

Pro. T. 13/68

ESTUDIO CITOQUIMICO  
Y ANALITICO  
EN EL HEPATOPANCREAS DE HELIX ASPERSA  
EN SITUACION NORMAL Y  
DE AYUNO

TRABAJO PRESENTADO POR DAVID PORCEL MUÑOZ  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

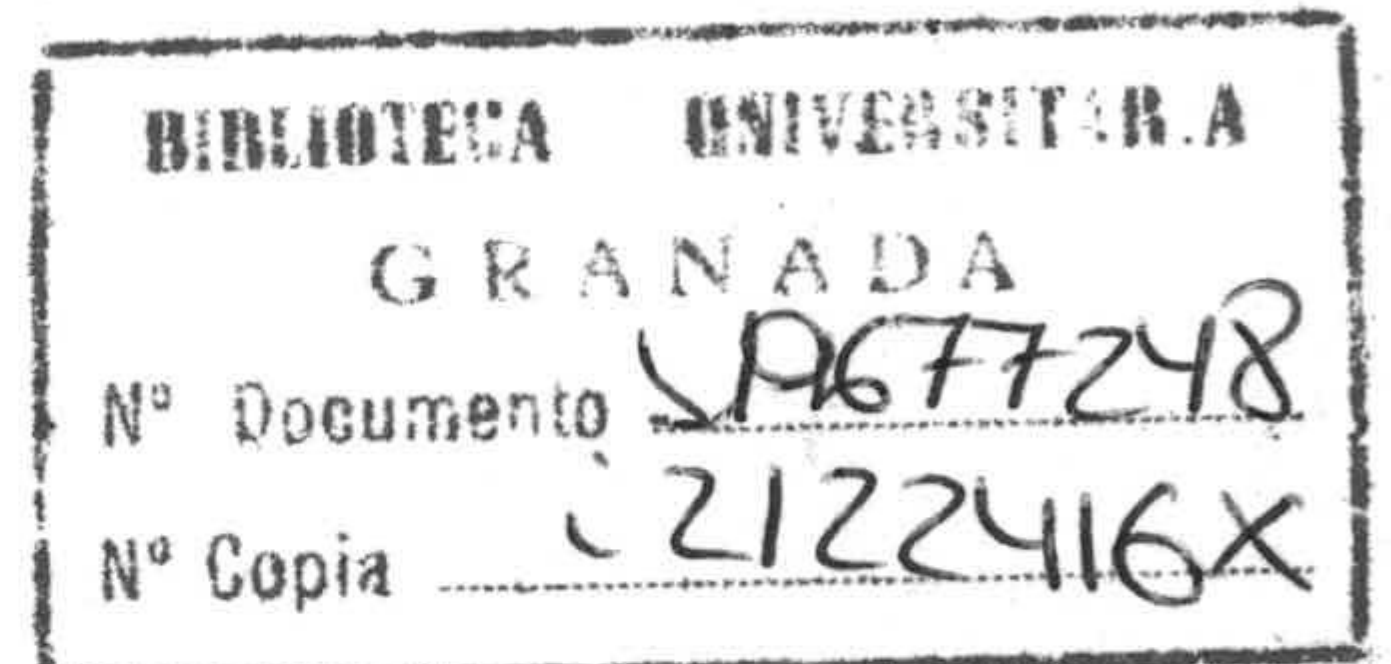
DIRECTOR: PROF. D R. ANTONIO M. ALMENDROS GALLEGO  
PROFESOR TITULAR DE BIOLOGIA CELULAR  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROV. + 13/68

T  
15  
77

ESTUDIO CITOQUIMICO  
Y ANALITICO  
EN EL HEPATOPANCREAS DE HELIX ASPERSA  
EN SITUACION NORMAL Y  
DE AYUNO

TRABAJO PRESENTADO POR DAVID PORCEL MUÑOZ  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR



DIRECTOR: PROF. D.R. ANTONIO M. ALMENDROS GALLEGO  
PROFESOR TITULAR DE BIOLOGIA CELULAR  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

David  
Porcel  
Muñoz

ANTONIO MANUEL ALMENDROS GALLEGO, PROFESOR TITULAR DE BIOLOGIA CELULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA: Que el presente trabajo "ESTUDIO CITOQUIMICO Y ANALITICO EN EL HEPATOPANCREAS DE HELIX ASPERSA EN SITUACIÓN NORMAL Y DE AYUNO", presentado por David Porcel Muñoz para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada bajo mi dirección. Una vez revisado, estimo que puede ser presentado para su defensa ante el tribunal nombrado al efecto.

Lo que firmo a petición del interesado para que conste y surta los efectos oportunos en Granada a 8 de Octubre de 1992.

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Antonio Manuel Almendros Gallego, is written above a horizontal line.

**AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

Cuando comencé este trabajo, jamás pensé que tendría que llevarse a cabo con la colaboración de tanta gente, pero a todos ellos por anticipado mi más profundo agradecimiento.

De un modo indudable, debo comenzar por mi agradecimiento al Director de Tesis Dr. Antonio Almendros, que ha sido muy paciente, soportando mi impaciencia e insistencia.

A todos mis compañeros de los Servicios Técnicos, con una mención muy especial a Concepción Hernández, Alfredo López y Ambrosio Molina, que de una manera u otra hicieron que este trabajo viera la luz.

La colaboración prestada por el Director de los Servicios Técnicos Dr. Salas Peregrín, ha sido muy apreciada por mí.

A los Drs. Arcadio Roda y Luis Megías del Departamento de Ciencias Morfológicas por sus valiosas enseñanzas e inestimable ayuda en la realización de las fotografías con microscopía óptica. La insistencia con la que el Dr Megías me ha instado a la conclusión de este trabajo la agradezco muy considerablemente.

A Amparo Martín, mi esposa, (a ésta si que le ha tocado un papel duro), que ha soportado mi mal humor y ansiedad.

La verdad es que debo mucho a mucha gente, así que, a todos les agradezco su interés.

M. Vázquez Montalbán en el año 1987 publicaba una columna en el diario El País, la cual transcribo de forma directa: " El hombre es el animal más falso de la Creación, y por si alguien lo pusiera en duda, le invito a que haga una reflexión sobre el comportamiento humano en relación con los caracoles. Cualquier posible y necesaria aportación científica a una cocina de la crueldad tendría en el trato que se le da al caracol pruebas suficientes para montar 100 tribunales de Nuremberg. Al caracol no sólo se le cuece vivo, sino que se le purga durante días en jaulas de concentración donde agoniza hacinado para pasar al prelavado, una salvaje manipulación donde interviene el vinagre o cualquier otro ácido eliminador de la tierna viscosidad del animalito.

Por contraste, el caracol excita ternuras en sus asesinos y hay canciones infantiles en las que los caracoles son objeto de buenos tratos y son muchos los niños que dan un trocito de lechuga a los caracoles perdidos sin collar. Resignado estaba yo a estas formas tradicionales de crueldad y piedad, cuando me entero de nuevas manipulaciones a costa del caracol que pongo a disposición del Defensor de Pueblo, por si defender al hombre de sus instintos tontos y crueles formara parte de sus atribuciones. Resulta que alguien le está tocando los huevos al caracol y se ha inventado un caviar a su costa, una huevada blancuzca con sabor a purgante, muy pregonada últimamente por gourmets cargados de resentimiento contra los paladares sensatos.

Y por si purgarlo, echarle vitriolo, cocerle vivo y tocarle los huevos no fuera suficiente, ahora resulta que se ha conseguido reproducir el cerebro del caracol en un microchip, sin que se sepa, aunque se tema, qué parte corresponde a Luis Solana en este invento, pero presumiendo la cantidad de caracoles descerebrados para este adelanto científico. Animal sufrido, un día de éstos va a perder la paciencia y se va a negar a salir de la cáscara, resistencia inútil porque, cociéndolo vivo, está comprobado, sale, ivaya si sale! Concedamos un descanso histórico al caracol y estudiemos muy seriamente las canalladas que les podemos hacer a las tarántulas."

INDICE

**INDICE**

## AGRADECIMIENTOS

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCION</b> .....   | 3  |
| <b>II. SITUACION BIBLIOGRAFICA</b> .....   | 8  |
| <b>1. Situación General de la Glándula Digestiva del Caracol <u>Helix aspersa</u></b> .....                                    | 8  |
| <b>2. Tipos Celulares que Constituyen los Adenómeros de la Glándula</b> .....  | 10 |
| 2.1. Células Digestivas .....  | 11 |
| 2.2. Células Excretoras .....  | 14 |
| 2.3. Células Cálcidas .....  | 15 |
| <b>3. Sobre los Lisosomas</b> .....  | 17 |
| 3.1. Los Cuerpos Líticos en General .....  | 17 |
| 3.2. Los Lisosomas en el Hepatopáncreas del Caracol .....  | 19 |
| <b>4. Gránulos Cálcidos</b> .....  | 21 |
| <b>5. Sobre las Modificaciones Ocurridas durante el Ayuno</b> .....  | 24 |
| 5.1. Generalidades .....   | 24 |
| 5.2. El Estado de Dormancia en el Caracol .....  | 25 |
| 5.3. Modificaciones en el Peso y Contenido de Materiales de la Glándula Digestiva .....  | 27 |
| <b>6. Histoquímica y Citoquímica de las Hidrolasas: Fosfatasa Acida, Fosfatasa Alcalina y Esterasas no Específicas</b> .....   | 30 |
| 6.1. Generalidades .....   | 30 |
| 6.2. Revelado de las Fosfatasa .....   | 32 |
| 6.3. Revelado de las Esterasas no Específicas .....  | 34 |
| 6.4. Las Hidrolasas: Fosfatasa Acida, Fosfatasa Alcalina y Esterasas no Específicas en la Glándula Digestiva de Moluscos ..... | 35 |
| <b>7. Muerte Celular</b> .....   | 39 |



|   |           |
|---|-----------|
| 7.1. Muerte Celular Generalidades .....   | 39        |
| 7.2. Muerte Celular en Gasteropodos .....   | 39        |
| <b>III. MATERIAL Y METODOS .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>1. Fuente de Experimentación. Animales .....</b>                                     | <b>41</b> |
| 1.1 Clasificación del Material Biológico .....  | 41        |
| 1.2 Acondicionamiento de los Animales .....   | 42        |
| 1.3 Dieta a la que fueron sometidos los<br>caracoles .....                              | 42        |
| <b>2. Preparación de las Muestras .....</b>   | <b>44</b> |
| 2.1. Obtención del Tejido .....   | 44        |
| 2.2. Fijación y Lavado .....  | 44        |
| 2.3. Procesado para Histoquímica .....  | 45        |
| 2.3.1. Deshidratación .....   | 45        |
| 2.3.2. Inclusión .....  | 46        |
| 2.3.3. Seccionamiento de la piezas .....  | 46        |
| 2.3.4. Incubación y Revelado<br>Histoquímico .....                                      | 46        |
| 2.4. Procesado para Citoquímica .....   | 47        |
| 2.4.1. Incubación y Revelado<br>Citoquímico .....                                       | 48        |
| 2.4.2. Postfijación .....   | 49        |
| 2.4.3. Deshidratación .....   | 49        |
| 2.4.4. Inclusión .....  | 49        |
| 2.4.5. Corte .....  | 50        |
| <b>3. Preparación de las Muestras para Microscopía<br/>Electrónica de Barrido .....</b> | <b>51</b> |
| <b>4. Preparación de las Muestras para Análisis .....</b>                               | <b>52</b> |
| <b>5. Estudios Cuantitativos .....</b>  | <b>53</b> |
| 5.1. Pérdida de Peso .....  | 53        |
| 5.2. Número de Células .....  | 53        |
| 5.3. Espesor de la Concha .....   | 54        |
| 5.4. Variaciones en Mg/Ca durante el Ayuno .....  | 54        |

|   |    |
|---|----|
| <b>IV. RESULTADOS</b> .....   | 55 |
| <b>1. Variaciones en el Peso</b> .....                                  | 55 |
| <b>2. Variaciones en el Número de Células Durante el Ayuno</b> .....    | 59 |
| 2.1. Células Digestivas .....   | 59 |
| 2.2. Células Excretoras .....   | 61 |
| 2.3. Células Cálculos .....   | 62 |
| <b>3. Variaciones en el Grosor de la Concha</b> .....                   | 64 |
| <b>4. Relación Mg/Ca en la Glándula y en la Concha</b> .....            | 66 |
| 4.1. Relación Mg/Ca en la Glándula .....                                | 66 |
| 4.2. Relación Mg/Ca en la Concha .....                                  | 66 |
| 4.3. Análisis Estadístico .....   | 67 |
| <b>5. Actividad Fosfatasa Acida en el Ayuno</b> .....                   | 68 |
| 5.1. Estudio de la Fosfatasa Acida con Microscopía Óptica .....         | 68 |
| 5.2. Estudio de la Fosfatasa Acida con Microscopía Electrónica .....    | 68 |
| <b>6. Actividad Fosfatasa Alcalina en el Ayuno</b> .....                | 72 |
| 6.1. Estudio de la Fosfatasa Alcalina con Microscopía Óptica .....      | 72 |
| 6.2. Estudio de la Fosfatasa Alcalina con Microscopía Electrónica ..... | 73 |
| <b>7. Actividad Esterasa en el Ayuno</b> .....                          | 74 |
| 7.1. Estudio de la Esterasa con Microscopía Óptica .....                | 74 |
| 7.2. Estudio de la Esterasa con Microscopía Electrónica .....           | 75 |
| <b>8. Muerte Celular</b> .....  | 76 |
| <b>V. DISCUSION</b> .....   | 78 |
| <b>1. Variaciones en el Peso</b> .....                                  | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>2. Sobre las Variaciones en el Número Relativo de las Células del Adenómero Hepatopancreático</b> ..... | 82  |
| <b>3. Sobre las Variaciones en la Composición Ionica</b> .....   | 86  |
| <b>4. Actividad Fosfatasa Acida en el Ayuno</b> .....  | 90  |
| <b>5. Actividad Fosfatasa Alcalina en el Ayuno</b> .....   | 95  |
| <b>6. Actividad Esterasa en el Aynuno</b> .....  | 99  |
| <b>7. Muerte Celular</b> .....   | 102 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....  | 104 |
| <b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 106 |
| <b>VIII. APENDICE I. TABLAS.</b>   |     |
| <b>IX. APENDICE II. GRAFICAS.</b>  |     |
| <b>X. APENDICE III. IMAGENES.</b>  |     |

## **INTRODUCCION**

Dentro del grupo de los Moluscos, los gasterópodos representan la clase más numerosa con 7342 géneros y subgéneros ( Taylor y Sohl, 1962), que se diferencian de las otras clases de Moluscos por unas particularidades anatómicas que no se encuentran en los otros grupos zoológicos y que son el resultado de una torsión de la masa visceral con respecto al cefalopodio. Esta torsión engendra una simetría muy pronunciada en su organización general confiriéndole a la clase una individualidad muy pronunciada.

Los gasterópodos terrestres representan un grupo de Moluscos en los que la cavidad respiratoria se ha soldado al cuerpo, no dejando más que un pequeño orificio abierto, el neumostoma. El techo de la cavidad paleal está ricamente irrigado por numerosos vasos que desembocan en una gran vena, denominada pulmonar, que conduce la sangre oxigenada a la aurícula derecha. El manto, cavidad paleal y vasos constituyen el órgano respiratorio o pulmón.

El tracto gastrointestinal de estos animales comprende desde la boca al ano: la cavidad bucal que se continúa por un bulbo musculoso con aspecto de buche y provisto dorsalmente de una mandíbula quitinosa denominada rádula, que se encuentra provista de varias filas de dientes puntiagudos y actúa como una lámina con movimientos longitudinales de vaivén que son producidos por fibras musculares en haces opuestos. En su base, se encuentra un odontóforo que regenera de forma continua esta estructura radular.

El bulbo se continúa por el esófago que se abre en un amplio y largo estómago fusiforme,

el cual va seguido por un intestino de gran longitud con una doble circunvolución alrededor del hepatopáncreas que termina en el ano. Dicho intestino tiene forma de "V" a causa de la torsión de 180 grados del saco visceral, característica de los gasterópodos. Adosadas a las paredes estomacales se encuentran dos glándulas salivales, blancuzcas y multilobulares de tipo alveolar compuesto, con un amplio conducto excretor que viene a desembocar a cada lado del bulbo bucal.

El hepatopáncreas es una glándula digestiva que comprende dos lóbulos que desembocan independientemente entre el estómago y el intestino. Cada lóbulo es una glándula tubular ramificada compuesta que se arrolla en espiral con el intestino, ocupando gran parte de la cavidad visceral. Los lóbulos se dividen en territorios de menor entidad anatómica, delimitados por tejido conectivo hasta las últimas unidades anatómicas y funcionales: los acini tubulosos ramificados o adenómeros.

