son consideradas por David y Gotze (1963) como retículo endoplasmático liso, pero Sumner (1966a) las califica como vesículas de fago y pinocitosis, puesto que son similares a las observadas por Gauthier (1963) y Afzelius y Rosen (1965) en las células absorbentes del gastrodermo de Hidroideos. Vesículas semejantes a estas se distribuyen también entre las vacuolas que contienen gránulos verdes o amarillos.

En el citoplasma de las células digestivas se disponen, asimismo, cisternas de retículo endoplasmático ru-

goso más o menos hinchadas, aparato de Golgi, situado en las cercanías del núcleo, mitocondrias y bolsas lipídicas (Sumner, 1965a, 1966a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). Además, Walker (1970) ha descrito la presencia de glucógeno en las células digestivas de *Agriolimax reticulatus*.

Las mitocondrias, de un tamaño aproximado de  $0,8 \mu$  de largo por  $0,6$  de ancho, se pueden distribuir de manera más o menos uniforme, o bien concentradas hacia el ápice (Sumner, 1965a). Sus crestas, según David y Gotze (1963), son de tipo longitudinal, aunque Sumner (1966a) encuentra más frecuentemente orientaciones transversales y oblicuas.

El número de bolsas lipídicas es variable, concentrándose a menudo unas junto a otras, para formar grandes agregados hacia la base celular (Sumner, 1965a). Pueden ser de forma redondeada o irregular, y su diámetro oscila entre  $0,5$  y  $1,5 \mu$ , pudiendo llegar incluso hasta  $3 \mu$ .

La disposición de la membrana plasmática en la superficie libre del tipo celular al que nos estamos refiriendo queda también recogida en la literatura. Según sea esta disposición, se distinguen dos clases de células digestivas (Sumner, 1965a). Una de ellas presenta microvellosidades, por debajo de las cuales se distingue una delgada lámina de citoplasma no vacuolado, mientras que la

otra clase no tiene microvellosidades y su parte apical hace protrusión en la luz del adenómero. La existencia de estos dos tipos de células digestivas se explica, según la opinión de Walker (1970), por la doble función secretora y absorbente de estas formas celulares; para este autor, las células con microvellosidades, que presentan vesículas fagocíticas y pinocíticas, se encuentran en fase absorbente, en tanto que las que carecen de ellas están en fase secretora.

Sumner (1966a) ha estudiado la estructura de las microvellosidades de estas células a microscopía electrónica y describe la existencia en ellas de microfilamentos de 100 Å de grosor, cuando se utiliza como fijador el tetróxido de osmio. Estas estructuras filamentosas son similares a las encontradas en las microvellosidades de células epiteliales del intestino de Mamíferos (Palay y Karlin, 1959; Brown, 1962; Millington y Finean, 1962; Kjaerheim, 1963; McNabb y Sandborn, 1964). Además, Sumner detalla la existencia en la parte distal de las microvellosidades de un material que sería equivalente al glicocalix.

Como se mencionaba con anterioridad, las células digestivas desarrollan una doble función de absorción de materiales alimenticios y de secreción de productos (Krijgsman, 1925, 1928; Fretter, 1952; Thiele, 1953; Sumner, 1965a; Walker, 1970). El carácter absorbente de estas células que-

da reflejado en la existencia de microvellosidades y la posible concentración apical de mitocondrias. Los productos absorbidos son probablemente digeridos intracelularmente (Rosen, 1941), lo cual parece quedar confirmado en las experiencias de Sumner (1965a), en las que las células digestivas de caracoles alimentados ofrece un considerable aumento del RNA citoplasmático con respecto a las de caracoles sometidos a un cierto período de ayuno, lo que, según Sumner, estaría en relación con la síntesis de los enzimas necesarios para la digestión de los materiales ingeridos. En cuanto a la secreción de sustancias, es de tipo apocrino, siendo expulsado el ápice celular a la luz del adenómero (Walker, 1970).

Aparte de las funciones absorbente y secretora, no faltan opiniones en la literatura acerca del desarrollo de otras funciones por parte de las células digestivas. Así, Fretter (1952), en sus estudios sobre *Helix pomatia*, *Arion hortensis* y *Agriolimax agrestis*, concluye que estas células se ocupan también del almacenamiento de glucógeno y grasa. En relación con esto existen discrepancias entre distintos autores. Así, Sumner (1965a) confirma, en efecto, la existencia de lípidos como inclusiones de reserva, pero no de glucógeno. Abolins-Krogis (1960) solo encuentra glucógeno en las células digestivas de *Helix pomatia*, pero Walker (1970), en *Agriolimax*, describe



los dos tipos de almacén.

Finalmente, Abolins-Krogis (1960) atribuye también a las células digestivas una participación en la regeneración de la concha.

#### D. Las células excretoras.-

Son células típicas del hepatopáncreas de Gasterópodos, puesto que en el de Moluscos Lamelibranquios no se presentan (Sumner, 1966c). En caracoles alimentados su número es relativamente abundante, aunque al someter a los animales a condiciones de ayuno, éste disminuye considerablemente. Las células excretoras son de forma globosa, con una altura media de 38  $\mu$  y una anchura máxima media de 23  $\mu$  (Sumner, 1965a). El núcleo es basal, pudiendo contener varios nucléolos, y presenta un bajo contenido en DNA, como lo demuestra su escasa capacidad de tinción con la reacción de Feulgen.

En el citoplasma aparece, por lo general, una vacuola central de grandes dimensiones, rodeada por una delgada capa citoplasmática. En su interior esta vacuola presenta inclusiones, que han sido calificadas como gránulos amarillos por Sumner (1965a, 1966a) y como gránulos excretorios por Walker (1970). Tales gránulos pueden presentarse indivisualizados o bien unidos entre sí, para formar

grandes agregados; además, cada gránulo aparece constituido, a microscopía electrónica, por muchos granos de menor tamaño (Walker, 1970).

Los gránulos amarillos de las células excretoras, o gránulos excretores, no son iguales a los que se encuentran en las células digestivas (Sumner, 1966a), aunque la participación de la lipofuchina en su composición está fuera de toda duda (Sumner, 1966a; Walker, 1970). No obstante, Abolins-Krogis (1960) creyó que los principales pigmentos constitutivos de estos gránulos eran el urocromo y la melanina, aunque más tarde (Abolins-Krogis, 1963a) admitió también la presencia en ellos de la lipofuchina. Además de estos pigmentos, encontró otras muchas sustancias en la composición de los gránulos excretores, como mucopolisacáridos, proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de RNA.

Las mitocondrias y bolsas de lípidos son otras estructuras que se pueden observar en el citoplasma de las células excretoras. Ambas se distribuyen fundamentalmente en el ápice celular y no son muy abundantes (Sumner, 1965a; Walker, 1970). En esta región celular se ha descrito, asimismo, la existencia de retículo endoplasmático y cuerpos multivesiculares (Walker, 1970). Sumner (1965a) dice no haber podido detectar la existencia de aparato de Golgi,

pero Thiele (1953) describe la presencia de esta estructura citoplasmática, aunque en estado de degeneración.

La superficie libre se dispone formando microvellosidades, por debajo de las cuales existe una región citoplasmática en la que abundan las estructuras tubulares, con unas dimensiones de 800-2400 Å de longitud y 200 Å de diámetro (Sumner, 1966a; Walker, 1970). Igualmente, en esta zona se disponen vacuolas, con un diámetro aproximado de 0,5  $\mu$ , las cuales pueden aparecer vacías a microscopía electrónica o con un material denso en su interior (Walker, 1970).

Aunque los primeros estudios realizados en el hepatopáncreas de Gasterópodos distinguían claramente entre células digestivas y excretoras, a partir de Krijgsman (1928) se han venido considerando a estas últimas, por diversos autores, como derivadas de las digestivas (Fretter, 1952; Billet y McGee-Russell, 1955; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). No obstante, otras opiniones afirman que las células excretoras son el producto de la degeneración de células cálcicas (Thiele, 1953; Sumner, 1965a, 1966a). Para Thiele (1953) esto es tan evidente que se refiere a las células cálcicas como "Kalkzellen Stadium II" y a las excretoras como "Kalkzellen Stadium III". El principal argumento de Sumner en contra de la procedencia de las células

excretoras a partir de las digestivas está en que no se han podido detectar estadios intermedios entre ambos tipos celulares, mientras que Abolins-Krogis (1960) describe células excretoras con gránulos proteicos en situación apical, que podrían corresponder a formas intermedias entre células digestivas y excretoras. De cualquier forma, ya deriven de células digestivas o de células cálcicas, lo que sí parece evidente es que las células excretoras son formas degeneradas, como se deduce del bajo contenido en DNA de su núcleo, de su escasa cantidad de citoplasma y de la ausencia o degeneración del aparato de Golgi (Sumner, 1965a).

Este mismo autor (Sumner, 1966a) describe la existencia de dos tipos de células excretoras, que denomina respectivamente como "células excretoras primitivas" y "células excretoras típicas". Posteriormente, Walker (1970) ha venido a confirmar la presencia de estas dos formas celulares. Las células excretoras primitivas presentan microvellosidades en la superficie apical, con un citoplasma en el que se disponen mitocondrias, cuerpos multivesiculares y diversas vacuolas de  $2,5 \mu$  de diámetro, con gránulos amarillos en su interior. Las células excretoras típicas pueden presentar microvellosidades, aunque frecuentemente éstas desaparecen. El citoplasma presenta los caracteres generales descritos para las células excretoras, destacan-

do la presencia de una única gran vacuola, a diferencia de las "primitivas" que tienen varias, y la escasez de las restantes estructuras citoplasmáticas, como mitocondrias o retículo endoplasmático.

En el criterio de Sumner (1966a), las células excretoras primitivas derivan de las células cálcicas, en las que las esférulas cálcicas van siendo sustituidas por cuerpos electron-densos y homogéneos, que se disponen en el interior de vacuolas. Posteriormente, en un grado más avanzado de transformación, las células excretoras primitivas darían origen a las células excretoras típicas. Es decir, el primer tipo de células excretoras no sería mas que un paso intermedio entre las cálcicas y las excretoras típicas.

La función asignada a las células excretoras ha sido diferente, según distintos autores. Así, inicialmente se creyó que eran secretoras de enzimas (Barfurth, 1883; Frenzel, 1885; Krijgsman, 1925), por lo que se les llamó "fermentzellen" (Barfurth, 1883). Pero otros investigadores han sustentado el criterio de que son células que se ocupan de la excreción de pigmentos clorofílicos tomados con el alimento (McMunn, 1900; Cuénot, 1899; Thiele, 1953; McGee-Russell, 1955). Asimismo, Sumner (1965a) y Walker (1970) defienden esta opinión, basándose en sus observa-

ciones de gránulos excretores o amarillos en la luz de los conductos glandulares y del intestino, así como en las heces. Por último, Abolins-Krogis (1960) piensa que el material de los gránulos amarillos de las células excretoras podría utilizarse en la regeneración de la concha de *Helix*.

#### E. Las células cálcicas.-

Este tipo celular ha sido descrito en Moluscos Gasterópodos (McMunn, 1900; Fretter, 1952; Van Weel, 1950; Thiele, 1953; Nakazima, 1956; Abolins-Krogis, 1965; Sumner, 1965a, 1966a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978; entre otros), aunque es inexistente en Lamelibranquios (Sumner, 1966b, 1966c).

Son células de forma más o menos piramidal, con una altura media en *Helix* de 37  $\mu$  y una anchura media en la base de 33  $\mu$  (Sumner, 1965a). El núcleo se sitúa hacia la base celular y muestra una forma irregular, con una marcada lobulación (Abolins-Krogis, 1965).

El citoplasma se caracteriza por presentar una alta concentración de RNA, como se ha podido demostrar con métodos histoquímicos, a microscopía óptica (Sumner, 1965a), situación que corresponde a la existencia de una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso, tal como se ha observado a microscopía electrónica (Abolins-Krogis, 1965;

Sumner, 1966a; Walker, 1970). Este retículo consta de cisternas aplanadas y paralelas entre sí, aunque en ocasiones pueden aparecer considerablemente dilatadas, sobre todo hacia el ápice celular.

Entre las cisternas de retículo se localizan unas inclusiones, esféricas u ovoideas, características de este tipo celular; son las llamadas esférulas cálcicas, o gránulos cálcicos, que se encuentran limitadas por una membrana, y cuya composición y estructura ha sido objeto de estudio por parte de numerosos autores (Barfurth, 1883; Grünbaum, 1913; Krijgsman, 1928; Sioli, 1935; Fretter, 1952; Abolins-Krogis, 1963a, 1965; Sumner, 1966a; Walker, 1970; Navascués y col., 1978; entre otros). No daremos aquí mayor detalle acerca de la situación bibliográfica de estas formaciones, puesto que será expuesta en otro capítulo de este apartado.

Además de las esférulas cálcicas, el citoplasma de estas células ofrece la presencia de vacuolas que contienen gránulos proteicos, de 4  $\mu$  de diámetro y estructura y composición semejantes a la de las inclusiones del mismo nombre existentes en las células digestivas. Estos gránulos, que se sitúan fundamentalmente en vacuolas del citoplasma apical, han sido observados por diversos autores, como Grünbaum (1913), Filhol (1937), Abolins-Krogis

(1960), Sumner (1965a) y Walker (1970).

Junto a las vacuolas con gránulos proteicos, en sus observaciones a microscopía óptica, Sumner (1965a) ha descrito la existencia de una gran vacuola apical con gránulos amarillos, pero con posterioridad (Sumner, 1966a), estudiando las células cálcicas a microscopía electrónica, no hace mención de ella.

Las mitocondrias, numerosas y con crestas oblicuas o transversales, se distribuyen por todo el citoplasma, aunque pueden aparecer concentradas en mayor proporción hacia el ápice (Sumner, 1965a, 1966a). El aparato de Golgi se sitúa hacia la base de las células, zona en la que igualmente abundan las bolsas lipídicas, cuyo tamaño oscila entre 1,5 y 5  $\mu$  de diámetro, pudiendo aparecer aisladas o en grupos más o menos numerosos (Sumner, 1965a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). Asimismo, Walker (1970) ha llegado a dar noticia de la existencia de gránulos de glucógeno en las células cálcicas de *Agriolimax*.

En la superficie apical se observan microvellosidades, de caracteres semejantes a las de las células digestivas (Sumner, 1966a), aunque Walker (1970) las ha encontrado menos numerosas que aquellas. El citoplasma inmediatamente inferior a estas microvellosidades carece de retí-

culo endoplasmático y suele ofrecer pequeñas vesículas de 1500 Å de diámetro y cuerpos multivesiculares (Sumner, 1966a). Este mismo autor ha referido la existencia de considerables invaginaciones de la membrana plasmática, hacia el polo basal de las células cálcicas.

Estas células se han especializado en almacenar sales de calcio (Fretter, 1952), aunque éste puede ser tan solo un aspecto de una función más general de almacenaje (Filhol, 1937), puesto que, como han demostrado Grünbaum (1913) y Nakazima (1956), las células cálcicas también almacenan lípidos, reduciéndose la cantidad de estos, cuando se someten a los animales a condiciones de ayuno.

Wagge (1951), McGee-Russell (1955) y Abolins-Krogis (1960, 1963a, 1965) opinan que las esférulas cálcicas se utilizan en la reparación de la concha de los Gasterópodos, en tanto que Hirsch (1917) y Krijgsman (1928) mantienen el criterio de que tales inclusiones son segregadas en el jugo digestivo, actuando como tampón para mantener constante el pH en el intestino. Por su parte, Walker (1970) refiere que el calcio almacenado será utilizado para diversas necesidades metabólicas del individuo, y concretamente en la producción del mucus que recubre el cuerpo de los Gasterópodos, mucus en el que, efectivamente, se ha demostrado la existencia de calcio (Barr, 1928; Dexheimer, 1951; Champion, 1961).

## F. Las células delgadas.-

McMunn (1900) fue el primero en describir este tipo celular en la especie *Limax flavus*, denominándolas "young cells", por creer que se trataba de células indiferenciadas.

Son células muy estrechas, que aparecen en escaso número, y cuya distribución, según las observaciones de Sumner (1965a), se hace entre cualquiera de los otros tipos celulares del adenómero, aunque en el criterio de Thiele (1953) y Walker (1970) solo se disponen entre células digestivas y cálcicas. El núcleo es basal y el citoplasma bastante homogéneo, con gran cantidad de mitocondrias (Sumner, 1965a, 1966a; Aijón y col., 1978) y un aparato de Golgi perinuclear. Contienen también retículo endoplasmático rugoso abundantemente distribuido y no presentan inclusiones de las existentes en los otros tipos celulares (Sumner, 1965a, 1966a).

Su función no es conocida, siendo la opinión más generalizada, aunque no plenamente demostrada, que se trata de células indiferenciadas, que en un determinado momento pueden dar origen a células cálcicas o digestivas (McMunn, 1900; Thiele, 1953; Sumner, 1965a; Walker, 1970). A este respecto, es interesante reseñar que mientras que Walker

(1970) defiende que pueden transformarse indistintamente en cualquiera de estos dos tipos celulares, Sumner (1965a) mantiene la opinión de que dan lugar fundamentalmente a células cálcicas, puesto que encuentra en éstas una gran actividad de fosfatasa alcalina, actividad que también había sido demostrada en las células delgadas (Nakazima, 1956), en tanto que en las células digestivas es muy escasa.

## 2. SOBRE LOS CUERPOS DENSOS

### A. Los cuerpos líticos en general.-

Desde que en la década de 1950, de Duve y su grupo de la Universidad Católica de Lovaina determinaron químicamente la presencia de hidrolasas ácidas en la subfracción "light" de la fracción mitocondrial de homogenados de hígado de rata (de Duve y col., 1955), los estudios sobre los cuerpos líticos del citoplasma celular se han ido sucediendo, llegando a proporcionar un abundante conocimiento sobre la morfología y función de tales estructuras. Tras la caracterización bioquímica de los lisosomas, se llevaron a cabo estudios a microscopía electrónica, con objeto de determinar la naturaleza estructural de estos elementos, estableciéndose en las células hepáticas una íntima correlación entre la actividad lítica y la presencia de cuerpos densos, de morfología heterogénea y rodeados por una membrana, relación que se ha visto confirmada en los demás tipos celulares que contienen lisosomas.

Con posterioridad, se han podido identificar un gran número de enzimas lisosómicas, tales como fosfatasa ácida, ribonucleasa ácida, desoxirribonucleasa ácida,  $\beta$ -glucuronidasa, lisozima, hialuronidasa, catepsina, esterases, etc. (Tappel, 1969; Barrett, 1972), demostrándose la heterogeneidad lisosómica en relación con su contenido enzimático.

Los primeros trabajos realizados sobre los lisosomas se llevaron a cabo en células hepáticas de Mamíferos (de Duve y col., 1955; Novikoff, 1957). Posteriormente, muchas de las investigaciones en este campo de la Citología se han realizado en el mismo material (Essner y Novikoff, 1961; Holt y Hicks, 1961; Ashford y Porter, 1962; Wattiaux y col., 1963; Novikoff y col., 1965; Goldfischer y col., 1970; Ma y Biempica, 1971; Kerr, 1973; Neely y col., 1977; Lee y col., 1979), como consecuencia de su especial aptitud para el estudio de estos componentes citoplasmáticos y de la acumulación de información bibliográfica sobre lisosomas en el citado material.

No obstante, los cuerpos líticos también han sido ampliamente investigados en otros tejidos de Mamíferos, como los epitelios de los túbulos renales (Miller y Palade, 1964; Maunsbach, 1966b, Straus, 1964, 1967; Galle, 1974) y de la mucosa intestinal (Behnke, 1963; Hsu y Tappel, 1964; Moe y col., 1965), o en los tejidos secretores de glándulas diversas, como tiroides (Wollman y col., 1964; Wollman, 1969; Nunez y Becker, 1970), próstata (Helminen y Ericsson, 1970), hipófisis (Smith y Farquhar, 1966) y glándulas sebáceas (Brandes y col., 1965). Asimismo, los lisosomas han sido objeto de investigación en los tejidos nervioso (Sellinger y col., 1964; Novikoff, 1967;

Koenig, 1969; Novikoff y col, 1971), óseo (Vaes, 1969), cartilaginoso (Dingle, 1962; Murray, 1975) y muscular (Schiaffino y Hamzlinkova, 1972; Topping y Travis, 1974; Wildenthal, 1975; Smith y Bird, 1976; Decker y Wildenthal, 1978). También se ha dirigido una especial atención en este campo a los leucocitos (Cohn y Hirsch, 1960; Hirsch, 1962; Farquhar y col., 1972; Bowers, 1973; David y col., 1979) y a los componentes del sistema retículo-endotelial (Novikoff, 1963; Treadwell, 1965).

De los mencionados estudios se deduce que la mayoría de las células de Mamíferos poseen un sistema lisosómico más o menos desarrollado. Igualmente se ha dado noticia de la presencia de orgánulos líticos en diversos tejidos de Vertebrados no Mamíferos (Weber, 1964, 1969; Hopkins y Baker, 1968; Hopkins, 1969; Davis y col., 1979) y de Invertebrados, fundamentalmente Artrópodos (Schin y Clever, 1965; Beaulaton, 1967a, 1967b; Bowen, 1968a, 1968b; Lockshin, 1969) y Moluscos (Sumner, 1969; Bowen, 1970a, 1970b; Bowen y Davies, 1971; Navascués y col., 1978).

La implicación del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi en la formación de los lisosomas ha sido claramente establecida (Novikoff y col., 1963, 1964a, 1964b; Novikoff y Shin, 1964; Brandes, 1965; Moe

y col., 1965; Dauwalder y col., 1972), habiendo sido desarrollado por Novikoff y su equipo (Novikoff, 1964; Novikoff y col., 1971) el concepto de GERL (asociación aparato de Golgi - retículo endoplasmático, de la cual proceden los lisosomas).

En lo que se refiere a los aspectos morfológicos, los cuerpos densos líticos muestran una notable variabilidad en las observaciones a microscopía electrónica, limitándose sus rasgos comunes a la presencia de una membrana limitante y a la existencia de un contenido interno, de densidad y apariencia muy diversas. Pronto se comprendió que las diferencias morfológicas de los lisosomas no son sino la expresión de la naturaleza dinámica y diferentes posibilidades de funcionamiento de estos orgánulos dentro de la célula. En efecto, esta situación se ha plasmado en el desarrollo del concepto de lisosomas primarios, para las vesículas cargadas de enzimas líticos que se liberan del aparato de Golgi y que aún no intervienen en procesos digestivos, y de lisosomas secundarios, para las estructuras lisosómicas cuyas hidrolasas ácidas se encuentran en un proceso activo de digestión. Estos últimos se hallan integrados fundamentalmente por las vacuolas heterofágicas ó fagolisosomas y las vacuolas autofágicas ó citolisosomas.

La formación de cuerpos líticos, junto con los mecanismos de endocitosis, vienen a constituir los procesos fundamentales de la digestión intracelular (Berthet, 1965; de Duve y Wattiaux, 1966). En efecto, el elegante trabajo de Straus (1964) en los túbulos contorneados del riñón, utilizando peroxidasa como elemento marcador de fagosomas y técnicas histoquímicas para la detección de lisosomas primarios, puso de manifiesto la fusión entre estos últimos y las vesículas de endocitosis, dando así origen a las vacuolas heterofágicas. Este proceso pudo tener su confirmación en el nivel ultraestructural merced a los estudios a microscopía electrónica de Graham y Karnovsky (1966) y Maunsbach (1966a, 1966b). Además, las vacuolas heterofágicas pueden unirse a nuevos fagosomas, utilizando así el contenido enzimático que aún permanezca activo en la degradación de los productos fagosómicos de reciente ingreso (Gordon y col., 1965).

Aparte de la digestión intracelular de productos exógenos, los lisosomas aparecen implicados también en procesos de autofagia, mecanismo mediante el cuál la célula digiere porciones más o menos limitadas de su propio citoplasma. Efectivamente, se ha podido detectar bajo microscopía electrónica la existencia de orgánulos incluidos en vacuolas más o menos grandes, separadas del

resto de citoplasma por una membrana, que se conocen como vacuolas autofágicas (Miller y Palade, 1964; Pitt y Galpin, 1973; Hall y col., 1973). Los orgánulos más frecuentemente examinados en estas condiciones han sido las mitocondrias, aunque también se han observado otros componentes citoplasmáticos, apareciendo casi siempre incluidas junto con ellos considerables porciones de hialoplasma.

En relación con el significado que la autofagia pueda tener dentro de la fisiología celular, se ha defendido que puede jugar un papel fundamental en la renovación de materiales celulares, contribuyendo de forma decisiva a la economía de la célula (Pitt, 1975). Se ha establecido que al someter células a estados de ayuno más o menos prolongados, se incrementan considerablemente los procesos de autofagia (Levy y Elliott, 1968). Probablemente ello se deba a que la inanición desencadena un mecanismo de supervivencia, a través del cual los componentes celulares que no son imprescindibles para el funcionamiento de la célula pueden ser degradados, obteniéndose así productos que están en condiciones de ser utilizados de nuevo o que pueden constituir una fuente de energía.

Se ha sugerido que las vacuolas autofágicas se podrían originar mediante un proceso en el que las cister-

nas de retículo endoplasmático liso, conteniendo enzimas líticas, envuelven una porción de citoplasma, que por último queda englobada en su totalidad (Ericsson, 1969a). El propio Ericsson (1969b) propone un nuevo mecanismo de formación de cuerpos autofágicos, según el cuál las vacuolas que incluyen material celular endógeno se fusionan con vacuolas heterofágicas, cuyo contenido enzimático actuaría tanto sobre el material ingerido por endocitosis como sobre las estructuras de carácter endógeno. Otros posibles orígenes de las vacuolas autofágicas son esbozados por Pitt (1975), como es la existencia de lisosomas primarios aplanados que abrazan y terminan envolviendo un trozo de citoplasma, o la acumulación en una zona de citoplasma de pequeños lisosomas primarios que van fundiendo sus membranas, hasta llegar a constituir una membrana continua que engloba a la citada región citoplasmática.

Como consecuencia de la digestión de materiales en las vacuolas heterofágicas y en las autofágicas, los productos de desecho junto a residuos no digeridos se acumulan en tales estructuras, convirtiéndose así en los llamados cuerpos residuales, los cuales pueden permanecer indefinidamente en la célula, llegando a afectar al normal funcionamiento celular. Tal acumulación ha sido descrita en células envejecidas de diversos tejidos, co-

mo nervioso (Samorajsky y col., 1964, 1968), hígado (Essner y Novikoff, 1960) y miocardio (Strehler y col., 1959).

Además de los mecanismos de digestión intracelular hetero o autofágica, los lisosomas pueden participar también en la digestión extracelular, mediante la liberación al medio externo de su contenido enzimático (Dingle y col., 1971), y en procesos secretores, como se ha podido demostrar en células hipofisarias y en las células foliculares del tiroides (Pitt, 1975).

#### B. Los lisosomas en el hepatopáncreas.-

Restringiendo nuestro comentario bibliográfico sobre los cuerpos líticos a la situación descrita en el hepatopáncreas de Moluscos, mencionemos que la ingestión de partículas alimenticias por parte de algunas células de la glándula digestiva de muchos de estos Invertebrados ha sido ampliamente defendida en la literatura (Cuénot, 1899; Jordon, 1918; Yonge, 1926; Millot, 1937; Rosen, 1941, 1952, 1965; Owen, 1955, 1970; Rosenbaum y Ditzion, 1963; Sumner, 1965b), habiéndose llegado a demostrar que tales partículas son digeridas intracelularmente (Rosen, 1930, 1941, 1950, 1952; Millot, 1937). Por otra parte, la presencia de diversas hidrolasas ácidas en la glándula digestiva de los Moluscos ha sido establecida, tanto por métodos bioquímicos (Jarrige y Henry, 1952; Billet,

1954; Dogson y Powell, 1959; Leon y col., 1960; Orzel, 1967) como mediante técnicas histoquímicas (Billet y McGee-Russell, 1955; Rosenbaum y Ditzion, 1963; Reid, 1966, 1968). Además, en los trabajos de Sumner (1965a, 1966a), Walker (1970) y Navascués y col. (1978) se describen en las células hepatopancreáticas de Gasterópodos toda una diversidad de gránulos o vacuolas que, por sus propiedades estructurales, parecen corresponder a cuerpos lisosómicos, correspondencia que, en efecto, ha sido confirmada por Sumner (1969) y Bowen y Davies (1971), habiéndose encontrado actividad fosfatasa ácida en los granos cálcicos de las células del mismo nombre, mientras que en las células digestivas y excretoras se ha localizado actividad de diversas enzimas líticas, tanto en las estructuras que presentan una morfología de lisosomas primarios, como en las vacuolas que contienen material fagocitado y en las que presentan gránulos de lipofuchina, las cuales podrían catalogarse como cuerpos residuales.

### 3. SOBRE LAS MITOCONDRIAS

#### A. Aspectos generales.-

Las mitocondrias vienen a constituir orgánulos proveedores de energía para la célula, habiendo sido catalogadas como las centrales energéticas de la misma (Lehninger, 1977). Los ya clásicos trabajos de Palade (1953) y Sjöstrand (1953) dieron a conocer los caracteres ultraestructurales básicos de estos componentes celulares, que estudios posteriores han venido a corroborar, si bien ofreciendo una amplia gama de variaciones morfológicas, estructurales y de relación con otras formaciones citoplasmáticas, en diferentes tipos de células o en distintos momentos de la vida celular.

Es hecho bien constatado que el número de mitocondrias puede sufrir variaciones, en relación con los requerimientos energéticos de la célula para la realización de las funciones específicas que ha de llevar a cabo (Fawcett, 1966; Du Praw, 1971; De Robertis y col., 1977). De este modo, resulta frecuente que la cantidad de mitocondrias aparezca aumentada en células que presentan muchas gotas de lípidos en su citoplasma, situación lógica teniendo en cuenta los altos requerimientos energéticos de estas células para efectuar la síntesis lipídica (Fawcett, 1966).

Por otra parte, la localización mitocondrial no es estática; por el contrario, las mitocondrias son orgánulos que se pueden desplazar de unos lugares del citoplasma a otros, movilidad que facilita su oportuna situación junto a aquellas estructuras celulares cuyo metabolismo requiere un aporte energético (Grundmann, 1967).

En relación con la ultraestructura de estos orgánulos, existe una situación similar. En efecto, aunque las imágenes de microscopía electrónica dan a menudo la impresión de que las mitocondrias son formaciones estructuradas de una manera rígida y estática, lo cierto es que su configuración ultraestructural resulta de una notable flexibilidad y dinamismo (Wolfe, 1977). La complejidad de su estructura interna varía en relación con la mayor o menor actividad metabólica de la célula que las contiene; en otras palabras, depende de la necesidad de producción de mayor o menor cantidad de ATP (Lehninger, 1964, 1977; Fawcett, 1966; De Robertis y col., 1977). De esta forma, células implicadas en procesos de transporte activo, en la síntesis de lípidos a partir de hidratos de carbono, o en la conversión de energía química en trabajo mecánico, suelen presentar mitocondrias con una gran cantidad de crestas (Fawcett, 1966). Por lo general, la densidad de la matriz es inversamente proporcional a la cantidad de crestas (Grundmann, 1967).

Relacionados con la dinámica situación de las mitocondrias se han descrito procesos de fragmentación o división mitocondrial, posibilidad que es conocida desde la comunicación de Lewis y Lewis (1915) y ha sido ampliamente recogida por la bibliografía general (Wolfe, 1977). Además, las mitocondrias pueden presentar estrechas relaciones con otras estructuras citoplasmáticas, situación que ha sido sobradamente demostrada (De Robertis y col., 1977). Así, frecuentemente las mitocondrias aparecen en íntima unión con gotas de lípidos, o relacionadas con profusas invaginaciones de la membrana plasmática (Fawcett, 1966). Tampoco resulta extraño que cisternas de retículo endoplasmático rugoso se sitúen rodeando a una mitocondria, manteniéndose a una distancia de la membrana externa mitocondrial igual a la que suele existir entre dos cisternas de retículo. Según Fawcett (1966), podría tratarse de una yuxtaposición transitoria entre estos dos elementos citoplasmáticos, para la utilización local de energía.