Los adenómeros están constituidos por células altamente imbricadas entre sí y de variable altura, lo que condiciona un contorno muy irregular a la luz del acini. Las células en cuestión son de tres tipos: digestivas, de forma columnar con ribete en cepillo y numerosos lisosomas que contienen sustancias absorbidas en degradación; excretoras, más o menos globosas, con una gran vacuola supranuclear conteniendo cuerpos densos que son excretados a la luz; cálcicas, de configuración más o menos cónica, de menor altura y citoplasma con abundantes gránulos de pirofosfato cálcico y magnésico.

Prácticamente, todas las células se encuentran implicadas en procesos de carácter

digestivo, en los que intervienen de manera decisiva una gran diversidad de cuerpos líticos. Por otra parte, estas células muestran una gran variedad morfológica y estructural según el estadio de ayuno en el que se encuentre el animal. Así, a medida que aumenta el estado de inanición, se incrementan los procesos líticos y degenerativos de los componentes celulares constitutivos de los adenómeros, junto con un aumento de los fenómenos de proliferación conectiva (Almendros, 1980). El conocimiento de la estructura de los túbulos digestivos, de los acinos y la significación funcional de los elementos celulares de la glándula digestiva es de gran importancia para la comprensión de la fisiología de la digestión; el problema es saber cuál es el grado de participación que tiene la glándula digestiva en los modos de digestión intracelular y/o extracelular.

Desde un punto de vista funcional, se sabe que la digestión en Moluscos tiene lugar extra e intracelularmente. Esta segunda forma de digestión es reciente desde el punto de vista evolutivo (Carter, 1957).

Yonge (1937) suponía que la digestión era exclusivamente intracelular. Prosser (1965), en base al descubrimiento de la amilasa en la luz de los túbulos de esta glándula, en gasterópodos herbívoros y lamelibranquios, señaló la existencia de una digestión extracelular. En gasterópodos, la importancia relativa de uno u otro mecanismo de digestión está en relación con el tipo de nutrición (Wiburg y Yonge, 1966). Según se desprende de la bibliografía consultada, los autores consideran al estómago como el lugar donde se produce la digestión extracelular y el hepatopáncreas como el responsable de la digestión intracelular (Prosser, 1965), en tanto que asignan al intestino la formación y consolidación de las heces (Andrew, 1959; Carter, 1957;

Grahan, 1952; Wirburg y Yonge, 1966).

Como continuación de los estudios de naturaleza estructura llevados a cabo por Almendros (1980) en la glándula digestiva de Helix aspersa (Molusco gasterópodo pulmonado) en situación normal y tras ayuno se planteó la conveniencia de estudiar esta glándula desde un punto de vista cito-histoquímico y analítico.

La evaluación cito-histoquímica de los enzimas de las células constitutivas del hepatopáncreas del caracol, constituye un dato de gran interés para conocer los eventos que ocurren en esta glándula durante los amplios períodos de inanición a los que se encuentran sometidos los individuos de esta especie.

Por otra parte, son bien conocidos los fenómenos de acumulación de sales minerales que a nivel de distintos tejidos tienen lugar en varios grupos zoológicos, especialmente invertebrados moluscos y crustáceos, siendo especialmente interesantes las concreciones minerales que se hallan en órganos implicados en procesos digestivos, como es el hepatopáncreas del caracol terrestre. En gasterópodos pulmonados, algunas células de su hepatopáncreas se encuentran íntimamente relacionadas con el metabolismo del calcio, elemento de gran importancia en la regulación del pH del jugo digestivo, en la formación del epifragma, así como en los procesos regenerativos de la concha; por ello, el estudio estructural y analítico de estos esferocristales, a través de la diversas etapas de ayuno, también será abordado en esta tesis doctoral.

El hepatopáncreas de Helix aspersa pues, se presta como un modelo útil para el estudio



de las transformaciones y modificaciones que sufren los orgánulos celulares y las células que los contienen ante condiciones de "stress" metabólico, modificaciones principalmente referentes a la acción de los enzimas lisosómicos, a la versatilidad de los orgánulos citoplasmáticos y a procesos de muerte celular.

Las células del hepatopáncreas (digestivas, excretoras y cálcicas), que en estado normal muestran una actividad determinada, ven roto su equilibrio metabólico cuando sometemos al animal a períodos de ayuno más o menos prolongados. Los períodos de inanición se dan de forma natural en aquellas situaciones de pocos recursos nutritivos, coincidiendo con los meses de invierno y verano. Por ello, estos períodos nunca se hacen más prolongados de tres meses.

Nuestra intención es estudiar, desde un punto de vista analítico y citohistoquímico, las modificaciones que sufre la glándula digestiva del caracol durante los períodos de inanición a los que hemos sometido a los caracoles, a saber 1, 3, 6, 9 y 12 meses. Para ello hemos planteado los siguientes objetivos fundamentales:

- 1/ Determinación de las variaciones en el peso de los caracoles en los distintos períodos de estudio.
- 2/ Revelado de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida (Fac), fosfatasa alcalina (Fal) y esterases (Est).
- 3/ Determinación analítica de los cambios de Calcio y Magnesio durante el ayuno.

## **SITUACION BIBLIOGRAFICA**

## 1. SITUACIÓN GENERAL DE LA GLÁNDULA.

El hepatopáncreas de los gasterópodos pulmonados es una glándula voluminosa de color pardo amarillento que, en el caso de las especies correspondientes al género *Helix* (Gasterópodo Pulmonado terrestre), ocupa gran parte de la espira, estando constituida por dos lóbulos que desembocan separadamente en el estómago a través de un conducto excretor independiente.

Los conductos de estos lóbulos, a medida que penetran en la glándula, se ramifican en túbulos cada vez más pequeños que terminan en unos adenómeros tubuloacinosos (Barfurth, 1883; Billet y Mc Gee-Russell, 1955; Krijgsman, 1925; Walker, 1970; Almendros, 1980).

Los conductos y conductillos excretores se hallan limitados por un epitelio columnar cuyas células van disminuyendo de altura a medida que se acercan a los adenómeros (Walker, 1970). 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 glucógeno.

Este complejo conjunto de túbulos y acinos descansan sobre una lámina basal, por debajo de la cual se dispone un tejido conjuntivo en donde se aprecian amplios espacios sanguíneos y terminaciones nerviosas. El exterior de la glándula está envuelta en una túnica propia que da gran cohesión a la glándula (Billet y Mc Gee Russell, 1955; Walker, 1970).

Entre el tejido conectivo, que contiene gran cantidad de fibras colágenas, se localizan algunas

células musculares lisas. En estas células, las miofibrillas se sitúan en la periferia del citoplasma. Están constituidas por filamentos de dos tipos, finos y gruesos, los finos de unos 60 Amstrong de diámetro y los gruesos, más numerosos y de tamaño variable. Entre las miofibrillas aparece escaso retículo endoplasmático liso y mitocondrias irregulares con abundantes crestas ( Abadía Fenoll et al., 1982). Dispuestos a lo largo de las células musculares se pueden observar axones nerviosos de diámetro variable (Walker, 1970).

La glándula digestiva de Gasterópodos es contráctil (Nakazima, 1956), condición que debe a la existencia de la 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 de los adenómeros hasta la luz intestinal, a través de los conductos excretores.

## 2. TIPOS CELULARES QUE CONSTITUYEN EL ADENOMERO.

La estructura citohistológica de los adenómeros tubulares de la glándula digestiva de gasterópodos pulmonados ha sido objeto de numerosos estudios tanto con microscopía óptica como electrónica. La información ofrecida por estos estudios se refiere fundamentalmente a la morfología y estructura de los tipos celulares que los constituyen (Barfurth, 1883; Frenzel, 1885; Krijgsman, 1925; 1928; Carriker y Bilstad, 1946; Thiele, 1953; Mc Gee-Russell, 1955; Abolins- Krogis, 1963, 1968, 1970, 1986; Bani, 1962; David y Gotze, 1963; Sumner, 1965, 1966a, 1966b, 1969; Owen, 1970; Walker, 1970; Abadia-Fenoll et al., 1982; Almendros, 1988). Por otra parte, la caracterización y distribución de los enzimas de esta glándula digestiva se ha realizado fundamentalmente por métodos bioquímicos (Reid, 1968; Jarofe y Kenty, 1952; Guarda Bassi y Ferreri, 1953; Nakazima, 1956a; Bollet, 1954; Leon, 1960; Orzel, 1967; Bielawski, 1986; Assaka, 1987) y citoquímicos (Billet y Mc Gee-Russell, 1955; Rosembaun, 1963; Reid, 1966, 1968; Bowen, 1971; Ireland, 1986; Chobisa, 1988).

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 de hepatopáncreas de *Helix* y *Arion*, que denominó "Kalkzellen", "Leberzellen" y "Fermentzellen", los cuales se corresponden con los actualmente conocidos como células cálcicas, células digestivas y células excretoras. Posteriormente otros investigadores han descrito estos mismos tipos celulares en varios géneros de Gasterópodos (Baecker, 1932; Van Weel, 1950; Fretter, 1952; Thiele, 1953; Nakazima, 1956; Bani, 1962; Sumner, 1965; Walker, 1970; Almendros et al., 1988). Junto a estas tres clases de células se ha descrito un cuarto tipo celular que se ha dado en llamar células delgadas (Sumner, 1965, 1966a; Walker, 1970), pseudopodiales (Bani, 1963) u oxifilas (Almendros, et al., 1988).

Parece posible que algunos de los cuatro tipos celulares mencionados no sea más que la manifestación morfológica de los diferentes estados metabólicos de un mismo tipo celular. Al parecer, esta posibilidad puede ser cierta para las células digestivas y excretoras (Fretter, 1952; Billet y Mc Gee-Russell, 1955; Almendros et al., 1988). Por otra parte, según otras hipótesis (Thiele, 1953; Sumner, 1965), las células excretoras procederían de la diferenciación de las células cálcicas. Además, David y Gotze (1963) describen la misma estructura para el citoplasma de las células cálcicas y digestivas, aunque en la opinión de Sumner (1966a) existe la posibilidad de que dichos autores estén describiendo sólo células digestivas. De cualquier modo, la existencia de estos cuatro tipos celulares en los túbulos secretores del hepatopáncreas, ya sea como consecuencia de diferentes situaciones metabólicas, ya por diferencias estructurales, parece bien establecida en la literatura.

La presencia de esos cuatro tipos celulares no es un carácter general en todos los Moluscos, ni incluso en la clase Gasterópodos, describiéndose un sólo tipo celular en la glándula digestiva de *Acroloxus* (Hubendick, 1945). Ya dentro de la clase Gasterópodos, en algunos Stylomatoforos, Ghose (1963) afirma que los adenómeros tubuloacinosos del hepatopáncreas están revestidos por dos tipos celulares (células de reserva y células cálcicas). Igual número de células describe Morton (1965a), pero él las llama digestivas y excretoras, siendo las primeras mucho más numerosas que las segundas.

A nuestro criterio, según se explicará en un apartado posterior, son tres los tipos celulares que se diferencian claramente en cuanto a su morfología en el hepatopáncreas del caracol Helix aspersa: células digestivas, excretoras y cálcicas.

## 2.1.- Células Digestivas.

Son diversos los autores que han contribuido con sus trabajos al conocimiento de la estructura y función de las células digestivas del hepatopáncreas de Gasterópodos, entre los que

destacan Sumner (1965, 1966a, 1969), Walker (1970) y Almendros (1980).

De acuerdo con Morton (1965a), las células digestivas son las más abundantes de los tipos celulares existentes en el adenómero. Tienen forma columnar, con unas dimensiones medias de 15 micras de anchura máxima y entre 44 y 61 micras de altura (Sumner, 1965). Hacia la base se sitúa el núcleo, más o menos ovalado, que suele contener dos nucléolos.

El citoplasma es muy vacuolizado, pudiendo detectarse ya con microscopía óptica diversos tipos de vacuolas apicales, con gránulos amarillos, gránulos verdes y gránulos proteicos (Sumner, 1965). Estas vacuolas se sitúan en la porción apical del citoplasma, con un diámetro de aproximadamente 1,5 micras y de aspecto claro (Sumner, 1965, 1966a).

En la región citoplasmática situada por encima del núcleo aparece una gran vacuola con numerosos cuerpos en su interior que han sido denominados gránulos amarillos (Walker, 1970). En algunas células digestivas, junto a la referida vacuola, se pueden observar otras más pequeñas, que también contienen el mismo tipo de inclusiones. Los gránulos amarillos ofrecen un diámetro de 2 micras y su forma es bastante irregular. A microscopía óptica se ha podido comprobar, mediante técnicas histoquímicas, que su componente fundamental es la lipofucsina (Sumner, 1965), aunque también presentan materiales de naturaleza polisacáridica, como se desprende de su naturaleza PAS positiva (Walker, 1970). A microscopía electrónica muestran una estructura electrodensa finamente particulada, que es similar a la de los gránulos de lipofucsina, descritos en varios tejidos de mamíferos por Ducan et al. (1960), lo cual concuerda con la composición ya reseñada de los gránulos amarillos.

Los gránulos verdes, así llamados por Krijgsman (1925), se sitúan entre las vacuolas apicales y la gran bolsa de gránulos amarillos. Son de tamaño superior a los amarillos y se encuentran constituidos por proteínas y polisacáridos (Walker, 1970). Los gránulos verdes, según Sumner (1965)

y Walker (1970), son acúmulos de material recientemente ingerido por las células digestivas, junto con residuos indigeribles.

Otras vacuolas que, aunque constatando su rareza en las células digestivas, han sido descritas por Sumner (1965), son las que contienen en su interior los denominados gránulos proteicos. Cuando se observan estos gránulos a microscopía electrónica, se aprecia que están formados por un material amorfo y difuso de carácter protéico, presentando una reacción positiva a los tests histoquímicos para la demostración de triptófano (Walker, 1970).

En el citoplasma de las células digestivas se disponen, así mismo, los orgánulos habituales de las células: cisternas de retículo endoplasmático rugoso, más o menos hinchadas, aparato de Golgi, situado en las cercanías del núcleo, mitocondrias y bolsas lipídicas (Sumner, 1965, 1966a; Walker, 1970; Almendros et al., 1988).

La superficie apical de las células digestivas muestra una disposición de la membrana plasmática que hace a Sumner (1965) distinguir dos tipos de células: una de ellas con 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 protusión en la luz del adenómero. La existencia de estos dos tipos de células digestivas se explica, según Walker (1970), por la doble función absorbente y secretora de estas formas celulares.

Como se mencionaba anteriormente, 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, 1965; Walker, 1970; Almendros et al., 1988).

Aparte de estas funciones, otros autores le atribuyen a estas células una función almacenadora de glucógeno y grasa (Fretter, 1959; Abolins Krogis, 1960; Walker 1970). Finalmente, Abolins Krogis (1960) atribuye también a las células digestivas una participación en la regeneración de la concha.



## 2.2.- Células Excretoras.

Walker (1970) indica que son células de forma globular con una gran vacuola esférica central. El núcleo es basal y contiene uno o más nucléolos. Los gránulos excretorios se tiñen de forma positiva con el análisis para la lipofushina, dando también positiva la reacción con el P.A.S.

Este autor también distingue dos tipos distintos de células excretoras según dispongan de microvellosidades o no. Aunque este carácter no parece suficiente para esta distinción y más bien podría hablarse de un estado intermedio entre el tipo de célula digestiva y excretora. Desde Krijgsman (1925, 1928) se ha venido considerando la posibilidad de que las células excretoras deriven de las células digestivas.

Según Abolins-Krogis (1960), los indicados gránulos amarillos están formados por urocromo, melanina y lipofushina. También se han encontrado mucopolisacaridos, proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de ARN, aventurando que los gránulos amarillos podrían tener algún papel en la regeneración de la concha.

Sumner (1966a, 1966b, 1969) asigna a estas células una función excretora de pigmentos clorofílicos adquiridos en el alimento, basándose en que los gránulos amarillos aparecen en la luz de los conductos glandulares, en el intestino y en las heces.

Los estudios de la distribución de las enzimas hidrolíticas de Sumner (1966a, 1969) ponen de manifiesto que las células excretoras de H. aspersa, junto con otros pulmonados, presentan actividad hidrolítica en los gránulos citoplasmáticos y en los gránulos de lipofuscina que se encuentran en la gran vacuola que ocupa estas células.

### 2.3.- Células Cállicas.

Este tipo celular ha sido descrito en Moluscos Gasterópodos (Mc Munn, 1900; Fretter, 1952; Van Weel, 1950; Thiele, 1953; Nakazima, 1956; Abolins Krogis, 1963; Sumner, 1965, 1966a; Walker, 1970; Poquet, 1981; Howard et al, 1981; Almendros et al., 1988).

Son células de forma más o menos piramidal. El núcleo se sitúa hacia la base celular y muestra una forma irregular, con una marcada lobulación (Abolins Krogis 1963).

El citoplasma se caracteriza por presentar una alta concentración de ARN, como se ha podido demostrar por métodos histoquímicos con microscopía óptica (Sumner, 1965), situación que se corresponde con la presencia de una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso, tal como se ha observado a microscopía electrónica (Abolins Krogis, 1965; Sumner, 1966a; Walker, 1970; Almendros et al., 1988).

Entre las cisternas de retículo se localizan unas inclusiones esféricas u ovoideas, según la orientación de corte. Son los gránulos cálcicos, que se encuentran limitados por una membrana. Autores como Durfort (1982), Poquet (1982) y Howard et al. (1981) piensan que estos gránulos se encuentran implicados en la regeneración de la concha, regulación metabólica, procesos de vitelogenesis y mecanismos de detoxificación (Hopkin, 1989).

En la superficie apical no se observan microvellosidades, al menos con la regularidad que aparecen en las células digestivas. El citoplasma apical inmediatamente inferior a las microvellosidades carece de retículo y ofrece gran número de vesículas y cuerpos multivesiculares. También han sido descritos gran número de invaginaciones de la membrana a nivel basal. Grünbaum (1913) y Nakazima (1956) indican que también hay un almacenaje de lípidos. Almendros (1980) pone de manifiesto que la cantidad de estos disminuye durante el ayuno.

Wagge (1951), McGee-Russel (1955) y Abolins-Krogis (1963, 1968, 1970, 1986) opinan que las esférulas cálcicas se utilizan en la reparación de la concha de los gasterópodos, en tanto que Hirsch (1917) y Krijgsman (1925, 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 se ha demostrado la existencia de calcio. La importancia del calcio en los procesos metabólicos en general ha sido aclarada por Burton (1976, 1977). Howard et al. (1981), por su parte, puntualiza la relevancia de los gránulos cálcicos con respecto a los mecanismos de detoxificación, llevados a cabo por una pirofosfatasa.

### **3. SOBRE LOS LISOSOMAS**

#### **3.1.- Cuerpos Líticos en general.**

Desde que en la década de los 50, de Duve y su grupo de la Universidad Católica de Lovaina determinaron químicamente la presencia de hidrolasas ácidas en la subfracción ligera de la fracción mitocondrial de homogenados de hígado de rata (de Duve et al., 1955; de Duve y Wattiaux, 1966; de Duve, 1975), 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 con 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 (Baiton, 1981; de Duve, 1983).

Con posterioridad, se han podido identificar un gran número de enzimas lisosómicas, tales como la fosfatasa ácida, ribonucleasa ácida, desoxirribonucleasa ácida, beta-glucuronidasa, lisozima, hialuronidasa, catepsina, esterasas, etc. (Tappel, 1969; Barrett, 1972; Bond y Butler, 1987), 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 et al., 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 et al., 1963; Novikoff, 1965; Goldfischer et al., 1970; Ma y Biempica

1971; Kerr, 1973; Neely et al., 1977; Lee et al., 1979; Jost-Vu et al., 1986; Yokota et al., 1988; Yokota y Asayama, 1990; Kudlacz et al., 1989), como consecuencia de su especial aptitud para el estudio de estos componentes citoplasmáticos y de la acumulación de información bibliográfica sobre los 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, 1966; Straus, 1964, 1967; Galle, 1974; Holmes et al., 1989) y de la mucosa intestinal (Behnke, 1963; Hsu y Tappel, 1964; Moe et al., 1965), o en los tejidos secretores de glándulas diversas, como el tiroides (Wollman et al., 1964; Wollman, 1969; Nunez y Becker, 1970; Bernar et al., 1986), próstata (Helminen y Ericsson, 1970; Pontes, 1983; Broghamer et al., 1985; Rubenstein et al., 1988), hipófisis (Smith y Farquhar, 1966) y glándulas sebáceas (Brandes et al., 1965). Asimismo, los lisosomas han sido objeto de investigación en los tejidos nervioso (Sellinger et al., 1964; Novikoff, 1967; Koenig, 1969; Novikoff et al., 1971; Decker, 1974, Broadwell y Balin, 1985), óseo (Vaes, 1969; Deporter et al., 1973; Tencate y Syrbu, 1974; Hammarström et al., 1983; Cole y Wezeman, 1987; Tanaka et al., 1987; Salama et al., 1990), cartilaginoso (Dingle 1962; Dingle et al., 1971; Murray, 1975; Cornelia, 1983) y muscular (Schiaffino y Hamzlinkova, 1972; Topping y Travis, 1974; Wildenthal, 1975; Smith y Bird, 1976; Decker y Wildenthal, 1978; Duncan, 1978, 1987; Yokota y Asayama, 1990). También se ha dirigido una especial atención en este campo a los leucocitos (Cohn y Hirsch, 1960; Hirsch, 1962; Farquhar et al., 1972; Bowers, 1973; David et al., 1979; Owen y Bhalla, 1983; Jamur et al., 1986; Moriguchi, 1989) y a los componentes del sistema retículo endotelial (Novikoff et al., 1963; Treadwell, 1965; Orci et al., 1984; Dunphy y Rothman, 1985; Sandra, 1988; Allen et al., 1989).

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 et al., 1979; Krumins y Roth, 1985; Wallace, 1985) y de invertebrados, fundamentalmente Artrópodos (Schin y Clever, 1965; Beaulaton, 1967a, 1967b; Bowen,

1968a, 1968b; Lockshin, 1969; Adiyody y Adiyody, 1983; Dean et al., 1984; Idrasith et al., 1988) y Moluscos (Sumner, 1969; Bowen, 1970a, 1970b; Bowen y Davies, 1971; Navascués et al., 1978; Cole y Wezeman, 1987).

La implicación del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi en la formación de los lisosomas ha sido claramente establecida (Novikoff et al., 1963, 1964a, 1964b; Novikoff y Shin, 1964; Brandes et al., 1965; Moe et al., 1965; Dauwalder et al., 1972), habiendo sido desarrollado por Novikoff y su equipo (Novikoff y Shia, 1964; Novikoff et al., 1971) el concepto de GERL (Asociación Aparato de Golgi-Retículo Endoplasmático, de la que 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 diversa. 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.

### **3.2.- Los Lisosomas en el Hepatopáncreas del Caracol.**

Restringiendo nuestro comentario bibliográfico sobre los cuerpos líticos a la situación descrita en el hepatopáncreas de Moluscos, mencionemos que la digestión de partículas alimenticias por parte de algunas células de la glándula digestiva de muchos de estos invertebrados ha sido ampliamente defendida en la literatura (Cuenot, 1899; Jordon, 1918; Yonge, 1926; Millot, 1937;

Rosen, 1941; 1952, 1965; Owen, 1955, 1970; Rosenbaum y Ditzion, 1963; Sumner, 1965), 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 et al., 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 (1965, 1966a), Walker (1970) y Navascués et al. (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. Esta correspondencia 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 lipofucsina, las cuales podrían catalogarse como cuerpos residuales.

#### 4. GRANOS CALCICOS.

Los gránulos cálcicos son formaciones granulares de una peculiaridad especial en cuanto a su estructura, composición y función, lo que nos ha inducido a tratarlos en un apartado propio dentro de la Introducción.

Los granos cálcicos, ó esférulas cálcicas, son estructuras vacuolares muy abundantes en las células cálcicas del hepatopáncreas de moluscos gasterópodos, aunque formaciones similares han sido descritas en el hepatopáncreas de crustáceos, intestino de cestodos, insectos y próstata humana. Los gránulos cálcicos del hepatopáncreas de Gasterópodos presentan forma esférica u ovoidea, con tamaños aproximadamente iguales dentro de una misma célula, si bien pueden variar en células diferentes (Sumner, 1965; Walker, 1970), observándose desde pequeños cuerpos esféricos de 0,6 micras de diámetro hasta formaciones de 7,5 micras 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, 1965; Navascués et al., 1978). Así mismo, se ha demostrado la relativa frecuencia de células cálcicas libres en la luz de los túbulos glandulares (Sumner, 1965; Becker et al., 1974).

Los gránulos cálcicos no son simples condensaciones homogéneas de sales cálcicas rodeadas de membrana, sino que presentan una estructura y composición muy particular y bastante compleja. En efecto, las esférulas cálcicas de Gasterópodos constan de una matriz orgánica sobre la que se depositan las sales de calcio (Baecker, 1932; Fretter, 1952; Billet y Mc Gee Russell, 1955; Abolins-Krogis, 1960, 1965; Burton, 1972). Las sales de calcio se presentan bajo la forma de fosfato y carbonato, aunque 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, siendo el carbonato cálcico la sal que se encuentra en mayor proporción en Helix pomatia (Abolins-Krogis, 1963). Sin embargo, estos resultados parecen estar en contradicción con los estudios de Howard et al., (1981) que, para los granos cálcicos del hepatopáncreas de esta misma especie, establecen una composición a base de calcio, magnesio y fosfato y una pequeña cantidad de carbonato, que viene a ser muy parecida a la descrita por Becker et al. (1974) en el cangrejo Callinectes sapidus.

Navascués et al. (1978) describieron que la calcificación puede tener lugar sobre núcleos de condensación diferentes, pero que la forma principal y más abundante es sobre formaciones granulosas dispuestas en capas concéntricas.

Rios et al. (1980) realizaron medidas del diámetro mayor y la superficie de los gránulos cálcicos, en estado normal y de ayuno, concluyendo que tales estructuras aparecen influenciadas por la situación de ayuno prolongado, ya que los valores medios de ambos parámetros resultaron significativamente inferiores en caracoles sometidos a 30 días de ayuno que en caracoles recién alimentados.

Durfort (1982, 1985) pone de manifiesto que las concreciones calcáreas de los copépodos (moluscos poliplacoforos) tienen un carácter de reserva, al contrario que las inclusiones minerales de las células de los tubos de Malpighi de insectos, de carácter eminentemente excretor. Esta misma autora también indica que las etapas finales del proceso de bioacumulación de sales minerales se caracteriza por la presencia de grandes esferocristales con una típica disposición concéntrica. En el proceso de formación de los esferocristales hay una disminución de inclusiones lipídicas y de glucógeno, junto con la presencia de formaciones laminares en la matriz mitocondrial. Además, el análisis puntual de la concreciones por difracción de rayos X revela la presencia de Cu, Si, Fe, Mg, Zn, Ca y Na.

Poquet M. (1982, 1986) apoya lo indicado por la anterior autora mediante estudios ultraestructurales y microanalíticos.

Howardt et al. (1981) realizó un estudio microanalítico de las concreciones cálcicas con difracción de rayos X, absorción atómica e infrarrojos, poniendo de manifiesto que dichas concreciones están formadas por pirofosfatos y presentan, además, una actividad enzimática de tipo pirofosfatasa. La existencia de estos pirofosfatos ha sido correlacionada con mecanismos de detoxificación del hepatopáncreas de diversos moluscos. De ello se desprende que dichos animales puedan ser unos buenos indicadores biológicos de contaminación (Beeby y Richmond, 1988).

## 5. SOBRE LAS VARIACIONES OCURRIDAS DURANTE EL AYUNO.

### 5.1.- Generalidades.

El estado de dormancia es un estado que se caracteriza por la espera de condiciones favorables para continuar con los procesos vitales de nutrición, relación y reproducción. Este estado ha llamado la atención de gran número de autores dada la gran variedad de organismos que lo sufren: bacterias, esporas de hongos, protozoos, moluscos pulmonados, ciertos embriones de crustáceos y semillas de muchas plantas, entre otros. El estado de dormancia está íntimamente relacionado con los cambios de pH intracelular (pHi) (Busa y Nuccitelli, 1984). Así, en embriones de Artemia Salina es el pHi el responsable, como mediador fisiológico, de la transición metabólica a la dormancia (Clegg y Conte, 1980). Estos cambios de pHi están íntimamente relacionados con las condiciones de stress metabólico (como puede ser el ayuno), a las que con frecuencia se encuentran sometidos estos organismos. En estas condiciones, las proteínas rinden aminoácidos los cuales terminarán produciendo glucosa. De la misma manera, los lípidos originan glicerina que formará glucosa y ácidos grasos, que se degradan hasta cuerpos cetónicos.

La degradación de la glucosa hasta ácido láctico, por vía anaeróbica, se había encontrado como el principal causante del descenso del pHi. Sin embargo, Gevers, (1977); Busa y Nuccitelli, (1984); Harrison et al, (1990) y Rees et al, (1991) prestan su atención a la hidrólisis del ATP, concluyendo que es ésta la responsable del descenso de pHi y no la acumulación de lactato.

Además, las alteraciones metabólicas que implican cambios en el pHi son muy conocidas por inducir modificaciones en los niveles de iones calcio en el interior de la célula (Alvarez-Leefmans

et al., 1981). Por otra parte, las modificaciones en la concentración de iones calcio influyen sobre la concentración de AMPc. Así, Rasmusen, (1981) y Boron et al. (1978) comprueban que los cambios en la concentración de AMPc intracelular (AMPci) son dependientes del pH. Esto se explica teniendo en cuenta que la regulación de la formación de AMPc se realiza a dos niveles; gracias a la adenil ciclasa, en la formación, y con la intervención de la fosfodiesterasa cíclica, en la hidrólisis. Ambas enzimas son dependientes del pH.

En resumen, se puede afirmar que los cambios metabólicos inducidos por el ayuno prolongado son los responsables, en último término, de que el animal entre en estado de dormancia.

## 5.2.- Sobre el Estado de Dormancia en el Caracol.

Puesto que el presente trabajo se ha centrado en el estudio de la glándula digestiva del caracol Helix aspersa, tras ayuno prolongado, resulta necesario describir los conocimientos actuales sobre aquellos procesos que de un modo u otro van a influir sobre la dormancia, así como aquellos otros trabajos en donde se haya estudiado esta glándula bajo la perspectiva del ayuno.

Los caracoles gastan grandes recursos durante el período de dormancia, pudiendo permanecer en este estado durante meses o años (Clegg y Conte, 1980; Whitwam, 1990; Brooks, 1991), esperando condiciones favorables que le lleven a una vida activa. Cuando los caracoles por causa de un ayuno prolongado, entran en estado de dormancia, crean una membrana (el epifragma) que les aísla del medio en que viven, si bien esta membrana es permeable al intercambio de gases (Barnhart, 1983).

Todos los estudios realizados en este sentido han conducido a establecer una correlación negativa entre la presión parcial de oxígeno y el contenido de dióxido de carbono en los tejidos (Barnhart y McMahan, 1986, 1987, 1988). La hipoventilación que tiene lugar durante la dormancia

lleva aparejada una disminución de la tasa metabólica y un aumento del dióxido de carbono corporal.

Barnhart y McMahan (1987) también han indicado que durante el período de dormancia hay un descenso de la tasa metabólica y junto con ello un descenso del  $pH_i$ . En este mismo sentido, diversos autores (Busa y Nuccitelli, 1984; Barnhart, 1986; Rees y Hand, 1990 y Rees et al. 1991) indican que el pH ácido intracelular esta íntimamente ligado al proceso de dormancia e incluso apuntan que el descenso de este parámetro sería la causa que disparase el mecanismo de entrada del caracol en este estado.

Por otra parte, Barnhart y sus colaboradores (Barnhart, 1983, 1986; Barnhart y McMahan, 1987; Barnhart et al., 1988) y Wright, (1990), señalan que el significado fisiológico de la hipoventilación viene determinado por la economía reinante durante los períodos de estivación-hibernación y que tiene como objeto evitar la pérdida de agua. Herreid, (1977) estudia el metabolismo del caracol Otala lactea durante la dormancia, estableciendo una serie de fórmulas mediante las cuales relaciona los microlitros de oxígeno consumido por gramo de peso del animal, tanto en estado de dormancia como en estado activo, estableciendo que la deshidratación sufrida por el animal, cuando entra en dormancia, es el mecanismo que de forma directa o indirecta provoca el descenso de la tasa metabólica.

Burton (1970), estudiando los mecanismos de regulación del pH en el caracol Helix aspersa, pone de manifiesto que si se provoca una acidosis metabólica o respiratoria, corresponde al fluido sanguíneo efectuar el efecto tampón. Esta regulación se logra por la movilización de carbonato cálcico, en sus formas de calcita o aragonito, bien de las células cálcicas de su glándula digestiva o bien de la concha. El mismo autor (Burton, 1972), evidencia variaciones en los iones calcio y magnesio en el hepatopáncreas de Helix aspersa durante la hibernación, pero no así en períodos de reparación de la concha, en los que los iones necesarios para este mecanismo pueden tener un origen extrahepatopancreático.

Por otra parte, se ha demostrado que las modificaciones en el contenido de agua en diversos órganos del caracol, tales como glándula digestiva, glándula del albumen, pié y saco del dardo, están inversamente relacionadas con la concentración de sodio en la hemolinfa (Burton, 1965).

Todos estos estudios muestran una estrecha relación entre la dormancia, el descenso de la tasa metabólica y el descenso del pHi. Si bien no queda suficientemente claro en la literatura consultada la relación causa-efecto de estos parámetros.