Las mitocondrias se encuentran altamente implicadas en el metabolismo celular del calcio (Lehninger, 1971). Cuando existen altas concentraciones de  $Ca^{++}$  en el ambiente que rodea a la mitocondria, ésta acumula el calcio en su interior (Peachey, 1964; Schraer y col., 1973; De Robertis y col., 1977), como ha podido ser de-

mostrado con métodos autorradiográficos que utilizan  $\text{Ca}^{35}$  (Cosmos, 1964; Carafoli, 1967). En condiciones de acumulación de calcio, las mitocondrias presentan densos gránulos osmiófilos en su matriz, que aunque no parecen corresponder a precipitados inorgánicos, de alguna manera intervendrían en la regulación del ambiente iónico interno de la mitocondria (Fawcett, 1966).

La incorporación intramitocondrial de calcio resulta facilitada por la presencia de aniones inorgánicos, como el fosfato (Bygrave, 1978). La identificación en la matriz mitocondrial de gránulos de fosfato cálcico (Lehninger, 1970, 1971) puede conducir a la consideración de que las mitocondrias son orgánulos fundamentales en los procesos de calcificación (Bygrave, 1978). Lehninger (1971) ha llegado a proponer que la calcificación se inicia mediante concentración de iones calcio y fosfato en el interior de la mitocondria, que, cuando se supera un cierto límite de acumulación, precipitan en forma de fosfato tricálcico amorfo. A continuación, parte del fosfato sería reemplazado por iones hidroxilo, para constituir hidroxapatita cristalina. Finalmente, la hidroxapatita pasaría al hialoplasma mediante mecanismos desconocidos, abandonando la célula para ser depositada en lugares extracelulares.

También resulta interesante resaltar que en muchos tipos de células aparecen frecuentemente degeneraciones mitocondriales, de las que la más generalizada es la inclusión de mitocondrias parcialmente digeridas en el interior de citolisosomas (Novikoff y Essner, 1962).

#### B. Las mitocondrias en las células hepatopancreáticas.-

La información acerca de las características específicas que las mitocondrias pueden ofrecer en las células del hepatopáncreas es exigua, y solo en algunas comunicaciones se hace referencia a ellas de manera más o menos indirecta.

El número de estos orgánulos varía en los diferentes tipos celulares del adenómero hepatopancreático. En las células excretoras se presentan en poca cantidad (Sumner, 1965a; Walker, 1970), en tanto que son relativamente numerosas en las células cálcicas y muy abundantes en las células delgadas u oxífilas (Sumner, 1965a, 1966a).

En cuanto a su distribución, las mitocondrias ofrecen preferentemente una localización apical en las células del adenómero (Sumner, 1965a, 1966a; Walker, 1970; Abolins-Krogis, 1970), aunque también pueden aparecer distribuidas uniformemente por todo el citoplasma, a excepción de las células excretoras.

Los detalles estructurales descritos en el hepatopáncreas de Gasterópodos sobre la estructura mitocondrial se limita casi exclusivamente a la disposición de las crestas, que por lo general presentan una orientación transversal u oblicua (Sumner, 1966a), aunque David y Gotze (1963) las han encontrado dispuestas en células digestivas de forma longitudinal. Por otra parte, Chen y col. (1974) han dado a conocer la formación de depósitos electrodensos de fosfato cálcico en las mitocondrias aisladas de células hepatopancreáticas del crustáceo *Callinectes sapidus*, en tanto que Abolins-Krogis (1968) refiere en células cálcicas de *Helix pomatia* la transformación de formaciones mitocondriales, para dar origen a esférulas cálcicas. Igualmente, han sido descritos procesos de fragmentación en mitocondrias del hepatopáncreas del caracol (Abolins-Krogis, 1970).

#### 4. SOBRE LOS GRANOS CALCICOS

##### A. Aspectos morfológicos y estructurales.-

Los granos cálcicos, ó esférulas cálcicas, son estructuras específicas de las células del hepatopáncreas de Moluscos Gasterópodos, aunque formaciones semejantes han sido descritas en el hepatopáncreas de Crustáceos (Becker y col., 1974) y el intestino de Cestodos (Nieland y von Brand, 1969; von Brand y Nylén, 1970).

Los granos cálcicos del hepatopáncreas de Gasterópodos presentan forma esférica u ovoidea, con tamaños aproximadamente iguales dentro de una misma célula, si bien en células diferentes pueden ofrecer una notable variación en sus dimensiones (Sumner, 1965a; Walker, 1970), observándose desde pequeños cuerpos esféricos de  $0,6 \mu$  de diámetro, hasta formaciones de  $7,5 \mu$ , que a menudo aparecen aplanadas (Abolins-Krogis, 1965). En las células cálcicas aparecen en situación relativamente basal, pudiéndose observar por todas las regiones del citoplasma, excepto en las apicales (Sumner, 1965a; Navascués y col., 1978). Asimismo, se ha demostrado la relativa frecuencia de esférulas cálcicas libres en la luz de los túbulos glandulares (Sumner, 1965a; Becker y col., 1974).

Los granos cálcicos no son simples condensaciones homogéneas de sales cálcicas, sino que poseen una

composición y estructura bastante más complicada (Grünbaum, 1913; Wagge, 1951; Abolins-Krogis, 1963a, 1963c, 1968). En efecto, las esférulas cálcicas de Gasterópodos constan de una matriz orgánica sobre la que se depositan sales de calcio (Baecker, 1932; Fretter, 1952; Billel y McGee-Russell, 1955; Abolins-Krogis, 1960, 1965). Estudios histoquímicos han demostrado que la matriz orgánica consta fundamentalmente de proteínas, junto a mucopolisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos en menor proporción (Abolins-Krogis, 1960, 1963c). Esta misma investigadora (Abolins-Krogis, 1965) describe como integrantes de la matriz orgánica, unas fibrillas proteicas que presentan una estriación, con un período de 208-220 Å, motivo que le induce a suponer que el material proteico podría ser de naturaleza colágena.

No obstante, la composición de la matriz orgánica no parece ser la misma en distintos grupos de animales; así, Becker y col. (1974), después de aislar mediante fraccionamiento los granos cálcicos del hepatopáncreas del cangrejo *Callinectes sapidus* y determinar su composición química, llegan a la conclusión de que las proteínas aparecen en escasa cantidad y los lípidos no son detectables, en tanto que aparecen cantidades apreciables de ATP, ADP y AMP.



Por lo que se refiere a los componentes minerales de las esférulas cálcicas, Krijgsman (1928), Sioli (1935) y Robertson (1941) han mantenido que, en el hepatopáncreas de *Helix*, las sales de calcio se presentan exclusivamente bajo la forma de fosfato, en tanto que Barfurth (1883) y Wagge (1951) defienden que solamente aparecen como carbonato. Fretter (1952), utilizando isótopos radiactivos, llegó a demostrar que en las esférulas cálcicas existe una mezcla de ambas sales, añadiendo Abolins-Krogis (1965) que, de ellas, es el carbonato cálcico el que se encuentra en mayor proporción en *Helix pomatia*. Sin embargo, estos resultados parecen estar en contradicción con los estudios de Burton (1972) que, para los granos cálcicos del hepatopáncreas de esta misma especie, establece una composición a base de calcio, magnesio y fosfato, fundamentalmente, y una pequeña proporción de carbonato, composición que viene a ser muy parecida a la descrita por Becker y col. (1974) en *Callinectes*.

La ultraestructura de las esférulas cálcicas ofrece, en diferentes grupos de animales, un similar ordenamiento de anillos concéntricos, tal como ha sido descrito por Bévelander y Benzer (1948), Bani (1962), Abolins-Krogis (1965), Sumner (1966a), Kapur y Gibson (1968), Stanier y col. (1968), Walker (1970), Becker y col. (1974)

y Navascués y col. (1978). Sumner (1966a), estudiando los granos cálcicos de *Helix aspersa*, describe la existencia de una membrana que los limita, y de un material denso a los electrones, situado en el centro de las esférulas, en torno al cual se disponen anillos de 400 a 1600 Å de grosor, constituidos por partículas muy densas. Separando a los distintos anillos, quedan espacios de baja densidad electrónica, de 100 a 1000 Å de espesor. Asimismo, entre el anillo más exterior y la membrana limitante se observa un espacio claro, de 800 a 5700 Å de anchura, que Walker (1970) considera debido a retracción del tejido; por el contrario, Bani (1962) opina que dicho espacio, en *Vaginulus borellianus*, estaría relleno de fluido.

No obstante, la estructura de los gránulos de calcio parece ofrecer ciertas variaciones en especies diferentes. Así, en *Agriolimax reticulatus*, Walker (1970) describe las formaciones anulares íntimamente adosadas a la membrana limitante, mientras que Bani (1962), en *Vaginulus*, cita la existencia de dos formaciones membranosas que unen a la membrana limitante del grano con la estructura anular interna, de manera que ésta quedaría como suspendida en el fluido antes mencionado; tales formaciones no se han podido detectar en otras especies.

Abolins-Krogis (1965) describe en *Helix pomatia* una estructura fibrilar que forma parte de los anillos

concéntricos, y que correspondería a la matriz orgánica, aunque Bani (1962) y Walker (1970) no dan noticia de su existencia. Según Abolins-Krogis (1965), los depósitos de sales cálcicas se pueden reconocer como densas granu- laciones bien definidas, que se disponen sobre la super- ficie de las fibrillas orgánicas. Por otra parte, el ma- terial denso observado por Sumner (1966a) en el centro de los granos cálcicos, ha sido descrito también por Ba- ni (1962) y Abolins-Krogis (1965) en otras especies de Gasterópodos, pero no ha sido detectado en Agriolimax (Walker, 1970).

En sus estudios de microscopía óptica, Sumner (1965a) ha llegado a observar, en caracoles en estado de hibernación, unos cuerpos anulares de 6-7  $\mu$  de diámetro, cada uno de los cuales consta de una zona superficial rica en RNA, que rodea a una esférula cálcica. Pero la equivalencia de estos cuerpos en la microscopía electró- nica no ha sido recogida en la literatura.

#### B. Gránulos relacionados con las esférulas cálcicas.-

Otro tipo de inclusiones granulares observadas en las células cálcicas de Helix, que parecen mostrar re- lación con las esférulas cálcicas, son los llamados "grá- nulos b" (Abolins-Krogis, 1965, 1968). Se trata de cuer- pos citoplasmáticos muy densos, de 0,4-0,7  $\mu$  de diámetro,

cuyo contenido parece incorporarse a los granos cálcicos. El aislamiento y análisis cromatográfico de los "gránulos b" ha permitido demostrar la presencia de calcio, proteínas, derivados del fenol y colesterol; este último compuesto puede facilitar la precipitación de iones calcio y la formación de proteínas fibrilares (Abolins-Krogis, 1963c). Los "gránulos b" podrían ser equivalentes a las estructuras observadas por Walker (1970), compuestas únicamente por material electrón-denso, que son consideradas como esférulas cálcicas inmaduras. Al parecer, los gránulos-b podrían actuar en algún proceso fuera de las células cálcicas, y así se ha llegado a describir una liberación de estos gránulos desde la base de las células que los contienen hacia el tejido conectivo subyacente (Abolins-Krogis, 1968).

Por otra parte, Becker y col. (1974) han descrito en el citoplasma de las células del hepatopáncreas del crustáceo *Callinectes sapidus*, tres tipos de formaciones de tipo cálcico. Las estructuras que estos autores determinan como gránulos tipo III serían equivalentes a las esférulas del hepatopáncreas de Gasterópodos, con su típica estructura anular y un diámetro de hasta 3-5  $\mu$ . Los gránulos tipo II, de un diámetro aproximado de 3  $\mu$ , poseen una membrana que limita un contenido muy denso, el cual queda separado de aquella por una región clara, que

podría ser debida a retracción. Los gránulos tipo I, de tamaño muy superior a los anteriores (20  $\mu$  de diámetro), no están limitados por membrana alguna y se observan como cuerpos densos con múltiples líneas de fractura que no se tiñen, exhibiendo hacia su periferia una estructura en capas. No se llega a aclarar la relación existente entre estos tres tipos de gránulos, aunque se apunta alguna evidencia morfológica que parece relacionar a los gránulos tipos II y III.

#### C. Origen y formación.-

El origen y formación de los granos cálcicos es una cuestión que aparece bastante confusa e incompleta en la bibliografía. De cualquier manera, parece seguro que el aparato de Golgi participa activamente en la síntesis de las sustancias necesarias para la formación de la matriz orgánica de las esférulas (Abolins-Krogis, 1965). Posteriormente, esta misma autora (Abolins-Krogis, 1968) describe un complejo proceso que estaría implicado en la formación de gránulos-b y esférulas cálcicas. En esta descripción se supone que las cisternas del aparato de Golgi de las células digestivas emiten pequeñas vesículas que contienen un material denso a los electrones, las cuales se fusionan entre sí para constituir vacuolas de tamaño medio y de menor densidad. En otras ocasiones, estas vacuolas se podrían formar a partir de la transformación

sufrida por mitocondrias, que son previamente rodeadas por cisternas del aparato de Golgi. Cualquiera que sea su procedencia, el contenido de tales vacuolas, mediante incorporación de materiales desde el citoplasma y posterior condensación, daría origen a gránulos amarillos, los cuales finalmente se transformarían en una red de sustancia electrodensa, entre la que se disponen espacios claros, que parecen compuestos por una sustancia fibrosa. Según Abolins-Krogis (1968), esta sustancia fibrosa se encontraría relacionada con los constituyentes de los gránulos-b y con las fibras de las esférulas cálcicas, pero no especifica en qué consiste tal relación, ni cómo los granos cálcicos se constituyen finalmente en las células cálcicas, puesto que todo el proceso descrito es referido a las células digestivas.

En resumen, en la formación de los granos cálcicos interviene el aparato de Golgi y también deben jugar un cierto papel los gránulos-b. Asimismo, parece ser que en dicha formación pueden intervenir tipos celulares diferentes de las células cálcicas.

#### D. Procesos fisiológicos en los que intervienen.-

Se les ha asignado a las esférulas cálcicas una intervención en diversos procesos fisiológicos, como es la producción de mucus que recubre el cuerpo de los Gas-

terópodos (Walker, 1970) o el mantenimiento del pH intestinal (Hirsch, 1917; Krijgsman, 1928), pero la función que ha sido mejor estudiada es su participación en los fenómenos de reparación de la concha, a cuya investigación Abolins-Krogis ha dedicado gran parte de sus trabajos (Abolins-Krogis, 1958, 1960, 1963b, 1963c, 1963d, 1968).

La reparación de la concha de Gasterópodos se inicia con la aparición de una matriz en la que aparecen una diversidad de estructuras cristalinas orgánicas, que muestran reacciones positivas para las proteínas colágenas, mucopolisacáridos de tipo condroitín y lípidos (Abolins-Krogis, 1958). Los cuerpos cristalinos mencionados contienen una serie de partículas de 0,2-0,4  $\mu$  de diámetro (Abolins-Krogis, 1958, 1963b, 1963c, 1963d). De tales partículas, las más grandes corresponden a "gránulos b" que contienen calcio (Abolins-Krogis, 1960, 1963c), mientras que las menores son probablemente idénticas a los gránulos proteicos observados en las células del hepatopáncreas (Abolins-Krogis, 1960). Durante la regeneración de la concha, muy pronto comienza una débil incorporación de calcio en los cuerpos cristalinos orgánicos, calcificación que va gradualmente afirmándose, hasta que finalmente las formaciones cristalinas orgánicas se transforman por completo en inorgánicas, puesto que reaccionan

negativamente ante las técnicas para la demostración de sustancias orgánicas (Abolins-Krogis, 1968). Las sustancias inorgánicas están constituidas fundamentalmente por carbonato cálcico, bajo la forma de calcita y aragonita (Abolins-Krogis, 1968).

Al parecer, los "gránulos b" son las partículas elementales que se van calcificando durante la mineralización de la concha (Abolins-Krogis, 1963d), actuando como centros de calcificación para el progreso de dicha mineralización. Posiblemente, los "gránulos b" de Abolins-Krogis son idénticos a los "gránulos iniciales" descritos por Bévelander y Benzer (1948) en el proceso de regeneración de la concha de Moluscos marinos.

Los estudios de Wagge (1951), Fretter (1952) y Abolins-Krogis (1960, 1963b) han demostrado que durante la regeneración de la concha, las proteínas de la matriz orgánica y las sales cálcicas se liberan desde el hepatopáncreas, siendo transportadas hasta la zona en reparación por células migradoras de carácter amebocítico. Previamente a su liberación, las esférulas cálcicas se desintegran, haciéndose más laxa su estructura y pudiéndose observar en ellas conjuntos de "gránulos b", los cuales abandonan las células cálcicas por su base y alcanzan el tejido conectivo subyacente (Abolins-Krogis, 1968), desde donde son recogidos y transportados por amebocitos.

### III. MATERIAL Y METODOS

## 1. FUENTE DE EXPERIMENTACION

Para la realización de este trabajo se han utilizado caracoles de la especie *Helix aspersa* (Müller). Los animales empleados fueron recogidos en el campo y colocados en un criadero, para su mantenimiento en el laboratorio. El criadero constaba de un recipiente de cristal, con forma de prisma rectangular y dimensiones aproximadas de 60x40x40 cm., cuya base se rellenó de ramas y hojas secas, situando asimismo dos placas de petri con agua y tierra, respectivamente. Sobre las hojas secas, que se renovaban de cuando en cuando, se depositaba el alimento, consistente en hojas de lechuga.

Dentro del criadero se dispusieron pequeños recipientes de cristal, limitados en su parte superior por una tela metálica de malla fina, con el fin de aislar los caracoles que habían de mantenerse en estado de ayuno, durante diferentes períodos de tiempo, como se describe más adelante.

El órgano utilizado para nuestro estudio, el hepatopáncreas ó glándula digestiva, es voluminoso y ocupa toda la espiral final de la concha del caracol, viniendo a desembocar entre el estómago y el intestino, a través del conducto excretor principal de la glán-

dula. Presenta dos lóbulos de diferentes tamaños: el lóbulo mayor se sitúa sobre el intestino, mientras que el lóbulo de menor tamaño queda más alejado del intestino y aparece incluido en las últimas espiras de la concha.

## 2. CLASIFICACION DEL MATERIAL

Para poder establecer las modificaciones de la estructura citohistológica sufridas por el hepatopáncreas de *Helix aspersa*, cuando se somete a los animales a diferentes períodos de ayuno, los caracoles utilizados en el presente estudio fueron divididos en tres grupos. Los animales del primer grupo fueron aislados en los pequeños recipientes existentes en el criadero, ya mencionados con anterioridad, y sometidos a un período de inanición de 10 días. El segundo grupo permaneció en estas condiciones durante 30 días. Por último, los caracoles pertenecientes al tercer grupo estuvieron durante 100 días en estado de ayuno.

### A. Caracoles con 10 días de ayuno.-

La situación básica establecida para el estudio del hepatopáncreas fue la ofrecida por los animales sometidos a 10 días de ayuno. Este período de tiempo es el necesario para que el material alimenticio existente en los conductos de la glándula digestiva pueda ser digerido, con lo que se favorece la consecución posterior de una buena preparación histológica del órgano en cuestión.

El número de caracoles sometidos a estas condiciones de ayuno fue de cinco. Al cabo de los 10 días de

inanición, los animales fueron colocados en un cristallizador con una pequeña cantidad de agua, proporcionándoles de esta forma un ambiente de humedad adecuado para hacerles salir de su estado de latencia. El objetivo de esta forma de proceder fue comprobar que, en efecto, los animales permanecían con vida, evitando así el que, por causas imprevisibles, se pudiera utilizar el órgano de un animal muerto, cuyas posibles modificaciones indujeran a falsas observaciones. Una vez comprobado este extremo, se procedió a extraer y preparar el hepatopáncreas de los diversos caracoles, en la forma que se detallará con posterioridad.

De las diversas glándulas digestivas utilizadas se obtuvieron un total de 120 muestras cúbicas de 1 mm de lado, correspondiendo 40 piezas a cada una de las regiones en que se dividió el órgano (partes proximal, media y distal).

#### B. Caracoles con 30 días de ayuno.-

Otros cinco caracoles fueron mantenidos en estado de inanición durante 30 días, procediéndose a continuación igual que con los de 10 días. De estos animales se obtuvieron también 120 muestras, repartidas entre las tres zonas del hepatopáncreas.

C. Caracoles con 100 días de ayuno.-

Por último, cinco nuevos animales fueron sometidos a un período de 100 días de ayuno, y tras comprobar que al cabo de este tiempo permanecían con vida, se procedió a la extracción de las respectivas glándulas digestivas y a los procesos de preparación del tejido, obteniéndose finalmente, igual que en los dos grupos de animales anteriores, 120 muestras, repartidas entre las porciones proximal, media y distal del hepatopáncreas.

### 3. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para la extracción del hepatopáncreas de cada caracol se procedió a la rotura de la concha, evitando producir cualquier tipo de lesión en el órgano objeto de estudio. Para ello se utilizaron unas pinzas, con las cuales se fue rompiendo cuidadosamente la concha, hasta dejar al descubierto los diversos órganos del animal. A continuación se extrajo el hepatopáncreas, separándolo de los restantes órganos, e inmediatamente fue introducido en un recipiente con solución fijadora. Se procedió entonces a la preparación de las muestras, para lo cual la glándula digestiva fue seccionada en tres partes, las cuales, como se ha mencionado anteriormente, fueron denominadas proximal, media y distal, según su grado de aproximación a la desembocadura del órgano en el intestino.

Con posterioridad, cada una de las mencionadas zonas fue cortada en porciones de una anchura aproximada de 1 mm, que se enumeraron, para saber en todo momento su situación dentro del hepatopáncreas. A su vez, cada una de estas porciones se seccionó en pequeñas piezas de forma cúbica, de 1 mm de lado. Una vez obtenidas estas piezas ó muestras, fueron sometidas a los distintos

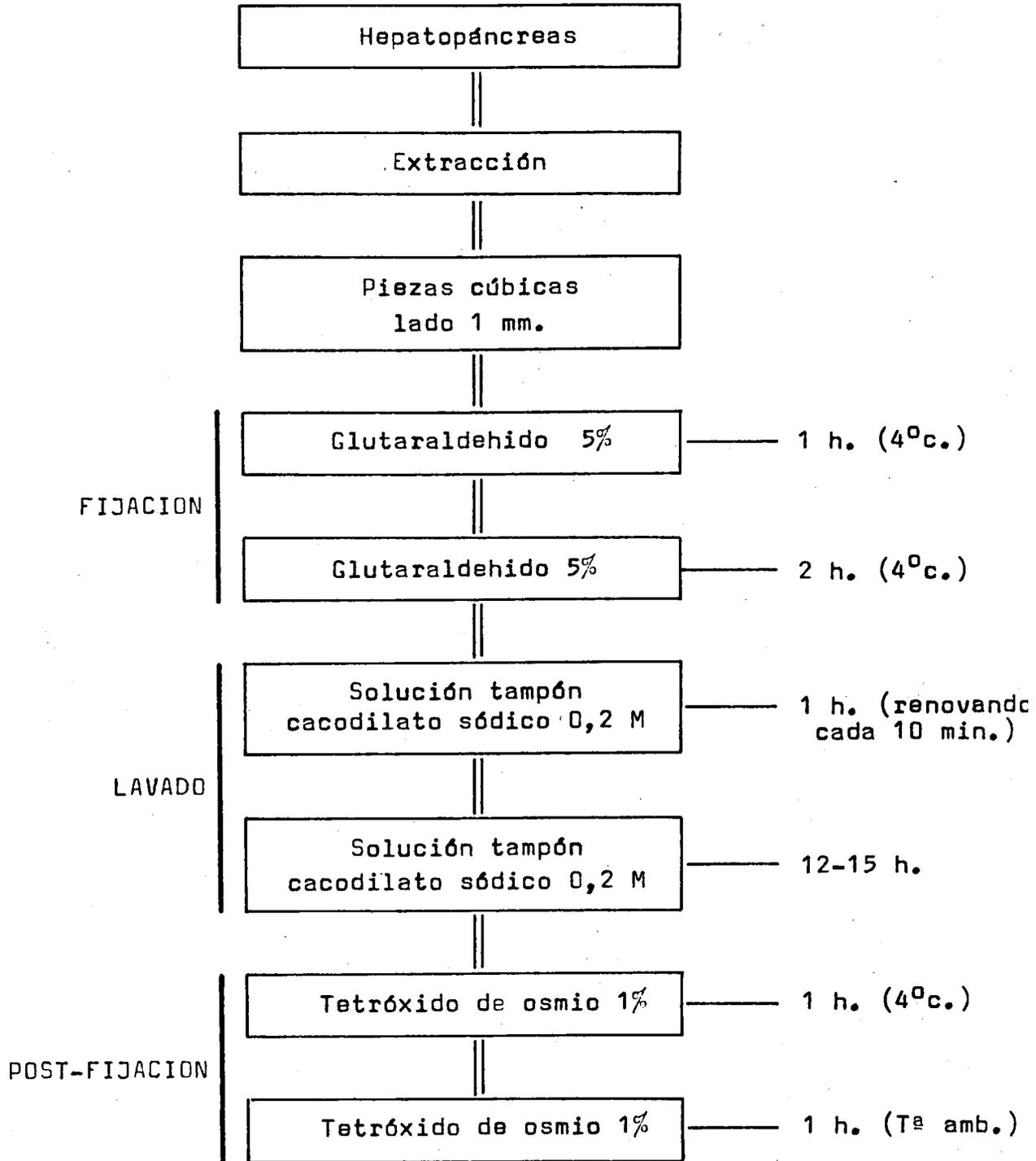
procesos de preparación, imprescindibles para la observación del material a microscopía electrónica, tal como se describe seguidamente.

#### A. Fijación.-

Se ha realizado una doble fijación, siguiendo el proceder de Sabatini y col. (1963). Para ello, se utilizaron sucesivamente dos tipos de fijadores: glutaraldehído y tetróxido de osmio, ambos tamponados con cacodilato sódico 0,2 M a pH 7,4.

El proceso seguido para la fijación de cada pieza de tejido queda resumido en el esquema 1. Las muestras fueron sumergidas inicialmente en una solución de glutaraldehído 5 %, tamponado con cacodilato sódico 0,2 M. Esta solución se dejó actuar durante 1 hora, a una temperatura de 4<sup>o</sup>c. Al cabo de ese tiempo, las piezas fueron transferidas a una nueva solución de glutaraldehído 5 %, continuándose la fijación durante 2 horas más. Posteriormente se lavaron con solución tampón de cacodilato sódico 0,2 M, que se renovó cada 10 minutos, durante 1 hora, dejando las piezas durante toda una noche en el último cambio, con lo cual se elimina el exceso de glutaraldehído que pudiera quedar en ellas, evitando de esta forma que los restos de fijador puedan reducir el osmio que se utiliza durante la post-fijación.

FIJACION Y POST-FIJACION



Esquema 1

La solución tampón de cacodilato sódico 0,2 M tiene la siguiente composición:

Cacodilato sódico .....	4,28 gr.
Acido clorhídrico 1 N .....	0,09 ml.
Agua destilada .....	100,00 ml.

La solución fijadora glutaraldehido-cacodilato se encuentra compuesta por:

Glutaraldehido 25 % .....	1 parte
Solución tampón .....	5 partes

La post-fijación se llevó a efecto, durante 2 horas, en una solución de tetróxido de osmio 1 %, tamponeado con cacodilato sódico 0,2 M. La primera hora de post-fijación se realizó en nevera, a una temperatura de 4<sup>o</sup>c., mientras que la segunda se llevó a cabo a temperatura ambiente.

La solución fijadora osmio-cacodilato se prepara 24 horas antes de ser utilizada, manteniéndose durante todo este tiempo en nevera para su total disolución, a una temperatura aproximada de 4<sup>o</sup>c. Esta solución fijadora se prepara mezclando los dos componentes, con

arreglo a la siguiente composición:

Tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) ..... 1 gr.  
Solución tampón cacodilato 0,2 M ..... 50 cc.

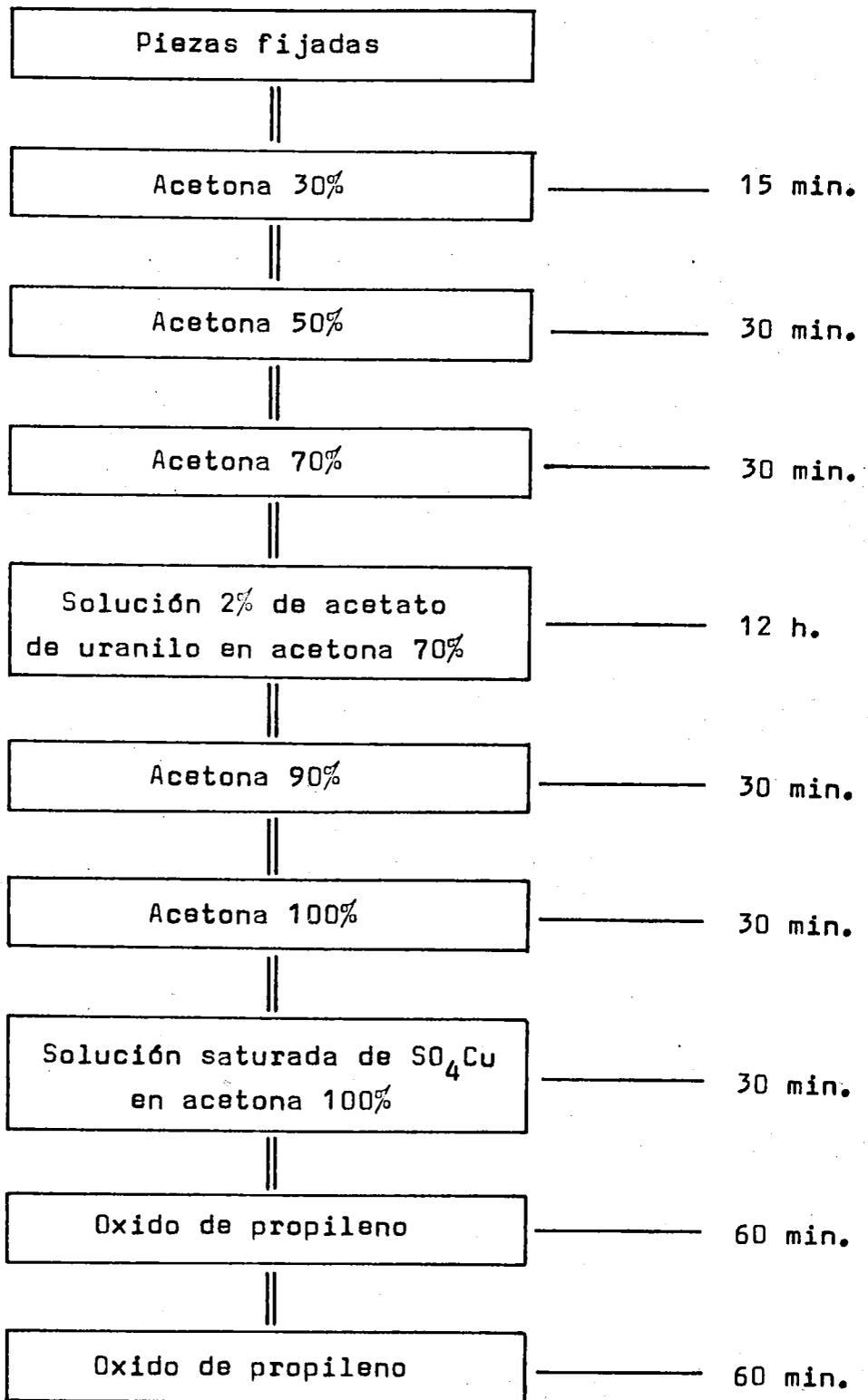
B. Deshidratación.-

Una vez concluida la post-fijación, se procedió a la deshidratación de las piezas, no efectuándose ningún tipo de lavado previo. La deshidratación del tejido se inició pasando las piezas sucesivamente por una serie de pequeños pocillos con acetona diluida en agua a concentraciones crecientes, tal como viene indicado en el esquema 2.

Es de señalar que entre los pasos de acetona 70 % y acetona 90 %, las muestras se mantuvieron durante toda una noche en una solución saturada de acetato de uranilo en acetona 70 %, con lo que, de forma simultánea a la deshidratación, se consigue una inicial tinción de las piezas.