### **5.3.- Modificaciones en el Peso y Contenido de Materiales de la Glándula Digestiva.**

Es poca la información que se tiene sobre las alteraciones inducidas por el ayuno prolongado sobre la pérdida de masa corporal y variaciones en el contenido de reservas en Moluscos. Existen en la bibliografía algunos trabajos en este sentido. Entre estos trabajos cabe destacar los llevados a cabo por Russel-Hunter y Eversale (1976, 1983) en Gasterópodos pulmonados, estableciendo que el ayuno prolongado de unos 132 días produce en estos animales una pérdida de biomasa de un 50%, con una mortalidad del 10%, experiencia hecha a temperatura ambiente de 8 grados centígrados, dato que contrasta con el ofrecido por Emerson y Duerr (1967), que a 23 grados centígrados, establecen una pérdida de peso del 62.3%, con una mortalidad del 56% a los 58 días de ayuno.

Por otra parte, Almendros (1980) concluye que al someter a los caracoles de vega, Helix aspersa, a un ayuno prolongado (100 días), se produce un aumento de los procesos líticos o degenerativos de los componentes celulares constitutivos de los adenómeros junto con un aumento de los fenómenos de proliferación conectiva.

Además de estos trabajos de la influencia del ayuno sobre la pérdida de masa corporal y

constitución general de la glándula, se hace necesario comentar aquellos otros trabajos que hacen referencia a la influencia del ayuno sobre el contenido en lípidos, hidratos de carbono y proteínas en la glándula digestiva de Moluscos (Vorhaben et al., 1980, 1984; Carpenter y Hand, 1986; Churchill y Storey, 1989; Whitwam, 1990; Stephen, 1991).

El estudio del contenido lipídico del hepatopáncreas de Moluscos ha adquirido una relevancia sobresaliente, ya que sus ácidos grasos son, en su mayoría, de tipo poliinsaturado y de todos es conocido la preocupación en el mundo moderno por una dieta equilibrada en la que estos ácidos grasos jueguen un papel importante, sin olvidar la riqueza en provitamina D de estos animales (Voogt, 1972, 1975; Piretti y Viviani, 1976). Por otra parte, hay que resaltar que las reservas de lípidos y carbohidratos están estrechamente relacionadas con la tasa metabólica que determinan los ciclos estacionales (Heral y Deslous-Paoli, 1983; Deslous-Paoli et al., 1988).

Por otra parte, las variaciones estacionales de lípidos y carbohidratos han sido correlacionadas con períodos de alimentación/crecimiento y no alimentación/maduración. Así, durante el verano (fase de alimentación/crecimiento) se realiza la reserva de lípidos y carbohidratos, siendo estos utilizados en la siguiente fase de no alimentación durante el invierno, cuando tiene lugar la maduración de las gónadas (Williams, 1970).

La variación en el valor energético del total de lípidos es dependiente de los cambios estacionales producidos en la composición de los ácidos grasos con respecto del total de lípidos (Beukema y De Bruin, 1979; Mahmoud, 1981), dependiente del período reproductivo (Krishnamoorthy et al., 1979) y de la calidad del alimento ingerido (De Moreno et al., 1975; Mori, 1979; Langdon y Waldock, 1981; Deslous-Paoli et al., 1988).

Las investigaciones sobre las variaciones estacionales de ácidos grasos en moluscos bivalvos ha demostrado que el órgano al cual se encuentran relacionados con preponderancia es el

hepatopáncreas (Piretti et al., 1987).

Almendros (1980) pone de manifiesto las modificaciones ultraestructurales producidas en las gotas lipídicas del hepatopáncreas, como principal órgano almacenador de las mismas, durante el ayuno. El período estudiado en este trabajo es de tres meses y mediante morfometría realiza una correlación entre el tiempo de ayuno y el diámetro de la gota lipídica, estableciendo que a los 3 meses de ayuno las gotas lipídicas se reducen en número, si bien son de mayor tamaño. En lo que se refiere a la influencia del ayuno en el contenido proteico del hepatopáncreas, Russel-Hunter y Eversole (1976), realizando un análisis del carbono orgánico y del nitrógeno de caracoles de agua dulce sometidos a 132 días de inanición, encuentran que la tasa C/N se reduce de 5,78/1 a 4,44/1, siendo la pérdida de componentes no proteicos mayor que la pérdida de proteínas, para ese período de ayuno.

El metabolismo de proteínas ha sido estudiado a través de la excreción de productos nitrogenados, adquiriendo un papel preponderante en estos organismos el ácido úrico (Duerr, 1966, 1967; De Jorge y Petersen, 1970; Nayeemunnisa, 1972; Russel-Hunter y Eversole, 1976).

En Helix pomatia se ha encontrado que el 90% de los productos nitrogenados están en forma de purinas, tales como ácido úrico, guanina y xantina. Ello indica una considerable retención de estas purinas en el riñón del caracol (47.1 mg nitrógeno/nefridio justo antes de finalizar la hibernación y de 13.1 mg/nefridio al comienzo de la hibernación) (Duerr, 1966, 1967; Emerson y Duerr, 1967; Jezewska et al., 1963; Jezewska y Barankiewicz, 1976; Spegg et al., 1968).



## **6. HISTOQUIMICA Y CITOQUIMICA DE LAS HIDROLASAS: FOSFATASA ACIDA, FOSFATASA ALCALINA Y ESTERASAS NO ESPECIFICAS.**

### **6.1.- Generalidades.**

El propósito inmediato de la citoquímica consiste en la identificación y localización de los diferentes compuestos químicos dentro de la célula. Este propósito es tanto cuantitativo como cualitativo. La citoquímica está incluida dentro de un campo más general, la histoquímica, que trata de la caracterización química y la localización de sustancias en las células y los espacios intercelulares de un tejido.

Los métodos cito-histoquímicos comprenden una serie de procedimientos químicos y físicos empleados para individualizar o medir diferentes componentes químicos en el interior de la célula. Estos métodos utilizan unos reactivos que forman unos productos de reacción detectables al microscopio óptico o al electrónico. En el caso del microscopio óptico, se eligen unos reactivos que den productos de reacción coloreados, lo cual permite que puedan ser localizados fácilmente. Cuando se usa el microscopio electrónico como medio de observación, se utilizan reactivos que dan unos productos de reacción con un elevado poder de dispersión electrónica con el consecuente aumento del contraste.

Siendo el objetivo de los métodos citoquímicos el localizar con precisión el lugar que ocupan ciertos componentes químicos en la célula, para que las observaciones sean útiles, conviene que se respeten la mayor parte de las condiciones siguientes: en primer lugar, que los tratamientos a los que se somete la célula (fijación, inclusión, realización de los cortes) no deben desplazar ni alterar los componentes químicos; en segundo lugar, los reactivos no deben actuar más que sobre un solo

componente químico (deben de ser lo más específicos que sea posible); y finalmente, el producto de reacción no debe sufrir desplazamiento de su lugar de origen en el tiempo que transcurre desde el momento en que se forma hasta que se observa.

Las enzimas son necesarias para la catálisis de las reacciones químicas en los sistemas biológicos. Estas son muy lábiles y es muy importante su preservación. Las enzimas hidrolíticas de los lisosomas son susceptibles de difundir durante el procesado de la muestra. Las recomendaciones para la preparación de los tejidos implican tiempos de fijación cortos, con soluciones a base de glutaraldehído a baja concentración y paraformaldehído a una concentración un poco más elevada y a una temperatura baja. Todo ello tiene por misión conseguir una mayor preservación de la actividad enzimática.

Existen cuatro formas de poner de manifiesto las reacciones histoquímicas (Pearse, 1968).

- 1.- Captura simultanea (acoplamiento, conversión y quelación).
- 2.- Acoplamiento post-incubación (conversión y quelación).
- 3.- Sustrato que se autocolorea (cambio de solubilidad).
- 4.- Reestructuración intramolecular.

El más ampliamente utilizado es el de captura simultanea, dada su fiabilidad en la obtención de resultados, que es el que se ha realizado en nuestros estudios. Este método, utilizado con gran profusión por Gomori (1950, 1951, 1952), se fundamenta en la precipitación de un metal, el cual puede ser sustituido por sales de diazonio.

El principio de acoplamiento, cuando es considerado en el contexto de la tinción azo, implica a un sustrato y a una sal de diazonio. El acoplador formado por la reacción entre el enzima y el sustrato es llamado producto primario de la reacción (PPR). El PPR cuando se combina con las sales de diazonio forma el producto final de la reacción (PFR), que es normalmente visible. El principal

problema de este método es la difusión del PPR, puede ser debida a tres factores según Pearse (1968) :

- 1.- tasa de hidrólisis del sustrato.
- 2.- coeficiente de difusión del PPR .
- 3.- tasa de acoplamiento del PPR con la sal de diazonio.

## 6.2.- Revelado de Fosfatasas.

Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos delimitados por membranas lipoproteicas. Contienen muchas enzimas siendo gran parte de ellas hidrolasas, las cuales catalizan reacciones del tipo:



Estas enzimas degradan una gran cantidad de moléculas (ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos) hasta productos de bajo peso molecular.

Las fosfatasas constituyen un amplio grupo de enzimas hidrolíticas que catalizan la degradación de los ésteres fosfato, liberando ácido fosfórico y un alcohol. Son diversas las fosfatasas cuya presencia puede ponerse de manifiesto mediante métodos histo-citoquímicos. Entre ellas, las fosfomonoesterasas revisten especial importancia, ya que pueden diferenciarse por su pH óptimo. En general, las fosfomonoesterasas son enzimas inespecíficos, dado que pueden reaccionar con diversos sustratos. Dentro de este grupo de enzimas se encuentra la fosfatasa alcalina (FAI), con un pico de actividad próximo a pH 9, y las fosfatasas ácidas que presentan su máximo de actividad a un pH cercano a 5.

Las actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina) se pueden poner de manifiesto indistintamente por dos métodos: utilizando sales de metales pesados ó sales de diazonio. De forma simultánea, Gomori (1939) utiliza el de la precipitación de metales pesados. La técnica de

Gomori utiliza una reacción de acoplamiento simultáneo, en donde el enzima hidroliza al sustrato (sodio beta-glicerofosfato), produciendo iones fosfato. Este producto primario reacciona con iones calcio formando un fosfato cálcico. En este punto se trata con nitrato de cobalto produciendo un fosfato de cobalto. Este producto de reacción no es visible a microscopía óptica, por lo que se hace necesario utilizar sulfuro de amonio para producir un precipitado negro de sulfuro de cobalto.

Las sales de diazonio fueron descritas por primera vez por Menton et al. (1944) y modificadas por Gomori (1951). Se emplean dos tipos de sustratos: un fosfato orgánico sencillo (alfa-naftil fosfato sódico), que da lugar a un producto primario de reacción moderadamente insoluble, por lo que puede haber algo de difusión; el segundo tipo de sustrato son fosfatos en los cuales hay un grupo naftol de sustitución ( naftol AS-BI fosfato ). En este caso, el producto primario de reacción es relativamente insoluble, por lo que la difusión es mínima.

El sustrato más ampliamente usado para fosfatasa ácida ha sido el beta-glicerofosfato Gomori lo utilizaba con el tampón acetato a pH 5, para los estudios con microscopía electrónica, pero Barka y Anderson (1962) encuentran que el Tris/maleato da mejor preservación de la citología y reduce la aparición de depósitos electrodensos no específicos en los tejidos incubados. La superioridad de este método fue puesta de manifiesto por Smith y Farquhar (1966), los cuales encontraron que daba menos tinción inespecífica sobre el núcleo celular, produciendo una reacción intensa.

La fosfatasa alcalina fue inicialmente estudiada con microscopía óptica (Gomori, 1939). El enzima era puesto de manifiesto utilizando como sustrato el glicerofosfato sódico e iones calcio que capturaban el fosfato liberado por la acción enzimática. El medio de incubación estaba tamponado a pH 9. Reale y Luciano (1967) realizan una adaptación de esta técnica para microscopía electrónica, añadiendo un 2% de solución de nitrato de plomo después de la incubación. El resultado que se obtiene es un precipitado denso a los electrones que resiste el posible arrastre por los medios de inclusión durante la infiltración.

### 6.3.- Esterasas no Específicas.

Desde un punto de vista histoquímico, las esterasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la síntesis de ésteres carboxílicos. La reacción, que es reversible, puede resumirse de la forma siguiente:



Al parecer, estas enzimas presentan distintas funciones. Según Meyer et al. (1957) las esterasas intervienen en el metabolismo proteico, gracias a su capacidad de hidrolizar los ésteres de las aminas y aminoácidos. Es posible que también intervengan en el proceso de fagocitosis (Burstone, 1957). Muchas de estas enzimas tienen un pH óptimo con un amplio rango, entre 5 y 9, de tal forma que cada enzima es capaz de hidrolizar un elevado número de sustratos, y a la vez, muchas esterasas son capaces de hidrolizar el mismo sustrato. De ahí la denominación de no específicas.

La mayoría de las esterasas son capaces de utilizar como sustrato el alfa acetato naftil. Son conocidas como esterasas no específicas y se dividen en tres grupos, según Pearse (1972):

- carboxil esterasas,
- aliesterasas,
- acetilesterasas,

El alfa naftil fosfato, actuando como sustrato, libera durante la hidrólisis alfa naftol, el cual es acoplado con una sal de diazonio para producir un grupo azo insoluble en el lugar de la actuación enzimática.

Gomori (1950, 52) modificó el método original de Nachlas y Seligman (1949), usando Fast

Blue B como sal de diazonio. Esta sal ha sido reemplazada con posterioridad por pararosanilina, consiguiendo una mejor localización del enzima (Davies y Ornstein, 1959).

Willson (1951), estudiando la actividad acetil colinesterasa purificada, comprobó que con ácido tioacético (como sustrato) se produce una acetilación, con la liberación de sulfuro de hidrógeno. En presencia de iones plomo se produce un precipitado muy insoluble de sulfuro de plomo, técnica que será muy útil para el trabajo con microscopía electrónica.

Barnett y Palade (1959) usan la misma técnica para el estudio ultraestructural de la distribución de las esterasas a nivel de placa motora. Modificaciones posteriores fueron hechas por Zacks y Blunberg (1961) y Barnett (1962). La técnica original presenta inconvenientes difíciles de subsanar, como puede ser la sobretinción y la diversidad de aliesterasas que hidrolizan el mismo sustrato. No obstante, estos inconvenientes no constituyen serios obstaculos en estudios como el presente.

#### **6.4.- Las Hidrolasas: Fosfatasas Acidas, Fosfatasas Alcalinas y Esterasas Inespecíficas en la Glándula Digestiva de Moluscos.**

El descubrimiento de la actividad digestiva intracelular es un hecho básico para el desarrollo de la biología celular normal y patológica. Los estudios de Metchnikoff y sus colaboradores a finales del ochocientos pusieron de manifiesto la existencia de estructuras intracelulares implicadas en procesos digestivos, actualmente conocidas como lisosomas.

De un modo genérico, se puede indicar que las hidrolasas están relacionadas con los lisosomas. Los lisosomas tienen su principal función en la digestión intracelular. Los materiales a digerir son incorporados al lisosoma. De este modo la célula aplica la economía sobre sus hidrolasas, ya que facilita el contacto con diversos enzimas con un gasto mínimo (la concentración de los enzimas

hidrolíticos lisosomales está en torno al rango de milimolar). Además, la compartimentación facilita el establecimiento de un pH ambiental bajo, necesario para la eficiente actividad de las hidrolasas.

Las hidrolasas lisosomales, como las fosfatasas ácidas, aril sulfatasas, beta-glucuronidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa y esterasas no específicas, han sido estudiadas en las células de la glándula digestiva de diversos invertebrados, con filogenia próxima, pudiéndose comprobar que básicamente se distribuyen en las vacuolas de origen digestivo (Sumner, 1969; Walker, 1970; Kado y Matsushima, 1976a,b; Gill, 1978; Kryzstofiak et al., 1983), microvellosidades (Bowen, 1970a, 1970b; Bowen y Davies, 1971; Bowen et al., 1988; Owen, 1970; Bielawski y Kesa, 1986) y gránulos cálcicos (Owen, 1966; Simkiss, 1981; George et al., 1982; Viarengo et al., 1985; Prosi y Dallinger, 1988).

La actividad fosfatasa alcalina se ha encontrado relacionada con procesos de absorción intestinal (Fontaine, 1981) y con mecanismos de almacén mineral en la glándula digestiva (Kryzstofiak et al., 1983; Bielawski y Kesa, 1986; Prosi y Dallinger, 1988).

Las esterasas no específicas se han encontrado asociadas a la glándula del estilo (Michelson y Dubois, 1971) y a la glándula digestiva (Sumner, 1969; Walker, 1970).

Todo lo indicado tiene parangón con lo descrito para las anteriores actividades enzimáticas en vertebrados. De este modo, la actividad fosfatasa ácida se encuentra relacionada con lisosomas primarios o secundarios (De Duve y Wattiaux 1966; Poste, 1971; NoviKoff, 1976; Wilson, 1986; Omura et al., 1986; Yajima, 1986; Jamur et al., 1986; Drenckhahn et al., 1987; McGuire y Kline, 1988).

Del mismo modo, la fosfatasa alcalina ha sido relacionada con procesos de secreción proteica y movimiento iónico (PetitClerc y Gerard, 1980; Fontaine, 1981; Shields et al., 1982; Owen y Bhalla, 1983; Hoffman y Wright, 1985; Garattini et al., 1985; Shi et al., 1988), además de estar localizada en fibroblastos, donde existe una reabsorción y degradación de matriz conjuntiva (Deporter et al., 1973;

Tencate y Syrbu, 1974; Shields et al., 1982; Sorrell y Weiss, 1982; Brière, 1986; Cole y Wezeman, 1987; Korte et al., 1991).

Las esterasas inespecíficas han presentado un problema añadido, cual es la gran diversidad de enzimas puestas de manifiesto con sustratos muy diversos, lo que da lugar a un solapamiento de actividades. (Owen y Bhalla, 1983; Kirkeby y Moe, 1988; Buat et al., 1988; McGuire y Kline, 1988; Myers et al., 1988; Tsujita y Miyada, 1988).

En el caracol Helix aspersa las hidrolasas se van a distribuir de un modo singular; se obtiene reacción positiva para la fosfatasa ácida en vacuolas de digestión de las células digestivas y en los gránulos cálcicos de células cálcicas. Las esterasas no específicas presentan actividad en los gránulos y citoplasma de las células digestivas. Las células cálcicas presentan actividad en las esférulas de calcio (Ericsson, 1969; Sumner, 1969; Walker, 1970; Bowen y Davies, 1971; Brown, 1977, 1978, 1982; Humbert, 1978; Prosi y Ballinger, 1988).

En el hepatopáncreas, las hidrolasas se van a encontrar en los lisosomas primarios, en vacuolas de material fagocitado en proceso de digestión y en vacuolas que están en los estadios finales de la actividad digestiva. Las células de la glándula digestiva ingieren partículas alimenticias (Jordon, 1918; Yonge, 1926; Sumner, 1965, 1966a, 1966b) que son digeridas intracelularmente (Millott, 1937; Rosen, 1950, 1952; Sumner, 1969; Walker, 1970; Bowen y Davies, 1971; Bowen et al., 1988; Kryztofiak et al., 1983; Bielawski y Kesa, 1986).

De modo general, las células digestivas son las que intervienen principalmente en la digestión intracelular (Millot, 1937), y es en estas células donde aparece una mayor distribución de actividad enzimática.

La reacción positiva de los gránulos cálcicos se presenta en lo que se ha dado en llamar el



anillo de la esférula. Se ha pensado que es debida a la implicación de dichas enzimas en el metabolismo del calcio (Sumner, 1969; Walker, 1970; Bowen y Lloyd, 1971; Bowen et al., 1988; Howard et al., 1981; Prosi y Dallinger, 1988).

El modelo de distribución de las fosfatasas en los helícidos va a depender de las condiciones fisiológicas del individuo (Kryztofiak et al., 1983; Bielawski y Kesa, 1986). El descenso del número de enzimas (bandas electroforéticas) en la hibernación es comparable a la situación detectada en otros moluscos (Gill, 1978).

## **7. MUERTE CELULAR.**

### **7.1.- Muerte Celular. Generalidades.**

Algunos autores han visto en este fenómeno una manifestación de procesos patológicos. Sus modelos experimentales incluyen la modificación de la regulación metabólica mediante diversos agentes, de modo que sus conclusiones van orientadas a la comprensión de los procesos celulares en determinadas enfermedades (Trump y Mergner, 1974; Jennings et al., 1975). Otros autores ven en la muerte celular un fenómeno fisiológico necesario para el desarrollo embrionario normal (Glücksman, 1951; Saunders, 1966).

Todo sugiere que hay dos tipos reconocibles de muerte celular, diferenciados morfológicamente. El primer tipo, llamado necrosis, se caracteriza por el edema celular, culmina con la ruptura celular y liberación de su contenido al espacio extracelular. El segundo, llamado apoptosis, implica una progresiva contracción del volumen celular, condensación de la cromatina y preservación de la integridad de organelas citoplasmáticas. Las células afectadas son aisladas por fragmentos de membranas y rápidamente fagocitadas por células adyacentes (Wyllie, 1981).

### **7.2.- Muerte Celular en Gasterópodos.**

Bowen (1984) y Bowen et al. (1982, 1986) han establecido en el desarrollo de invertebrados, la presencia de una fosfatasa ácida libre como una característica de la muerte celular programada, encontrándose esta actividad en la zona apical de las vellosidades en las células digestivas de gasterópodos.

La fosfatasa ácida extralisosomal está ligada a procesos autolíticos encargados del reemplazamiento tisular que ocurre como un preludio a la morfogénesis y metamorfosis de anfibios (Fox et al., 1988; Lockshin, 1969).

La presencia de ATPasa en la zona apical de células se ha encontrado en larvas de mosquito (Hussein et al., 1986). Esta actividad es resistente a la ouabaina (Jungereis, 1977; Anstee y Bowler, 1979). La creencia general es que existe una ATPasa apical específicamente activada por potasio. Esta actividad se localiza, de modo particular, en epitelios de insectos y gasterópodos y es también resistente a la ouabaina (Harvey et al., 1983; English y Cantley, 1985; Bowen et al., 1988).

## **MATERIAL Y METODOS**

## 1. FUENTE DE EXPERIMENTACION. ANIMALES.

Para la realización de este trabajo se utilizaron caracoles de la especie Helix aspersa (Müller). Los animales fueron recogidos en la Vega de Motril. Todos los especímenes eran sexualmente maduros, si bien su peso mostró dispersión . Después, fueron colocados en un criadero para su mantenimiento en el laboratorio.

### 1.1.- Clasificación del Material Biológico.

Para poder establecer las modificaciones de las estructuras objeto de nuestro estudio, se realizó el siguiente diseño experimental.

Los caracoles fueron clasificados en dos grupos: uno el grupo control (animales alimentados) y otro el grupo de caracoles que iban a ser sometidos a diversos períodos de ayuno. A este segundo grupo, se le indujo a la dormancia mediante el ayuno, estableciéndose cinco subgrupos correspondientes a 1, 3, 6, 9 y 12 meses de inanición respectivamente, según se detalla en el **Esquema 1**.

ESQUEMA 1.

| PERIODO DE<br>AYUNO | NUMERO DE<br>CARACOLES | MUERTOS | SUPERVIVIENTES | CITOHISTOQUIMICA | ABSORCION<br>ATOMICA |
|---------------------|------------------------|---------|----------------|------------------|----------------------|
| CONTROL             | 10                     | 0       | 10             | 6                | 4                    |
| 1 MES               | 10                     | 0       | 10             | 6                | 4                    |
| 3 MESES             | 10                     | 0       | 10             | 6                | 4                    |
| 6 MESES             | 10                     | 4       | 6              | 4                | 2                    |
| 9 MESES             | 10                     | 5       | 5              | 3                | 2                    |
| 12 MESES            | 10                     | 6       | 4              | 2                | 2                    |

### 1.2.- Acondicionamiento de los Animales.

La cría de helícidos se ha realizado en un criadero diseñado en nuestro Departamento y basándonos en el modelo de separaciones verticales de Cuellar R. (1985), modelo que permite la entrada de luz difuminada. El número de horas diarias de luz recibidas fue de 16, fotoperiodo que se ha estimado como el más conveniente (Gomot L. 1987). Para ello se instaló en el criadero un temporizador, de modo que se aprovecharan al máximo las horas de luz solar. Cuando ésta faltaba se suplía con luz eléctrica blanca.

### 1.3.- Dieta a la que fué sometido el Material Biológico.

Los caracoles recibieron durante el tiempo de experimentación un pienso basado en: harina de maíz (65%), salvado de trigo (15%), mezcla de soja (10%) y cáscaras de huevo (10%). La incorporación de cáscaras de huevo se realizó porque éstas contienen chalazas y farfaras junto con restos de clara de huevo (Cuellar R. 1985). De este modo, las cáscaras aportan no sólo una gran riqueza mineral, sino también gran cantidad de proteínas procedentes de las farfaras y restos de clara. Con todo, cada determinado tiempo, se les aportaba material vegetal fresco, con la intención de completar el aporte vitamínico.

En cuanto a la patología parasitaria, sólo se presentaron problemas con el ácaro Ricardoella limacum. Las hembras depositaban los huevos entre las fibras musculares y en los repliegues de la cavidad paleal. Las larvas penetraban a través del pneumostoma en la cavidad paleal donde succionaban la hemolinfa del hospedador.

La presencia masiva de ácaros constituye uno de los mayores peligros en la cría helicícola,

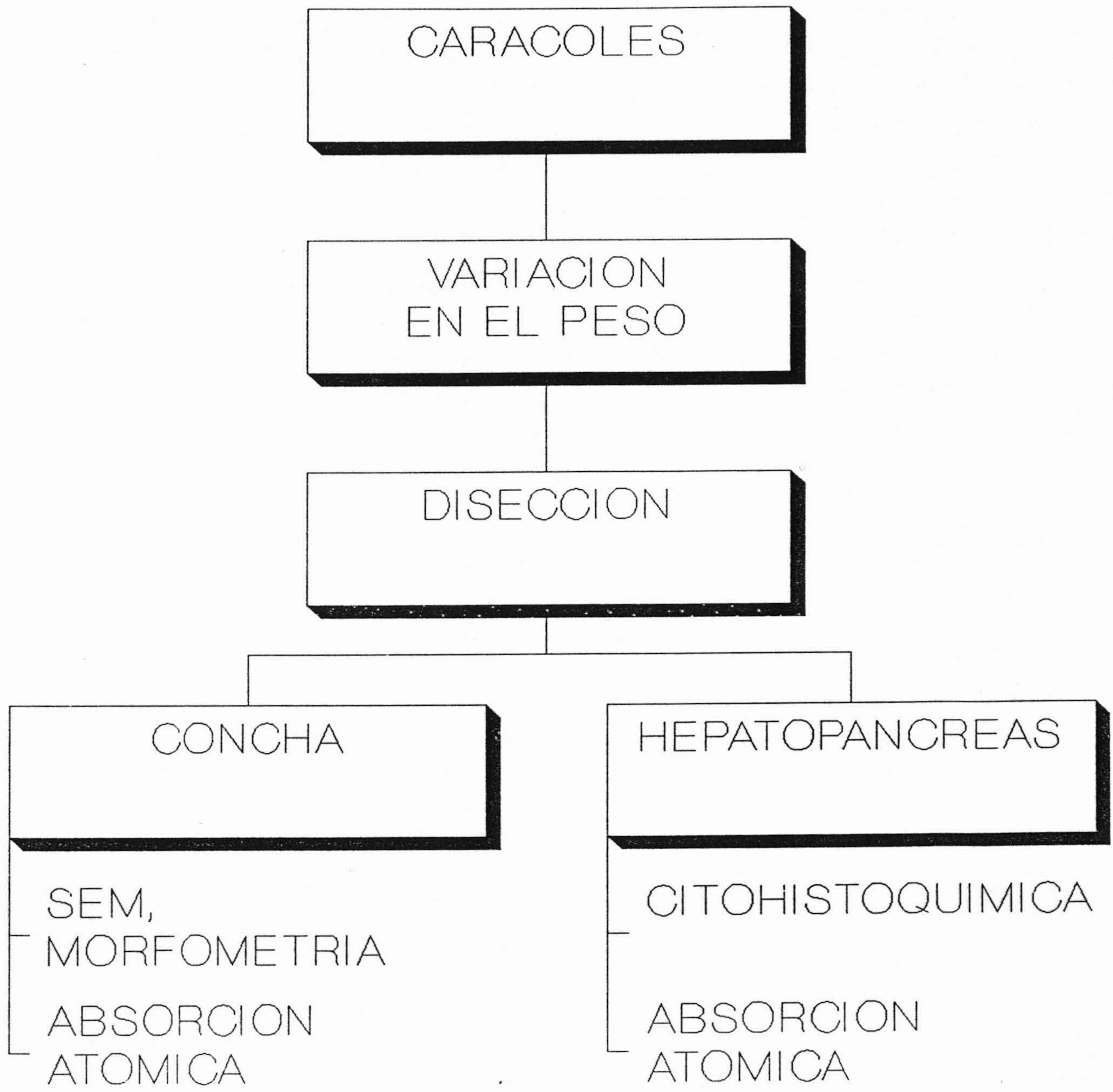
puesto que una elevada concentración de parásitos en la cavidad paleal origina fuertes procesos anémicos, con las consiguientes repercusiones en la reproducción y en el crecimiento, pudiendo llegar, en ocasiones, a producir la muerte de los caracoles parasitados.

El órgano utilizado en nuestro estudio ha sido el hepatopáncreas o glándula digestiva, cuya anatomía, constitución general y funcionalidad ha sido ampliamente discutida en el capítulo anterior, si bien, se han empleado conchas para las determinaciones analíticas de los iones calcio y magnesio.

En cada uno de los especímenes se realizaron las determinaciones que quedan expuestas en el **Esquema 2**.



ESQUEMA 2.



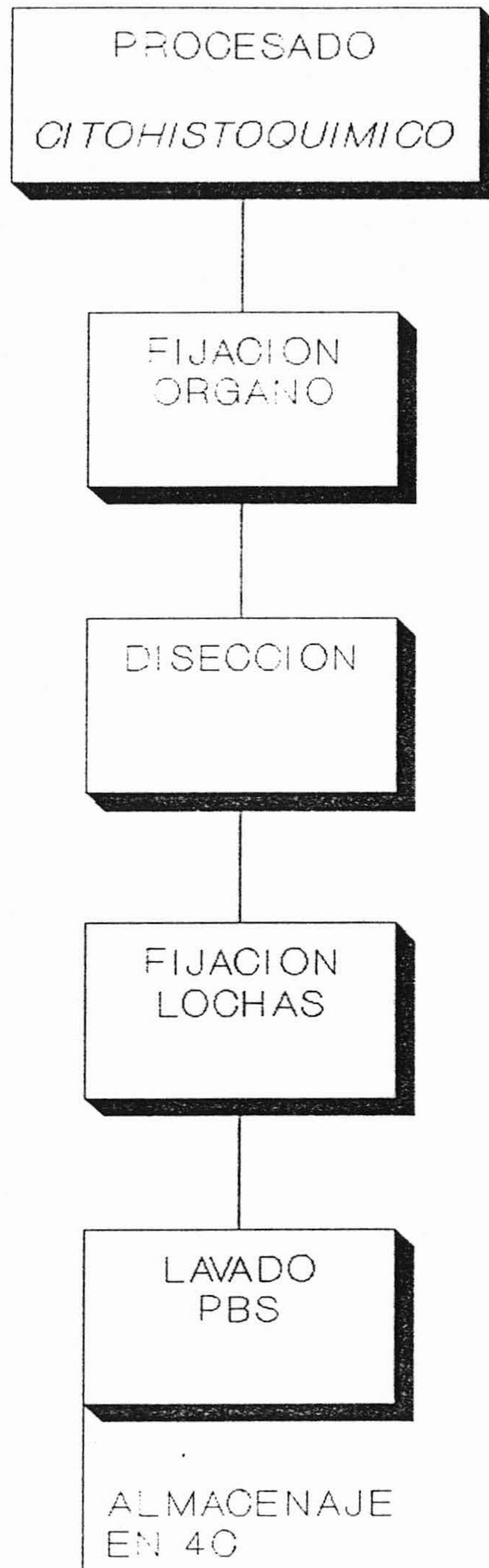
## 2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

2.1- Obtención del Tejido.- Para la extracción de la glándula digestiva de cada caracol se siguió el siguiente proceder: en primer lugar, los caracoles fueron anestesiados siguiendo el proceder más ampliamente utilizado en Gasterópodos pulmonados (Runhan N.W. 1965), que consiste en inyectar 1 ml de una solución de cloruro de magnesio al 10% mediante una aguja hipodérmica que se inserta en la cara derecha del cuerpo, cerca del cerebro. De este modo se consigue una completa relajación, en la mayoría de los casos, tras un período de tiempo que oscila entre 5 y 15 minutos, evitándose así los inconvenientes del uso del eter, como puede ser la producción de gran cantidad de moco y la retracción del órgano.

Una vez anestesiado el animal, se le libera de la concha, se rompen las pleuras que envuelven la masa visceral y se extrae el hepatopáncreas.

2.2.- Fijación y Lavado . El hepatopáncreas fue introducido rápidamente en una solución fijadora constituida por una solución v/v de glutaraldehído al 0,5% y formaldehído al 2% (obtenido este último a partir del paraformaldehído) en PBS, por un tiempo de 4 horas y a temperatura de cuatro grados centígrados. Después se obtuvieron lonchas de tejido de un grosor de 0,5 mm. Estas fueron introducidas durante 1 hora en la misma solución fijadora, posteriormente lavadas abundantemente en PBS y a continuación almacenadas en tampón en el frigorífico hasta el momento de su uso (Esquema 3).

ESQUEMA 3.