La deshidratación se concluyó, una vez efectuado el paso por acetona 100 % con sulfato de cobre a saturación, manteniendo las piezas en oxido de propileno (Luft, 1961) durante 2 horas, repartidas en dos pasos de 1 hora cada uno.

DESHIDRATAACION



### C. Inclusión.-

Tras la deshidratación del tejido, se llevó a cabo su inclusión en el medio Durcupán ACM, para el que son apropiados todos los fijadores conocidos en microscopía electrónica. El proceder seguido queda reflejado en el esquema 3. Antes de comenzar con la inclusión propiamente dicha, las piezas de tejido fueron sometidas a una etapa intermedia entre la deshidratación e inclusión. Esta etapa intermedia consta de una serie de pasos por mezclas de oxido de propileno y Durcupán ACM-1, en proporciones crecientes de este último (3:1, 1:1, 1:3).

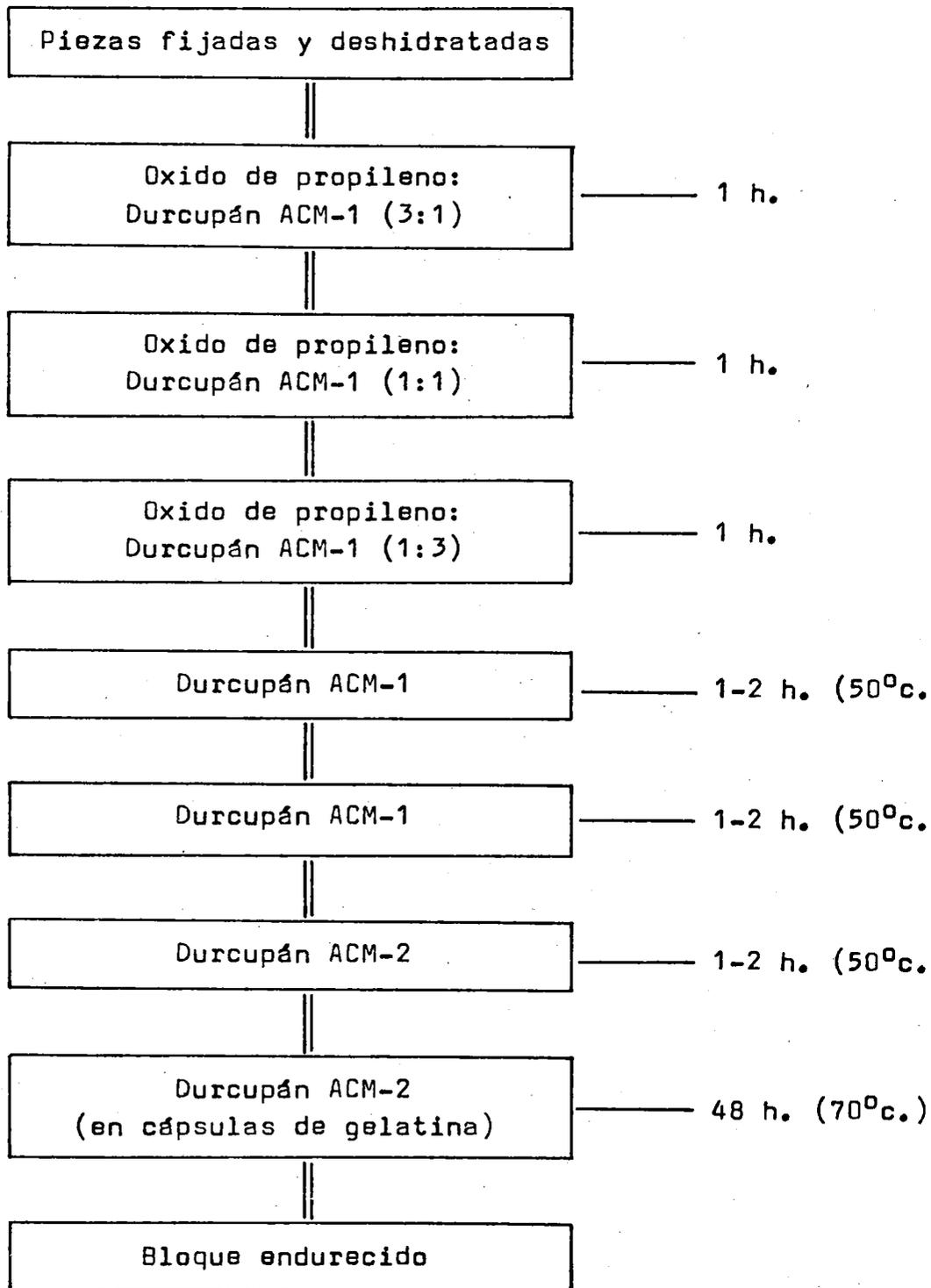
La inclusión puede considerarse dividida en cuatro fases, a saber:

1. Impregnación en la mezcla Durcupán ACM-1.
2. Impregnación en la mezcla Durcupán ACM-2.
3. Inclusión en la mezcla Durcupán ACM-2.
4. Endurecimiento.

La mezcla Durcupán ACM-1 está constituida por los siguientes componentes:

Componente A/M (Resina epoxídica) ...	10 cc.
Componente B (Endurecedor 964) .....	10 cc.
Componente D (Phtalato de butilo) ...	0,1-0,2 cc.

INCLUSION



Esquema 3

La mezcla Durcupán ACM-2 tiene la siguiente composición:

Componente A/M (Resina epoxídica) ...	10 cc.
Componente B (Endurecedor 964) .....	10 cc.
Componente C (Acelerador 964) .....	0,3-0,4 cc.
Componente D (Phtalato de butilo) ...	0,1-0,2 cc.

La mezcla ACM-1 puede prepararse 24 horas antes de su empleo, pero la mezcla ACM-2 no se debe preparar con una antelación mayor a 20 minutos, puesto que podría polimerizar. En nuestro caso, tanto una como otra mezcla se prepararon inmediatamente antes de su utilización, teniendo la precaución de agitar fuertemente el matraz cada vez que se incorporó un nuevo componente, con objeto de obtener una homogeneidad adecuada. Durante el brevísimo lapso de tiempo transcurrido desde la preparación hasta su utilización, las mezclas se conservaron en estufa a 50°c.

Después de pasadas las piezas por la mezcla de Durcupán ACM-2, fueron colocadas y orientadas en cápsulas de gelatina bien secas. A continuación, estas cápsulas fueron rellenas con la misma mezcla ACM-2, y, una vez cerradas, se dejaron en la estufa a 50-80°c., duran-

te 48 horas, al menos, para su endurecimiento. Una vez conseguido éste, se dejaron enfriar, obteniéndose así bloques ligeramente coloreados (amarillo oro), de una dureza igual a la del metacrilato, que se dejan cortar fácilmente (Pease, 1964).

El componente C de la mezcla Durcupán ACM-2 (acelerador 964) provoca una disminución de la fragilidad del bloque y una mejora de las propiedades de corte; ahora bien, si la cantidad de acelerador es excesiva, el bloque resulta más oscuro de lo normal y los cortes tienden a hacerse quebradizos. De ahí que las proporciones de los diversos componentes, señaladas con anterioridad, deban ser escrupulosamente controladas, como así se hizo.

#### D. Corte de las piezas.-

En la obtención de cortes ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo LKB III, empleando cuchillas de vidrio de la misma firma comercial, preparadas con una máquina LKB. Para la realización de estos cortes, los bloques de inclusión fueron tallados en un Pyramitome LKB, según el modelo del tronco de pirámide, con objeto de retirar el exceso de plástico que cubre a la correspondiente pieza.

El grosor aproximado de las secciones fué de 500 Å. Una vez efectuados los cortes y recogidos en una balsa de agua destilada, fueron estirados con vapores de dicloroetano, consiguiendo con este proceder evitar los posibles pliegues del corte.

A continuación, los cortes se recogieron por contacto en la superficie de rejillas de malla G-300, en las que previamente se había depositado una lámina de formvar, el cual tiene la propiedad de ser transparente a los electrones, evitando así la posible salida de los cortes por los huecos de la rejilla, sin interferir con la observación del tejido en el microscopio electrónico.

Para conseguir depositar la lámina de formvar sobre la superficie de las rejillas, se procedió del siguiente modo. Primeramente se introdujo un portaobjetos, previamente lavado con jabón, en la siguiente solución:

Formvar .....	0,2 gr.
Dicloroetano .....	100,0 cc.

A continuación se dejó secar el porta en posición vertical. Una vez seco, se introdujo poco a poco

en el agua contenida en un cristalizador, con objeto de que la lámina de formvar existente en la superficie del portaobjetos se desprendiese, quedando finalmente flotando en el agua. Sobre ella se depositaron entonces las rejillas, y sobre éstas un papel de filtro. Cuando éste se encontraba totalmente mojado, se retiró, consiguiendo así arrastrar a las rejillas, y a continuación se dejó secar. En estas condiciones, las rejillas ya pudieron ser recogidas con unas pinzas, presentando sobre su superficie una delgada lámina de formvar.

#### E. Contraste de los cortes.-

El contraste del tejido comienza con la impregnación del mismo gracias a la acción del tetróxido de osmio, utilizado durante la fijación. Además, el contraste de las muestras se refuerza durante la etapa de deshidratación, mediante la adición de una solución al 2 % de acetato de uranilo en acetona 70 %, como ya se describió con anterioridad.

El contraste del tejido se completa tiñendo los cortes obtenidos con una solución de acetato de uranilo 5 % en agua destilada. Para llevar a cabo esta tinción se disponen unas gotas de la solución de acetato de uranilo sobre una superficie de cera contenida en una pla-

ca de petri, y en cada gota se deja flotar una rejilla, teniendo la precaución de que los cortes queden hacia abajo, de tal manera que contacten con la respectiva gota de solución. Esta situación se mantiene entre 30 y 50 minutos y a continuación las rejillas son lavadas en agua destilada durante 2 minutos, agitándolas vigorosamente en ella. Después se depositan sobre un papel de filtro y se dejan secar en estufa a 30°c.

Con el fin de aumentar el contraste de los cortes ya teñidos, se procedió a su impregnación con una sal de un metal pesado, concretamente de plomo, siguiendo el método descrito por Reynolds (1963). En él se utiliza la siguiente solución:

Nitrato de plomo .....	1,33 gr.
Citrato sódico .....	1,76 gr.
Hidróxido sódico 1N .....	8 cc.
Agua destilada exenta de gases ...	hasta 50 cc.

Para la obtención de agua destilada exenta de gases se procedió del siguiente modo. En un pequeño matraz se puso agua destilada, dejándola hervir a fuego lento durante 10-15 minutos, con objeto de que se desprendieran todos los gases. A continuación se tapó el matraz con algodón estéril, proceder que permite la sa-

lida de gases pero no la entrada, y se enfrió rápidamente al grifo.

Con el agua así tratada se preparó entonces la solución antes reseñada, lo que se hizo de la forma siguiente. En primer lugar se añadieron el nitrato de plomo y el citrato sódico a 30 cc. de agua exenta de gases. El recipiente utilizado para ello se agitó durante 1 minuto, dejándolo en reposo 5 minutos, repitiendo esta operación durante 30 minutos. A continuación se agregaron los 8 cc. de hidróxido sódico 1N y finalmente se añadió agua destilada hasta 50 cc.

Los cortes se sometieron a la acción de esta solución, utilizando una manera de proceder igual a la empleada con el acetato de uranilo 5 %. La solución de Reynolds se dejó actuar durante 7 minutos a temperatura ambiente, procurando protegerla de la acción del  $\text{CO}_2$  atmosférico, para evitar la formación de carbonato de plomo, que podría dificultar con posterioridad la observación y reconocimiento de las estructuras celulares. A continuación las rejillas, con los cortes ya teñidos, se lavaron repetidas veces en hidróxido sódico 0,02 N y en agua destilada. Finalmente se secaron en estufa a  $50^\circ\text{C}$ ., encontrándose ya en disposición de ser observadas en el microscopio electrónico.

F. Observación y fotografía.-

Las observaciones microscópicas fueron realizadas en un microscopio electrónico Philips EM-300. Tales observaciones se llevaron a cabo con unos aumentos que oscilaron entre 3192x y 51300x.

Las microfotografías se realizaron en placas Agfa-Gevaert de 6,5 x 9 cm., las cuales se positivaron utilizando aumentos en la ampliadora entre 2,5 y 3,5x. Los aumentos totales, que son los que figuran en el pie de las diversas microfotografías de este trabajo, corresponden al producto de los aumentos obtenidos en el microscopio y los proporcionados por la ampliadora.



#### 4. ESTUDIOS CUANTITATIVOS Y SISTEMAS DE MEDIDA

Además de las observaciones de carácter morfológico y estructural, en el presente trabajo se han realizado estudios de naturaleza cuantitativa sobre las dimensiones y superficies de gotas lipídicas y granos cálcicos, tanto en estado de 10 días de ayuno como a los 30 días de inanición, efectuando con posterioridad las correspondientes comparaciones entre las medidas obtenidas en ambas situaciones.

En las células del hepatopáncreas de caracoles sometidos a 10 días de ayuno se efectuaron medidas en un total de 342 gotas lipídicas y 117 granos cálcicos, ambos elegidos al azar, mientras que en los animales de 30 días de ayuno se midieron 278 gotas de lípidos y 75 esférulas cálcicas, asimismo escogidos de manera azarosa. Las medidas, llevadas a cabo sobre microfotografías de microscopía electrónica, han consistido en la determinación del diámetro mayor y de la superficie de sección de los dos elementos citoplasmáticos mencionados. Para la realización de tales medidas se ha utilizado un aparato MOP/AMO3.

Los diversos valores obtenidos, tanto de diámetro como de superficie, han sido tratados con arreglo a

los métodos estadísticos aptos para las experiencias biológicas, determinándose los respectivos valores medios y los porcentajes correspondientes a las frecuencias encontradas en los diferentes intervalos comprendidos entre unos límites inferior y superior. Asimismo, se efectuaron tests de comparación de medias, en los que se empleó la fórmula

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{S_d}$$

siendo

$$S_d = \sqrt{S_{m_1}^2 + S_{m_2}^2}$$

$$S_{m_1} = \frac{S_1}{\sqrt{n_1 - 1}}$$

$$S_{m_2} = \frac{S_2}{\sqrt{n_2 - 1}}$$

en donde  $m_1$  y  $m_2$  representan los valores medios comparados,  $S_1$  y  $S_2$  las correspondientes desviaciones típicas, y  $n_1$  y  $n_2$  los números de medidas efectuadas. Se adoptó un coeficiente de seguridad del 95 %, por lo que los valores de  $t$  superiores a 1,96 indican la existencia de diferencias significativas entre los valores comparados.

#### IV. OBSERVACIONES Y RESULTADOS

## 1. CARACTER GENERAL DE LA GLANDULA

### A. Situación macroscópica y disposición tisular de los elementos componentes.-

El hepatopáncreas de *Helix aspersa* se presenta como un órgano helicoidal (Esquema 1), compacto, granuloso y de coloración amarronada, que ofrece hacia su parte interior (cara interna de la hélice) un gran conducto ó cavidad continua, al que vienen a desembocar cavidades de menor tamaño, aunque todavía considerables. Ambos tipos de cavidades aparecen tapizadas por un revestimiento epitelial, tipo epitelio intestinal, entre cuyas células se pueden distinguir, aunque en muy escaso número, algunos elementos celulares de los tipos pertenecientes a los del propio parénquima glandular.

Como se recoge en el esquema 2, los sacos menores se dicotomizan, continuándose con los conductillos de los adenómeros. Los adenómeros forman pequeñas bolsas constituidas por las células, que se disponen entre un conectivo basal y las estrechas luces de los citados adenómeros. Todo el cuerpo de la glándula está relleno de estas formaciones, que le dan su aspecto granuloso. Entre las rosetas adenoméricas se disponen lagunas linfáticas, rodeadas por los elementos del conectivo basal. La glándula está superficialmente envuelta en una serosa, sobre la que hacen prominencia pequeños abultamientos

pertenecientes a sáculos linfáticos situados en superficie (Esquema 3). En la parte interior de la hélice, junto al conducto general, se pueden apreciar sacos linfáticos superficiales de mayor tamaño.

Como se recoge en el esquema 4, los adenómeros conectan con los conductos de segundo o tercer orden, y entre ellos se distribuye el conectivo, dentro del cual quedan dispuestos los sacos ó lagunas linfáticas. Las luces que dejan las células glandulares son muy estrechas (Esquema 5), y los diferentes tipos celulares se distribuyen imbricándose entre sí, desde su luz apical hasta la base conectiva, aunque posiblemente no todos los elementos la alcanzan (el gran tamaño de las células y su profusa imbricación dificulta el poderlas seguir completamente, aun a microscopía óptica).

La superficie apical de las células (Esquema 6) está total o parcialmente tapizada de microvellosidades, que se proyectan sobre la luz de los conductillos. Entre células de adenómeros vecinos, e incluso entre las de uno mismo, pueden intercalarse muy finas prolongaciones conectivas basales.

El estudio de las características celulares, tal y como se desprende de las observaciones realizadas con

la microscopía óptica, ya ha sido profusamente descrito desde principios de siglo, por lo que en el presente trabajo no nos ocuparemos de este aspecto. Nuestro interés se centrará, como ya se dijo con anterioridad, en la observación de los elementos del adenómero y de los constituyentes del conectivo basal, a partir de observaciones sobre material procesado para microscopía electrónica.

Los esquemas demostrativos de la disposición tridimensional de las estructuras, así como del conjunto de sáculos y conductos que forman la glándula, han sido fruto de observaciones realizadas sobre secciones de superficie y gruesos cortes, que fueron examinados a pequeño y mediano aumento con lupas y objetivos entre 6x y 10x y con iluminación refleja. Los detalles mayores fueron completados mediante observaciones realizadas con "scanning", tal y como presentamos acompañando a los diversos esquemas.

#### B. Estudio con microscopía electrónica.-

El adenómero se presenta como la unidad básica o fundamental del hepatopáncreas de *Helix aspersa*, en la que se han de llevar a cabo los fenómenos morfofuncionales que van a colaborar en las funciones digestivas del animal. Esta unidad fundamental se presenta constituida por diversos tipos o formas celulares (Fig. 1), entrelazadas de manera muy irregular. La situación general es

la de que las células, dispuestas entre una base conectiva y la luz central del adenómero, aparecen con diversidad de formas, debido a los diferentes momentos funcionales en los que se las puede sorprender, como consecuencia de su variada o compleja actividad.

Da la impresión de que todas las células parten, si no de una misma base, por lo menos cerca de ella, y contienen sus núcleos cerca de esta base, desde la que se extienden hasta la luz tubular, donde llegan a formar parte de la superficie apical. La forma como se entrelazan es tal (Fig. 2), que estrechas partes citoplasmáticas de una célula pueden formar una especie de láminas o dedos de guante que se adentran o quedan envueltas en el citoplasma de la vecina, con lo que cuando se las observa en secciones histológicas, sobre todo a microscopía electrónica, se aprecian imágenes compuestas (Fig. 3), en las que bandas citoplasmáticas estrechas aparecen como comprimidas entre porciones vecinas más amplias. Este tipo de relaciones intercelulares determina una compleja situación de interdigitaciones de membranas plasmáticas, tal y como se muestra en la figura 4.

La superficie exterior del adenómero, que podemos considerar como la situación basal de las células, aparece limitada por una delicada trama conectiva (Fig. 5),

en la que, como veremos más adelante, se pueden distinguir diferentes tipos de células y espacios ó lagunas con un contenido fluido, tipo plasma circulatorio.

En la porción apical, la que da a la luz del adenómero, cada célula, según la porción de la misma que hayamos cortado, muestra diferente amplitud (Fig. 6). La membrana plasmática aparece dispuesta en este lugar constituyendo microvellosidades, cuyo número y disposición varía, según el tipo celular que observemos o el momento funcional en que se encuentre la célula en cuestión. En estos niveles, por debajo de las microvellosidades, el citoplasma aparece también con diferente fluidez y constitución, según el tipo celular de que se trate.

En las porciones apicales, la relación intercelular es más estrecha y aparece reforzada por los conocidos complejos de unión, característicos del cierre, en estos niveles, de los epitelios glandulares (Fig. 7).

En una primera observación se puede observar, tanto con microscopía óptica como electrónica, que cada adenómero está formado por diferentes imágenes de tipos celulares, en las que se aprecia variedad de núcleos, de disposición del retículo endoplasmático, de número y formas mitocondriales, de granos densos, y asimismo diversidad en el aspecto y fluidez citoplasmática, que varía des-

de formas condensadas con riqueza de orgánulos hasta formas muy fluidas, con aspecto de haber sido objeto de una profunda lisis (Fig. 8).

Todas las antedichas variedades y disposiciones hacen que hayamos podido detectar en la glándula distintos tipos de células, que catalogamos inicialmente como:

- (a) células propiamente glandulares, y
- (b) células extraglandulares o superficiales.

Dentro de los dos grupos anteriormente expuestos, y atendiendo a la diferente morfología observada, se pueden distinguir nuevas variedades de elementos celulares, que en cada grupo vienen a ser las siguientes:

- (a) Células glandulares:
  - (1) Digestivas.
  - (2) Excretoras.
  - (3) Cállicas.
  - (4) Oxífilas.
- (b) Células extraglandulares:
  - (1) Conectivas.
  - (2) Musculares.
  - (3) Secretoras.

## 2. CELULAS PROPIAMENTE GLANDULARES

### A. Células digestivas.-

Esta forma ó tipo celular se caracteriza por su morfología y la disposición propia de sus orgánulos. La forma general exterior de las células no cuenta con una disposición definida, ya que, igual que le ocurre a los demás tipos constitutivos del adenómero, la imbricación de unas células en otras determina que sus contornos sean irregulares. Por lo tanto, la peculiaridad del tipo celular digestivo radica en la cualidad de sus zonas apicales, medias o basales.

Las células digestivas contactan con el conectivo de la base, o superficie del adenómero, produciéndose ligeras interdigitaciones entre la membrana plasmática del tipo celular digestivo y la propia de los elementos conectivos. Cerca de estas regiones basales se puede apreciar (Fig. 8), en preparaciones apropiadas de microscopía electrónica, la localización de los núcleos de estas células, generalmente irregulares y densos. En sus inmediaciones se distribuye un citoplasma que, como muestra la figura 8, se caracteriza por la presencia de gotas lipídicas y un retículo endoplasmático preferentemente liso. El aparato de Golgi (Fig. 9), a veces múltiple, ofrece un tamaño y disposición que recuerda al de los dictiosomas de las células vegetales.

Hacia su porción central, las células digestivas (Fig. 9) ofrecen una membrana plasmática que se imbrica con la de células vecinas. El citoplasma, distribuido por el interior de esa membrana, contiene mitocondrias de aspecto denso, gránulos diversos implicados en los procesos digestivos de lisis, con formación de restos vesiculares (vacuolas residuales) (Fig. 10), y retículo endoplasmático liso, que puede ser de forma vesicular. Si la vacuolización citoplasmática adquiere consideración, el citoplasma activo queda situado como una banda dispuesta directamente por debajo de la membrana plasmática, conteniendo fundamentalmente retículo endoplasmático y ribosomas.

La zona apical, donde la célula mira a la luz del conducto, ofrece microvellosidades, por debajo de las cuales el citoplasma se muestra rico en mitocondrias, retículo endoplasmático liso de pequeñas dimensiones y vesículas de diverso tamaño, con un contenido entre electrodenso y ligeramente grisáceo (Fig. 11).

Estas condiciones descritas en las células catalogadas como digestivas, si bien nos ayudan a diferenciarlas, se hallan contenidas parcialmente en los otros tipos celulares, pero sólo en parte y tan solo algunas de las diferencias son las que permiten distinguir claramente unos tipos de otros, aunque sus posibles semejanzas deter-

minan que, en alguna medida, los diferentes tipos se muestran como formas de transición de uno común, o bien como situaciones de morfología cambiante debido a distintos estados ó momentos funcionales. Por esto, las diferencias y analogías en las imágenes nos llevan a sospechar que un mismo tipo se pueda presentar de una u otra forma, según el momento o actividad en que es sorprendido. Con todo, nuestro actual interés y dedicación está centrado sobre las peculiaridades de cada una de estas formas, sin entrar, de momento, a determinar si proceden de un tronco común o son momentos distintamente detectados en un mismo tipo.

#### B. Células excretoras.-

Su aspecto fundamental (Fig. 12) se caracteriza por presentar un citoplasma abundantemente constituido por bolsas ó granos de tamaño y carácter diferente, con tendencia a coalescer, por lo que llegan a obtener tamaños considerables que, al romperse, pueden proporcionar la imagen de un citoplasma fluido, compuesto por sustancias enzimáticas y restos de digestión (Fig. 12). La superficie apical muestra disminución, y hasta puede que casi ausencia, de microvellosidades, en comparación con las imágenes ofrecidas por el tipo digestivo. El citoplasma contenido en estos niveles (Fig. 13) es también más fluido y contiene bolsas de considerable tamaño. Las partes de la célula que no están ocupadas por los granos,

bolsas ó vacuolas contienen algunos de los elementos observados en las células digestivas, como gotas lipídicas, retículo endoplasmático superficial, etc.

En conjunto, lo típico de la célula excretora es su gran contenido en cuerpos densos y el aspecto de soportar una intensa lisis. El nombre le viene dado fundamentalmente porque se presentan como elementos dispuestos a realizar una excreción apo u holocrina. Como ya se ha dicho, la célula digestiva puede, aunque parcialmente, ofrecer alguno de los caracteres enzimáticos y de bolsas líticas propios de las excretoras, pero su cuantía e intensidad es mucho menor.

La cantidad de células digestivas o excretoras depende del momento o situación en que observemos el hepatopáncreas y de la zona que se esté estudiando, pues conforme una región es más antigua, más posibilidades ofrece de haber sufrido los procesos necesarios para dar lugar a la formación de cuerpos densos y de los tipos ó estados líticos.

La célula excretora o secretora, al igual que la digestiva, puede ofrecer un aspecto de incipiente calcificación en alguno de sus cuerpos densos. Tal situación se nos presenta como un posible estado previo al de constitución definitiva de células de tipo cálcico.

### C. Células cálcicas.-

La célula cálcica se cataloga como tal por contener, de modo fundamental, patentes gránulos con un contenido cálcico (Fig. 14). El grano cálcico, del cual hablaremos después detenidamente, puede presentarse de modo compacto o mostrar solamente una estrecha zona superficial por causa de haber perdido la totalidad de su contenido interior, al saltar, como consecuencia de su dureza, durante el proceso de corte en el ultramicrotomo.

Los granos cálcicos se localizan hacia las zonas basales de las células, donde aparecen entremezclados con gotas lipídicas (Fig. 14) y rodeados de un citoplasma que ofrece algunas particularidades, como la de poseer un retículo endoplasmático rugoso, generalmente constituido por pequeñas vesículas ribeteadas por nítidos ribosomas; asimismo, se pueden apreciar ribosomas sueltos. Es frecuente detectar en el citoplasma mitocondrias que guardan una estrecha relación con el retículo endoplasmático rugoso.

Hacia la base de la célula cálcica se puede detectar la presencia del núcleo (Fig. 15), parecido al de las digestivas.

La separación o contacto entre las células cálcicas y sus vecinas se lleva a cabo por interdigitaciones

y ondulaciones de la membrana plasmática. La célula cálcica, igual que las demás constituyentes del adenómero, ofrece una disposición general irregular, en la que zonas estrechas se alternan con otras dilatadas, dando la impresión de que la célula se extiende como mejor puede, debido a la presión de las vecinas, lo que viene a determinar ese carácter de entremezclamiento apreciable entre los distintos tipos celulares.

La célula cálcica ofrece una extensión en dirección al ápice más limitada que los otros tipos anteriormente descritos. Es muy difícil seguir una distribución de célula cálcica que alcance la luz del adenómero, por lo que se puede asegurar que muy probablemente las células cálcicas son elementos basales, que quedan por debajo de las digestivas y de las excretoras.

Las dos características fundamentales de las células cálcicas son los granos cálcicos y la densidad del citoplasma, con abundante retículo endoplasmático rugoso.

#### D. Células oxífilas.-

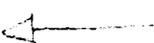
Entendemos por tales, aquellas imágenes celulares en las que el citoplasma aparece considerablemente cargado de mitocondrias (Fig. 16), tanto que en ocasiones ocupa casi todo el espacio interior celular. El conglome-

rado mitocondrial puede detectarse fundamentalmente hacia las partes apical y media, y en menor proporción en la base. Hacia el ápice, por debajo de las microvellosidades, se presenta como una acumulación de estos órganulos (Fig. 6). Algunas mitocondrias presentan signos de modificación (Fig. 17), y en el citoplasma que las circunda se pueden ver pequeñas vesículas redondas o ligeramente alargadas, dispuestas entre algún que otro cuerpo denso. Semejante imagen se puede detectar con alguna frecuencia al observar el carácter de los elementos celulares que, a este nivel, componen la corona que bordea la luz del adenómero.

Cuando las mitocondrias aparecen acumuladas en regiones medias de la célula (Fig. 16), muestran disposiciones análogas a las anteriormente descritas, solo que dispuestas en zonas más alejadas de la superficie apical. Ya hemos dicho anteriormente que en la base es más difícil detectar tales acumulaciones.

Algunas imágenes celulares se presentan con características cualitativas semejantes a las que estamos exponiendo, pero con diferencias cuantitativas. Queremos decir con esto que, al observar algunas células, tanto sus mitocondrias como las pequeñas vesículas repartidas por el citoplasma recuerdan a las observadas en estas

otras células que catalogamos como oxífilas, pero la cantidad de mitocondrias y vesículas difiere, y lo hace en el sentido de que el número de mitocondrias es bastante menor, mientras que, por el contrario, el de vesículas es más considerable. Tal situación la podemos sorprender, tanto en el ápice celular como en el centro y base de la misma (Fig. 18).

Tanto las células oxífilas como estas otras de citoplasma "fluido" (no lisado) recuerdan en sus imágenes a las células digestivas, con diferencias que hacen pensar en un posible estado de modificación de las mencionadas células. Sobre esta posibilidad hablaremos en el comentario de esta tesis. Estos dos últimos tipos recuerdan, por su aspecto de transición, a las células de los epitelios de revestimiento intestinal. 

#### E. Distribución tridimensional.-

En las figuras anteriores queda recogido, de modo aislado, el aspecto de cada uno de los elementos contenidos o constituyentes del adenómero. Las células de cada tipo, o los diferentes estados de un posible tipo inicial, son representadas en una disposición tridimensional, que se consigue realizando una reconstrucción a partir de las distintas imágenes ofrecidas por el material procesado a microscopía electrónica. Cuando se realizan

las observaciones con el microscopio electrónico, la imagen bidimensional de la pantalla es como la recogida en la figura 19, en la que se puede ver que vistas parciales de diversas células se entremezclan, constituyendo un cuadro general en el que sólo algunas partes se localizan en superficie apical, mientras que otras figuras parciales se distribuyen por la región central y por la base. A partir de esta imagen, la forma de reconocer las distintas porciones solo puede llevarse a cabo buscando esos detalles especiales que anteriormente han sido descritos.

Es necesario aclarar que, tanto la disposición bidimensional como la tridimensional son referidas a la imagen que proporciona la estructura básica o unidad fundamental del adenómero, como pieza que repetidamente podemos encontrar en la constitución total del órgano. En este sentido podemos confirmar que los estudios han sido realizados en tres zonas del órgano: una cercana al tubo digestivo, otra en una zona media del órgano, y por último, también en su porción distal. En las tres zonas, los resultados sobre la composición de la estructura básica ofrecen una disposición común.

### 3. CARACTERES DE LA SUPERFICIE CELULAR

En la superficie celular consideramos una zona apical, que es el lugar en el que las células miran a la luz de los conductos, unas zonas laterales, que son las superficies de contacto entre las células vecinas, y una zona basal, donde las células contactan con el conectivo envolvente. Hay células que, por su disposición central en la pared o espesor de la lámina, podrían estar rodeadas de otros tipos, sin llegar a contactar con el conectivo.

#### A. Superficie apical.-

Las células ofrecen una superficie apical, consistente en una membrana plasmática con diverso grado de ondulación, que oscila desde una simple curvatura hasta la formación de auténticas microvellosidades (Fig. 20).

Se aprecian imágenes (Fig. 21) en las que la membrana plasmática superficial es casi recta o con muy poca ondulación. Esta situación se detecta preferentemente en lugares donde el citoplasma aparece muy cargado de mitocondrias; es decir, se trataría de citoplasmas pertenecientes a células o porciones de células en situación oxífila (en ocasiones puede apreciarse alguna microvellosidad). Como puede verse en la figura 20, por fuera del límite citoplasmático se localizan secciones transversales

de microvellosidades (imagen de pequeños círculos), que han de pertenecer bien a microvellosidades contenidas en una porción adyacente de la misma célula o bien a la sección de largas microvellosidades pertenecientes a células vecinas.

En otras ocasiones (Fig. 22), la membrana plasmática aparece igualmente pobre en microvellosidades, pero se observa ondulada o abombada. Tal situación se corresponde con la de superficies pertenecientes a células de las catalogadas como excretoras, con mediana densidad citoplasmática. En ocasiones (Fig. 23), se puede apreciar una expulsión de los productos celulares al exterior.

Hay imágenes (Fig. 24) en las que las microvellosidades alcanzan tamaños medios que alternan con otros pequeños. Esta es una de las figuras que indican cómo, en una misma célula, no toda su superficie puede estar igualmente ondulada o dotada de vellosidades. La presente situación se da, preferentemente, en células que ofrecen por debajo de esa superficie un citoplasma fluido (como se puede ver en la figura 25), en el que se distinguen finas y alargadas cisternas o sacos membranosos, que se distribuyen entre algunas mitocondrias transformadas, o con tendencia a la transformación, y algún saco de cierto volumen, con contenido interior denso. El tipo celular

se correspondería con el que hemos descrito con anterioridad como de transformación a citoplasma fluido y membranoso.

Cuando las microvellosidades alcanzan su mayor dimensión (Fig. 26), aparecen como finas digitaciones más bien rectas, que muestran un contenido de microtúbulos en su interior, y en ocasiones se puede detectar, preferentemente hacia sus extremos, un material electrodensso. Este tipo de ondulación es frecuentemente acompañado por intensas figuras de micropinocitosis (Fig. 27). Las bolsas micropinocitóticas llegan a introducirse en el citoplasma de modo considerable, se funden en ocasiones con otras vecinas, y dan imágenes irregulares de mamelones que se invaginan cargados de sustancias, que acabarán por desprenderse hacia el interior celular (Fig. 28). Una vez aquí, los productos ingeridos aparecen como pequeñas bolsas de contenido medianamente denso o como pequeños anillos con un centro claro, o también como estructuras de mayor tamaño, resultado de la fusión de las anteriores. Estas, que ya se presentan como auténticas vacuolas, alcanzan tamaños considerables y se concentran hacia regiones más profundas de la célula. Es curiosa la imagen que ofrecen algunas de las pequeñas bolsas pinocitóticas, así como los extremos distales de las invaginaciones de la membrana, que muestran (Fig. 28) una superficie de peque-

ños granitos o densas excrecencias que se distribuyen de manera uniforme.

La situación de vellosidades de considerable tamaño junto a imágenes de abundante pinocitosis parece observarse con preferencia en células que ofrecen un citoplasma compacto y rico en cuerpos densos, sobre todo en regiones medias e interiores de la célula, siendo por esto por lo que a dichas células habría que catalogarlas como inicialmente digestivas y de futura excreción.

Todavía se puede distinguir otra forma de superficie celular, en la que la membrana plasmática (Fig. 29) aparece abombada y con ligeras ondulaciones, detectándose exteriormente numerosas imágenes de vellosidades cortadas transversalmente (pertenecientes, por lo tanto, a zonas de arranque de otros lugares), todo ello situado sobre una reducida porción de citoplasma, en la que se distinguen mitocondrias y retículo, ambos transformados. Por debajo de este citoplasma denso se encuentran grandes bolsas, que casi ocupan todo el resto de la célula, en número de una o dos solamente, con un contenido central muy denso y de tamaño reducido en relación con el de la bolsa; el resto del contenido citoplasmático es muy fluido. Este tipo celular también parece destinado a la excreción y representa, por su imagen, una estructura en estado

final, con marcada degeneración, no pudiendo, por el momento, asegurar su origen, aunque, por su citoplasma, hace sospechar una proveniencia digestiva. Es un tipo que se observa cercano a los epitelios tipo intestinal.

Por encima o fuera de toda la superficie se localiza frecuentemente una masa homogénea y amorfa de material digestivo que rellena la luz de los conductos (Fig. 30). Entre este material, a veces, pueden detectarse (Figs. 23 y 30) restos citoplasmáticos, de los que debieron expulsarse junto con el material excretado por las células correspondientes. También, en algunas imágenes (Fig. 31), pueden detectarse cilios cortados transversalmente o saliendo de la superficie celular (Fig. 32). En este caso muestran la típica constitución ciliar, que conecta claramente con la placa basal (Fig. 31) y que, en imágenes apropiadas, se les puede ver continuándose por sus raíces ciliares, ya en el interior de un citoplasma (Fig. 32) que, por su disposición, recuerda al de las células digestivas. Estas células ciliadas (Figs. 33 y 34) alternan sus cilios con microvellosidades y serían tipos de transición a las de tipo intestinal.

La superficie celular muestra en estos niveles apicales, allí donde contacta con una vecina, condensaciones de la membrana del tipo de banda de cierre (Fig.

35). Estas condensaciones son demostrables entre todas las células adyacentes, a estos niveles, como expresión de uniones de cohesión y de dificultad para la difusión de productos por estos lugares intercelulares.

#### B. Contactos intercelulares.-

Es interesante observar cuál es la disposición ofrecida por las membranas plasmáticas de las caras laterales de las células hepatopancreáticas. Se pueden catalogar hasta cinco formas generales de disposición de tales membranas en los contactos entre células vecinas (Fig. 36).

Un primer tipo (Fig. 36, 1) es aquel en el que las membranas aparecen estrechamente adosadas. Esta forma de relación intercelular puede presentarse en cortos trechos, entre cualesquiera tipos celulares, pero donde fundamentalmente aparecen es en la relación que mantiene con células vecinas ese tipo catalogado como célula de citoplasma denso, considerable cantidad de mitocondrias y grandes bolsas interiores (Fig. 37). También se da este tipo de relación entre las células que catalogamos como de "citoplasma fluido" y sus vecinas (células que ya se insinuaron como posibles transformaciones de las que contienen numerosas mitocondrias). El hecho de que sean preferentemente estas células las que ofrecen ese tipo de

disposición de su membrana plasmática a nivel de sus caras laterales es un dato más para su diferenciación de los otros tipos celulares, y su adscripción a tipos análogos a los del epitelio intestinal.

El tipo 2 de contactos, que está bastante extendido por toda la glándula, se halla formado por membranas que, separándose entre sí, dejan espacios intercelulares de mediano tamaño, que se continúan hasta en las bifurcaciones de lugares donde puedan confluir tres células (Fig. 38). La disposición es tan profusa que, en ocasiones, da la impresión de que, mediante formaciones de este tipo, podrían quedar separadas regiones citoplasmáticas del resto de la célula. Ello es debido a que en el lugar de separación entre células vecinas (Fig. 39), se disponen junto a la membrana, y de modo paralelo, largas cisternas de retículo endoplasmático que sufren dilataciones y fusiones entre sí que, como decimos, dan la impresión de que van a dejar aisladas partes de ese citoplasma. Las células que ofrecen este tipo de relación son, principalmente, las digestivas y excretoras. En menor grado, también pueden presentar alguna de estas formas las membranas laterales de las células cálcicas. Podemos aquí repetir lo mismo que se dijo anteriormente para otros detalles morfológicos: la constancia del tipo de asociación hace pensar en derivaciones de un tronco común y en que este es un detalle típico de tales formas celulares.

Un tercer tipo de disposición es aquella en que las membranas de las células vecinas dejan entre sí voluminosos espacios, que son dilataciones de lugares donde las membranas se muestran bastante próximas y como reforzadas, dando la imagen de zónulas en las que ha existido una resistencia a la separación o continuidad de los espacios dilatados. Esta disposición se entabla entre células que, por su citoplasma oscuro y el carácter de sus mitocondrias, recuerdan a las conexiones del tipo 1, pero en este caso el contacto es entre dos tipos celulares diferentes (células densas, tal vez epiteliales, con células excretoras) (Fig. 40).

El tipo 4 de asociación se detecta preferentemente entre células excretoras y digestivas, entre las digestivas o entre excretoras. Principalmente se da en aquellos lugares en los que confluyen tres células (Fig. 41). Como se puede apreciar, el tipo consiste en la dilatación o formación de espacios entre las membranas vecinas, pero a estos niveles, y dado que la dimensión lo permite, se detectan múltiples y pequeñas vellosidades, formándose en conjunto una imagen que recuerda a la propia de los canales biliares del hígado de los mamíferos. No se trata de bolsitas independientes, puesto que, en imágenes apropiadas, se puede seguir la continuidad entre el citoplasma de las células y las vellosidades (Fig. 42).

En el tipo 5 recogemos una variedad del tipo 2, pero con espacios dilatados en los que se pueden detectar pequeñas bolsitas o dilataciones de la membrana (Fig. 43), con lo que este tipo viene a ser un estadio intermedio entre las formas 2 y 4. Aparece en los mismos tipos de células que las que corresponden a esos dos tipos.

En conjunto, lo que nos ofrecen las relaciones intercelulares laterales son imágenes de unión y disociación, con vellosidades y espacios a los que podría emitirse algún producto celular. La profusión de estas membranas explicaría, en cualquier caso, la posibilidad de fraccionamientos celulares.

#### C. Elementos de la base.-

Como se muestra en el dibujo de la figura 44, en la porción basal de los elementos secretores, aparece dispuesta una delicada cubierta conectiva, la cual se extiende más allá mediante una red de amplias mallas, constituida por células de diverso tipo (que representan los nudos de la red) y por tractos de conexión, que no son otra cosa mas que finas prolongaciones citoplasmáticas de esas células, que entran en contacto con otras vecinas. Entre las prolongaciones quedan amplios espacios ocupados por una sustancia fluida o plasma.

En la base de las células secretoras, cálcicas o digestivas, la delicada cubierta conectiva está constituida (Fig. 45) por fibroblastos o fibrocitos (según el grado de madurez en el momento de la observación) y por fibrillas precolágenas o colágenas dispuestas dentro o fuera de las células, según el momento de actividad del fibrocito correspondiente. Si el fibrocito que observamos ha actuado intensamente, su citoplasma queda reducido a muy finas prolongaciones, entre las que, de modo extracelular, aparecen dispuestas las fibrillas colágenas.

Los núcleos de los fibrocitos (Fig. 46) son oscuros y ligeramente irregulares, en tanto que el citoplasma es más bien denso, sobre todo si ya se expulsó el material precolágeno, e igualmente oscuro resulta ser el contenido de las prolongaciones (Fig. 47). Las fibrillas colágenas ofrecen un grosor regular de  $400 \text{ \AA}$ , y pueden aparecer empaquetadas y mostrando su típica y estrecha estriación (Fig. 48).

Entre los fibrocitos se pueden detectar otros dos tipos de elementos celulares. Uno corresponde al de células musculares y el otro a células con presencia de pequeños granos, de contenido muy electrodenso. Las células musculares (Fig. 49) representan un tipo celular distribuido por la base de las células hepatopancreáti-

cas y esparcido entre las bridas citoplasmáticas de los fibrocitos y entre las fibrillas colágenas. En secciones longitudinales y oblicuas (Fig. 50) se pueden sorprender los núcleos de tales células y el citoplasma, que contiene paquetes de miofibrillas. Los núcleos presentan un contorno irregular y su cromatina se densifica en superficie, ofreciendo una banda heterocromática continua a este nivel. El resto del contenido cromático es más bien fluido o eucromatínico. Los paquetes de miofibrillas se hacen especialmente patentes en las secciones transversales de las células (Fig. 51), sobre todo en cortes que quedan fuera de las inmediaciones del núcleo. Aquí se puede ver que el citoplasma está completamente ocupado por miofilamentos, y sólo una estrecha banda de plasma fundamental se distribuye en superficie. Entre las miofibrillas, tal y como aparece en la imagen de la figura 52, se puede disponer alguna mitocondria, como tantas veces hemos visto que ocurre en las relaciones energéticas mitocondrias-filamentos.

Los miofilamentos son de dos tipos, finos y gruesos. Los finos ofrecen un tamaño regular, de alrededor de  $60 \text{ \AA}$ , y son más numerosos que los gruesos. Los filamentos gruesos ofrecen diversos tamaños, son más escasos y no ofrecen ninguna forma especial de distribución; aparecen dispersos por todo el espacio, sin mostrar especiales

acumulaciones de tamaño único en determinados lugares. Es decir, dentro de sus diferentes tamaños, los filamentos gruesos se entremezclan sin un orden definido, alternando los más gruesos con los medianos o los menores. En ocasiones, pueden aparecer varios de un mismo tamaño (4 a 8) en un reducido espacio, pero, como se puede ver, su número es escaso. El número de filamentos gruesos por cada  $1500 \mu^2$  es de unos 14 a 18, mientras que los finos se distribuyen en una cantidad 15 veces mayor, esto es, encontramos, aunque sin un orden especial, unos 15 finos por cada grueso. El tamaño de los gruesos oscila entre 150 y  $450 \text{ \AA}$ , siendo curioso que, dentro de estos límites, se detectan cuatro diámetros bastante definidos, como son los de alrededor de  $450 \text{ \AA}$ , de  $300 \text{ \AA}$ , de  $222 \text{ \AA}$  y de  $150 \text{ \AA}$ . En algunas secciones transversales observamos que abundan unos tamaños y en otras tamaños diferentes, lo cual obliga a suponer la posibilidad de que un mismo tipo de filamento, con distinto grosor a lo largo de su longitud, puede aparecer en la imagen más o menos grueso, según el nivel en el que le sorprenda la sección. De ser esto cierto, las secciones o imágenes correspondientes a los diámetros mayores serán las pertenecientes a la parte central de los filamentos y las menos gruesas a las distales. Según esto, al no estar todos los filamentos gruesos situados a la misma altura, las secciones de distinto grosor alternan entre sí (de nuestras observaciones no podemos asegurar tal posibilidad).

Tanto por el carácter de los núcleos como del citoplasma, las mitocondrias o los filamentos de estas células, las podemos catalogar como pertenecientes al tipo de carácter liso. Como se puede apreciar en la figura 51, la fibra puede estar situada directamente en la parte basal de las células del adenómero o distribuirse entre las láminas o estrechas prolongaciones de citoplasma pertenecientes a fibrocitos, que expulsaron el contenido precolágeno, fruto de su actividad, conectando íntimamente con otras vecinas. Entre las prolongaciones quedan espacios ocupados por fibrillas colágenas de disposición laxa y por otros elementos, entre los que podemos contar con porciones de citoplasma cargadas de granos de considerable densidad.

Los granos aparecidos en porciones citoplasmáticas distribuidas entre el colágeno son de dos aspectos fundamentalmente distintos. Unos son muy densos y desprovistos de membrana (Fig. 53); recuerdan a los granos de cimógeno de las células del páncreas acinar y presentan dos formas, redondeada o elíptica, cuyos diámetros mayores oscilan entre 0,14 y 0,83  $\mu$ . Otros son de densidad variable (Fig. 54), están rodeados de membrana y recuerdan a los granos alfa y delta de las correspondientes células de los islotes de Langerhans. Aparecen en número mayor y tamaños menores que los anteriormente descritos

como cimogénicos. Los tamaños oscilan entre 2150 Å y 700 Å (Fig. 55). Ambos tipos de gránulos, que no está claro si pueden coincidir en un mismo citoplasma, se pueden encontrar, en secciones transversales, rellenando a este casi por completo, habiéndolos observado frecuentemente en esta situación, sin otras relaciones con su núcleo y demás partes celulares, por lo que pensamos si serán los lugares de acumulación superficial o inferior de células que, ocupando lugares más superiores (donde están las células del parénquima), alcanzan estos puntos del conectivo. Algunos gránulos análogos hemos encontrado dentro de células musculares.

Pasemos ahora a describir las observaciones correspondientes a la disposición de los tractos citoplasmáticos conectivos, a los espacios que forman y a su disposición por la base del parénquima del órgano. Como se puede ver en la figura 56, una banda continua de conectivo se extiende por la base de las células hepatopancreáticas, y en ella se pueden distinguir, como ya se ha dicho, fibroblastos, fibrocitos, células musculares lisas, fibrillas colágenas y secciones citoplasmáticas que contienen los gránulos de tipo pancreático. Un material anhisto, tipo lámina o membrana basal, se puede observar en el lugar (Fig. 57), pero su disposición es mucho más amplia que la propiamente común de las láminas basales,

por lo que, más que de lámina basal, habría que hablar de campo o zona basal anhistá.

Desde la célula fibrocítica, esparcidos por el territorio basal, parten tractos citoplasmáticos estrechos que conectan con otros de células vecinas, y algunos, alejándose de la base, se extienden en dirección opuesta, formando bridas que delimitan lagunas (Fig. 58), en las que se puede detectar un contenido de plasma linfático. El carácter de los estrechos citoplasmas que delimitan las lagunas o espacios linfáticos es el de oscuras bandas, en las que destacan pequeños abultamientos superficiales (Fig. 59) correspondientes a mitocondrias. Las bridas fibrocíticas cierran los sacos o espacios linfáticos juntándose en algunos de sus extremos, constituyendo entonces territorios más amplios, en los que se pueden distinguir somas celulares y porciones citoplasmáticas con gránulos tipo pancreático, entre otros elementos (Fig. 60). Las bolsas confluyen hacia centros en los que se localizan los conductillos linfáticos.

#### 4. CARACTER GENERAL DE LOS NUCLEOS

Los núcleos de las células pertenecientes al hepatopáncreas ofrecen variedades que corresponden a localización, forma y contenido cromático.

La localización puede ocurrir hacia la base de las células. En este caso (Fig. 56), el núcleo queda orientado en la dirección de la base. La forma de estos núcleos es más regular, sobre todo si se trata de células con un buen contenido de citoplasma activo. Un tipo nuclear que aparece poco denso, y por lo tanto con cromatina laxa, corresponde a células de las que ofrecen un citoplasma con estrechos sacos alargados y, a veces, con formaciones especiales de retículo endoplasmático liso y escasas mitocondrias y gránulos (Fig. 56). Otros núcleos, ofreciendo un contorno menos regular (Fig. 61), muestran un contenido cromático más denso; pertenecen a células cálcicas o a porciones inferiores de células digestivas.

Hay núcleos que se sitúan en lugares ligeramente superiores, de orientación variable, con cromatina semejante a la ofrecida por los núcleos de las células cálcicas (Fig. 62). Pertenecen estos núcleos a células digestivas o excretoras. Cuando estas células se observan en fases en las que la actividad digestiva se encuentra en un momento avanzado (Fig. 8), los núcleos aparecen más irregulares y con cromatina densa.

Finalmente, se pueden apreciar núcleos que muestran una marcada orientación perpendicular a la base o, si se quiere, con su eje mayor paralelo a la dirección base-ápice de la célula (Fig. 63). Aparecen en células que ofrecen una disposición citoplasmática alargada, con escasos gránulos, que recuerdan los tipos de epitelio intestinal.

En secciones apropiadas, en el interior del núcleo, se pueden detectar uno o dos nucléolos (Fig. 64). En algunos casos la membrana externa se puede presentar con un mayor o menor grado de separación en relación a la interna (Figs. 62 y 65), aumentando con ello el espacio perinuclear. Hay núcleos que pueden ofrecer imágenes muy irregulares y condensadas (Fig. 66), como pertenecientes a células que han degenerado a través de sus profundos estadios de digestión.

En la base vamos a encontrar los núcleos de los fibrocitos o fibroblastos (Fig. 46), siguiendo la dirección de las bandas colágenas, que viene a ser la dimensión o diámetro mayor de las células que los contienen. Son núcleos de superficie irregular y cromatina densificada, de acuerdo con el grado de madurez del fibrocito (Fig. 56), que puede llegar a situaciones de intensa imagen heterocromática cuando el cuerpo del fibrocito es muy reducido (Figs. 47 y 58).

Los núcleos de las células musculares (Fig. 50) son más grandes que los de los fibrocitos. Ofrecen una banda superficial casi continua de heterocromatina y un contorno irregular.

## 5. LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias contenidas en las células del hepatopáncreas de *Helix aspersa* ofrecen variedades de número, tamaño, forma, localización y estructura, suficientes como para poder realizar un estudio clasificatorio.

El número mitocondrial de las células del hepatopáncreas es elevado en todas sus células, pero, conforme estas van sufriendo los procesos digestivos, va decreciendo, debido a las transformaciones que ocurren en ellas. El mayor número se detecta, como es natural, en las llamadas células oxífilas, mientras que el menor se da en las de "citoplasma fluido" (Figs. 35 y 67).

Se pueden apreciar dos formas: redondeada y alargada, si bien esta última es la más frecuente (Figs. 68 y 69). Algunas resultan extremadamente largas, sobre todo si la célula muestra una considerable actividad (Fig. 69).

Asimismo, se observan dos tipos generales de mitocondrias, uno denso y otro claro. Las mitocondrias más densas deben su situación a la presencia de una matriz muy rica en materiales (Fig. 70). Coincide en este tipo la disposición de crestas dilatadas, frecuentemente de aspecto triangular. La forma clara ofrece más crestas, que son de aspecto fino y ondulado (Fig. 71).

Estos orgánulos pueden aparecer con imágenes de transformación que consisten en: desintegración en pequeños sacos aplanados (Fig. 72) y formación de cuerpos multivesiculares; condensación interior, dando lugar a contenidos de aspecto paracristalino (Fig. 73); formación de cuerpos densos (Fig. 73); y, por último, imágenes de proliferación o multiplicación, mostrando aspectos multiformes (Fig. 74).

Todas estas características antedichas pueden ser ofrecidas en las mitocondrias de los distintos tipos celulares, pero, de modo típico, hay formas y particularidades que se dan con preferencia en unos tipos determinados, situación que queda recogida en el cuadro de la figura 75. El carácter de las mitocondrias ofrecido por cada tipo celular, tal y como queda recogido en el cuadro, es una condición más que nos ayuda a la catalogación de los distintos tipos. En este sentido, se pueden destacar algunas particularidades que pasamos a relatar a continuación.

Las células cálcicas se caracterizan por la frecuente observación en ellas de mitocondrias íntimamente rodeadas por retículo endoplasmático rugoso (Fig. 76); el tipo mitocondrial corresponde al denso, de crestas dilatadas, y sólo en algún caso hemos podido detectar mito-

condrias claras, con muy finas y profusas crestas (Fig. 71) que, como se aprecia en la imagen, son bastante abundantes. Las células ciliadas ofrecen también el tipo de mitocondria densa (Figs. 31 y 34). En las células oxínticas destaca el número (Fig. 73) y sus imágenes de proliferación. Las excretoras muestran mitocondrias claras, en tanto que las digestivas y fluidas se caracterizan por sus variadas formas de transformación (Figs. 24 y 72). Imágenes de transformación, en el sentido de desintegración y constitución de cuerpos grumosos (Figs. 35 y 77) que se integran en bolsas de mayor tamaño, se pueden observar en el interior de células cálcicas.

Por todo lo dicho, nos encontramos con que las características más sobresalientes de las mitocondrias en estas células son su versatilidad y la cantidad de las mismas.

Las mitocondrias de las células del conectivo de la base no ofrecen caracteres especiales, a no ser esas formas que sobresalen de los tractos que delimitan a los sacos linfáticos (Fig. 59), que, ciertamente, muestran una localización que llama la atención.

## 6. EL RETICULO ENDOPLASMATICO Y EL APARATO DE GOLGI

El retículo endoplasmático de las células del hepatopáncreas de *Helix aspersa* presenta algunas características dignas de ser tenidas en cuenta, para poder comprender el tipo celular y su posible función.

Resulta constante la presencia de retículo endoplasmático rugoso en las células de tipo cálcico. Este retículo se presenta con forma alargada (Fig. 78) o bien como en pequeñas esferas con sus ribosomas dispuestos superficialmente (Fig. 76). Estos tipos de retículo son difíciles de detectar en los otros tipos celulares, por lo que, cuando se posee cierta costumbre en verlos, su sola observación nos demuestra estar en presencia de células cálcicas. En ellas también se aprecia, como detalle habitual, la existencia de retículo endoplasmático rugoso dispuesto en torno a las mitocondrias, de forma que llega a rodearlas casi por completo, e incluso enteramente (Fig. 70).

En las células excretoras el retículo se encuentra muy disminuido, cosa que no es de extrañar, toda vez que la gran actividad lítica y la abundancia de gránulos densos distorsionan la normalidad del citoplasma. El aspecto que ofrece, cuando se detecta, es el de retículo largo, liso o rugoso (Fig. 79), y dispuesto en situación



superficial, debajo de la membrana plasmática de las caras laterales de las células, y con orientación paralela a las mismas.

Las células digestivas se caracterizan por ofrecer un retículo de aspecto liso (Fig. 41), alargado y con gran abundancia en relación con el grado de actividad de la célula. Este retículo puede aparecer dilatado en algunos lugares (Fig. 10).

Cuando apreciamos células de las que han sido catalogadas como claras, producto de la transformación del citoplasma, con escasas mitocondrias (Fig. 72) y considerable cantidad de vesículas o sáculos estrechos y alargados, estamos en presencia de imágenes que dan la impresión de tratarse de retículo endoplasmático liso y abundante, pero, como quiera que muchas de estas vesículas parecen proceder de mitocondrias (Fig. 80), en tanto no contemos con otro tipo de pruebas, no nos pronunciaremos sobre este particular. Lo mismo podríamos decir sobre aquellos casos en los que se detectan formas de asociación paralela, con carácter de cisternas alargadas (Fig. 81), que en las secciones transversales ofrecen imágenes regulares y en panal (Fig. 82), no estando claro si proceden de transformación de retículo endoplasmático liso o si de transformación y asociación de mitocondrias (Fig. 83).

Todas estas formas descritas de retículo endoplasmático tipifican, como ya se ha dicho, a las células correspondientes, proporcionándoles aspectos que las diferencian de otros tipos celulares generales del organismo o del propio de las células del conectivo de la base.

Entremezcladas con los tipos celulares anteriormente descritos, se detectan, como ya sabemos, formas celulares que se parecen a las digestivas, pero que se corresponden más bien con los tipos celulares de revestimiento o epitelio intestinal (Fig. 84). Estas formas celulares ofrecen un retículo endoplasmático sin especiales particularidades, pero muestran, sin embargo, una considerable cantidad de formaciones de aparato de Golgi (Figs. 9 y 84), pequeñas y similares a las formas propias de los dictiosomas de células vegetales. Si estos tipos celulares se corresponden con formas de modificación de células digestivas, estos aparatos de Golgi representarían la estructura correspondiente implicada en los mecanismos metabólicos de la digestión inicial y producción de sustancias. Por otra parte, podemos decir que estos tipos de aparato no se detectan en los otros tipos celulares hepato-pancreáticos.

## 7. FORMACIONES GRANULARES Y ESFERULARES

Encuadramos bajo este epígrafe las estructuras que, presentando generalmente un aspecto esférico, comprenden elementos de diversa categoría, que van desde simples acumulaciones de carácter paraplasmaático hasta las granulaciones de tipo cálcico, pasando por los diversos tipos de cuerpos densos que pueden aparecer en los diferentes tipos celulares.

### A. Las gotas lipídicas.-

Gotas de lípidos se detectan en todos los tipos celulares hepatopancreáticos, en forma de acumulaciones de bolsas de diferente tamaño que se localizan preferentemente hacia la base de las células (Fig. 42). En niveles medios de las células del adenómero también pueden apreciarse este tipo de gotas, pero donde prácticamente no aparecen es en las porciones apicales.

Las gotas lipídicas no presentan membrana alguna que las rodee, aunque en su superficie puede condensarse una fina película de material citoplasmático sin estructura definida (Fig. 41), que bien podría ser una acumulación de los medios de contraste en el cambio de fase y tensión que representa la superficie de relación entre la gota lipídica y su ambiente.

Las gotas tienden a juntarse en acúmulos que dejan estrechas bandas citoplasmáticas entre sí (Figs. 42 y 65). En ocasiones, se aprecian imágenes en las que se ve una tendencia a la fusión de algunas gotas, pero el aspecto general es la preferencia a conservar la individualidad, pues, aun en acúmulos que destacan por su abundancia, se las distingue perfectamente de sus vecinas (Fig. 42).

#### B. Tipos de granos densos.-

Los tipos de gránulos existentes en las células del hepatopáncreas de *Helix aspersa* son análogos a los que aparecen en otras especies del género *Helix*, poniéndose de manifiesto diversidad de formas que no son otra cosa que la expresión de una intensa actividad digestiva.

Los gránulos, que se pueden detectar en todos los tipos celulares, son especialmente abundantes y diversos en las células excretoras, menos numerosos en las digestivas, y todavía menor cantidad de ellos se detecta en las cálcicas, si eliminamos en estas los granos cálcicos propios de este tipo celular. Aunque pueden aparecer entremezclados los granos densos con alguna gota lipídica, éstas se encuentran en escaso número allí donde los gránulos se acumulan. Las células muy cargadas de mitocondrias (Figs. 6 y 16) muestran también escasez granular.

Aunque las formas y constitución de los gránulos pueden ofrecer hasta siete u ocho variedades, la observación detallada permite distinguir cuatro tipos básicos y una disposición en grandes bolsas, con lo que, en total, distinguimos inicialmente cinco formaciones, tal y como se representa en el esquema de la figura 85. Aquí, el tipo II corresponde a formaciones de contorno irregular y contenido homogéneo, situadas preferentemente hacia las zonas medias y apicales de las células digestivas y excretoras que no hayan alcanzado un estadio final. Estos gránulos II se forman como resultado de la fusión de pequeñas bolsas situadas en la superficie apical, que representan productos de pinocitosis; debido a ello, los granos II son mayores conforme observamos regiones más cercanas a la zona media de las células, puesto que así han tenido ocasión de ir aumentando su tamaño mediante nuevas adhesiones.

El tipo IV, si la célula no está en un avanzado proceso de lisis, se localiza hacia las zonas medias e inferiores de las células (ya que las superiores están ocupadas por el tipo II). Pero si observamos una célula excretora en sus estadios finales, veremos que el tipo IV se extiende por todas partes. Se trata de bolsas de contenido claro y tamaños que oscilan entre 3 y 6  $\mu$  de diámetro, viniendo a ser como el doble o el triple que

los mayores elementos del tipo II. De la simple observación de la estructura no se puede deducir la procedencia de las bolsas tipo IV, aunque las formas mayores son el resultado de la unión de otras menores del mismo carácter.

El tipo III comprende formaciones de menor tamaño que las anteriores, generalmente de 0,5 a 1,5  $\mu$ , que presentan una membrana dispuesta superficialmente y un contenido denso y granular, que sólo ocupa parte de la zona contenida dentro de la membrana. Estas formaciones tipo III pueden presentar tamaños mayores si, por unión de varias de estas estructuras, se asocian los elementos densos o unidades básicas responsables de la condensación interior. Las estructuras de unión pueden apreciarse como formaciones en las que, dentro de una membrana, se detectan hacia el centro de la bolsa varias agrupaciones de material granujiento, o bien como apretada asociación de varias unidades básicas, las cuales quedan contenidas en un contorno, por dentro del que no se aprecian espacios claros (como se ve en el esquema IIIb). Las formaciones tipo III parecen provenir de la transformación de mitocondrias, que se asocian o incorporan formando bolsas de diferente densidad y tamaño.

El tipo I es el que ofrece unos tamaños menores, siendo sus mayores dimensiones de alrededor de 0,5  $\mu$ . En-

globamos aquí tres formaciones de aspecto distinto por la siguiente razón: se trata de pequeños elementos que parecen tener una procedencia mitocondrial y, aunque a veces ofrecen imágenes que recuerdan a pequeños lisosomas, por la simple imagen es difícil precisar su carácter. Por este motivo encuadramos estas distintas y pequeñas formaciones dentro del tipo I, en el que quedan comprendidas pequeñas vesículas de aspecto variado y otras algo mayores que recuerdan a los lisosomas primarios. En conjunto, se distinguen: una primera forma, "a", en la que, envuelta por una membrana, se observa una condensación central rodeada por un halo periférico; otra forma, "b", de tamaño semejante a la anterior ( $0,1-0,2 \mu$ ) pero con un contenido homogéneo y menos denso; y otra forma, "c", de mayor tamaño (alrededor de  $0,5 \mu$ ), con un contenido denso y escaso, rodeado por un halo superficial menos denso, y un aspecto, en conjunto, que recuerda a los lisosomas primarios o a mitocondrias transformadas.