La solución tampón PBS 0,01 M pH 7.2 tiene la siguiente composición:

- Fosfato sódico ..... 1.48 g.
- Bifosfato potásico ..... 0,43 g.
- Cloruro sódico ..... 7.20 g.
- Agua destilada hasta ..... 1 litro.

La solución fijadora glutaraldehído/formaldehído se realizó según el siguiente proceder:

Solución A:

- Se disuelve 1 g. de paraformaldehído en 25 ml de agua, - Se calienta hasta 60 grados y se aclara la solución sumando unas gotas de NaOH 0,1N .

Solución B:

- Se disuelven 4 ml de glutaraldehído comercial del 25% en 96 ml de tampón PBS.
- Se completa con PBS hasta 200 ml.

La solución fijadora final se obtuvo mezclando a partes iguales las soluciones A y B.

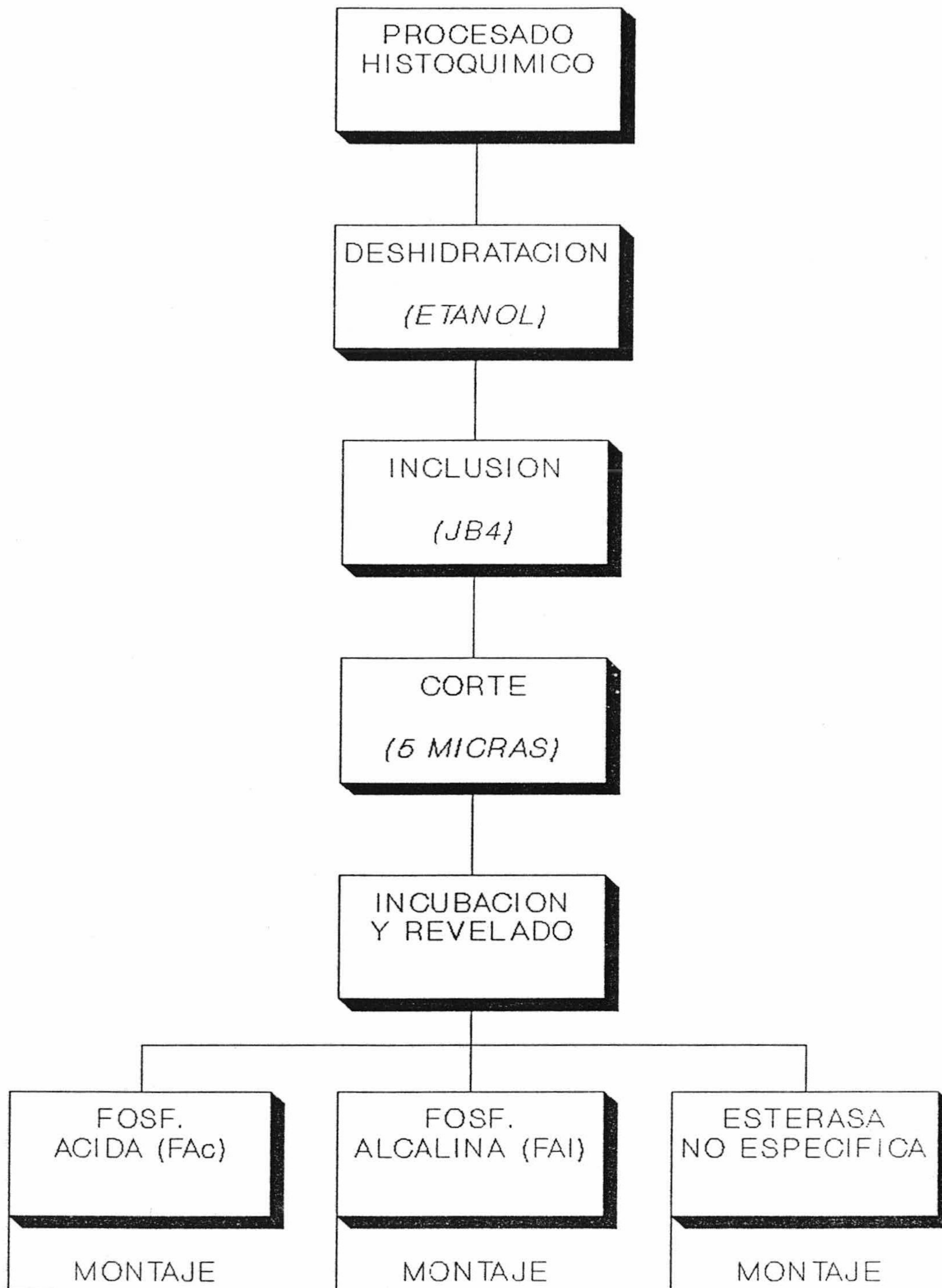
A continuación las lonchas de 0,5 mm de grosor fueron sometidas a los diferentes procesos de preparación para las determinaciones histoquímicas y citoquímicas, tal como se describe a continuación.

### 2.3.- Procesado para Histoquímica (Esquema 4)

Las muestras (lonchas de tejido de 0,5 mm de grosor) fueron sometidas al siguiente proceder:

2.3.1.- **Deshidratación.**- Una vez concluida la fijación y tras lavado posterior, se procedió a la

ESQUEMA 4.



deshidratación de las piezas, que consistió en pasos sucesivos en soluciones de etanol en agua de concentraciones crecientes y en frío. La deshidratación se concluye una vez efectuado el paso a etanol 100%.

**2.3.2.- Inclusión .-** La inclusión del material se llevó a cabo en el medio JB4, soluble en agua, y compuesto prioritariamente por glicol metacrilato. Antes de comenzar la inclusión propiamente dicha se realizó una infiltración previa con la solución A más acelerador durante toda la noche (16 horas aproximadamente) y posteriormente una infiltración definitiva en el medio completo (solución A + B + acelerador). Este paso se realizó en una campana de vacío y con un agente desecador en el medio, ya que el oxígeno y la humedad inhiben la polimerización.

**2.3.3.- Seccionamiento de las Piezas .-** Los cortes de cinco micras de grosor fueron realizados en un ultramicrotomo Reichert Ultracut E empleando cuchillas de vidrio. Los cortes fueron montados en portaobjetos a los que se les había puesto una capa de polilisina . A continuación se incubó con las diferentes soluciones, según los procedimientos que a continuación se exponen.

**2.3.4.- Incubación y Revelado Histoquímico.**

\* Revelado para la Fosfatasa Ácida.-

- se precalienta agua a 37 grados centígrados.
- se añade 0,1 ml de nitrato sódico a 0,1 ml de Fast Garnet. Se agita y se mezcla por un tiempo de 2 a 5 minutos.
- se adicionan 3.8 ml de agua.
- se adicionan 0,5 ml de solución de acetato sódico.

- se incuba durante una hora a 37 grados centígrados.
- se lava de forma abundante el tejido.

\* Revelado de Fosfatasa Alcalina.-

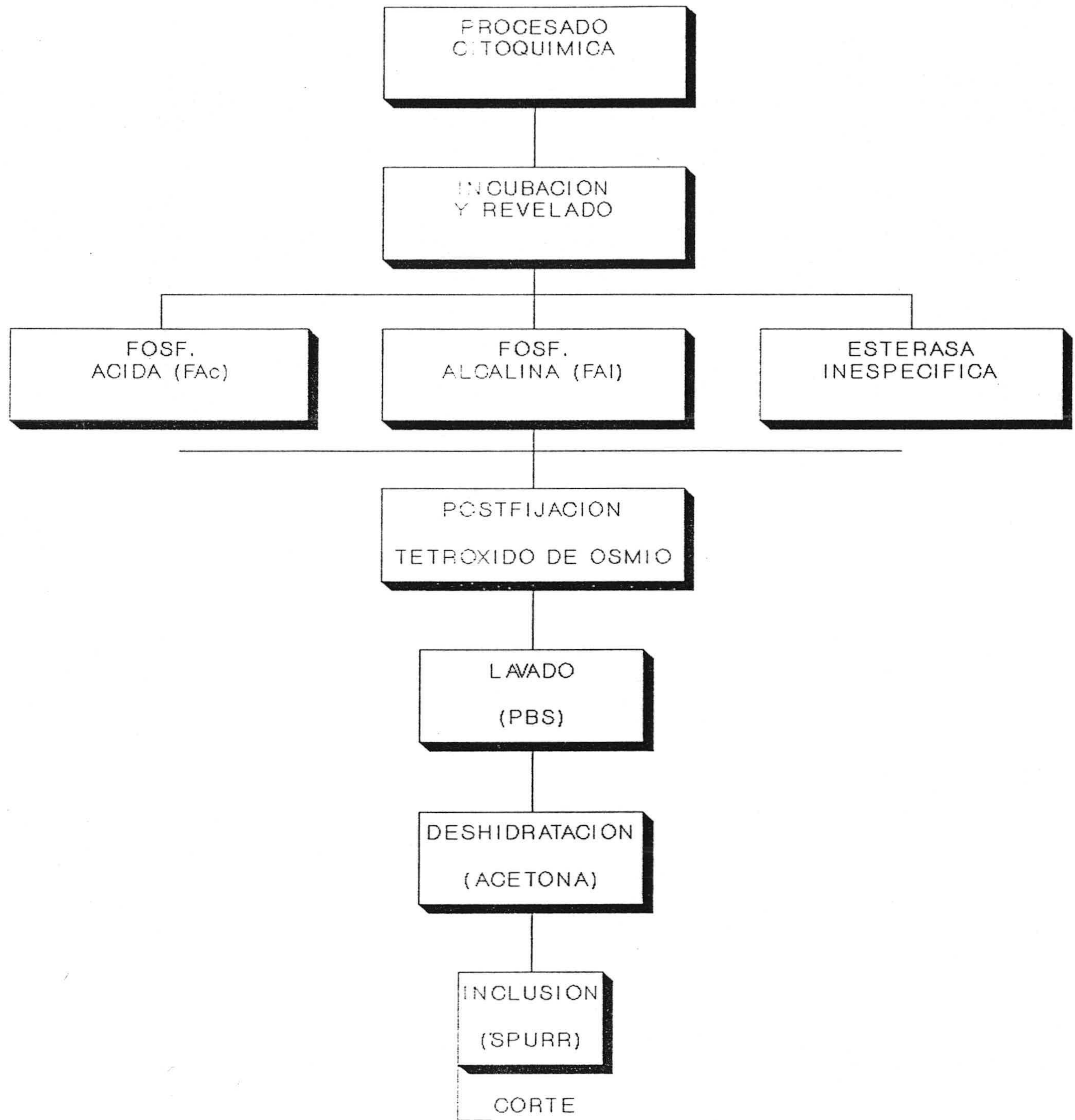
- se precalienta agua a 37 grados.
- se añade 0,1 ml de nitrato de sodio a 0,1 ml de FRV-Alcalina
- se le adiciona 4.5 ml de agua.
- se le suma 0,1 ml de Naphthol AS-B1 Alcalina.
- se incuba el tejido por un tiempo de 15 minutos a 37 grados centígrados.
- se lava abundantemente el tejido.

\* Revelado de Esterasas no Específicas.-

- calentar agua hasta 37 grados centígrados.
- calentar los reactivos hasta 37 grados centígrados.
- 0,1 ml de solución de nitrato es adicionada a 0,1 ml de Fast Blue BB.
- a la solución anterior se le suma 4 ml de agua.
- adicionar 0,5 ml de Trizmal.
- Se añade 0,1 ml de alfa-Naphthyl Acetato.
- se incuba por un tiempo de 30 minutos a 37 grados y protegido de la luz.
- lavar de forma abundante.

2.4.- Procesado para Citoquímica. (Esquema 5)

ESQUEMA 5.





Después de la fijación, las muestras son lavadas en tampón PBS, pudiendo permanecer en tampón por espacio de varias semanas sin que la actividad enzimática disminuya de forma apreciable.

**2.4.1.- Incubación y Revelado Citoquímico.-**

\* Revelado Fosfatasa Acida.(Barka y Anderson 1962).

- 0,2 Tris/Maleato pH 5.2 ..... 10 ml
- 0,1 M beta-glicerofosfato ..... 4 ml
- 0,02 M nitrato de plomo ..... 6 ml
- agua destilada ..... 30 ml
- se incuba durante una hora a 37 grados centígrados

\* Revelado Fosfatasa Alcalina( Barka y Anderson 1962, modificado).

- 0,2 M Tris/Maleato pH 9.5 ..... 10 ml
- 0,1 M beta-glicerofosfato ..... 4 ml
- 0,02 M nitrato de plomo ..... 6 ml
- agua destilada ..... 30 ml
- se incuba durante una hora a 37 grados centígrados

\* Revelado de Esterasas no Específica.( Lewis y Knight 1977).

- 0,1 ml de ácido tioacético

- se le suma 12.5 ml de NaOH 0,1N frio, se agita vigorosamente (1).
- se suman los siguientes reactivos (2)
  - + 3 ml de maleato 0,2 N pH 6.2
  - + 3 ml de nitrato de plomo 0,02 N
  - + 1 ml de agua destilada.
- se suman 3 ml de (1) a la mezcla (2).
- se incuba el tejido en la solución anterior a temperatura ambiente durante una hora, protegido de la luz.

2.4.2.- **Postfijación.**- Una vez que los tejidos han sido incubados y lavados de modo abundante, fueron posfijados con tetróxido de osmio al 2% en PBS por un tiempo de una hora.

Con posterioridad el tejido era, de nuevo, lavado abundantemente en el mismo tampón, previamente al paso de la deshidratación.

2.4.3.- **Deshidratación.**- El agente deshidratante elegido fue la acetona. Las muestras, una vez osmificadas, fueron pasadas por concentraciones crecientes de acetona en agua en disoluciones del 30%,50%,70%,90% y 100%, a temperatura ambiente y durante 15 minutos en cada pase.

2.4.4.- **Inclusión.**- Como medio de inclusión se utilizó la resina epóxica introducida por Spurr en 1961 dada su baja viscosidad y por consiguiente mayor capacidad de penetración. Para facilitar la infiltración, las muestras fueron pasadas por mezclas de óxido de propileno y resina en las proporciones 3/1, 1/1 y 1/3 respectivamente.

La polimerización de la resina se llevó a cabo en dos etapas, una primera en estufa a 37 grados centígrados durante 6 horas y otra a 60 grados centígrados durante 12 horas.

2.4.5.- **Corte** .- El corte de la muestra se ha realizado con un ultramicrotomo, Reichert Ultracut E, con cuchilla de vidrio. En primer lugar se hicieron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina y azur II. Ello permitió la localización de zonas de interés. De las zonas seleccionadas se realizaron cortes ultrafinos que eran contrastados con acetato de uranilo y observados con microscopio electrónico (Zeiss EM 10C).

### 3. Preparación de las Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.

Las muestras de hepatopáncreas fueron **fijadas** con glutaraldehido 2% y paraformaldehido 2% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7.4). Se **postfijaron** en tetróxido de osmio en el mismo tampón al 2% durante un tiempo de 2 horas en frigorífico.

La **deshidratación** se realizó en gradientes de acetona 50%, 70%, 80%, 90%, 100% y acetona anhidra por tiempos de 15 minutos. Las piezas se sumergieron en acetato de amilo, en donde permanecían un tiempo variable, hasta realizar el **desechado** por punto crítico (Anderson T.F. 1951).

Tras el punto crítico, las piezas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, fracturándose la pieza con una cuchilla que previamente había sido enfriada.

Una vez obtenida la superficie de fractura, las piezas eran pegadas con plata coloidal a los portamuestras del microscopio. Se **recubrieron** en un "sputter" con oro, estando listas para su visualización posterior en un microscopio electrónico de barrido DSM 950 de Zeiss.

Las muestras de conchas de caracol fueron preparadas de un modo más conciso. Se **desecharon** en estufa y de forma directa se **metalizaron**, pasándose a la observación posterior.

**4. Preparación de las Muestras para Análisis.**

Cuando los animales fueron sacrificados y extraídas sus glándulas digestivas, se tomaron muestras de las mismas, las cuales fueron digeridas con ClH al 10%. La solución resultante fue la que se utilizó para realizar las mediciones de calcio y magnesio mediante Absorción Atómica.

De manera similar se actúa con la concha del caracol, de modo que también se realizó una medida de la cantidad de calcio y magnesio.

## 5. Estudios Cuantitativos.

Además de las observaciones realizadas con carácter morfológico y estructural, en el presente trabajo se han realizado estudios de naturaleza cuantitativa sobre el peso del animal, número de células, espesor de la concha y relación Mg/Ca en el hepatopáncreas y en concha.

### 5.1.- Pérdida de Peso.

Se tomaron diez individuos por grupo ( siendo los grupos 1, 3, 6, 9, 12 meses de inanición). Se obtuvo una relación de pérdida de peso realizando el siguiente cociente: peso del animal ayunado/peso del animal alimentado. Sobre los datos obtenidos se realizó el Análisis de la Varianza para verificar el comportamiento de las medias de los diversos grupos.

### 5.2.- Número de Células.

Se observaron cortes semifinos de hepatopáncreas teñidos con azul de toluidina. Trabajando con portaobjetos de diez cortes semifinos, se eligió un adenómero por portaobjetos, en donde se contaron diez células a partir de un punto elegido al azar, comprobándose cuales de estas correspondían a cada tipo celular presente en el hepatopáncreas. Este proceso se repitió veinte veces.

A los datos obtenidos, también se les aplicó el Análisis de Varianza para poder comprobar qué comportamiento tenían las medias por grupos.

### 5.3.- Espesor de la Concha.

Se realizaron diez fotomicrografías de las conchas correspondientes a cada grupo de experimentación. Sobre cada fotografía (todas hechas al mismo aumento) se tomaron cinco mediciones de las distintas capas que constituyen la concha.

Con las mediciones obtenidas se realizó la siguiente relación para conseguir un índice de espesor: periostraco/ostraco-hipostraco. Este índice de espesor nos será muy útil a la hora de las representaciones y de poder efectuar el correspondiente Análisis de la Varianza.

### 5.4.- Variaciones en Mg/Ca Durante el Ayuno.

Mediante Absorción Atómica se obtuvieron los datos en c.p.m. (cuentas por millón) de Ca y Mg presentes en la concha y en el hepatopáncreas. Seguidamente, obtuvimos la relación Mg/Ca en el tejido y en la concha.

Los datos obtenidos de este modo los usamos para realizar una recta de regresión, comprobando cómo se comporta una variable frente a la otra (concha frente a tejido).

## **RESULTADOS**



## 1. VARIACIONES EN EL PESO

Las variaciones en el peso de los caracoles sometidos al ayuno han sido el parámetro que primero hemos cuantificado en nuestra experiencia. La toma de datos se ha realizado tal como se explica en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

En la **Tabla I** se muestran los datos correspondientes al índice de pérdida de peso de los diferentes caracoles sometidos a ayuno. El número de individuos por grupo es de 10. Las casillas en blanco se deben al fallecimiento del individuo en cuestión. Se adjunta la media de pérdida de peso por grupo y la desviación típica, como medida de dispersión. El índice de pérdida de peso ha sido calculado por el cociente entre el peso del animal en ayuno y lo que pesaba antes de la experiencia.

$$\text{pérdida de peso} = \text{peso ayuno} / \text{peso alimentado}$$

En la **Gráfica I**, en donde vienen representados mediante gráfica lineal los porcentajes de pérdida de peso por grupo de ayuno, se puede apreciar que a partir de los tres meses existe una pérdida de peso muy marcada estabilizándose la misma a los seis meses.

Cuando se representa el porcentaje de pérdida de peso, mediante un histograma de barras (**Gráfica II**), se pueden apreciar dos grupos diferenciados en cuanto a la pérdida de peso

de los individuos. Un grupo cuya pérdida de peso oscila entre el 10 el 20% y que corresponde a los caracoles ayunados hasta los tres meses y otro grupo que abarca los caracoles sometidos a períodos de ayuno de tres a doce meses y en los que la pérdida de peso oscila alrededor del 40%.

Llegado a este punto se hace preciso realizar un análisis estadístico de los datos con objeto de dilucidar si los diferentes grupos de experimentación se comportan de modo diferente o no. Para ello, se realiza un Análisis de Varianza donde comprobamos la homogeneidad de diversas medias. La hipótesis  $H_0$  es que "todas las medias sometidas a estudio son iguales" y la hipótesis  $H_1$  es que "no todas las medias son iguales".

Realizando el Análisis de Varianza sobre los cinco grupos de experimentación (**Tabla II**) se obtiene que la  $F$  experimental es mayor que la  $F$  teórica ( $F_{ex} > F_{te}$ ), por lo que se rechaza  $H_0$  y se admite  $H_1$ , es decir, no todas las medias son iguales. Así, de un modo general, puede decirse que el ayuno no afecta por igual a todos los grupos de análisis y puede inferirse que la diferencia entre los grupos de experimentación, es el tiempo que los caracoles están sometidos a inanición. Pero al observar el estudio gráfico nos hace sospechar un cierto comportamiento similar entre los grupos de 1 y 3 meses por un lado y 6, 9 y 12 meses por otro. Realizamos el estudio del Análisis de Varianza entre los individuos sometidos a 1 mes y 3 meses (**Tabla III**), obteniéndose unos datos que muestran que la  $F_{ex} > F_{te}$ , por lo que también en ésta ocasión se rechaza  $H_0$  por tanto los individuos de un mes y tres meses se comportan de forma diferente en cuanto a la pérdida de peso durante el ayuno. Cuando esta misma prueba se realiza sobre los caracoles sometidos a ayuno 6, 9 y 12 meses (**Tabla IV**) se comprueba que  $F_{ex} < F_{te}$  y por tanto se acepta  $H_0$ , es decir, todas las medias son iguales por lo que puede afirmarse que los distintos

grupos de experimentación analizados tienen un comportamiento similar frente al tiempo de ayuno.

De este modo, pueden establecerse tres grupos de caracoles según su comportamiento en lo que se refiere a la pérdida de peso durante el ayuno: caracoles de hasta un mes de ayuno, caracoles de tres meses de inanición y caracoles de seis meses de ayuno en adelante.

En resumen con respecto a este primer apartado sobre la pérdida de peso durante el ayuno podemos concluir que:

1.- En los caracoles de un mes existe una pérdida de peso próxima a un 13 %. En este punto se puede inferir que tiempos de ayuno de hasta un mes pueden darse de forma habitual en los períodos de hibernación.

2.- Los caracoles de tres meses presentan una pérdida de peso que se cifra en torno al 20%. Estos tiempos de dormancia se dan preferentemente en lugares con un fuerte período de estiaje, como es propio en la vertiente mediterránea.

3.- En los caracoles de seis meses de ayuno la pérdida de peso está en torno a un 40%. En este grupo comienza a observarse muerte de algunos individuos cifrándose ésta por debajo del 50%. Tiempos tan prolongados de dormancia no se presentan en condiciones naturales.

4.- Los caracoles de nueve meses muestran una pérdida de peso cercana al 40%. En este

## RESULTADOS

período la muerte de los individuos es considerable, de aproximadamente el 50%. Por ello, la medida de dispersión es algo mayor.

5.- Los caracoles de doce meses tienen una pérdida de peso muy similar a los grupos anteriores solo que, en este caso, la muerte de los individuos es mayor superándose, el 50%.

## **2. VARIACIONES EN EL NUMERO DE CELULAS DURANTE EL AYUNO.**

Nuestro propósito en este apartado es determinar la evolución numérica de las células glandulares del hepatopáncreas del caracol durante los distintos períodos de ayuno planteados en nuestro estudio, es decir, al mes, tres, seis, nueve y doce meses. Para ello, tal como se expone en el apartado de Material y Métodos, se hicieron recuentos utilizando como zona de muestreo el campo de visión con el objetivo de 40x y ocular de 10x. En cada observación se contaron de un modo aleatorio, 10 células, anotando las que pertenecían a cada uno de los tipos celulares.

### **2.1.- Células Digestivas.**

Las células digestivas corresponden a una morfología típica, caracterizándose primordialmente por presentar microvellosidades en su superficie apical, un núcleo basal y numerosas vesículas de digestión.

Los datos sobre las distintas observaciones en los recuentos de las células digestivas vienen recogidos en la **Tabla V**. En la primera columna se recogen las distintas observaciones. En la primera fila, los períodos de ayuno y en las casillas la frecuencia relativa de células digestivas en cada observación. Las casillas que contienen el 0 significa la no existencia de células en esa observación y en ese período de ayuno. Cuando se representan gráficamente los valores recogidos en la tabla (**Gráfica III**), se obtiene una curva en la que se observa que el número de células

digestivas durante el ayuno tiende a disminuir. Durante el primer mes de ayuno este número, prácticamente no varía, decrece fuertemente desde los tres hasta los nueve meses y a partir de este periodo de ayuno las células digestivas, al menos con su morfología típica, no aparecen en ninguna observación. Cuando realizamos el estudio del Análisis de Varianza (Tabla VI) entre los grupos donde aparecen células digestivas es decir, en caracoles normales y con, uno, tres y seis meses de ayuno comprobamos que la  $F_{ex} > F_{te}$  por lo que se rechaza la  $H_0$  es decir, al menos una de las medias es distinta a las otras. Cuando el Análisis de Varianza (Tabla VII) se realiza entre los grupos de caracoles alimentados y ayunados un mes se obtiene que la  $F_{ex} < F_{te}$  por lo que se acepta  $H_0$ , lo cual indica que las medias de ambos grupos son muy similares.

Todo lo anteriormente expuesto puede interpretarse en el sentido de que durante el primer mes de ayuno, en donde no existe variación del número de células digestivas, los caracoles utilizan como fuente de recursos energéticos los materiales almacenados en sus numerosas bolsas e inclusiones citoplasmáticas, pero a medida que progresa el ayuno, sobre todo desde los seis a los nueve meses, las células dejan de tener funcionalidad convirtiéndose en fuente de recursos nutritivos. Esto explicaría ese descenso tan fuerte del número de estas células. El dato ya apuntado de que a los nueve y doce meses no aparezcan células digestivas se explicaría en parte por la abundante muerte celular que ocurre a partir de estos periodos y en parte por dejar de mostrar el criterio de diagnóstico típico señalado al principio del presente apartado. Las imágenes correspondientes a las Figuras I a IV muestran imágenes con microscopía óptica donde se pueden ver células de individuos alimentados y ayunados. En estos últimos podemos observar la degeneración y muerte celular propias de los estadios de ayuno.

## 2.2.- Células Excretoras en Ayuno.

Las células excretoras se muestran como células con una forma columnar globosa, con un núcleo de disposición basal y una gran vacuola central ocupando gran parte del citoplasma, rasgos morfológicos y estructurales utilizados para su diagnóstico.

Los datos cuantitativos sobre la evolución del número de estas células durante el ayuno están recogidos en la **Tabla VIII** confeccionada del mismo modo que la **Tabla V**, correspondiente a las células digestivas. La **Gráfica IV** nos muestra la curva correspondiente a la evolución de estas células durante el ayuno. De su observación se desprende que las células excretoras siguen un comportamiento inverso a las digestivas durante el ayuno, esto es las células excretoras aumentan con el ayuno, correspondiendo este incremento en el tiempo con la mayor bajada en el número de células digestivas.

El estudio estadístico de los datos sobre la evolución de las células excretoras durante el período de experimentación (**Tabla IX**) pone de manifiesto que las medias de los diversos grupos son distintas, de modo que la hipótesis  $H_0$  es rechazada. De esta forma el estudio gráfico y estadístico vuelven a ser paralelos, manifestando que la diferencia entre los diversos grupos de estudio radica en un continuo incremento del número de estas células, aumento éste que se hace más patente a partir de los seis meses de experimentación.

### 2.3.- Células Cállicas.

Estas células se presentan como el tipo celular con el rasgo de diagnóstico más típico del hepatopáncreas, puesto que muestran en su citoplasma unas inclusiones de pirofosfatos de calcio y magnesio con una estructura muy definida que hace muy fácil su distinción.

De igual forma que en los casos anteriores, se ha confeccionado una gráfica a partir de los datos recogidos en la **Tabla X**. En esta **Gráfica IV**, puede observarse que el número de estas células permanece invariable durante el primer mes de ayuno y es a partir de él cuando el número relativo se incrementa, siendo este incremento suave hasta los tres meses y muy acusado desde los seis a los nueve meses, estabilizándose a partir de este período.

El estudio estadístico mediante el Análisis de Varianza (**Tabla XI**) demuestra que la hipótesis  $H_0$  es rechazada, dado que las medias son significativamente distintas, pudiéndose inferir que las diferencias entre grupos son producidas por las condiciones de la experimentación. El ayuno hace que el número relativo de células cállicas aumente.

En la **Gráfica VI** se ha realizado una superposición de las tres gráficas referentes a los tipos celulares, pudiéndose apreciar, que existen durante todo el período de experimentación dos tipos generales de comportamiento en lo que se refiere a las variaciones en el número de células. Uno desde recién alimentado hasta los seis meses de ayuno en el que estas variaciones son muy suaves y otro a partir de los seis meses, en el que los cambios son muy drásticos.



## RESULTADOS

Las **Figuras I a IV** nos muestran imágenes a microscopía óptica, de adenómeros representativos de los individuos alimentados y con diferentes períodos de ayuno.

### 3. VARIACIONES EN EL GROSOR DE LA CONCHA.

Las variaciones en el grosor de la concha de los caracoles sometidos a ayuno prolongado han sido cuantificadas, dado que, se habían puesto de manifiesto una serie de modificaciones durante el ayuno, entre las que caben destacar una disminución en el grosor de la concha y una mayor elasticidad de la misma.

La concha es producida por el manto (repliegue del tegumento que recubre la masa visceral) a partir del calcio de los alimentos, siendo su composición de un 98-99% de sales minerales y 1-2% de materia orgánica (conquiolina).

Tal como se aprecia en la Fig. V, la concha se halla constituida por tres capas: una externa o **periostraco**, compuesta por una fina película de materia orgánica (conquiolina), otra media u **ostraco** formada por láminas prismáticas, impregnadas de compuestos cálcicos cristalizados (tipo calcita) en el seno de una matriz proteica y otra interna o **hipostraco**, conjunto de láminas superpuestas, formadas alternativamente por carbonato cálcico cristalizado (tipo aragonito) y conquiolina.

Las variaciones de grosor en la concha han sido medidas tomando la relación Periostraco / Ostraco-Hipostraco. Nuestra hipótesis de trabajo parte de que los términos de la relación

anterior van a tener un comportamiento determinado. Así, el numerador (periostraco) sufre pocos cambios a lo largo del período de experimentación, ya que es la capa más alejada de las células del manto, que se encargarán del depósito y reabsorción de la matriz mineral. El denominador (ostraco-hipostraco) puede sufrir variaciones debidas fundamentalmente a los procesos de deposito y movilización de sustancia mineral.

En la **Gráfica VII**, donde vienen recogidos los cambios producidos en la relación a lo largo del período de experimentación, se puede apreciar que en tiempos de ayuno de hasta tres meses esta relación disminuye con una ligera pendiente. Puesto que el periostraco es de grosor constante, este dato se traduce en un aumento del grosor de la concha.

A partir de los tres meses de ayuno el comportamiento de la gráfica es en sentido opuesto, mostrando un aumento muy marcado de esta relación lo cual significaría una disminución del grosor de la concha.

El estudio estadístico mediante el Análisis de Varianza en este caso no aporta ninguna información complementaria. La hipótesis  $H_0$  se rechaza debido a que las medias no son iguales, ya que cada grupo presenta unas variaciones en el grosor de la concha. Estos cambios vienen producidos por el período de experimentación en sí. Concluyendo, se puede decir que la duración del ayuno influye sobre el espesor de la concha, en el sentido de que el ayuno prolongado provoca una disminución del mismo.

#### **4. RELACION Mg/Ca EN LA GLANDULA Y EN LA CONCHA**

La Concha del caracol está compuesta fundamentalmente de carbonatos de calcio y magnesio. Además, estos iones están implicados en una gran variedad de procesos metabólicos entre los que se encuentran aquellos que disparan la dormancia. Estas razones son las que nos han movido a considerar los cambios de la relación Mg/Ca en la concha y en el hepatopáncreas como es un indicador de la tasa de actividad metabólica.

##### **4.1.- Relación Mg/Ca en la Glándula.**

Según nos ofrece la **Gráfica VIII**, la relación Mg/Ca en el hepatopáncreas se incrementa considerablemente entre 1 y 6 meses de ayuno. A partir de los seis meses de ayuno el valor de esta relación prácticamente se estabiliza (En la **Figura VI** se observan células cálcicas en el hepatopáncreas).

##### **4.2.- Relación Mg/Ca en la Concha.**

En la **Gráfica IX** se puede apreciar la evolución de dicha relación durante el período de experimentación, comprobándose que existe un incremento continuo a lo largo de los doce meses

con una pendiente muy suave.

#### 4.3.- Análisis Estadístico.

Debido a que nos encontramos con dos variables cuantitativas, es obligado determinar las relaciones de dependencia de las mismas. La recta de regresión nos da la existencia de una determinada relación entre variables pero no el grado de dependencia de una con respecto a la otra.

La **Gráfica X** muestra la recta de regresión sobre la nube de puntos, se adjunta el punto de corte de la recta con los ejes y la pendiente de la recta. Dicha recta muestra la existencia de una relación entre las dos variables.

Con objeto de cuantificar el grado de ligazón de las variables calculamos el coeficiente de correlación. El valor de  $r = 0,9257$  y  $r^2 = 0,8569$ , de lo que se desprende que en el 85% de los casos las variaciones de la relación Mg/Ca en la concha y en el órgano están unidas y en consecuencia producidas por el estado alimentario del animal. El 15% restante tiene sus causas en otros agentes externos a la experiencia.

## **5. ACTIVIDAD FOSFATASA ACIDA EN EL AYUNO**

La actividad fosfatasa ácida (FAC) ha sido estudiada con microscopía óptica y electrónica, utilizándose dos agentes de tinción diferentes, las sales de diazonio y el nitrato de plomo, respectivamente.