En el esquema de la figura 85 se ha representado, debajo de los cuatro tipos descritos, una formación de tamaño muy superior, con un interior muy claro y sólo alguna estructura, aunque de pequeña condensación, hacia el centro. Estas grandes bolsas, que pueden llegar a alcanzar tamaños que comprenden hasta tres cuartas partes de la célula, aparecen en células que han sufrido un in-

tenso proceso de digestión lítica, las cuales ofrecen un escaso y muy oscuro citoplasma, dando un aspecto más de elemento en completa inactividad que de formas vitales. Por su aspecto, no ofrecen estructura que pueda hacerlas equiparables a estados finales de células excretoras.

Cuando se observan los diversos granos densos, se pueden detectar formas y constituciones que no se corresponden exactamente con las descritas, pero, al intentar catalogarlos, se ve que corresponden a mezcla de los tipos básicos relatados, por lo que estas nuevas variedades no son otra cosa que mezcla o asociación de los anteriores. En este sentido, cuando pasemos a describir más detalladamente estas formaciones, indicaremos su posible forma de constituirse, pero sin pretender afirmar definitivamente su origen, en tanto que estudios histoquímicos nos confirmen la realidad de su constitución.

Las células cálcicas ofrecen constantemente granulaciones del tipo III, aunque no de forma abundante (Fig. 86). La transformación de mitocondrias, que puede ocurrir en cualquier tipo de células, se puede detectar en las cálcicas bajo la forma de condensaciones (Figs. 38, 87, 88 y 89), como paso previo a la obtención de gránulos tipo III. También en estas células se detectan formas tipo I, situación que se puede apreciar en cualquier citoplasma de las células del adenómero hepatopancreático. Las

células cálcicas ofrecen un tipo especial de gránulo (Fig. 90), que parece ser una de las formas precursoras de los futuros granos cálcicos. Ese gránulo se parece a los de tipo III, pero destaca su homogeneidad y densidad. Sobre estas formaciones, así como sobre las disposiciones concéntricas de capas granulosas en las que se instaura la calcificación, hablaremos posteriormente al tratar de los gránulos cálcicos. En las células cálcicas no se encuentran formas tipo II y muy escasas del tipo IV o sus derivadas.

Las células digestivas contienen el tipo II (Figs. 11 y 91b) con mayor abundancia que ningún otro. Son también abundantes en estas células el tipo IV y sus derivados (Fig. 91). Asimismo, aunque en menor cantidad, se presenta el tipo III, ya sea porque se combina con los tipos II y IV o porque no se da preferentemente en este tipo celular.

Hay formas celulares que parecen ser intermedias entre digestivas y excretoras (Fig. 92), pero tienen un citoplasma menos denso y presentan una considerable cantidad de gránulos tipos III y IV.

Las células excretoras se caracterizan por ofrecer gránulos de todos los tipos. El tipo menos abundante

es el II; de las demás formas, así como de sus posibles combinaciones, podemos encontrar una abundante representación. De esta forma, se pueden observar granos tipo I (Fig. 93) y sus correspondientes derivados, producto de la asociación de los tipos I y II (Figs. 94 a 105), gránulos III (Figs. 23 y 108) y gránulos tipo IV (Figs. 23 y 108). Todos estos gránulos aparecen entremezclados en un citoplasma básico que guarda una relación cuantitativa inversa al número de gránulos, pudiéndose decir lo mismo del número de mitocondrias. El aspecto de este citoplasma básico es denso. Cuando las células excretoras se encuentran en un momento avanzado de su proceso de digestión o próximas a la emisión de sus productos (Fig. 23), su citoplasma resulta más claro y sus gránulos aparecen con preferencia como pertenecientes a los tipos III y IV o sus derivados.

Para terminar de relatar las formas granulares y comprender la realidad de los tipos que se acaban de describir, pasamos seguidamente a ofrecer las imágenes que ofrecen asociación, con la consiguiente formación de variedad granular. En la figura 91 se observa un proceso de unión y asociación entre elementos del mismo carácter. Las flechas con la letra "a" señalan lugares de unión entre formaciones granulares que muestran semejante contenido, estando las membranas íntimamente adosadas. En los lugares señalados con las flechas "b" lo que tenemos es

un comienzo de fusión o un fusión patente. Por otra parte, el gran grano "A" muestra en su interior otros contenidos, que representan la fusión entre gránulos con un contenido cuyo aspecto es diferente. Aquí, el acúmulo señalado con un asterisco es semejante al de la pequeña vesícula exterior, mientras que el material señalado con "x" se parece al de la pequeña bolsa señalada con el mismo signo. Todas estas imágenes indican que pueden ponerse de manifiesto la existencia de uniones y fusiones entre gránulos del mismo o de distinto carácter. Estos detalles de unión y asociación son los que vamos a presentar en las figuras siguientes.

En la figura 13 vemos la fusión de dos gránulos de contenido homogéneo y denso, que, además, ofrecen unas ligeras concreciones muy electrodensas. Las figuras 91 y 106 muestran adhesión de gránulos de los tipos I a IV. En las imágenes de las figuras 28 y 107 lo que observamos es la asociación de pequeñas bolsitas del tipo II y la formación de unidades de tamaño cada vez mayor. En la figura 108 observamos diversos tipos de asociación entre elementos del mismo carácter y una adhesión entre dos bolsas del tipo III. Esta unión es observada con más detalle en la figura 109, pudiéndose apreciar que la unión es muy estrecha. En la imagen aumentada de la figura 110 se observa que, al adherirse las membranas de las dos bol-

sas, las láminas osmiófilas internas de cada gránulo mantienen su disposición inicial, mientras que las osmiófilas superficiales se funden en una sola que no aumenta su grosor, quedando constituido el conjunto por tres estrechas bandas osmiófilas y dos osmiófobas entre ellas. Análogas e íntimas uniones pueden observarse entre elementos iguales o distintos, como los que aparecen en la figura 111. Aquí, mientras los gránulos más densos aparecen claramente fusionados, en la zona opuesta de la imagen hay varias figuras en estrecha asociación, y dos de ellas presentan una imbricación entre dos elementos de aspecto distinto, sin que todavía se pueda observar la fusión, situación que ya sí es patente entre las dos bolsas que vemos en las figuras 112 y 113, en las que se puede apreciar el lugar de fusión de las dos membranas y el de penetración del producto de una bolsa en la otra. Por último, las figuras 80, 88, 90 y 114 muestran, junto a la íntima unión de gránulos, mitocondrias en fase de transformación y desintegración, situación a través de la cual se pueden obtener pequeños grumos y vesículas que pasarán a engrosar el variado conjunto de elementos densos repartidos por el citoplasma. Otra muestra de la transformación de mitocondrias, y consiguientemente de su participación en la formación de las distintas bolsas y gránulos, la encontramos en las imágenes de la figura 73, que hablan por sí solas.

Tras las antedichas observaciones, venimos a considerar como imágenes básicas a aquellas que ofrecen un mismo contenido (los tipos inicialmente descritos con los guarismos I a IV) y como imágenes compuestas, aquellas en las que el contenido es múltiple. El tipo I recuerda a las formaciones tipo lisosomas, el tipo II a fagosomas, y los tipos III y IV a diferentes formaciones de gránulos proteicos descritos en la literatura (aquí podrían incluirse formaciones que representan modificaciones mitocondriales). Las imágenes compuestas representan, en tal caso, vacuolas digestivas, autofágicas y cuerpos residuales.

### C. Los gránulos cálcicos.-

Son formaciones que caracterizan a las células del mismo nombre. Su estructura es la de cuerpos de contorno redondeado o ligeramente ovalado (Fig. 115) que presentan una considerable densidad, si bien existen variaciones en la misma.

Los gránulos cálcicos ofrecen variación en la intensidad de su constitución, indicando con ello una graduación en su madurez o etapas de formación. Las células cálcicas presentan imágenes de bolsas con contenido denso, que sólo se encuentran en este tipo celular, no observándose en los demás. Los gránulos correspondientes a estas imágenes se han de catalogar como diversas formas o

aspectos de los grumos cálcicos, sobre las que se puede realizar, por lo tanto, una catalogación o estudio de su proceso de formación. Contamos con figuras en las que, como se ve en la número 116, por su aspecto sencillo, estamos ante la formación inicial sobre la se ha de llevar a cabo el comienzo de la calcificación. Estas imágenes ofrecen semejanza con algunas de las transformaciones que sufren orgánulos como mitocondrias o cuerpos densos, y por ello son consideradas como iniciales (Figs. 117 a 120). Un segundo tipo de imágenes (Figs. 121 y 122) muestran una serie de círculos concéntricos, de diversa intensidad tanto en número como en opacidad a los electrones. Estos círculos pueden ofrecer más o menos proximidad y graduación de condensación, hasta llegar a constituir estructuras casi compactas o plenamente compactas (Figs. 123 y 124).

Conforme las estructuras se van condensando, van aportando un mayor grado de calcificación (Fig. 125), hasta conseguir disposiciones en las que se observan elementos bien calcificados (Fig. 126) o bien con un centro hueco (Fig. 127). Esto ocurre como consecuencia de haber saltado el interior del gránulo, una vez efectuadas las secciones en el ultramicrotomo, proceso durante el cuál la cuchilla tropieza con la dureza interna del grano y la hace saltar.

Como ya se dijo anteriormente, las células cálcicas aparecen preferentemente situadas hacia la base de los adenómeros, aunque algunas de ellas pueden aparecer desplazadas hacia la zona media. Por lo dicho, la mayor parte de los gránulos cálcicos se podrán igualmente detectar hacia la base y cercanas al conectivo subyacente (Fig. 128). El número de gránulos puede llegar a ser muy abundante, quedando reducido el citoplasma activo, en relación con la correspondiente cantidad de gránulos (Figs. 128 y 129).

## 8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ELEMENTOS DEL HEPATOPANCREAS EN SUCESIVAS ETAPAS DE AYUNO

### A. Comparación de la situación a los 10, 30 y 100 días.-

Las células del adenómero hepatopancreático de caracoles sometidos a 10 días de ayuno, ofrecen una disposición bastante densa de su citoplasma, como se puede apreciar, por ejemplo, en la figura 27. Figuras como la número 4, que corresponde a un animal sometido a un mes de ayuno, muestran un citoplasma claramente más fluido, siendo ésta una característica de frecuente observación. Pero donde la fluidez, o más bien destrucción, del citoplasma es mayor es después de 100 días de ayuno (Figs. 130 y 131), pudiéndose apreciar una gran alteración citoplasmática y nuclear, con formación de densificaciones y vacuolas, como índice de inactividad. Se asiste, pues, con el aumento del ayuno, a un progresivo deterioro del citoplasma y de la constitución general de las células. Pero quede claro que, aunque los signos de destrucción sean claros, al describir los mismos nos referimos fundamentalmente a la frecuencia que podemos detectar de imágenes normales o alteradas, sin que en ningún momento queramos significar que toda la glándula se encuentra en la misma situación, puesto que, dado el gran movimiento metabólico y de transformación de los elementos celulares del adenómero, cabría esperar alguna alteración aislada en cualquier punto del hepatopáncreas de animales no sometidos.

dos a ayuno. Por lo tanto, lo típico de las alteraciones que se describen hace referencia específica a la intensidad de las modificaciones y a su frecuencia.

Otras modificaciones afectan a los gránulos cálcicos. Es más frecuente observar imágenes de inmadurez (Fig. 129) en el proceso de calcificación de estos granos, tras 10 días de ayuno que después de un mes (Figs. 126 y 127), situación esta última en la que el número de gránulos es mayor y también la cantidad de figuras que muestran gránulos cuyo interior ha saltado. Este aspecto está todavía más exagerado después de 100 días de ayuno (Figs. 132 y 133), situación en la que, además, se observa una gran ausencia de formas inmaduras. Por el contrario, el número de imágenes de inmadurez y de consiguiente transformación de mitocondrias es más abundante a los 10 días, como puede verse en las imágenes contenidas en las figuras 38, 77, 112 y 117. Respecto a la disposición de las figuras mitocondriales normales, serán más numerosas en situaciones de 10 días de ayuno (Figs. 70, 71, 84), ofreciendo un mayor aspecto de transformación después de un mes (Figs. 72, 76, 80, 104). A los 100 días, el estado de destrucción proporciona una difícil observación del carácter de los orgánulos citoplasmáticos.

El aspecto cada vez más fluido de los citoplasmas, conforme aumenta el ayuno, hace que esta situación

se detecte fundamentalmente en el carácter de los granos densos, menos fluidos en las figuras de 10 días (Figs. 93, 106 y 108) y con mayor aspecto lítico en imágenes de más prolongado ayuno. Las gotas lipídicas parecen más abundantes a los 10 días (Fig. 42). Por otra parte, las formas en panal o de membranas paralelas son más frecuentes tras la prolongación del ayuno, como se ve en las imágenes correspondientes a un mes de ayuno (Figs. 82 y 83) o en las de 100 días (Fig. 134).

El conectivo de la base muestra también modificaciones, que cursan del siguiente modo. Tras 10 días de ayuno (Figs. 45 y 59), el conectivo no es muy abundante, sus tractos son finos y el colágeno es escaso. Cuando observamos imágenes de un mes (Figs. 50, 53, 56 y 58) o de 100 días (Figs. 101 y 135) se aprecia un aumento de reacción del conectivo basal, más densidad y estructuración del colágeno y mayor condensación de la cromatina nuclear y los citoplasmas celulares.

Con el fin de poder ofrecer una imagen más gráfica de las antedichas situaciones, producidas por el ayuno, se ha confeccionado la gráfica de la figura 136, en la que quedan recogidas, para las tres etapas estudiadas, las disposiciones de los diferentes componentes celulares más específicos.

Finalmente, para poder comprobar de un modo más demostrativo la existencia de transformaciones con el paso del tiempo de ayuno, se han realizado dos estudios cuantitativos, que pasamos a relatar a continuación, y que han consistido en estudiar el tamaño medio de los granos cálcicos y de las gotas lipídicas a los 10 días de ayuno y después de un mes.

Las transformaciones relatadas y las que se relatan a continuación han sido obtenidas en caracoles que fueron sometidos a las ya mencionadas experiencias de ayuno, siendo patentes las modificaciones, hasta tal grado que, por ejemplo, en múltiples piezas de 100 días de ayuno fue prácticamente imposible poder obtener secciones útiles, debido a la gran fragilidad del tejido incluido.

## 9. ESTUDIO CUANTITATIVO SOBRE LA DISPOSICION DE GOTAS DE LIPIDOS Y GRANULOS CALCICOS TRAS DIVERSO TIEMPO DE AYUNO

Con el fin de poder determinar de un modo más objetivo posibles transformaciones de los contenidos citoplasmáticos de las células del hepatopáncreas de *Helix*, conforme los animales se someten a un incremento del tiempo de ayuno, hemos realizado un estudio cuantitativo en los dos elementos que resultan más distintivos para la realización de un análisis de medidas: las gotas lipídicas y los gránulos cálcicos.

### A. Estudio cuantitativo en las gotas lipídicas.-

Relataremos primeramente los resultados obtenidos al efectuar las medidas de los tamaños de gotas lipídicas. No ha parecido oportuno realizar inicialmente estudios sobre el número de gotas, primero porque podría ser necesario para ello efectuar una reconstrucción tridimensional de las células (aspecto que se realizó únicamente desde un punto de vista cualitativo), y segundo porque el número, en principio, podría venir afectado por las destrucciones ocurridas con la prolongación del ayuno, y los análisis a través de las reconstrucciones sólo tendrían sentido contabilizando a la vez el número de células íntegras. El tamaño de las gotas, por el contrario, es un tipo de análisis que se realiza sobre cada

elemento y su valor habla por sí mismo, de manera que, aunque en dependencia de la situación celular, resulta estadísticamente válido, siempre en relación con el número de gotas estudiadas, puesto que si éste es suficiente la muestra será representativa de la población.

Como se puede apreciar en la tabla 1, se midieron 342 gotas en distintas células de los adenómeros hepatopancreáticos de caracoles sometidos a 10 días de ayuno y 278 gotas pertenecientes a animales dispuestos en estado de ayuno durante un período de 30 días. Sobre este número de medidas, la tabla 1 recoge los resultados de los valores de los diámetros de esas gotas. En cada fila se indican los valores de diámetro, expresados en micras, recogiendo para cada valor medio, por ejemplo 0,104, los límites inferior (Lim i) y superior (Lim s) (0,000 - 0,208) del correspondiente intervalo. En cada intervalo se contabilizó un número determinado de gotas (en el ejemplo citado,  $n = 8$  para 10 días de ayuno, y  $n = 3$  para 30 días). Ese número de elementos para un diámetro dado representa un tanto por ciento del total de gotas medidas, que en el caso de las de 10 días es el 2,3 % y en el de las de 30 días el 1,1 %. Junto a estos valores, con la clave de %A, se representa la sucesiva acumulación que, desde 0 hasta 100, van experimentando los porcentajes conforme se van considerando nuevos in-

tervalos. Es decir, entre 0 y 0,208  $\mu$  de diámetro hay un 2,3 % del total de gotas medidas en los animales de 10 días de ayuno, entre 0 y 0,417  $\mu$  hay un 10,2 %, resultado de la acumulación del 7,9 % que aparece entre 0,208 y 0,417  $\mu$  sobre el 2,3 % existente entre 0 y 0,208  $\mu$ . Por último, en cada fila se expresan  $\Delta\%$  y  $\Delta\%A$ , que son el resultado de comparar los respectivos porcentajes (para cada fila) del valor obtenido en animales de 10 días y el encontrado en los de 30 días. Los valores negativos indican que entre el valor de 10 días y el de 30 no hay un incremento de porcentaje, sino una disminución.

Del estudio de la tabla 1 se pueden obtener varias conclusiones, como las siguientes: a los 10 días, el mayor número de gotas ofrece diámetros comprendidos entre 0,418 y 1,044  $\mu$ , mientras que en los estudios de 30 días el mayor número se extiende hasta valores de 1,253  $\mu$ . Esto quiere decir que los diámetros son mayores en las gotas de animales sometidos a 30 días de ayuno. Tal situación se aprecia mejor al estudiar los distintos  $\Delta\%$  y  $\Delta\%A$ , en los que se puede ver que hay, respectivamente, un 14,1 % y un 18,9 % más gotas a los 10 días que a los 30, en diámetros comprendidos entre 0,418 y 0,626  $\mu$ , mientras que para diámetros comprendidos entre 1,045 y 1,253  $\mu$  hay un 8,4 % más gotas a los 30 días. En la grá-

gráfica 1 se representan los valores de diámetros en un polígono de frecuencias, pudiéndose apreciar lo que acabamos de decir, al comparar la representación de valores a los 10 días (línea continua) y a los 30 días (línea de trazos). La gráfica 2 recoge la distribución de %A, viéndose cómo los intervalos para la línea continua (10 días) son mayores al principio y luego van disminuyendo, mientras que para los 30 días son mayores hacia el centro de la curva y van disminuyendo sólo al final.

Estos valores, comparaciones y conclusiones resultarán mucho más significativos haciendo un estudio sobre la superficie de las gotas, en vez de realizarlo sobre diámetros, que es una medida lineal. Esto es lo que se ha llevado a cabo y se expone en la tabla 2. La distribución de valores aquí recogida es análoga a la anteriormente descrita para los diámetros, siendo ahora expresados los valores, como es lógico, en  $\mu^2$ . Aquí se hace más patente cómo, para las superficies menores, las gotas dan mucha mayor frecuencia a los 10 días de ayuno que a los 30 (14,1 % y 11,8 % más a los 10 que a los 30 días). La representación gráfica de estos valores se ha recogido en las figuras de las gráficas 3 y 4.

En la tabla 3 se representan los valores del test de comparación de medias, para los diámetros y las

superficies de las gotas estudiadas, siendo expresados los valores medios en Å (7180 - 8440) y  $\mu^2$  (0,43 - 0,60), respectivamente. El valor de "t" es claramente superior a 1,96 e indicativo de la diferencia significativa entre los valores de las dos situaciones de ayuno.

En conclusión, de todo lo expuesto se deduce sin lugar a dudas que con la prolongación del ayuno, las gotas lipídicas aumentan de diámetro y, como es lógico, también de superficie.

TABLA 1.-

Distribución de los diámetros mayores de las gotas lipídicas en caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno respectivamente. En las tres primeras columnas se indican los límites inferior y superior de cada intervalo y el correspondiente valor medio del intervalo. Estos valores son referidos en micras.

Para cada tipo de caracol  $n$  = número de gotas comprendidas en el intervalo correspondiente; % = porcentaje que tal número de gotas representa en relación al total de las medidas; %A = porcentaje que representan las gotas comprendidas desde el límite inferior de la distribución hasta el intervalo de que se trate.

$\Delta\%$  = incremento de % desde 10 a 30 días de ayuno;  $\Delta\%A$  = incremento de %A de 10 a 30 días de ayuno.

TABLA 1

GOTAS LIPIDICAS: DIAMETRO MAYOR

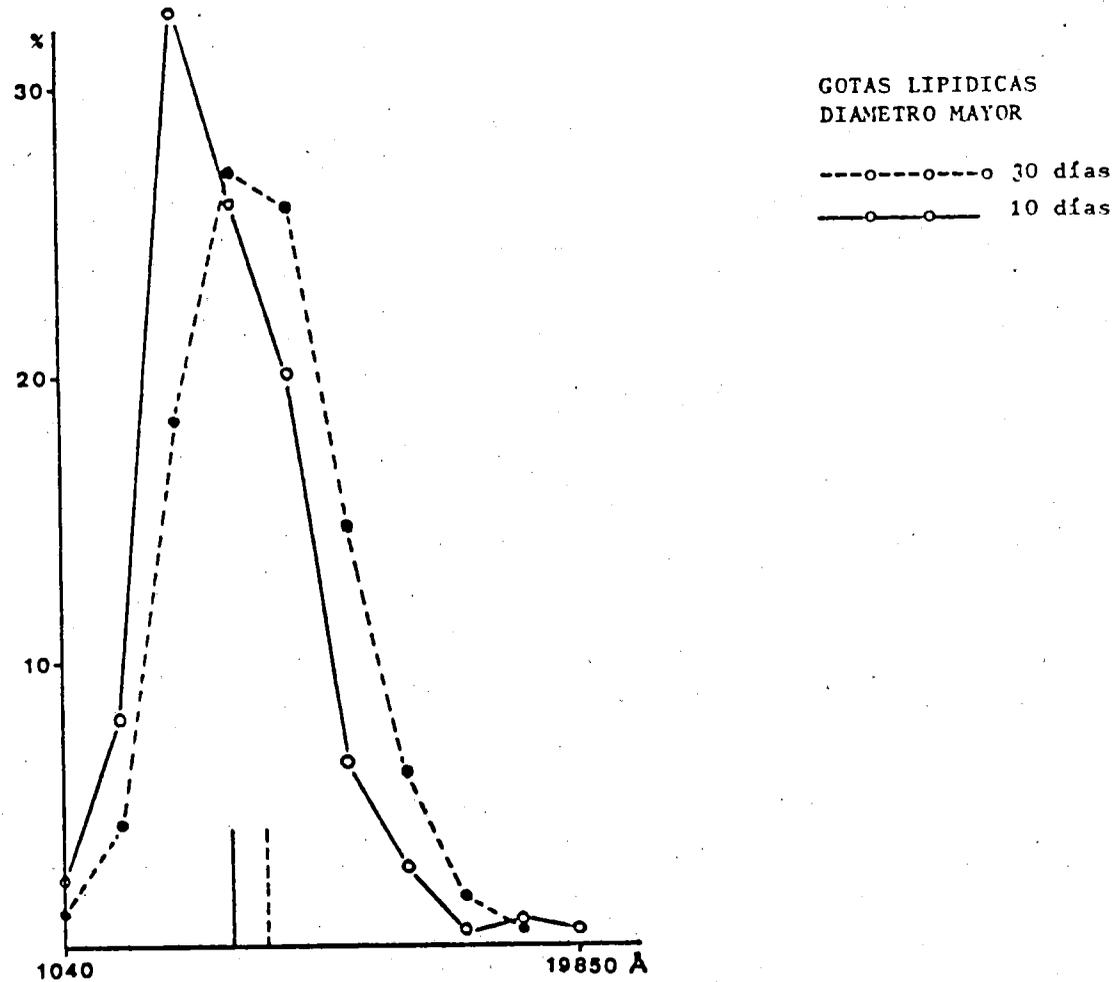
Lim i	Lim s	Med I	10 días			30 días			$\Delta\%$	$\Delta\%A$
			n	%	%A	n	%	%A		
0,000	0,208	0,104	8	2,3	2,3	3	1,1	1,1	-1,2	-1,2
0,209	0,417	0,313	27	7,9	10,2	12	4,3	5,4	-3,3	-4,8
0,418	0,626	0,522	111	32,5	42,7	51	18,4	23,8	-14,1	-18,9
0,627	0,835	0,731	89	26,0	68,7	75	27,0	50,8	1,0	-17,9
0,836	1,044	0,940	68	19,9	88,6	72	25,9	76,7	6,0	-11,9
1,045	1,253	1,149	22	6,4	95,0	41	14,8	91,5	8,4	-3,5
1,254	1,462	1,358	10	2,9	97,9	17	6,1	97,6	3,2	-0,3
1,463	1,671	1,567	2	0,6	98,5	5	1,8	99,4	1,2	0,9
1,672	1,880	1,776	3	0,9	99,4	2	0,7	100,1	-0,2	0,7
1,881	2,089	1,985	2	0,6	100,0				-0,6	

### GRAFICA 1.-

Polígono de frecuencias correspondiente a la distribución de los valores del diámetro mayor de las gotas lipídicas en caracoles sometidos a 10 días de ayuno (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos), respectivamente. En abscisas se representan valores del diámetro mayor, expresados en  $\text{Å}$ , mientras que en ordenadas se indican porcentajes.

Los distintos círculos indican, en cada caso, el porcentaje de gotas, sobre el total de cada muestra, cuyo diámetro mayor se encuentra comprendido en el correspondiente intervalo.

Las líneas continuas y de trazos señaladas sobre el eje de abscisas corresponden a la situación del diámetro mayor medio en cada grupo de caracoles.



GRAFICA 1.-

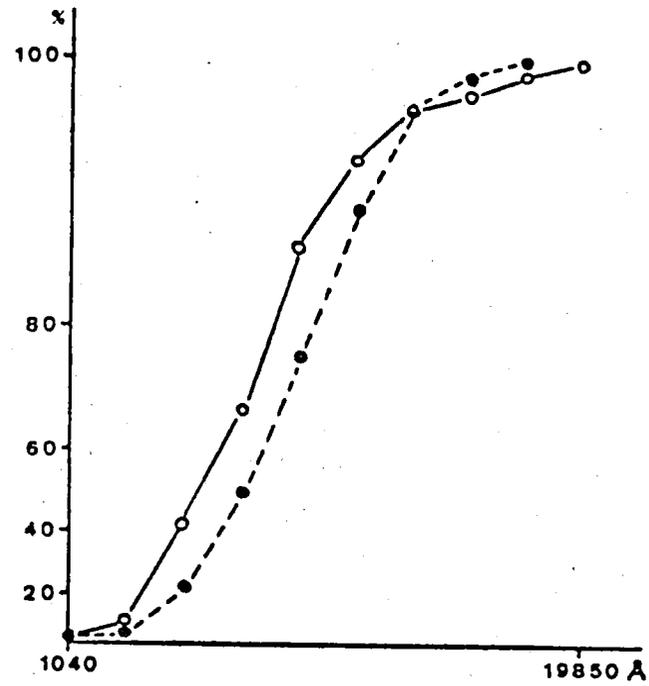
GRAFICA 2.-

Distribución de los %A (indicados en ordenadas) para los valores del diámetro mayor (expresado en Å en abcisas) de las gotas lipídicas de caracoles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos), respectivamente.

Los diferentes círculos indican el %A que corresponde a los distintos valores de diámetro mayor.

GOTAS LIPÍDICAS  
DIAMETRO MAYOR

---o---o--- 30 días  
—o—o— 10 días



GRAFICA 2.-

TABLA 2.-

Distribución de la superficie de las gotas lipídicas en caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno respectivamente. En las tres primeras columnas se indican los límites inferior y superior de cada intervalo, con el correspondiente valor medio del intervalo. Estos valores se expresan en micras cuadradas. Los restantes parámetros tienen la misma significación que en la tabla 1.

TABLA 2

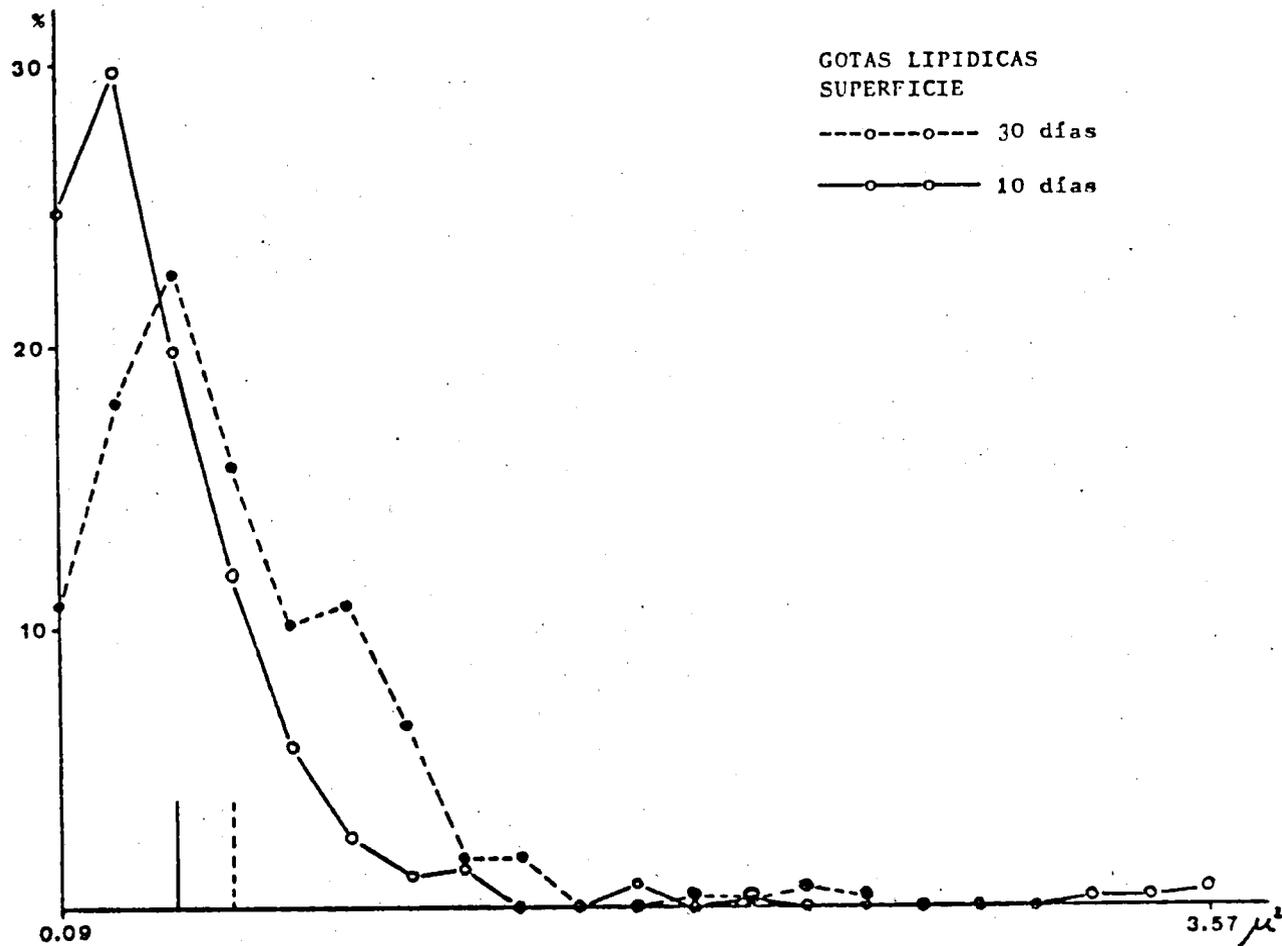
GOTAS LIPIDICAS: SUPERFICIE

Lim i	Lim s	Med I	10 días			30 días			Δ%	Δ%A
			n	%	%A	n	%	%A		
0,00	0,17	0,09	85	24,9	24,9	30	10,8	10,8	-14,1	-14,1
0,18	0,35	0,27	102	29,8	54,7	50	18,0	28,8	-11,8	-25,9
0,36	0,52	0,44	68	19,9	74,6	63	22,6	51,4	2,7	-23,2
0,53	0,70	0,62	41	12,0	86,6	44	15,8	67,2	3,8	-19,4
0,71	0,87	0,79	20	5,8	92,4	28	10,1	77,3	4,3	-15,1
0,88	1,04	0,96	9	2,6	95,0	30	10,8	88,1	8,2	-6,9
1,05	1,22	1,13	4	1,2	96,2	18	6,5	94,6	5,3	-1,6
1,23	1,39	1,31	5	1,5	97,7	5	1,8	96,4	0,3	-1,3
1,40	1,57	1,48			97,7	5	1,8	98,2	1,8	0,5
1,58	1,74	1,66			97,7			98,2	0,0	0,5
1,75	1,91	1,83	3	0,9	98,6			98,2	-0,9	-0,4
1,92	2,09	2,01			98,6	1	0,4	98,6	0,4	0,0
2,10	2,26	2,18	1	0,3	98,9	1	0,4	99,0	0,1	0,1
2,27	2,44	2,35			98,9	2	0,7	99,7	0,7	0,8
2,45	2,61	2,53			98,9	1	0,4	100,1	0,4	1,2
2,62	2,79	2,70			98,9				0,0	
2,80	2,96	2,88			98,9				0,0	
2,97	3,13	3,05			98,9				0,0	
3,14	3,31	3,22	1	0,3	99,2				-0,3	
3,32	3,48	3,40	1	0,3	99,5				-0,3	
3,49	3,66	3,57	2	0,6	100,1				-0,6	

GRAFICA 3.-

Polígono de frecuencias correspondiente a la distribución de los valores de superficie de las gotas lipídicas en caracoles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos). En abcisas se representan los valores de superficie en micras cuadradas, en tanto que en ordenadas se indican porcentajes.

Los círculos y líneas sobre el eje de abcisas ofrecen la misma significación que en la gráfica 1.



GRAFICA 3.-

GRAFICA 4.-

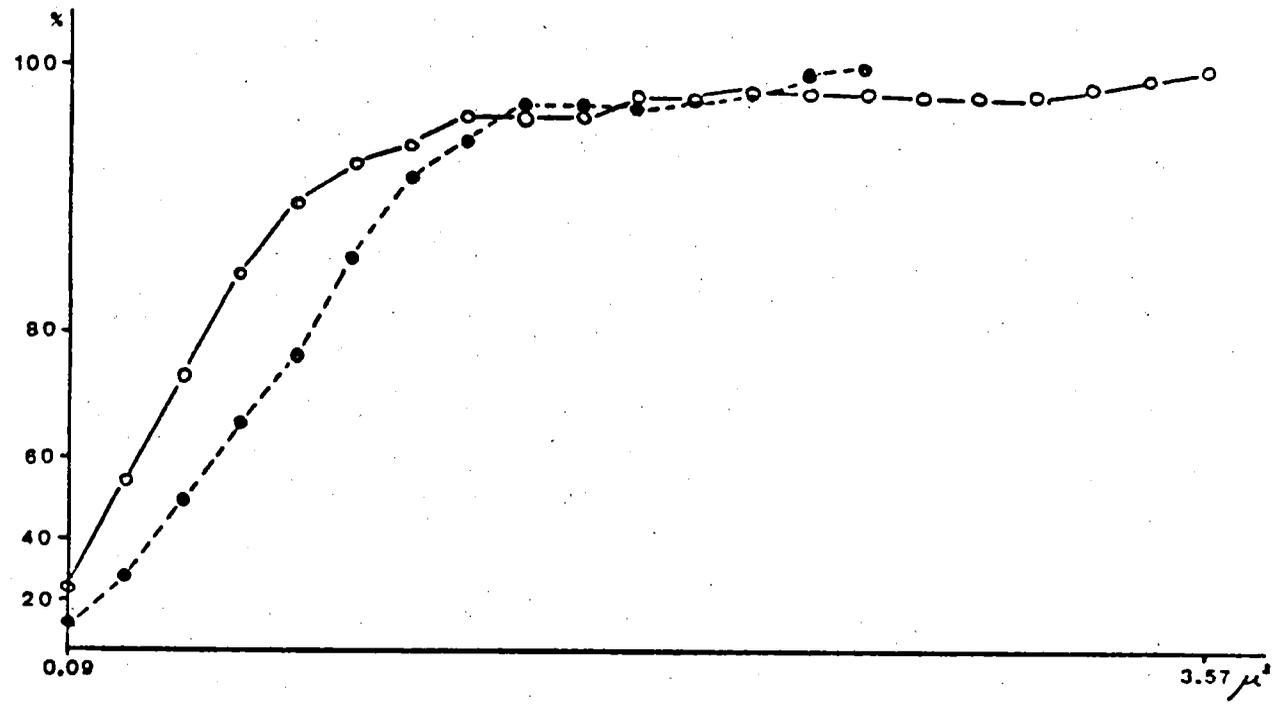
Distribución de los %A (indicados en ordenadas) para los valores de superficie (expresados en micras cuadradas en abcisas) de las gotas de lípidos en caracoles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos).

Los diferentes círculos indican el %A que corresponde a los distintos valores de superficie.

GOTAS LIPIDICAS  
SUPERFICIE

---o---o--- 30 días

—o—o— 10 días



GRAFICA 4.-

TABLA 3.-

Comparación de los valores medios encontrados para el diámetro mayor y la superficie en las gotas lipídicas de caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno, respectivamente.

Para cada tipo de caracoles  $N$  = número de gotas medidas;  $\bar{X}$  = valor medio del diámetro mayor (expresado en  $\text{Å}$ ) o de la superficie (en micras cuadradas) de las gotas lipídicas;  $S_m$  = error standard del correspondiente valor medio.

Para cada parámetro  $\Delta$  = incremento del valor medio desde 10 a 30 días de ayuno;  $t$  = resultado del test de comparación de medias.

TABLA 3

GOTAS LIPIDICAS: COMPARACION

		10 días	30 días	$\Delta$	t
Diámetro mayor	N	342	278		
	$\bar{X}$	7180	8440	1260	5,1
	$S_m$	170	180		
Superficie	N	342	278		
	$\bar{X}$	0,43	0,60	0,27	4,9
	$S_m$	0,02	0,02		

## B. Estudio cuantitativo en los gránulos cálcicos.-

Un estudio semejante al expuesto con anterioridad para las gotas lipídicas ha sido realizado en los granos cálcicos. El carácter general de las tablas y gráficas ofrece la misma disposición de parámetros, medidos en filas y columnas, que las correspondientes a gotas de lípidos. El número de gránulos estudiados para células de animales de 10 y 30 días de ayuno ha sido, respectivamente, de 117 y 75.

Del estudio de los valores expuestos en la tabla 5 se deduce que, para los menores tamaños, la superficie de los gránulos cálcicos da mayor número a los 10 días que a los 30 (un  $\Delta\%$  de 16,6 y un  $\Delta\%A$  de 23,2). Las diferencias, tanto de tamaños de superficie como de diámetros, presentan valores significativos, como queda recogido en la tabla 6, con valores de "t" de 3,4 y 2,7, respectivamente.

Las gráficas 5 a 8 recogen una representación de los valores de las tablas 4 y 5, que dan una visión más directa de las posibles comparaciones que se puedan establecer entre los resultados obtenidos a los 10 y a los 30 días de ayuno.

De todo lo estudiado se deduce que conforme se prolonga el tiempo de ayuno, las medidas obtenidas en los granos cálcicos disminuyen. Con esto no queremos decir que los gránulos disminuyen en sí, sino que nos referimos a las "medidas obtenidas", puesto que es probable que el producto calcificado no pierda materiales, no haciéndose menor por lo tanto, sino que lo que puede ocurrir es que a los 10 días, al ser las calcificaciones menores en intensidad, los productos aparecen más iniciales y como dilatados, mientras que, conforme pasa el tiempo y se intensifica la calcificación, los gránulos quedan como más concretos y mejor delimitados, siendo nuestra opinión que a eso se deben principalmente las diferencias de tamaño.

Así pues, resumiendo, habría que pensar, a falta de otros estudios, que lo que sucede a los 30 días de ayuno es que las calcificaciones son más intensas o densas, y tal vez se pierdan las partes más superficiales de los granos iniciales.

TABLA 4.-

Distribución de los diámetros mayores de los gránulos cálcicos en caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno. En las tres primeras columnas se indican los límites superior e inferior de cada intervalo y el valor medio de los intervalos. Estos valores se expresan en micras. Para cada tipo de caracol  $n$  = número de gránulos comprendidos en el correspondiente intervalo; % = porcentaje que tales gránulos representan respecto al total de los medidos; %A = porcentaje que representan los gránulos comprendidos desde el correspondiente intervalo hasta el límite inferior de la distribución.

$\Delta\%$  = incremento de porcentaje desde 10 a 30 días;  $\Delta\%A$  = incremento de %A desde 10 a 30 días.

TABLA 4

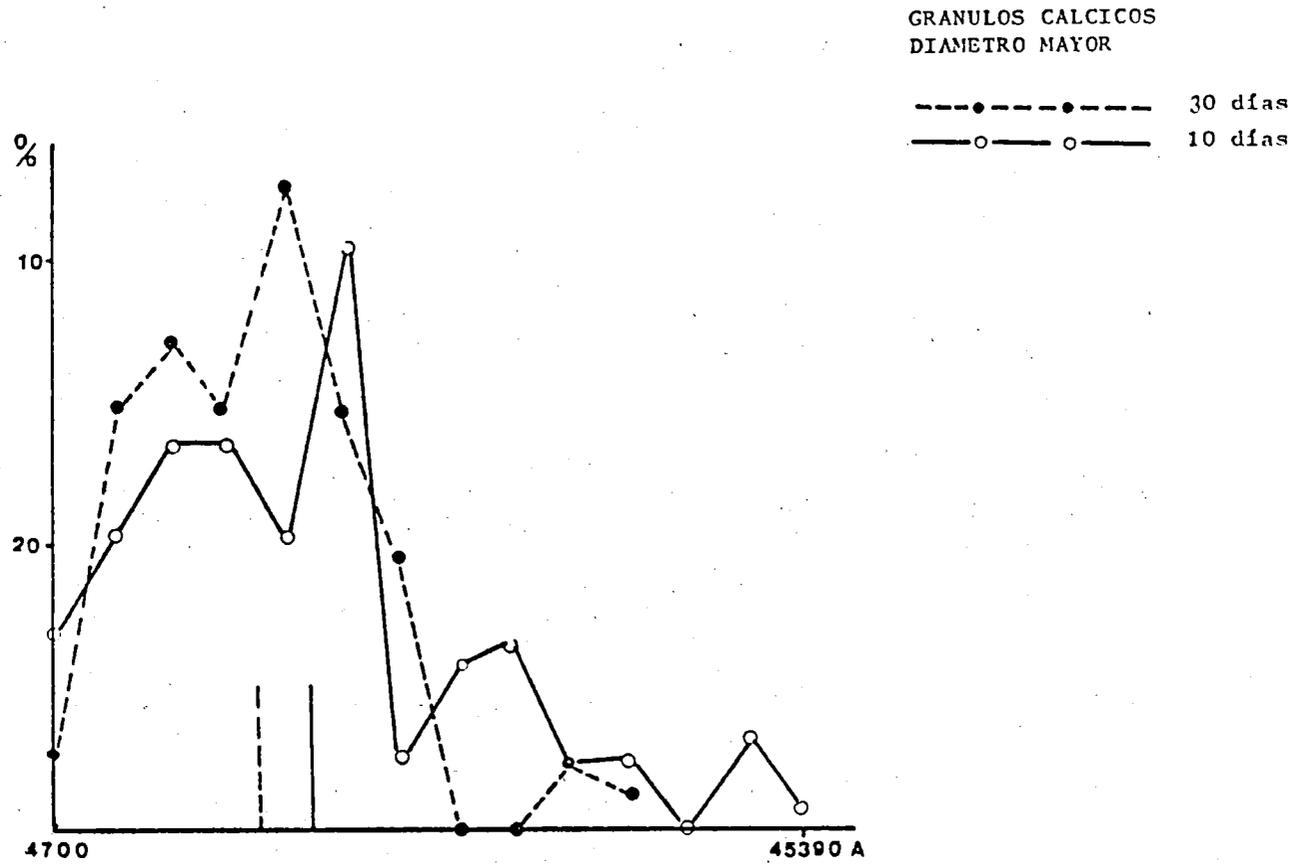
GRANULOS CALCICOS: DIAMETRO MAYOR

Lim i	Lim s	Med I	10 días			30 días			$\Delta\%$	$\Delta\%A$
			n	%	%A	n	%	%A		
0,314	0,626	0,470	8	6,8	6,8	2	2,7	2,7	-4,1	-4,1
0,627	0,939	0,783	12	10,3	17,1	11	14,7	17,4	4,4	0,3
0,940	1,252	1,096	16	13,7	30,8	13	17,3	34,7	3,6	3,9
1,253	1,565	1,409	16	13,7	44,5	11	14,7	49,4	1,0	4,9
1,566	1,878	1,722	12	10,3	54,8	17	22,7	72,1	12,4	17,3
1,879	2,191	2,035	24	20,5	75,3	11	14,7	86,8	-5,8	11,5
2,192	2,504	2,348	3	2,6	77,9	7	9,3	96,1	6,7	18,2
2,505	2,817	2,661	7	6,0	83,9			96,1	-6,0	12,2
2,818	3,130	2,974	8	6,8	90,7			96,1	-6,8	5,4
3,131	3,443	3,287	3	2,6	93,3	2	2,7	98,8	0,1	5,5
3,444	3,756	3,600	3	2,6	95,9	1	1,3	100,1	-1,3	4,2
3,757	4,070	3,913			95,9				0,0	
4,071	4,383	4,226	4	3,4	99,3				-3,4	0,8
4,384	4,696	4,539	1	0,8	100,1				-0,8	

### GRAFICA 5.-

Polígono de frecuencias correspondiente a la distribución de los valores del diámetro mayor de los gránulos cálcicos de caracoles sometidos a 10 días de ayuno (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos). En abcisas se representan valores de diámetro mayor en  $\text{Å}$ ; en ordenadas se indican porcentajes.

Los distintos círculos indican, en cada caso, el porcentaje de gránulos, sobre el total de cada muestra, cuyo diámetro mayor se encuentra comprendido en el correspondiente intervalo. Las líneas continua y de trazos representadas sobre el eje de abcisas corresponden a la situación del diámetro mayor medio en cada grupo de animales.

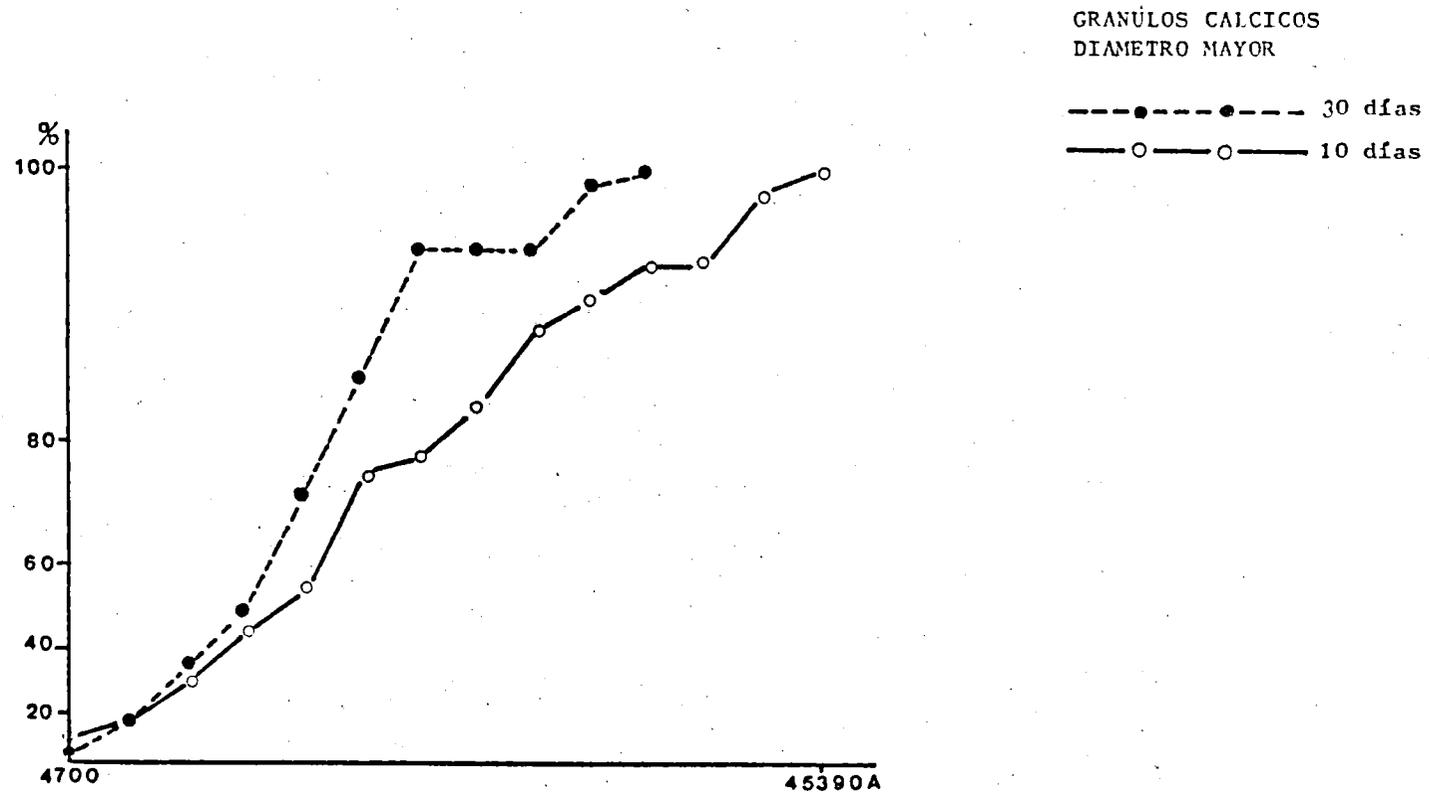


GRAFICA 5.-

GRAFICA 6.-

Distribución de los %A (indicados en ordenadas) para los valores del diámetro mayor (expresado en abscisas en Å) de los caracòles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos).

Los diferentes círculos indican el %A que corresponde a los distintos valores de diámetro mayor.



GRAFICA 6.-

TABLA 5.-

Distribución de la superficie de los gránulos cálcicos en caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno. En las tres primeras columnas se indican los límites inferior y superior y el valor medio de cada intervalo. Estos valores vienen expresados en micras cuadradas. El resto de parámetros tienen la misma significación que en la tabla 4.

TABLA 5

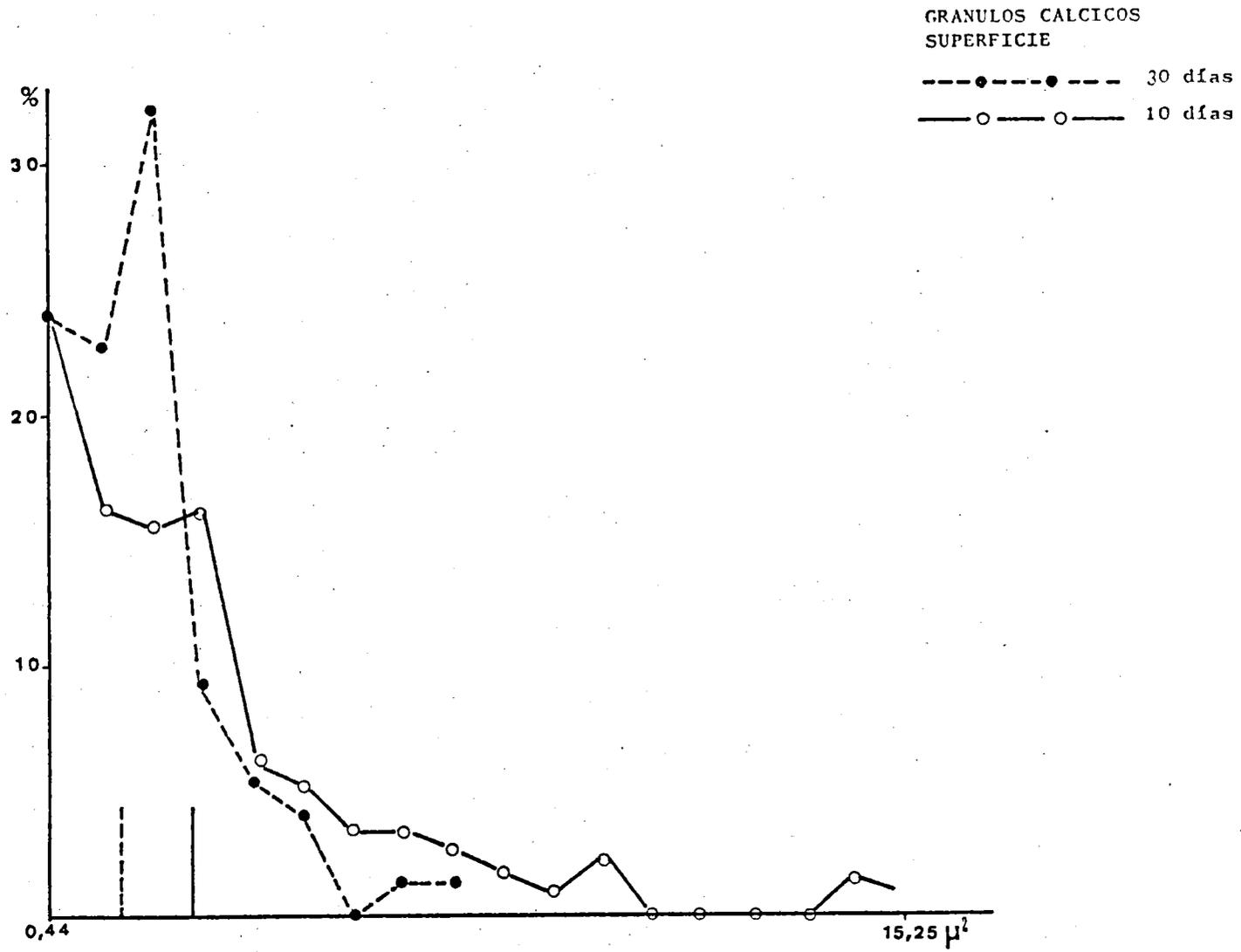
GRANULOS CALCICOS: SUPERFICIE

Lim i	Lim s	Med I	10 días			30 días			Δ%	Δ%A
			n	%	%A	n	%	%A		
0,00	0,87	0,44	28	23,9	23,9	18	24,0	24,0	0,1	0,1
0,88	1,74	1,31	19	16,2	40,1	17	22,7	46,7	6,5	6,6
1,75	2,61	2,18	18	15,4	55,5	24	32,0	78,7	16,6	23,2
2,62	3,48	3,05	19	16,2	71,7	7	9,3	88,0	-6,9	16,3
3,49	4,35	3,92	7	6,0	77,7	4	5,3	93,3	-0,7	15,6
4,36	5,22	4,79	6	5,1	82,8	3	4,0	97,3	-1,1	14,5
5,23	6,09	5,66	4	3,4	86,2			97,3	-3,4	11,1
6,10	6,97	6,54	4	3,4	89,6	1	1,3	98,6	-2,1	9,0
6,98	7,84	7,41	3	2,6	92,2	1	1,3	99,9	-1,3	7,7
7,85	8,71	8,28	2	1,7	93,9				-1,7	6,0
8,72	9,58	9,15	1	0,9	94,8				-0,9	5,1
9,59	10,45	10,02	3	2,6	97,4				-2,6	2,5
10,46	11,32	10,89			97,4				0,0	2,5
11,33	12,19	11,76			97,4				0,0	2,5
12,20	13,06	12,63			97,4				0,0	2,5
13,07	13,94	13,50			97,4				0,0	2,5
13,95	14,81	14,38	2	1,7	99,1				-1,7	0,8
14,82	15,68	15,25	1	0,9	100,0				-0,9	

GRAFICA 7.-

Polígono de frecuencias correspondiente a la distribución de los valores de superficie de los gránulos cálcicos de caracoles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos). En abcisas se representan valores de superficie en micras cuadradas, y en ordenadas, porcentajes.

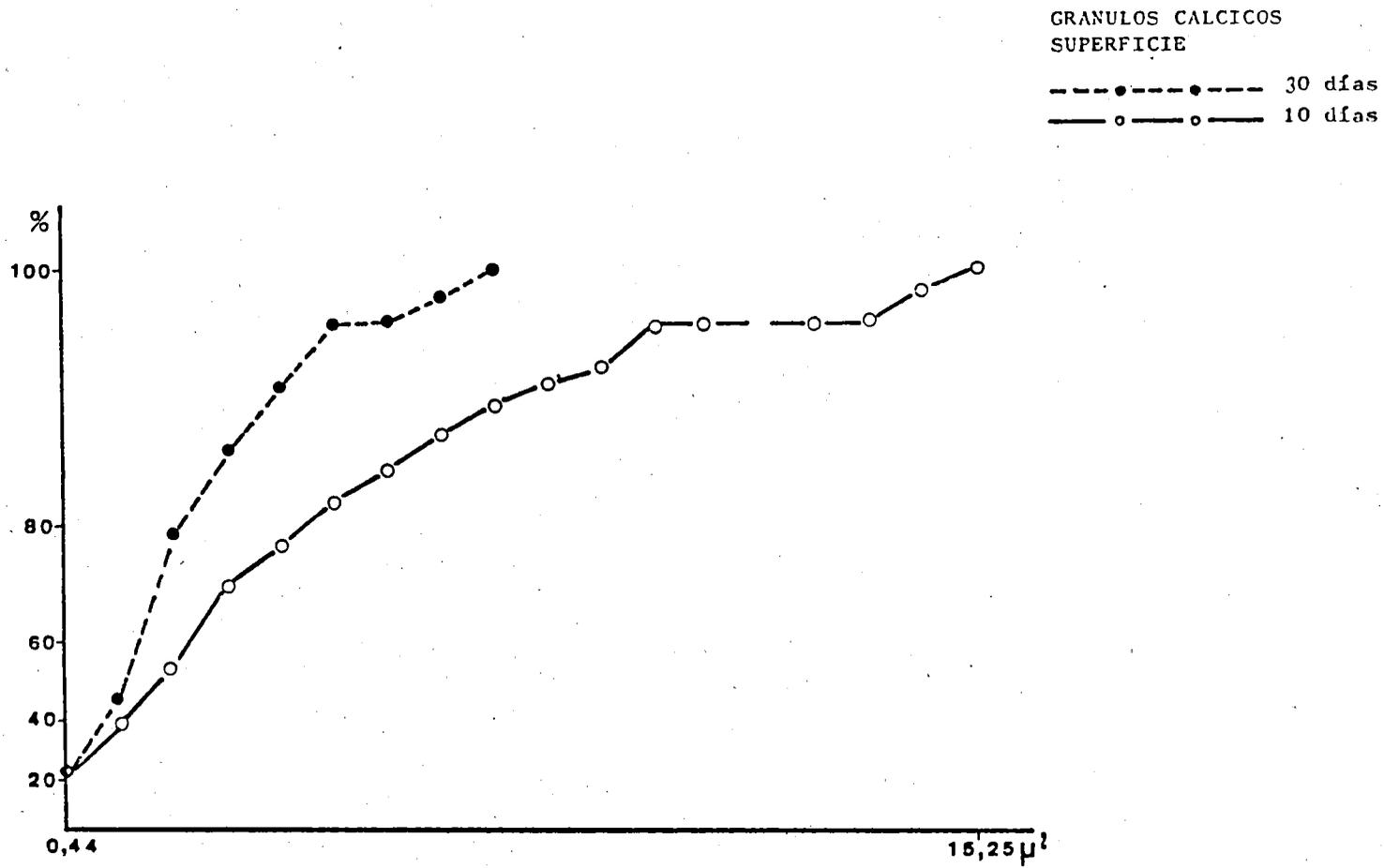
Los círculos y líneas sobre el eje de abcisas como en la gráfica 5.



GRAFICA 7.-

GRAFICA 8.-

Distribución de los %A (indicados en ordenadas) para los valores de superficie (expresados en abcisas en micras cuadradas) de los gránulos cálcicos en caracoles sometidos a 10 (línea continua) y 30 días de ayuno (línea de trazos). Los diferentes círculos indican el %A que corresponde a los distintos valores de superficie.



GRAFICA 8.-

TABLA 6.-

Comparación de los valores medios encontrados para el diámetro mayor y la superficie en los gránulos cálcicos de caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno, respectivamente.

Para cada tipo de caracoles, N = número de gránulos medidos;  $\bar{X}$  = valor medio del diámetro mayor (expresado en  $\text{\AA}$ ) o de la superficie (expresado en micras cuadradas) de los gránulos pertenecientes a los caracoles de 10 y 30 días de ayuno;  $S_m$  = error standard del correspondiente valor medio.

$\Delta$  = incremento para el correspondiente valor medio desde 10 a 30 días; t = resultado del test de comparación de medias al comparar los valores medios del correspondiente parámetro encontrados en el grupo de caracoles sometidos a 10 días de ayuno y en los sometidos a 30 días.

TABLA 6

GRANULOS CALCICOS: COMPARACION

		10 días	30 días	$\Delta$	t
Diámetro mayor	N	117	75		
	$\bar{X}$	18320	15490	-2830	2,7
	$S_m$	850	630		
Superficie	N	117	75		
	$\bar{X}$	3,00	1,96	-1,04	3,4
	$S_m$	0,26	0,15		

## V. COMENTARIO

## 1. SOBRE LA CONSTITUCION GENERAL DE LA GLANDULA

Aunque algunos autores, como Russell-Hunter (1968), consideran impropio el empleo del término "hepato" y sus derivados para denominar la glándula digestiva del intestino de algunos Moluscos, hemos juzgado que la estructura de esta glándula, tal como ha sido descrita, ofrece suficientes detalles que se pueden considerar similares a los que ofrece el hígado de Vertebrados, como para no resultar inaceptable la denominación de hepatopáncreas.

Por otra parte, en la moderna literatura, cuyos trabajos han utilizado ampliamente la microscopía electrónica, no resulta infrecuente encontrar este término (Abolins-Krogis, 1965, 1970; Bani, 1962; Aijón y col., 1978), si bien es cierto que otros autores han preferido referirse a este órgano con el nombre de glándula digestiva (Sumner, 1965a, 1966a, 1969; Walker, 1970; Bowen y Davies, 1971). Por ello, hemos creído oportuno considerar válidas ambas denominaciones y a lo largo de este trabajo las hemos utilizado indistintamente.

El hepatopáncreas de *Helix aspersa* se encuentra constituido por una serie de elementos tisulares

de diferente naturaleza. Entre tales elementos se encuentran los de carácter glandular, con sus regiones propiamente glandulares ó adenómeros y sus conductos excretorios, los de naturaleza conectiva, las células musculares y los conductos linfáticos. Los trabajos encontrados en la literatura que trata del hepatopáncreas de Gasterópodos, tanto a microscopía óptica como electrónica, le dedican una especial atención a las estructuras glandulares, siendo prácticamente ignorados, o relatados de manera más o menos indirecta, los restantes elementos.

El tejido conectivo, cuya disposición ha sido mencionada por Billet y McGee-Russell (1955) y por Walker (1970), se encuentra interpuesto entre los adenómeros glandulares, y aparece formado fundamentalmente por fibrocitos, como elementos celulares, y fibrillas de colágeno, como estructuras no celulares. Los fibrocitos ofrecen generalmente un citoplasma muy ramificado, situación lógica, puesto que se trata de células que han ido sufriendo continuos y muy activos procesos de expulsión de material precolágeno, mediante la formación de grandes vacuolas de exocitosis, que han venido a conformar poco a poco esa notable irregularidad del contorno citoplasmático. Las ramificaciones citoplasmáticas

de los fibrocitos pueden conectar entre sí, delimitando lagunas de un contenido linfático, que vendrían a constituir un sistema de irrigación linfática de la glándula. Las lagunas terminan confluyendo en conductillos linfáticos de diverso calibre, tal como se relató en las observaciones.

En cuanto a las fibrillas de colágeno, ofrecen una típica estructura estriada, semejante a la que se puede encontrar en el conectivo de los vertebrados. El diámetro observado -- 400 Å --, así como su denso empaquetamiento, se corresponde igualmente con la situación conectiva de animales superiores. No hemos llegado a observar en el tejido conectivo tipos celulares diferentes de los fibrocitos, aunque Wagge (1951), Fretter (1952) y Abolins-Krogis (1960, 1963b) han descrito la existencia en él de células migradoras de carácter amebocítico, que serían las encargadas del transporte de proteínas y sales cálcicas desde el hepatopáncreas a otros lugares del individuo, para intervenir en los procesos de regeneración de la concha. Es posible que estos amebocitos correspondan a células fibroblásticas que en un determinado momento, ante las necesidades fisiológicas relacionadas con la reparación de la concha, se transformen en elementos de carácter móvil, que in-

gieren y transportan los productos necesarios para la citada regeneración. En nuestro caso, al utilizar animales cuya concha se encontraba intacta, no se habría producido esa transformación, y ello explicaría el que no hallamos podido observar amebocitos en el presente trabajo.

Entre las prolongaciones citoplasmáticas de los fibrocitos y las fibras de colágeno se localizan células musculares, cuya existencia ya fue detectada por Walker (1970), aunque la descripción que de ellas ofrece resulta bastante pobre. El carácter más distintivo de estas células es la existencia en su citoplasma de gran cantidad de miofilamentos, que pueden ser finos y gruesos, igual que sucede en las células musculares lisas o estriadas de los vertebrados. Pero a diferencia de éstas, los filamentos de las células musculares del hepatopáncreas de *Helix* no muestran uniformidad en cada tipo, sino que los gruesos ofrecen la peculiaridad de ofrecer una variedad de diámetros, lo que podría corresponder, como ya se apuntó en las observaciones, a la posibilidad de existencia de un único tipo de miofilamento grueso, pero con diferente grosor en distintas porciones de su longitud, por lo cual, al ser seccionado en diferentes niveles, se observa en los cortes como de diámetro va-

riable. Si esta posibilidad fuera cierta, al aparecer en una misma sección diversos diámetros, habríamos de concluir que los filamentos gruesos no se sitúan todos al mismo nivel, situación drásticamente diferente de la encontrada en las células estriadas. Por ello, coincidiendo con la opinión de Walker (1970) hemos calificado a las células musculares del hepatopáncreas como pertenecientes al tipo liso.

La presencia de las células musculares en el hepatopáncreas de *Helix* vendrían a explicar la situación contráctil de este órgano, propiedad que ha sido expuesta por Nakazima (1956).

Los elementos de carácter propiamente glandular se encuentran constituidos por adenómeros, cuya estructura comentamos con posterioridad, los cuales vienen a desembocar en pequeños conductillos excretorios, fruto de la dicotomía de conductos mayores, los cuales terminan confluyendo en un gran conducto de localización lateral dentro del hepatopáncreas, el cuál va siguiendo la hélice descrita por éste, hasta desembocar en el intestino. Aunque en esta tesis hemos dedicado una atención preferente a la situación adenomérica, se ha podido comprobar que los conductos excretorios se ha-

llan revestidos por un epitelio, cuyas células ofrecen una superficie apical ciliada, como ya había sido mostrado por Walker (1970). En la luz de los conductos se puede detectar frecuentemente una masa de material digestivo, entre el que pueden observarse algunos restos celulares procedentes de la excreción de productos por parte de algunas células de los adenómeros. Muy probablemente los cilios de las células epiteliales se encuentran favoreciendo el avance del citado material digestivo a lo largo de los conductos excretorios.

## 2. SOBRE LA ESTRUCTURA GENERAL DEL ADENOMERO

Desde el trabajo inicial de Barfurth (1883), las numerosas descripciones efectuadas sobre los adenómeros del hepatopáncreas de Gasterópodos Pulmonados, han venido a coincidir en la existencia de tres (Baecker, 1932; Van Weel, 1950; Fretter, 1952; Nakazima, 1956) o cuatro tipos celulares (Sumner, 1965a, 1966a; Walker, 1970; Aijón y col., 1978). En el presente trabajo hemos podido constatar que realmente existen suficientes variaciones estructurales dentro de las distintas células hepatopancreáticas como para diferenciar claramente los citados cuatro tipos (digestivas, excretoras, cálcicas y oxífilas); pero además hemos descrito una nueva forma, que hemos denominado como de "citoplasma fluido", la cual ofrece unos caracteres que no podemos ajustar perfectamente a los presentados por las células digestivas o las excretoras, aunque, ciertamente, parece estar emparentada con estos tipos celulares.

Si bien la realidad estructural de los diversos tipos celulares resulta incuestionable, se ha discutido en la literatura sobre la posibilidad de que, desde el punto de vista de la diferenciación de los elementos celulares, algunos de esos tipos coincidan, es decir que células que ofrecen caracteres estructurales

diferentes no serían sino la observación de dos momentos metabólicos diferentes de un mismo tipo celular. Tal posibilidad ha sido apuntada por algunos autores (Fretter, 1952; Billet y McGee-Russell, 1955; Aijón y col., 1978) para las células digestivas y excretoras. En efecto, nosotros hemos encontrado suficientes detalles que hablan en favor de esta hipótesis, si bien sobre este aspecto no se puede aventurar una rotunda afirmación hasta que no se lleven a cabo trabajos con una especial metodología, encaminada en ese sentido de la investigación hepatopancreática. No obstante, como decíamos, es nuestra opinión que las células excretoras proceden de las digestivas mediante una profunda intensificación de los procesos lítico-digestivos, que determinan la aparición de una gran cantidad de cuerpos densos, los cuales vienen a ocupar la mayor parte del citoplasma.

Por otra parte, David y Gotze (1963) encuentran una semejanza entre las células cálcicas y las digestivas, que podría indicar un origen común. En este sentido nosotros hemos podido detectar que la célula digestiva, así como la excretora, puede presentar una calcificación inicial en alguno de sus cuerpos densos, que podría representar un primer estadio en la diferencia-

ción de células de tipo cálcico. Igualmente , una relación entre las células excretoras y cálcicas ha sido apoyada por Thiele (1953) y Sumner (1965a), aunque en un sentido opuesto, ya que estos autores defienden la procedencia de las células excretoras a partir de las cálcicas, por degeneración de éstas.

En cuanto a las células oxífilas, su realidad estructural parece fuera de toda duda, aunque a veces pudiera presentarse la posibilidad de catalogar como perteneciente a este tipo, trozos de citoplasma correspondientes a otras clases de células hepatopancreáticas, ya que la gran irregularidad de estas células determina que, en los cortes histológicos para microscopía electrónica, aparezcan numerosas porciones citoplasmáticas aisladas que, en ocasiones, se presentan cargadas de mitocondrias, por lo que podrían confundirse con células oxífilas, tratándose realmente de un trozo de citoplasma que ofrece unos caracteres similares a los de ese tipo celular, pero que pertenece a una célula que, al considerarla en su totalidad, debe calificarse como perteneciente a otro tipo. En la bibliografía la opinión más generalizada es la que defiende que las células oxífilas (o delgadas) son células indiferenciadas que terminarán transformándose en células cálcicas

o digestivas (McMunn, 1900; Thiele, 1953; Sumner, 1965a; Walker, 1970). En nuestro estudio, las células de "citoplasma fluido" podrían derivar de las oxífilas, como ya se apuntó en el apartado de observaciones, constituyendo un paso intermedio en la diferenciación de tales elementos hacia células digestivas, con cuyos citoplasmas presentan notables semejanzas.

En resumen, parece probable que las células del adenómero hepatopancreático sufran grandes variaciones estructurales en distintos momentos de su vida, lo que vendría a traducirse en una notable interconversión de unos tipos celulares en otros. Esta situación resulta especialmente posible para el caso de las células digestivas y excretoras.

Los diferentes tipos celulares muestran una gran irregularidad de su superficie, que determina la existencia de una variada gama de contactos intercelulares. A nivel de estos contactos se pueden detectar diversas diferenciaciones de la membrana plasmática, que ofrecen dos significaciones distintas. Por una parte, las hay que contribuyen a mantener la cohesión celular, mientras que otras dan lugar a la existencia de pequeños canalículos intercelulares.

Entre las diferenciaciones de la membrana plasmática que ayudan a la cohesión celular caben citar las condensaciones que aparecen, en todas las células, en los niveles apicales de las caras laterales, donde contactan con sus vecinas, situación observada en el presente trabajo, confirmando las descripciones de Sumner (1966a). Las citadas condensaciones, que corresponden al tipo de banda de cierre descrito en Mamíferos por Palay y Karlin (1959), dificultaría asimismo el paso de productos desde los espacios intercelulares hacia la luz de los adenómeros. Igualmente, favorece la adherencia entre células adyacentes la existencia de muchas y profundas interdigitaciones, que son las determinantes de que, en las secciones histológicas para microscopía electrónica, aparezcan gran cantidad de pequeñas porciones citoplasmáticas, que dan la impresión de encontrarse aisladas entre porciones celulares vecinas que se observan con mayores dimensiones.

En algunos casos, las membranas plasmáticas de las caras laterales de células vecinas se encuentran estrechamente adosadas, de manera que el espacio intercelular es mínimo. Pero también es muy frecuente la existencia de espacios intercelulares más o menos dilatados que se disponen entre células adyacentes. Como ya se ha

expuesto en las observaciones, hemos llegado a distinguir hasta cinco tipos diferentes de tales espacios, y en uno de ellos la situación parece ser muy similar a la de los canalículos biliares del hígado de mamíferos, con una profusa disposición de cortas microvellosidades, distribuidas irregularmente. La existencia de espacios amplios entre las células del adenómero hepatopancreático ha sido descrita en *Lamelibranchios* por Sumner (1966c), el cual no llega a observar diversidad morfológica en ellos, limitándose a indicar que se da preferentemente hacia la base de las células y que su misión podría estar en relación con la penetración de amebocitos entre los elementos celulares de los adenómeros. No obstante, en nuestra opinión, los espacios intercelulares, con una extensa distribución y una morfología típica, deben cumplir además otras misiones, como el drenaje de productos intercelulares, ya que las células de carácter amebocítico suelen tener la facultad de atravesar barreras de naturaleza epitelial, mediante una gradual separación de células adyacentes, y por lo tanto no sería precisa la previa existencia de canales intercelulares, aunque, por supuesto, éstos pueden favorecer la citada penetración.

La superficie apical de las células hepatopancreáticas ofrece, en la mayoría de los casos, la presen-

cia de microvellosidades, de mayor o menor longitud y dispuestas más o menos densamente, según los tipos celulares. Donde mayor escasez muestran es en las células excretoras, como resultado de los intensos procesos que caracterizan a este tipo celular. Coincidimos con Sumner (1966a) en la observación de microfilamentos en el interior de las microvellosidades, que son semejantes a los descritos en las de células del epitelio intestinal de mamíferos (Palay y Karlin, 1959; Brown, 1962; Millington y Finean, 1962; Kjaerheim, 1963; McNabb y Sandborn, 1964). Asimismo, en la superficie de las microvellosidades hemos podido detectar un fino material amorfo que podría ser similar al glicocalix de las citadas células de mamíferos, si bien esta semejanza debe ser confirmada mediante estudios de carácter citoquímico.

### 3. SOBRE LA SITUACION MITOCONDRIAL

Las mitocondrias han sido catalogadas por Lehninger (1977) como las centrales energéticas de la célula, para significar que se trata de orgánulos capaces de sintetizar ATP, el cual se utiliza en las necesidades metabólicas y fisiológicas de la célula. En general, la localización mitocondrial puede variar según los diferentes lugares citoplasmáticos en los que se necesite un aporte de energía; es decir, la concentración de las mitocondrias puede sufrir variaciones, relacionadas con los diferentes requerimientos energéticos en distintas zonas citoplasmáticas (Fawcett, 1966; De Robertis y col., 1977). En este sentido, cabe destacar que es frecuente en las células glandulares del hepatopáncreas de *Helix aspersa*, una abundante localización de mitocondrias en las zonas apicales del citoplasma (Sumner, 1966a; Abo-lins-Krogis, 1970), encontrándose entremezcladas con vesículas de pinocitosis que penetran hacia el citoplasma desde la base de las microvellosidades. Tal situación resulta lógica, puesto que los fenómenos pinocitóticos necesitan para su realización de un aporte de energía.

En las células cálcicas es fácil encontrar una localización basal de las mitocondrias. No es de extrañar tal situación, ya que en estos niveles, según Abo-



lins-Krogis (1968), se da una liberación de elementos cálcicos hacia el conectivo subyacente, proceso que, muy probablemente, ha de llevarse a cabo con el consiguiente consumo de ATP.

De los diferentes tipos celulares del órgano glandular objeto de nuestro estudio, en donde se ha observado una mayor concentración mitocondrial ha sido en las células oxífilas, mientras que las excretoras son las más pobres en mitocondrias, como ya fue mostrado por Sumner (1965a) y Walker (1970). Esta pobreza en este tipo de orgánulos es probablemente debida a que los procesos líticos que tienen lugar en las células excretoras han llegado a degradar un buen número de ellos.

Los dos tipos de estructura mitocondrial descritos en las observaciones (mitocondrias de matriz densa con crestas triangulares y mitocondrias de matriz clara con crestas filamentosas) deben de corresponderse con situaciones funcionales diferentes, puesto que, como apunta Lehninger (1964, 1977) y Fawcett (1966), la estructura mitocondrial puede sufrir variaciones en relación con la actividad metabólica de las células que las contiene. Entra dentro de lo posible que sea el tipo claro el menos funcional, puesto que generalmente aparece en

las células excretoras, que son elementos cuyo citoplasma no se encuentra en una situación metabólica muy activa, ya que gran parte de sus componentes han sido lisados y excretados. No obstante, en las mitocondrias hepatopancreáticas se aprecia una proporcionalidad inversa entre la densidad de la matriz y el número de crestas, situación ya establecida por Grundmann (1967) para la generalidad celular; es decir, las mitocondrias densas suelen tener menor número de crestas que las claras, lo que parece indicar que estas últimas son más activas que las densas, contrariamente a nuestro anterior razonamiento. Por ello, como ya decíamos, solo nos cabe suponer que la funcionalidad de ambos tipos mitocondriales debe ser distinta, sin poder entrar en más detalles, fuera de estos límites.

En cuanto a las relaciones mitocondriales, destaca en las células cálcicas la disposición de cisternas de retículo endoplasmático rugoso que abrazan estrechamente a las mitocondrias. Esta imagen resulta bastante frecuente, habiendo sido descrita ya por Fawcett (1966), en células de mamíferos. Pero mientras Fawcett opina que podría ser una yuxtaposición transitoria entre los dos orgánulos citoplasmáticos para la utilización local de energía, es nuestra opinión que, en las células del ór-

gano que nos ocupa, esta relación no es sino el comienzo de una gradual transformación mitocondrial en gránulos cálcicos, fenómeno que ya ha sido señalado por Abolins-Krogis (1968).

Otro tipo de transformaciones mitocondriales que se aprecia en las células hepatopancreáticas acaba con la degradación de estos orgánulos en el interior de cuerpos densos. Tal degeneración de las mitocondrias resulta muy frecuente en las células digestivas y excretoras, habiendo sido observados por nosotros los sucesivos grados de incorporación a citolisosomas y de digestión en el interior de ellos. Esta situación de degradación mitocondrial en vacuolas autofágicas ha sido descrita en células de animales superiores por Novikoff y Essner (1962).

En resumen, las mitocondrias muestran en las células del hepatopáncreas de *Helix* una notable variabilidad en lo referente a número, localización, estructura interna, relaciones con otros elementos y transformaciones, que viene a mostrar el intenso dinamismo morfofisiológico que caracteriza a tales células.

#### 4. SOBRE LAS OBSERVACIONES DE CUERPOS DENSOS

La existencia de gran cantidad de cuerpos densos es un carácter típico del citoplasma de las células hepatopancreáticas de *Helix*. Tales cuerpos densos se encuentran, en todos los casos, rodeados por una membrana, siendo las células excretoras las que los contienen en mayor cantidad, y en número algo inferior las digestivas. Los diferentes tipos de estos elementos parecen corresponder a distintas situaciones lisosómicas, como ha podido demostrarse por Sumner (1969) y Bowen y Davies (1971).

En los estudios ultraestructurales, que utilizan la microscopía electrónica, es fundamental la elección de un fijador adecuado a las estructuras que se hayan de observar. Así, Sumner (1966a) llama la atención sobre la diferente imagen que se puede conseguir según el fijador que se utilice. Esta consideración es de gran interés cuando se trata de investigar las estructuras de carácter lisosómico. Para este tipo de estudios uno de los mejores fijadores debe ser el glutaraldehído, puesto que preserva muy favorablemente a los enzimas, y los cuerpos densos de las células hepatopancreáticas poseen un considerable contenido enzimático (Billet y McGee-Russell, 1955; Rosenbaum y Ditzion, 1963; Sumner, 1965a, 1966a, 1969; Bowen, 1970; Walker, 1970; Bowen y Davies,

1971). En nuestro trabajo, en efecto, hemos empleado el glutaraldehído como fijador.

En el presente trabajo se han podido observar múltiples cuerpos densos, que han sido agrupados en cuatro tipos fundamentales. A continuación, teniendo en cuenta nuestras observaciones, vamos a tratar de establecer la significación de tales tipos, si bien hemos de tener presente las dificultades que ello entraña cuando se consideran tan solo estudios de carácter morfológico, puesto que para disponer de una cierta seguridad se hace preciso acudir a investigaciones citoquímicas y autoradiográficas.

Dentro del tipo I hemos considerado tres clases de formaciones (a, b, c). Los cuerpos Ia, de pequeño tamaño y contenido denso separado de la membrana limitante por un halo claro, responden a la estructura que suelen presentar los lisosomas primarios. Los elementos Ib, asimismo pequeños, pero con un contenido grisáceo y homogéneo, parecen representar vacuolas de pinocitosis, ingeridas a partir de la superficie apical; efectivamente, esta suposición concuerda con la frecuente localización apical de este tipo de estructuras. En cuanto a las formaciones Ic, de mayor tamaño pero con una estructura se-

mejante a las Ia, podrían corresponder a lisosomas primarios de mayor tamaño, producto de la fusión de vesículas Ia, o bien a lisosomas secundarios de reciente formación, merced a la unión de elementos Ia y Ib.

Los granos tipo II, con un contenido homogéneo y grisáceo, parecen haberse formado por fusión de vesículas de micropinocitosis. Se trataría, por lo tanto, de estructuras que todavía no están implicadas en procesos degradativos, en tanto no se unan a cuerpos lisosómicos. Estas vacuolas se corresponden, al parecer, con las descritas en la literatura, desde Krijgsman (1928), como gránulos verdes que, según Walker (1970), tienen una composición a base de proteínas y polisacáridos. La procedencia sugerida en este comentario, a partir de vesículas de micropinocitosis, parece estar de acuerdo con las ideas de Sumner (1965a) y Walker (1970), que afirman que los gránulos verdes son acúmulos de material recientemente ingerido. No nos parece adecuada la hipótesis de Krijgsman (1928) y Thiele (1953), que habla en favor de una transformación de gránulos amarillos para dar origen a los verdes.

El tipo III de granos, que ofrece un contenido denso y granular que no llega a ocupar toda la zona que

se dispone dentro de la membrana limitante, parece corresponderse en la bibliografía con las vacuolas que contienen gránulos amarillos, descritas por numerosos autores (Sumner, 1965a, 1966a; Billet y McGee-Russell, 1955; Walker, 1970). La composición de tales gránulos amarillos es fundamentalmente lipofuchina (Sumner, 1965a), con una morfología semejante a los granos de este producto encontrados en tejidos de mamíferos (Duncan y col., 1960; Malkoff y Strehler, 1963; Goldfischer y Bernstein, 1969). De nuestras observaciones parece deducirse, aunque no se pueda asegurar definitivamente, que el contenido de los granos tipo III procede de la degradación de mitocondrias, fruto de un proceso de digestión; por lo tanto, caso de confirmarse esta procedencia, se trataría de citolisosomas o, al menos, de vacuolas con un contenido parcialmente citolisosómico.

En cuanto a los granos tipo IV, con un contenido claro y fibrogranular, podrían incluirse entre los fagolisosomas, induciéndonos a pensar esto su localización media o basal en el citoplasma, puesto que a estos niveles ya se habría podido producir la fusión de vesículas de pinocitosis con lisosomas primarios, aunque, por supuesto, otros modos de formación de estos elementos no pueden ser descartados.

De cualquier forma, aunque de momento la catalogación exacta de su procedencia no pueda nada más que sugerirse, lo que sí es seguro es que todas estas formas vacuolares se encuentran muy relacionadas entre sí, como se demuestra por la existencia de numerosas formas intermedias, mezcla de las anteriores, y asimismo relacionadas con los procesos degradativos celulares.

## 5. SOBRE LOS GRANOS CALCICOS

Los gránulos cálcicos son estructuras típicas del tipo celular del mismo nombre. La estructura en anillos concéntricos observada en el presente estudio, en su situación de madurez, coincide plenamente con la descrita por otros autores, tanto en el hepatopáncreas de Gasterópodos como de otros grupos de animales (Bévelander y Benzer, 1948; Bani, 1962; Abolins-Krogis, 1965; Sumner, 1966a; Kapur y Gibson, 1968; Stanier y col., 1968; Walker, 1970; Becker y col., 1974; Navascués y col., 1978).

La localización de los granos cálcicos es preferentemente basal, lo cual concuerda con la afirmación de Abolins-Krogis (1968) de que estos elementos, después de haberse descompuesto, van a abandonar la célula cálcica por su base, para pasar al conectivo de la base del adenómero. Asimismo, esta suposición parece verse favorecida por la especial situación de las células cálcicas hacia las partes inferiores de las unidades fundamentales del hepatopáncreas, por debajo de células digestivas y excretoras.

Las células cálcicas presentan un retículo endoplasmático rugoso relativamente abundante, que se dispone entre los granos de calcio (Abolins-Krogis, 1965;

Sumner, 1966a; Walker, 1970). Esta disposición resulta corresponder a un tipo celular con unas amplias actividades de síntesis proteica, ya que en la composición de los granos cálcicos, además de las sales minerales, interviene una matriz orgánica, constituida fundamentalmente por proteínas (Abolins-Krogis, 1960, 1965).

Las imágenes de gránulos cálcicos iniciales, que podrían corresponder a los gránulos "b" de Abolins-Krogis (1965, 1968) o a las formas inmaduras de Walker (1970), presentan una característica semejanza con ciertas transformaciones que pueden sufrir mitocondrias y cuerpos densos, por lo que cabe la posibilidad de que su origen se sitúe en estos dos tipos de orgánulos, si bien durante el proceso de formación contribuya, en mayor o menor medida, el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, como ha defendido Abolins-Krogis (1965). En relación con la procedencia a partir de mitocondrias, hemos de destacar la constante presencia, y en número relativamente elevado, en las células cálcicas de formaciones mitocondriales bastante densas y rodeadas íntimamente por cisternas de retículo endoplasmático rugoso; esta situación podría representar el punto de partida de una serie de transformaciones que condujeran a la constitución del grano cálcico.

## 6. SOBRE LAS MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL AYUNO

La situación de ayuno en los caracoles provoca en las células de la glándula digestiva una destrucción de muchas de sus estructuras, que, si el tiempo de ayuno resulta muy prolongado, puede llegar a la total destrucción celular, probablemente gracias a la acción autolítica de la variedad de cuerpos densos existente en el citoplasma de estas células. Esta situación de total destrucción es muy frecuentemente observada a los 100 días de ayuno, si bien, como hemos expresado en las observaciones, no quiere ello decir que toda la glándula se encuentre en situación de destrucción. Es probable que los materiales que están siendo autodigeridos vayan a ser utilizados en otras partes del animal, para su mantenimiento. Por otra parte, las destrucciones celulares no pueden ser debidas a la muerte del animal correspondiente, puesto que en todos los casos, antes de la extracción de la glándula, se procedió a comprobar la supervivencia del caracol.

En el estudio de Sumner (1965a) se han referido diversos cambios celulares con un incremento progresivo de los días de ayuno, que parecen estar de acuerdo con nuestras observaciones. Así, este autor comprueba un sucesivo incremento del tamaño de las vacuolas, acom-

pañado de una reducción de su número. Según él, por encima de los 65 días de ayuno es imposible diferenciar las células digestivas de las excretoras, hecho que nos parece explicable, ya que las células digestivas, en su progresivo aumento del estado lítico, favorecido por el ayuno, irían transformándose en excretoras. Lo que sí parece curioso en el trabajo de Sumner es que estos cambios suceden cuando los animales se mantienen en condiciones artificiales de ayuno prolongado, pero cuando se encuentran en situación de hibernación natural, la estructura hepatopancreática es similar a la de caracoles con un corto período de ayuno. Estos hallazgos requieren para su explicación de trabajos adicionales, pero nos permiten suponer que la hibernación es un fenómeno que ha sido preparado en el animal por una especial disposición metabólica.

Junto a la destrucción de las células adenoméricas, se asiste, con el ayuno prolongado, a un aumento de la observación de estructuras conectivas de la base. Por lo tanto, los distintos elementos del hepatopáncreas muestran distinta reacción y labilidad frente a las condiciones de ayuno prolongado.

Por último, los estudios de carácter cuantitativo que se han llevado a cabo en la presente tesis, nos

han conducido a determinar, de forma más objetiva, algunas transformaciones sufridas por ciertas estructuras citoplasmáticas, como son gotas lipídicas y gránulos cálcicos, transformaciones que no son apreciables mediante el simple estudio morfológico. Los resultados obtenidos indican que a los 10 días de ayuno las gotas lipídicas son de menor tamaño que a los 30 días, mientras que la situación contraria se da en el caso de los gránulos cálcicos.

Los resultados encontrados en estos análisis pueden ser considerados como significativos, para la realización de comparaciones, puesto que las condiciones metodológicas en las que se han efectuado las determinaciones cuantitativas han sido semejantes en los grupos de caracoles sometidos a 10 y 30 días de ayuno. Las influencias de orientación, elección de diferentes tamaños, etc. han debido ser similares en ambos grupos de animales al escoger las secciones de manera aleatoria, y dentro de cada una de ellas elegir igualmente al azar los distintos elementos que iban a ser medidos.

La explicación de la disminución de tamaño de los granos cálcicos podría estar en una mayor concreción de los mismos al aumentar el tiempo de ayuno, debida a

una intensificación de la calcificación. También podría suceder que la situación de ayuno prolongado alterara, de alguna manera que desconocemos, el comportamiento metabólico de las células cálcicas, produciendo granos de dimensiones más reducidas.

Por lo que se refiere a las gotas lipídicas, el incremento de tamaño observado con la prolongación del ayuno desde 10 a 30 días parece contradecirse con lo que podría esperarse a priori, puesto que lo lógico es que, al utilizar el animal materiales de reserva, como son los lípidos, tales estructuras se hicieran menores. No obstante, parece probable que, en efecto, se de esa utilización lipídica, pero al mismo tiempo suceda una fusión gotas lipídicas entre sí, con lo que, en conjunto, el tamaño de éstas se vería aumentado significativamente, como se deduce de nuestro estudio cuantitativo.

## VI. CONCLUSIONES

Del estudio efectuado se desprenden las siguientes conclusiones:

1ª.- El hepatopáncreas de *Helix aspersa* es una profusa glándula túbulo-acinosa constituida por unidades elementales, que vierten sus productos de secreción a canalículos que desembocan en un gran conducto general de carácter intestinal. La base de las unidades elementales está constituida por elementos conectivos, musculares aislados y sacos linfáticos.

2ª.- Cada unidad fundamental está formada por células imbricadas entre sí, que ofrecen imágenes de aspecto diferente. Distinguimos una imagen digestiva, una imagen excretora, una imagen cálcica y una oxíntica. Al menos las dos primeras podrían ser estados funcionales diferentes de un mismo tipo básico.

3ª.- El carácter de la superficie apical de las células, el modo de relación de sus caras laterales, sus canalículos intercelulares con pequeñas microvellosidades y los gránulos de células esparcidas por la basal, apoyan decididamente la denominación de hepatopáncreas.

4ª.- Existe una intensa actividad lítico-digestiva, que va desde iniciales fenómenos de micropinocitosis hasta la formación de cuerpos residuales y grandes bolsas de excreción, pasando por los demás estadios intermedios. La imagen es la de una glándula destinada a su propia digestión.

5ª.- En el citoplasma de las células hepatopancreáticas se comprueba un proceso de transformación de las mitocondrias en pequeñas vesículas y sacos aplanados, por un lado, y en cuerpos densos relacionados con retículo endoplasmático rugoso, por otro, pudiendo sufrir éstos últimos ulteriores procesos de calcificación.

6ª.- Las células cálcicas y sus correspondientes gránulos se localizan preferentemente hacia la base de los adenómeros, sin que hayan podido detectarse imágenes de relación entre las mismas y los sacos linfáticos. Estas células, como los demás tipos, contienen considerable cantidad de gotas lipídicas.

7ª.- Al someter a los caracoles de la especie *Helix aspersa* a un ayuno prolongado, se ocasiona un incremento de los procesos líticos o degenerativos de los componentes celulares constitutivos de los adenómeros y un aumento de fenómenos de proliferación conectiva.

8ª.- El ayuno prolongado proporciona inicialmente aumento de las imágenes de transformación mitocondrial y profusión de membranas citoplasmáticas, con figuras en panal, y más tardíamente considerables destrucciones y alto grado de friabilidad tisular.

9ª.- Con el ayuno se incrementa el tamaño de las gotas lipídicas, a la vez que se produce una más intensa calcificación de los gránulos de las células cálcicas, con la consiguiente concreción y limitación de su superficie.

10ª.- El hepatopáncreas de *Helix aspersa* se presenta como un modelo útil para el estudio de las transformaciones y modificaciones que los orgánulos celulares sufren ante condiciones de stress metabólico, modificaciones principalmente referentes a la acción de los enzimas lisosómicos y a la versatilidad mitocondrial.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. ABOLINS-KROGIS, A. (1958)

The morphological and chemical characteristics of organic crystals in the regenerating shell of *Helix pomatia*, L.

Acta Zool., 39: 19

2. ABOLINS-KROGIS, A. (1960)

The histochemistry of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.) in relation to the regeneration of the shell.

Ark. Zool., 13: 159

3. ABOLINS-KROGIS, A. (1963a)

Some features of the chemical composition of isolated cytoplasmic inclusions from the cells of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.).

Ark. Zool., 15: 393

4. ABOLINS-KROGIS, A. (1963b)

The histochemistry of the mantle of *Helix pomatia* (L.) in relation to the repair of the damaged shell.

Ark. Zool., 15: 461

5. ABOLINS-KROGIS, A. (1963c)

On the protein stabilizing substances in the isolated b-granules and in the regenerating membranes of the shell of *Helix pomatia* (L.).

Ark. Zool., 15: 475

6. ABCLINS-KROGIS, A. (1963d)  
The morphological and chemical basis of the initiation of calcification in the regenerating shell of *Helix pomatia* (L.).  
Acta Univ. Upsal., 20: 1
7. ABCLINS-KROGIS, A. (1965)  
Electron microscope observations on calcium cells in hepatopancreas of snail *Helix pomatia* (L.).  
Ark. Zool., 18: 85
8. ABCLINS-KROGIS, A. (1968)  
Shell regeneration in *Helix pomatia* with special reference to the elementary calcifying particles.  
Symp. Zool. Soc. Lond., 22: 75
9. ABCLINS-KROGIS, A. (1970)  
Alterations in the fine structure of cytoplasmic organelles in the hepatopancreatic cells of shell-regenerating snail, *Helix pomatia* L.  
Z. Zellforsch., 108: 516
10. AFZELIUS, B. A. y ROSEN, B. (1965)  
Nutritive phagocytosis in animal cells.  
Z. Zellforsch., 67: 24

11. AIJON, J., ALMENDROS, A. y ABADIA-FENOLL, F. (1978)  
Ultraestructura del adenómero del hepatopáncreas de  
*Helix hortensis*.  
Trab. Lab. Inst. Cajal Invest. Biol., en prensa.
12. ASHFORD, T. P. y PORTER, K. R. (1962)  
Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes.  
*J. Cell Biol.*, 12: 198
13. BAECKER, R. (1932)  
Die Mikromorphologie von *Helix pomatia* und einigen  
anderen Stylommatophoren.  
*Z. ges. Anat. Abt. III*, 29: 449
14. BANI, G. (1962)  
Struttura e ultrastruttura dell'epatopancreas di *Vaginulus borellianus* (colosi).  
*Monit. Zool. Ital.*, 69: 157
15. BARFURTH, D. (1883)  
Über den Bau und Tätigkeit der Gastropodenleber.  
*Arch. Micr. Anat.*, 22: 473
16. BARR, R. A. (1928)  
Some notes on the mucous and skin glands of *Arion*  
*ater*.  
*Quart. J. Micr. Sci.*, 71: 503

17. BARRETT, A. J. (1972)

Lysosomal enzymes.

En "Lysosomes. A laboratory handbook", ed. por J. T. Dingle, pg. 46, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

18. BEAULATON, J. (1967a)

Localisation d'activités lytiques dans la glande prothoracique du ver á soie du chêne (*Antheraea pernyi* Guér.) au stade prénympal. I. Structures lysosomiques, appareil de Golgi, et ergastoplasme.

J. de Microsc., 6: 179

19. BEAULATON, J. (1967b)

Localisation d'activités lytiques dans la glande prothoracique du ver á soie du chêne (*Antheraea pernyi* Guér.) au stade prenympal. II. Les vacuoles autolytiques (cytolysomes).

J. de Microsc., 6: 349

20. BECKER, G. L., CHEN, C.-H., GREENAWALT, J. W. y LEHNINGER, A. L. (1974)

Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*.

J. Cell Biol., 61: 316

21. BEHNKE, D. (1963)  
Demonstration of acid phosphatase-containing granules and cytoplasmic bodies in the epithelium of foetal rat duodenum during certain stages of differentiation.  
J. Cell Biol., 18: 251
22. BERTHET, J. (1965)  
La digestion intracellulaire et les lysosomes.  
Archs Biol., 76: 367
23. BÉVELANDER, G. y BENZER, P. (1948)  
Calcification in marine molluscs.  
Biol. Bull., 94: 176
24. BILLET, F. (1954)  
The  $\beta$ -glucuronidase of the Roman snail (*Helix pomatia*).  
Biochem. J., 57: 159
25. BILLET, F. y MCGEE-RUSSELL, S. M. (1955)  
 $\beta$ -glucuronidase in the digestive gland of the Roman snail (*Helix pomatia*).  
Quart. J. Micr. Sci., 96: 35

26. BOWEN, I. D. (1968a)

Electron-cytochemical localization of acid phosphatase activity in the digestive caeca of the desert locust.

J. Roy. Micr. Soc., 88: 279

27. BOWEN, I. D. (1968b)

Electron-cytochemical studies on autophagy in the gut epithelial cells of the locust, *Schistocerca gregaria*.

Histochem. J., 1: 141

28. BOWEN, I. D. (1970a)

The fine structural localization of acid phosphatase in the gut epithelial cells of the slug, *Arion ater* (L.).

Protoplasma, 70: 247

29. BOWEN, I. D. (1970b)

Golgi associated acid phosphatase in muscle and nerve cells from *Arion ater* (L.).

Protoplasma, 71: 409

30. BOWEN, I. D. y DAVIES, P. (1971)

The fine structural distribution of acid phosphatase in the digestive gland of *Arion hortensis* (Fr.).

Protoplasma, 73: 73

31. BOWERS, W. E. (1973)  
Lysosomes in rat thoracic duct lymphocytes fractionated by zonal centrifugation.  
J. Cell Biol., 59: 177
32. BRANDES, D. (1965)  
Observation of the apparent mode of formation of "pure" lysosomes.  
J. Ultrastruct. Res., 12: 63
33. BRANDES, D., BERTINI, F. y SMITH, E. W. (1965)  
Role of lysosomes in cellular lytic processes. II. Cell death during holocrine secretion in sebaceous glands.  
Exp. Mol. Pathol., 4: 245
34. BROWN, A. I. (1962)  
Microvilli of the human jejunal epithelial cells.  
J. Cell Biol., 12: 623
35. BURTON, R. F. (1972)  
The storage of calcium and magnesium phosphates and of calcite in the digestive glands of the Pulmonata (Gastropoda).  
Comp. Biochem. Physiol., 43A: 655

36. BYGRAVE, F. L. (1978)  
Mitochondria and the control of intracellular calcium.  
Biol. Rev., 53: 43
37. CAMPION, M. (1961)  
The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*.  
Quart. J. Micr. Sci., 102: 195
38. CARAFOLI, E. (1967)  
In vivo effect of uncoupling agents on the incorporation of calcium and strontium into mitochondria and other subcellular fractions of rat liver.  
J. Gen. Physiol., 50: 1849
39. CARRIKER, M. R. y BILSTAD, N. M. (1946)  
Histology of the alimentary system of the snail *Limnaea stagnalis appressa* Say.  
Trans. Amer. Micr. Soc., 65: 250
40. COHN, Z. A. y HIRSCH, J. G. (1960)  
The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes.  
J. Exp. Med., 112: 983

41. COSMOS, E. (1964)  
Intracellular distribution of calcium in developing breast-muscle of normal and dystrophic chickens.  
J. Cell Biol., 23: 241
42. CUÉNOT, L. (1899)  
La fonction excrétrice du foie des gastropodes pulmonés.  
Arch. Zool. Exp. Gen., 7: 25
43. CHEN, C.-H., GREENAWALT, J. W. y LEHNINGER, A. L. (1974)  
Biochemical and ultrastructural aspects of  $Ca^{++}$  transport by mitochondria of the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*.  
J. Cell Biol., 61: 301
44. DAUWALDER, M., WHALEY, W. G. y KEPHART, J. E. (1972)  
Functional aspects of the Golgi apparatus.  
Subcell. Biochem., 1: 225
45. DAVID, A., BERNARD, J., THIERNESSE, N., NICOLAS, G.; CEROTTINI, J.-C. y ZAGURY, D. (1979)  
Is the process of localized lysosomal exocytosis responsible for the cytolytic action of killer lymphocytes?  
C. R. Acad. Sci. Ser. D, 288: 441

46. DAVID, H. y GOTZE, J. (1963)  
Elektronenmikroskopische Befunde an der Mitteldarmdrüse von Schnecken.  
Z. mikr.-anat. Forsch., 70: 252
47. DAVIS, W. L., JONES, R. G. y HAGLER, H. K. (1979)  
Calcium containing lysosomes in the normal chick duodenum: a histochemical and analytical electron microscopic study.  
Tiss. Cell, 11: 127
48. DECKER, R. S. y WILDENTHAL, K. (1978)  
Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes.  
Lab. Invest., 38: 662
49. DE DUVE, C., PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. y APPELMANS, F. (1955)  
Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.  
Biochem. J., 60: 604
50. DE DUVE, C. y WATTIAUX, R. (1966)  
Functions of lysosomes.  
Ann. Rev. Physiol., 28: 435

51. DE ROBERTIS, E. D. P., SAEZ, F. A. y DE ROBERTIS, E. M. F. (1977)  
Biología celular.  
Ed. El Ateneo, Buenos Aires.
52. DEXHEIMER, L. (1951)  
Beiträge zum Kalkstoffwechsel der Weinbergschnecke (Helix pomatia).  
Zool. Jahrb., 63: 129
53. DINGLE, J. T. (1962)  
Lysosomal enzymes and the degradation of cartilage matrix.  
Proc. Roy. Soc. Med., 55: 109
54. DINGLE, J. T., BARRETT, A. J. y WESTON, P. D. (1971)  
Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown.  
Biochem. J., 123: 1
55. DOGSON, K. S. y POWELL, G. M. (1959)  
Studies on sulphatases. 26. Arylsulphatase activity in the digestive juice and digestive gland of Helix pomatia.  
Biochem. J., 73: 666

56. DUNCAN, D., NALL, D. y MORALES, R. (1960)  
Observations of the fine structure of old age pigment.  
J. Gerontol., 15: 366
57. DU PRAW, E. J. (1971)  
Biología celular y molecular.  
Ed. Omega. Barcelona.
58. ERICSSON, J. L. E. (1969a)  
Mechanism of cellular autophagy.  
En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por J. T. Dingle y H. B. Fell, vol. 2, pg. 346, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
59. ERICSSON, J. L. E. (1969b)  
Studies on induced cellular autophagy. J. Electron-microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes.  
Exp. Cell Res., 55: 95
60. ESSNER, E. y NOVIKOFF, A. B. (1960)  
Human hepatocellular pigments and lysosomes.  
J. Ultrastruct. Res., 3: 374

61. ESSNER, E. y NOVIKOFF, A. B. (1961)  
Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means electron microscopy.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 773
62. FARQUAR, M. G., BAITON, D. F., BAGGIOLINI, M. y DE DUVE, D. (1972)  
Cytochemical localization of acid phosphatase activity in granule fractions from rabbit polymorphonuclear leukocytes.  
J. Cell Biol., 54: 141
63. FAWCETT, D. W. (1966)  
An atlas of fine structure. The cell: its organelles and inclusions.  
W. B. Saunders Co. Philadelphia.
64. FILHOL, J. (1937)  
La cellule hépatique d'absorption chez quelques gastéropodes pulmonés.  
Arch. Anat. Micr., 33: 95
65. FRENZEL, J. (1885)  
Über die Mitteldarmdrüse der Mollusken.  
Arch. Mikr. Anat., 25: 48

66. FRETTER, V. (1952)

Experiments with  $P^{32}$  and  $I^{131}$  on species of *Helix*,  
*Arion* and *Agriolimax*.

Quart. J. Micr. Sci., 93: 135

67. GALLE, P. (1974)

Rôle des lysosomes et des mitochondries dans les phénomènes de concentration et d'élimination d'éléments minéraux (uranium et or) par le rein.

J. de Microsc., 19: 17

68. GARDINER, M. S. (1978)

Biología de los Invertebrados.

Ed. Omega. Barcelona.

69. GAUTHIER, G. F. (1963)

Cytological studies on the gastroderm of *Hydra*.

J. Exp. Zool., 152: 13

70. GOLDFISCHER, S. y BERNSTEIN, J. (1969)

Lipofuscin (ageing) pigment granules in the newborn human liver.

J. Cell Biol., 42: 253

71. GOLDFISCHER, S., NOVIKOFF, A. B., ALBALA, A. y  
BIEMPICA, L. (1970)  
Hemoglobin uptake by rat hepatocytes and its break-  
down within lysosomes.  
J. Cell Biol., 44: 513
72. GORDON, G. B., MILLER, L. R. y BENSCH, K. G. (1965)  
Studies on the intracellular digestive process in  
mammalian tissue culture cells.  
J. Cell Biol., 25: 41
73. GRAHAM, A. (1931)  
On the morphology, feeding mechanisms, and digestion  
of *Ensis siliqua* (Schumacher).  
Trans. Roy. Soc. Edin., 56: 725
74. GRAHAM, R. C. y KARNOVSKY, M. J. (1966)  
The early stages of absorption of injected horsera-  
dish peroxidase in the proximal tubules of mouse kid-  
ney: ultrastructural cytochemistry by a new technique.  
J. Histochem. Cytochem., 14: 291
75. GRÜNBAUM, S. (1913)  
Sur la cellule calcigere et ses corpuscles dans le  
foie d'*Helix*.  
C. R. Soc. Biol., 75: 208

76. GRUNDMANN, E. (1967)  
Citología general. Introducción a la morfología funcional de la célula.  
Ed. Labor. Barcelona.
77. HALL, J. L., FLOWERS, T. J. y ROBERTS, R. M. (1973)  
Cell structure and metabolism.  
Longman. London.
78. HELMINEN, H. J. y ERICSSON, J. L. E. (1970)  
On the mechanism of lysosomal enzyme secretion. Electron microscopic and histochemical studies on the epithelial cells of the rat's ventral prostate lobe.  
J. Ultrastruct. Res., 33: 528
79. HIRSCH, G. C. (1917)  
Die Ernährungsbiologie fleischfressender Gastropoden.  
I. Makroskopischer Bau, Nahrung, Nahrungsaufnahme, Verdauung, Sekretion.  
Zool. Jahrb., 35: 357
80. HIRSCH, J. G. (1962)  
Cinemicrophotographic observations on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.  
J. Exp. Med., 116: 827

81. HOLT, S. R. y HICKS, R. M. (1961)

The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 11: 47

82. HOPKINS, C. R. (1969)

The fine structural localization of acid phosphatase in the prolactin cell of the teleost pituitary following the stimulation and inhibition of secretory activity.

Tiss. Cell, 1: 653

83. HOPKINS, C. R. y BAKER, B. I. (1968)

The fine structural localization of acid phosphatase in the prolactin cell of the eel pituitary.

J. Cell Sci., 3: 357

84. HSU, L. y TAPPEL, A. L. (1964)

Lysosomal enzymes of rat intestinal mucosa.

J. Cell Biol., 23: 233

85. JARRIGE, P. y HENRY, R. (1952)

Étude de l'activité glucuronidasique du suc digestif d'*Helix pomatia* (L.) et de sa phénolsulfatase.

Bull. Soc. Chim. Biol., 34: 872

86. JORDON, H. J. (1918)  
Phagocytosis und Resorption bei *Helix pomatia*.  
Arch. neerl. Physiol., 2: 471
87. KAPUR, S. P. y GIBSON, M. A. (1968)  
A histochemical study of calcium storage in the  
foot of the freshwater gastropod *Helisoma duryi*  
*eudiscus* (Pilsbry).  
Can. J. Zool., 46: 987
88. KERR, J.F.R. (1973)  
Some lysosome functions in liver cells reacting  
to sublethal injury.  
En "Lysosomes in Biology and Pathology", vol. 3,  
pag. 365, ed. por J. T. Dingle, North-Holland  
Publishing Co., Amsterdam.
89. KJAERHEIM, A. (1963).  
The fine structure of the microvilli on principal  
epithelial cells of mouse jejunum after freeze  
substitution.  
J. Ultrastruct. Res., 9: 393
90. KOENIG, H. (1969)  
Lysosomes in the nervous system.  
En "Lysosomes in Biology and Pathology", vol. 2,  
pag. 109 (ed. por J. T. Dingle y H. B. Fell) ,  
North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

91. KRIJGSMAN, B. J. (1925)  
Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen bei *Helix pomatia*. 1. Die Natürlichen Bedingungen.  
Zeit. Vergl. Physiol., 2: 264
92. KRIJGSMAN, B. J. (1928)  
Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen bei *Helix pomatia*. 2. Sekretion, resorption und Phagocytose.  
Zeit. Vergl. Physiol., 8: 187
93. LEE, D., HOLLAND, R. K. y GROUFSKY, A. K. (1979)  
Integrity of lysosomes in the isolated perfused rat liver before and after exposure to dimethylsulphoxide.  
Cryobiol., 16: 18
94. LEHNINGER, A. L. (1964)  
The mitochondrion: molecular basis of structure and function.  
W. A. Benjamin Inc., New York.
95. LEHNINGER, A. L. (1970)  
Mitochondria and calcium ion transport.  
Biochem. J., 119: 129

96. LEHNINGER, A. L. (1971)  
Mitochondria and the physiology of  $Ca^{++}$ .  
Trans. Amer. Clin. Climat. Assn., 83: 83
97. LEHNINGER, A. L. (1977)  
Bioquímica.  
Ed. Omega, Barcelona.
98. LEON, Y. A., BULBROOK, R. D. y CORNER, E. D. S.  
(1960)  
Steroid sulphatase, arylsulphatase and  $\beta$ -glucuronidase in the Mollusca.  
Biochem. J., 75: 612
99. LEVY, M. R. y ELLIOTT, A. M. (1968)  
Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation.  
J. Protozool., 15: 208
100. LEWIS, W. H. y LEWIS, M. R. (1915)  
Mitochondria and other cytoplasmic structures in tissue cultures.  
Am. J. Anat., 17: 339

101. LOCKE, M. (1965)  
The structure of septate desmosomes.  
J. Cell Biol., 25: 166
102. LOCKSHIN, R. A. (1969)  
Lysosomes in insects.  
En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por J.T. Dingle y H. B. Fell, pg. 364, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
103. LUFT, J. H. (1961)  
Improvements in epoxy resin embedding methods.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 409
104. MA, M. H. y BIEMPICA, L. (1971)  
The normal human liver cell (emphasis on lysosomes).  
Am. J. Path., 62: 353
105. MALKOFF, D. B. y STREHLER, B. L. (1963)  
The ultrastructure of isolated and in situ human cardiac age pigment.  
J. Cell Biol., 16: 611

106. MAUNSBACH, A. B. (1966a)

Absorption of  $^{125}\text{I}$ -labelled homologous albumin by rat kidney proximal tubules cells: a study of microperfused single proximal tubules by electron microscopic autoradiography and histochemistry.

J. Ultrastruct. Res., 15: 197

107. MAUNSBACH, A. B. (1966b)

Observations on the ultrastructure and acid phosphatase activity of the cytoplasmic bodies in rat kidney proximal tubule cells.

J. Ultrastruct. Res., 16: 197

108. MCGEE-RUSSELL, S. M. (1955)

A cytological study of tissues concerned in the secretion of shell in the snail, *Helix pomatia*.

Tesis doctoral, Oxford.

109. McMUNN, C. A. (1900)

On the gastric gland of mollusca and decapod crustacea: its structure and functions.

Phil. Trans. Roy. Soc. B, 193: 1

110. McNABB, J. D. y SANDBORN, E. (1964)

Filaments in the microvillous border of intestinal cells.

J. Cell Biol., 22: 701

111. MILLER, F. y PALADE, G. E. (1964)

Lytic activities in renal protein absorption droplets.

J. Cell Biol., 23: 519

112. MILLINGTON, P. F. y FINEAN, J. B. (1962)

Electron microscope studies of the structure of the microvilli on principal epithelial cells of rat jejunum after treatment in hypo- and hypertonic saline.

J. Cell Biol., 14: 125

113. MILLOTT, N. (1937)

On the morphology of the alimentary canal, process of feeding, and physiology of digestion of the nudibranch mollusc *Jorunna tomentosa* (Cuvier).

Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 228: 173

114. MOE, H., ROSTGAARD, J. y BEHNKE, O. (1965)

On the morphology and origin of virgin lysosomes in the intestinal epithelium of the rat.

J. Ultrastruct. Res., 12: 396

115. MURRAY, C. M. (1975)

The distribution and function of lysosomes in condylar cartilage.

J. Anat., 119: 85

116. NAKAZIMA, M. (1956)  
On the structure and function of the midgut gland.  
Jap. J. Zool., 2: 469
117. NAVASCUÉS, J., ALMENDROS, A. y ABADIA-FENOLL, F. (1978)  
Estudio sobre la ultraestructura de los gránulos cálcicos en el hepatopáncreas del caracol.  
Morfol. Norm. Patol., Sec. A, 2: 233
118. NAVASCUÉS, J., ALMENDROS, A., AIJON, J. y ABADIA-FENOLL, F. (1978)  
Estudio a microscopía electrónica de las formaciones granulares del hepatopáncreas de *Helix hortensis*.  
Morfol. Norm. Patol., Sec. A, 2: 401
119. NEELY, A. N., COX, J. R., FORTNEY, J. A., SCHWORER, C. M. y MORTIMORE, G. E. (1977)  
Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion.  
J. Biol. Chem., 252: 6948
120. NIELAND, M. L. y VON BRAND, T. (1969)  
Electron microscopy of cestode calcareous corpuscle formation.  
Exp. Parasitol., 24: 279

121. NOVIKOFF, A. B. (1957)  
Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles of rat liver.  
Symp. Soc. Exp. Biol., 10: 92
122. NOVIKOFF, A. B. (1963)  
Lysosomes and possible roles in the reticulo-endothelial system.  
En "Role du Système Réticulo-endothélial dans l'Immunité Antibactérienne et Antitumorale", ed. por B. N. Halpern, pg. 67, Centre National de la Recherche Scientifique, Francia.
123. NOVIKOFF, A. B. (1964)  
GERL, its form and function in neurons of rat spinal ganglia.  
Biol. Bull., 127: 358
124. NOVIKOFF, A. B. (1967)  
Lysosomes in nerve cells.  
En "The neuron" (ed. por H. Hydén), pg. 319, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
125. NOVIKOFF, A. B. y ESSNER, E. (1962)  
Pathological changes in cytoplasmic organelles.  
Fed. Proc., 21: 1130

126. NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E. y QUINTANA, N. (1963)  
Relations of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus  
and lysosomes.  
J. de Microsc., 2: 3
127. NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E. y QUINTANA, N. (1964a)  
Golgi apparatus and lysosomes.  
Fed. Proc., 23: 1010
128. NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E. y QUINTANA, N. (1964b)  
A suggested role for the small vesicles of the Gol-  
gi apparatus.  
Exc. Med., Int. Cong. Ser., 77: 33
129. NOVIKOFF, A. B., IACIOFANO, P. y VILLAVERDE, H.  
(1965)  
Observations on the staining reactions of hepatic  
lysosomes.  
J. Histochem. Cytochem., 13: 23
130. NOVIKOFF, A. B. y SHIN, W.-Y. (1964)  
The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its  
relations to microbodies, Golgi apparatus and auto-  
phagic vacuoles in rat liver cells.  
J. de Microsc., 3: 187

131. NOVIKOFF, P. M., NOVIKOFF, A. B., QUINTANA, N. y HAUN, J.-J. (1971)  
Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia studied by thick and thin section cytochemistry.  
J. Cell Biol., 50: 859
132. NUNEZ, E. A. y BECKER, D. V. (1970)  
Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. I. Ultrastructural changes during the pre-, early and mid-hibernation periods with some comments on the origin of autophagic vacuoles.  
Am. J. Anat., 129: 369
133. ORZEL, R. (1967)  
Arylsulfatase and  $\beta$ -glucuronidase activity in various species of tropical molluscs.  
Can. J. Zool., 45: 134
134. OWEN, G. (1955)  
Observations of the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia.  
Quart. J. Microsc. Sci., 96: 517
135. OWEN, G. (1970)  
The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve, *Cardium edule*.  
Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 258: 245

136. PALADE, G. (1953)

An electron microscope study of the mitochondrial structure.

J. Histochem. Cytochem., 1: 188

137. PALAY, S. L. y KARLIN, L. J. (1959)

An electron microscopic study of the intestinal villus. I. The fasting animal.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 5: 383

138. PEACHEY, L. D. (1964)

Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules.

J. Cell Biol., 20: 93

139. PEASE, D. C. (1964)

Histological techniques for electron microscopy.

Academic Press, New York.

140. PITT, D. (1975)

Lysosomes and cell function.

Longman, London.

141. PITT, D. y GALPIN, M. (1973)

Isolation and properties of lysosomes from dark-grown potato shoots.

Planta, 109: 233

142. REID, R. G. B. (1966)

Digestive tract enzymes in the bivalves *Lima hians* Gmelin and *Mya arenaria* L.

Comp. Biochem, Physiol., 17: 417

143. REID, R. G. B. (1968)

The distribution of digestive tract enzymes in lamel-libranchiate bivalves.

Comp. Biochem. Physiol., 24: 727

144. REYNOLDS, E. S. (1963)

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.

J. Cell Biol., 17: 208

145. RIGBY, J. E. (1963)

Alimentary and reproductive systems of *Oxychillus cellarius* (Müller) (Stylommatophora).

Proc. Zool. Soc. Lond., 141: 311

146. ROBERTSON, J. D. (1941)  
The function and metabolism of calcium in the Invertebrata.  
Biol. Rev., 16: 106
147. ROGERS, D. C. (1968)  
Fine structure of smooth muscle and neuromuscular junctions in the optic tentacles of *Helix aspersa* and *Limax flavus*.  
Z. Zellforsch., 89: 80
148. ROSEN, B. (1930)  
Die Proteolyse bei *Helix pomatia* und *Vivipara vivipara*.  
Z. Vergl. Physiol., 12: 774
149. ROSEN, B. (1941)  
Intrazelluläre Verdauung bei *Helix pomatia* L.  
Zool. Jahrb., 60: 241
150. ROSEN, B. (1950)  
Proteases in the digestive gland of lamellibranchs.  
Ark. Kemi, 1: 205

151. ROSEN, B. (1952)

The problem of phagocytosis in *Helix pomatia*.

Ark. Zool., 3: 33

152. ROSEN, B. (1965)

Zur Verbreitung der Nahrungs-phagocytose unter den Invertebraten.

Ark. Zool., 16: 331

153. ROSENBAUM, R. M. y DITZION, B. (1963)

Enzymatic histochemistry of granular components in digestive gland cells of the Roman snail *Helix pomatia*.

Biol. Bull., 124: 211

154. RUSSELL-HUNTER, W. D. (1968)

A biology of lower Invertebrates.

McMillan Co., New York.

155. SABATINI, D. D., BENSCH, K. y BARNETT, R. J. (1963)

Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymatic activity by aldehyde fixation.

J. Cell Biol., 17: 19

156. SAMORAJSKI, T., KEEFE, J. y ORDY, J. M. (1964)  
Intracellular localization of lipofuscin age pigments in the nervous system.  
J. Gerontol., 19: 262
157. SAMORAJSKI, T., ORDY, J. M. y RADY-REIMER, P. (1968)  
Lipofuscin pigment accumulation in the nervous system of aging mice.  
Anat. Rec., 160: 555
158. SCHIAFFINO, S. y HAMZLINKOVA, V. (1972)  
Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system.  
J. Ultrastruct. Res., 39: 1
159. SCHIN, K. S. y CLEVER, U. (1965)  
Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of *Chironomus tetans*.  
Science, 150: 1053
160. SCHRAER, R., ELDER, J. A. y SCHRAER, H. (1973)  
Aspects of mitochondrial function in calcium movement and calcification.  
Fed. Proc., 32: 1938



161. SELLINGER, O. Z., RUCKER, D. L. y DE BALBIAN VERSTER, F. (1964)

Cerebral lysosomes. I. A comparative study of lysosomal N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and mitochondrial aspartatic transaminase of rat cerebral cortex.

J. Neurochem., 11: 271

162. SIOLI, H. (1935)

Über den Chemismus der Reparatur von Schalendefekten bei *Helix pomatia*.

Zool. Jahrb., 54: 507

163. SJÖSTRAND, F. G. (1953)

Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes.

Nature, 171: 30

164. SMITH, A. L. y BIRD, J. W. C. (1976)

Distribution of lysosome populations in rat cardiac tissue.

En "Recent Advances in Studies of Cardiac Structure and Metabolism", ed. por P. Harris, R. J. Bing y A. Fleckenstein, vol. 7, pg. 41, University Park Press, Baltimore.

165. SMITH, R. E. y FARQUHAR, M. (1966)

Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland.

J. Cell Biol., 31: 319

166. STANIER, J. E., WOODHOUSE, M. A. y GRIFFIN, R. L.  
(1968)

The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (L.) (Decapoda, Bronchyura).

Crustaceana, 14: 56

167. STRAUS, W. (1964)

Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase.

J. Cell Biol., 20: 497

168. STRAUS, W. (1967)

Lysosomes, phagosomes and related particles.

En "Enzyme Cytology", ed. por D. B. Rodyn, pg. 239, Academic Press, London.

169. STREHLER, B. L., MARK, D. D., MILDVAN, A. S. y GEE, M. V. (1959)

Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium.

J. Gerontol., 14: 430

170. SUMNER, A. (1965a)

The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*.

Quart. J. Micr. Sci., 106: 173

171. SUMNER, A. T. (1965b)

Experiments on phagocytosis and lipid absorption  
in the alimentary system of *Helix*.

J. Roy. Microsc. Soc., 84: 415

172. SUMNER, A. (1966a)

The fine structure of digestive gland cells of *Helix*, *Succinea*, and *Testacella*.

J. Roy. Micr. Soc., 85: 181

173. SUMNER, A. (1966b)

The cytology and histochemistry of the digestive  
gland cells of some fresh water lamellibranchs.

J. Roy. Micr. Soc., 85: 201

174. SUMNER, A. (1966c)

The fine structure of the digestive gland cells  
of Anodonta.

J. Roy. Micr. Soc., 85: 417

175. SUMNER, A. T. (1969)

The distribution of some hydrolytic enzymes in the  
cells of the digestive gland of certain lamelli-  
branchs and gastropods.

J. Zool., 158: 277

176. TAPPEL, A. L. (1969)

Lysosomal enzymes and other components.

En "Lysosomes in Biology and Pathology", vol. 2, ed. por J. T. Dingle y H. B. Fell, pg. 207, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

177. THIELE, G. (1953)

Vergleichende Untersuchungen über den Feinbau und die Funktion der Mitteldarmdrüse einheimischer Gastropoden.

Z. Zellforsch., 38: 87

178. TOPPING, T. M. y TRAVIS, D. F. (1974)

An electron cytochemical study of mechanisms of lysosomal activity in the rat left ventricular mural myocardium.

J. Ultrastruct. Res., 46: 1

179. TREADWELL, P. E. (1965)

Association of the lysosomes of the reticuloendothelial system with mouse anaphylaxis.

J. Immunol., 94: 692

180. TSUBO, I. y BRANDT, P. W. (1962)

An electron microscopic study of the Malpighian tubules of the grasshoper, *Dissosteira carolina*.

J. Ultrastruct. Res., 6: 28

181. VAES, G. (1969)

Lysosomes and cellular physiology of bone resorption.

En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por J. T. Dingle y H. B. Fell, vol. 1, pg. 217, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

182. VAN WEEL, P. B. (1950)

Contribution to the physiology of the glandular media intestine of the African Giant Snail, *Achatina fulica* Fer., during the first hours of digestion.

Physiol. Comp. Oecol., 2: 1

183. VON BRAND, T. y NYLEN, M. U. (1970)

Organic matrix of cestode calcareous corpuscles.

Exp. Parasitol., 28: 566

184. WAGGE, L. E. (1951)

The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatases during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*.

Quart. J. Microsc. Sci., 92: 307

185. WALKER, G. (1970)

The citology, histochemistry, and ultrastructure of the cell types found in the digestive gland of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller).

Protoplasma, 71: 91

186. WATTIAUX, R., WIBO, M. y BAUDHUIN, P. (1963)

Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat liver lysosomes.

En "Ciba Foundation Symposium on Lysosomes", ed. por A.V.S. de Reuck y M.P. Cameron, pg. 176, Little, Brown and Co., Boston.

187. WEBER, R. (1964)

Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis.

J. Cell Biol., 22: 481

188. WEBER, R. (1969)

Tissue involution and lysosomal enzymes during anuran metamorphosis.

En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por J. T. Dingle y H. B. Fell, vol. 2, pg. 437, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

189. WIENER, J., SPIRO, D. y LOEWENSTEIN, W. R. (1964)

Studies on an epithelial (Gland) cell junction. II. Surface structure.

J. Cell Biol., 22: 587

190. WILDENTHAL, K. (1975)

Lysosomes and lysosomal enzymes in the heart.

En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por J. T. Dingle y R. T. Dean, vol. 4, pg. 167, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

191. WOLFE, S. L. (1977)  
Biología de la célula.  
Ed. Omega. Barcelona.
192. WOLLMAN, S. H. (1969)  
Secretion of thyroid hormones.  
En "Lysosomes in Biology and Pathology", ed. por  
J. T. Dingle y H. B. Fell, vol. 2, pg. 483, North-  
Holland Publishing Co., Amsterdam.
193. WOLLMAN, S. H., SPICER, S. S. y BURSTONE, M. S.  
(1964)  
Localization of esterase and acid phosphatase in gra-  
nules and colloid droplets in rat thyroid epithelium.  
J. Cell. Biol., 21: 191
194. WOOD, R. L. (1959)  
Intercellular attachment in the epithelium of Hydra  
as revealed by electron microscopy.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 6: 343
195. YONGE, C. M. (1926)  
Structure and physiology of the organs of feeding  
and digestion in *Ostrea edulis*.  
J. Mar. Biol. Ass. U. K., 14: 295