### **5.1.- Estudio de la FAC con Microscopía Óptica.**

En los cortes procesados para su observación con microscopía óptica, contrastados con sales de diazonio, la actividad fosfatasa ácida aparece muy poco patente, apenas perceptible, en los distintos tipos celulares y en los diferentes períodos de ayuno. Con todo, su lugar de localización preferente es en las **células digestivas** y concretamente en sus numerosas vesículas citoplasmáticas (**Fig. VIIa**). También aparece actividad FAC positiva en la gran bolsa excretora de las células del mismo nombre (**Fig. VIIb y VIIc**). Las **células cálcicas** aparentemente no muestran actividad, si bien ésta puede aparecer bordeando los gránulos cálcicos en las espiras de concreción más periféricas (**Fig. VIIc**).

### **5.2.- Estudio de la FAC con Microscopía Electrónica.**

En el grupo de individuos recién alimentados la actividad FAC aparece en las **células**

**digestivas** con una distribución muy amplia. A nivel citoplasmático se localiza en las diferentes vacuolas de digestión. Hay que distinguir entre las pequeñas bolsas líticas, con un precipitado muy fino e irregularmente distribuido (**Fig. VIIIa**) y aquellas otras vacuolas de mayor tamaño, en las que el producto de reacción electrodensito aparece distribuido de dos formas, bien aglutinado en el centro de la bolsa o bien más disperso ocupando casi todo el interior de la misma (**Fig. IVa**). Las cisternas del retículo endoplasmático y los sáculos golgianos no muestran actividad.

Además de esta localización citoplasmática, existe una actividad muy marcada a nivel de la membrana plasmática en su cara apical y en las microvellosidades. El producto de reacción aparece como un fino precipitado electrodensito, que se extiende de forma irregular a lo largo de toda la microvellosidad (**Fig. VIIIa y b**).

Las **células excretoras** muestran una localización del producto de reacción muy específica, apareciendo éste como una ó varias manchas electrodensas en el interior de la gran vacuola central que ocupa casi todo el citoplasma celular. No aparece actividad en el resto de los escasos orgánulos celulares ni en las microvellosidades (**Fig. IXa y b**).

Las **células cálcicas** muestran una distribución del enzima perfectamente restringida a sus gránulos específicos, los gránulos cálcicos. El producto de reacción aparece localizado a nivel de las membranas que constituyen sus anillos de crecimiento, sobre todo en los anillos más periféricos y de forma patente en el centro del gránulo. Los gránulos cálcicos que aparecen vacíos no muestran anillos de crecimiento por haber saltado su contenido en el proceso del corte (**Figs. X**

y XI).

En el grupo de caracoles ayunados un mes, el enzima muestra la misma distribución que en el grupo anterior de caracoles recién alimentados, ofreciendo imágenes muy semejantes.

Los caracoles correspondientes a los períodos de tres y seis meses de ayuno muestran una distribución de la actividad fosfatasa ácida muy similar. La actividad FAc se localiza en las vacuolas digestivas de las células del mismo nombre. La diferencia esencial con los grupos de experimentación anteriores radica en que en estos niveles de ayuno no aparece ya actividad enzimática a nivel de microvellosidades y membrana plasmática (**Fig. IX**). Las células excretoras siguen mostrando actividad exclusivamente a nivel de su gran vacuola central. La actividad en las células cálcicas sigue apareciendo a nivel de los gránulos cálcicos, con una distribución en los mismos muy semejante a la mostrada en estadios anteriores (**Figs. X y XI**).

A los seis y nueve meses de ayuno sigue apareciendo actividad fosfatasa ácida en la vacuolas digestivas (**Fig. XII y Fig XIII**). En este estadio aparecen las células con una menor altura y con sus núcleos desplazados hacia porciones más apicales (**Fig. XIIIa**). Las células muestran signos de destrucción y muerte celular con citoplasma de aspecto claro, con bolsas o vesículas sin apenas contenido y algunas con restos muy electrodensos. Los núcleos aparecen muy heteropicnóticos (**Fig. XIIIa**).

Al final de la experiencia, doce meses de ayuno, podemos ver una mayor destrucción celular con imágenes donde aparecen numerosos restos celulares, presumiblemente procedentes



de las **células digestivas**, que dan positiva la reacción para la fosfatasa ácida (**Fig. XIV**). Son muy frecuentes los casos de células que muestran un marcado síntoma de muerte celular. En las **células excretoras** aumenta el número de vacuolas existentes en su citoplasma, mostrando actividad en las mismas. Los gránulos cálcicos de las **células cálcicas** muestran actividad enzimática a nivel de los anillos de crecimiento, hecho que es constante a lo largo de todo el período de experimentación.

## **6. ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA EN EL AYUNO**

La actividad fosfatasa alcalina (FAI) ha sido relacionada generalmente con procesos de secreción proteica, pero en el hepatopáncreas del caracol adquiere una gran importancia debido a su relación con los fenómenos de movilización de la matriz del conjuntivo, como se verá posteriormente.

Igual que la actividad enzimática FAc, la FAI se ha estudiado a dos niveles: a microscopía óptica y a microscopía electrónica. En el primer caso se usan las sales de diazonio y en el segundo las sales de plomo como agentes acoplantes, pudiéndose observar que en ambos casos se obtienen imágenes equiparables.

### **6.1.- Estudio de la FAI con Microscopía Óptica.**

La **Figura XV** muestra secciones de glándula digestiva de animales en diversos períodos de ayuno (normal, 1, 3 y más de seis meses) en las que la actividad FAI aparece localizada en la base de los diferentes adenómeros, en el conectivo, rodeándolos en todo su perímetro. Se puede observar que, a este nivel, no existen diferencias apreciables en cuanto a la intensidad y distribución de la actividad fosfatasa alcalina durante los períodos de ayuno indicados.

## 6.2.- Estudio de la FAI con Microscopía Electrónica.

Con microscopía electrónica de transmisión se puede localizar de un modo más preciso la localización y distribución del enzima. Con esta metodología, la actividad enzimática FAI se ha encontrado asociada principalmente al conjuntivo que rodea a los adenómeros. Estas observaciones son compatibles con lo observado a nivel de Microscopía Óptica.

En individuos recién alimentados y con un mes de ayuno, la actividad enzimática se localiza en los espacios intercelulares, asociada a la membrana plasmática de los fibroblastos. También aparece actividad FAI bordeando a las gotas lipídicas de las células glandulares (**Figura XVI y XVII**).

En los individuos de tres, seis, nueve y doce meses de inanición, la actividad FAI sigue apareciendo localizada en el conectivo basal (**Figura XVIII**) que aparece cada vez más desorganizado como consecuencia del incremento de los períodos de ayuno.

## **7. ACTIVIDAD ESTERASA INESPECIFICA EN EL AYUNO**

La actividad esterasa inespecífica ha sido estudiada siguiendo las pautas de las actividades anteriormente indicadas. Primero se estudia a nivel de microscopía óptica con sales de diazonio y en segundo lugar con microscopía electrónica, siendo el agente acoplante el nitrato de plomo.

### **7.1.- Estudio de la Esterasa con Microscopía Óptica.**

La actividad esterasa inespecífica (**Figura XIX**) se encuentra ampliamente distribuida en dos de los tres tipos celulares del hepatopáncreas del caracol, esto es en las células digestivas y células excretoras.

En las células digestivas aparece una marcada actividad a nivel citoplasmático en las diferentes vesículas de digestión. Las células excretoras muestran actividad enzimática en la gran vesícula excretora que ocupa casi todo el citoplasma celular.

Durante los distintos períodos de ayuno no aparecen diferencias apreciables de actividad enzimática, a nivel de microscopía óptica, si bien los procesos de lisis celular se ven muy incrementados a medida que aumenta el ayuno, sobre todo en los períodos más avanzados, 9 y

12 meses, tal y como se aprecia en la **Figura XIXd**.

#### **7.2.- Estudio de la Esterasa con Microscopía Electrónica.**

Las observaciones realizadas con microscopía electrónica sobre secciones de glándula digestiva en orden a determinar la actividad esterasa inespecífica en los distintos grupos de caracoles sometidos al ayuno, nos ha permitido determinar dos grandes grupos en lo que actividad enzimática se refiere: uno estaría constituido por los caracoles recién alimentados hasta tres meses de inanición y otro a partir de los tres meses hasta el año de ayuno.

El primer grupo (**Figura XX y XXI**) muestra actividad enzimática de forma generalizada en los tres tipos celulares de los adenómeros, localizándose el producto de reacción en las células digestivas y excretoras a nivel del citoplasma extravacuolar y en las células cálcicas, además de una localización citoplasmática, es muy llamativa la fuerte reactividad en los espacios más periféricos de los gránulos cálcicos. Es también, muy apreciable la presencia de una fuerte actividad en los espacios intercelulares.

El segundo grupo, partir de tres meses de ayuno, sigue apareciendo actividad en los tres tipos celulares, si bien esta actividad es más patente en la células excretoras (**Figs. XXII, XXIII**). La localización a nivel celular sigue siendo en el citoplasma extravacuolar y en los grumos electrodensos del interior de las vacuolas. En estos estadios de ayuno no se aprecia actividad esterasa en los espacios intercelulares.

## 8. MUERTE CELULAR.

Bajo este término se engloban dos procesos, uno entendido como un proceso fisiológico que tiene como función el mantenimiento de la morfología del tejido (recambio celular), y otro que surge del cambio ambiental de las condiciones en las que se desarrolla la célula (Bessis 1964).

El primer tipo, llamado apoptosis, lleva consigo una progresiva contracción del volumen celular, condensación de la cromatina y preservación de los orgánulos citoplasmáticos. Las células afectadas por este proceso son fagocitadas por células adyacentes. El segundo tipo, llamado necrosis, se caracteriza por el edema que culmina en la ruptura de la membrana plasmática y membranas internas, con el consiguiente vertido del contenido celular al espacio extracelular.

En nuestro caso, como rasgo de diagnóstico de muerte celular hemos tomado la morfología y estructura de los diversos tipos celulares con características de apoptosis y/o necrosis durante el proceso de experimentación. Ello se ha realizado mediante la observación de las imágenes obtenidas tanto a microscopía óptica como electrónica.

En individuos alimentados no se observaron imágenes celulares con rasgos morfológicos que pudieran catalogarse como de muerte celular (Figuras VIII y I).

En caracoles que han estado ayunando durante un mes las imágenes son muy similares

a las que se presentan en los individuos alimentados, (**Figuras XVb, XIXb, II**), es decir no aparecen signos de muerte celular.

En los especímenes que han ayunado durante tres meses empiezan a aparecer imágenes de células que podrían estar entrando en un proceso de degeneración celular. Estos primeros signos de muerte se manifiestan a nivel del conjuntivo basal con imágenes de una mayor desorganización del mismo y una condensación de la cromatina, (**Figs. XXIV, XVII, XVIII, XIXb**).

En los especímenes que han estado en inanición durante seis, nueve y doce meses se observa que las células digestivas muestran una disminución de sus microvellosidades, un acortamiento de la longitud celular, los núcleos dejan de ser basales, la cromatina de los mismos se condensa y el citoplasma aparece casi en su totalidad vacío. También, se observan numerosos restos celulares procedentes de la lisis celular. De este modo, podríamos encontrarnos en algunos casos, frente a un fenómeno similar a la necrosis y en otros semejante a la apoptosis (**Figuras VIIc, XII, XIII, XIV, XVc, XIXc, XXV, I, XXVII**).

Concluyendo podemos afirmar que los fenómenos de muerte celular en las células hepatopancreáticas del caracol común se inician a partir de los tres meses de ayuno, siendo éstos muy patentes partir de los seis.

## **DISCUSIÓN**



### 1. VARIACIONES EN EL PESO

El ayuno prolongado es una de las causas que inducen el estado de dormancia en una gran variedad de organismos y, entre ellos, en el caracol común Helix aspersa. Uno de los parámetros que más se ve afectado por el ayuno prologado es la pérdida de biomasa. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la pérdida de peso de los animales durante el ayuno, permiten afirmar que el ayuno produce una progresiva pérdida de peso durante los seis primeros meses hasta un 40% del peso inicial. Mayores pérdidas de peso parecen no permitir la supervivencia del individuo.

Las variaciones estacionales que provocan que los caracoles terrestres entren en un estado de dormancia son: la temperatura, humedad y disponibilidad de recursos, entre otros. Ello hace que los caracoles entren en un proceso descrito por diversos autores, que se caracteriza por un aumento de la presión parcial de anhídrido carbónico en los tejidos y una pérdida de agua corporal (Burton, 1965), lo cual provoca una disminución de la tasa metabólica (Herreid, 1977; Barnhart y Mahon, 1987).

En nuestro trabajo hemos encontrado que la pérdida de peso en los grupos de 1 mes y 3 meses de ayuno es muy similar y poco marcada, siendo inferior al 18%. En los grupos de 6, 9 y 12 meses la pérdida de peso esta próxima al 40%. Estos datos están por debajo de los obtenidos por Russell-Hunter y Eversole (1976) en Gasterópodos Pulmonados, que establecía que el ayuno durante 132 días produce una pérdida de biomasa de aproximadamente el 50%, ó como los

ofrecidos por Emerson (1967), que también en Gasterópodos Pulmonados encontró una pérdida de peso del 62,3%, para el mismo periodo. Esta mayor pérdida de peso apuntada por estos autores puede deberse, en parte, a las condiciones ambientales en las que se encuentren los individuos durante la fase de experimentación, puesto que la temperatura ambiente y la falta de humedad afectan a la pérdida de agua por transpiración, favoreciendo que el animal pierda más peso.

En nuestro entorno, períodos de ayuno de hasta tres meses se dan de forma natural durante las estaciones de verano e invierno, teniendo los caracoles mecanismos fisiológicos para afrontar estos períodos de ayuno. De nuestros resultados se desprende que estos periodos de ayuno no agotan las reservas del animal, que no llega a alcanzar el 20% de pérdida de peso. Así, el individuo puede soportar ayunos ligeramente superiores a tres meses, si excepcionalmente se ve obligado a ello.

La pérdida de peso que ocurre durante los 3 primeros meses de ayuno comporta que el animal consuma parte de sus reservas almacenadas en las numerosas vesículas digestivas de las células del hepatopáncreas. En este sentido, Piretti et al (1987, 1988) y Deslous-Paoli et al (1988) estudiaron las variaciones estacionales de lípidos en diversos órganos de moluscos bivalvos acuáticos y concluyen que la mayor abundancia de lípidos se da en primavera y en el hepatopáncreas, siendo estos en su mayor parte insaturados. Almendros (1980) en estudios morfométricos con microscopía electrónica puso de manifiesto que el número de gotas lipídicas disminuye con el ayuno (3 meses), si bien, estas aumentan de tamaño. Lo anteriormente indicado concuerda con los datos obtenidos para otros moluscos. Así, en moluscos bivalvos, se ha puesto de manifiesto una movilización de los recursos lipídicos desde el hepatopáncreas, que van a ser consumidos en los procesos metabólicos que requieran la obtención de energía. Entre estos

procesos se encuentra la maduración sexual (Pollero et al 1979), siendo de resaltar que los caracoles terrestres tienen dos períodos fértiles, otoño y primavera, que coinciden con la salida de períodos como el invierno y verano en donde el individuo permanece en estado latente.

Williams (1970) indica que en Littorina littorea, existen cambios estacionales en la composición de lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos recursos serán movilizados en los períodos de no alimentación, cuando se produce la maduración de las gónadas. De este modo, el autor establece una correlación entre la movilización de recursos y la maduración de las gónadas, que sigue un modelo muy similar en machos y hembras.

Idéntica sugerencia se desprende del estudio de Durfort (1982) sobre las concreciones minerales del hepatopáncreas de Trachydermon cinereus. En dicho estudio encuentra que los ejemplares de menor tamaño en fases de inmadurez sexual registran mayor presencia de litosomas, por lo que considera que las concreciones podrían tener un carácter de reserva temporal, más que una función excretora.

En lo que se refiere a los caracoles sometidos a 6, 9 y 12 meses de ayuno las pérdidas de peso, alrededor del 40%, que sufren los distintos grupos no son significativamente distintas. Ello supone esta pérdida llega a un punto crítico, a partir del cual la bajada en el peso lleva aparejado un aumento drástico en la muerte de los individuos, siendo esta muerte superior al 60% en los caracoles de 12 meses de inanición. El tiempo que el individuo podrá soportar el ayuno dependerá de forma directa de la masa corporal disponible. Así, los individuos que más pesan soportan más tiempo de inanición (Herreid, 1977).

En nuestra opinión, los caracoles sometidos a un ayuno prolongado pasan por dos fases digestivas

muy marcadas. En primer lugar existiría una fase de digestión intracelular de carácter heterofágico, con una movilización de sus reservas, fundamentalmente lipídicas, que se prolongaría hasta los seis meses de ayuno y en segundo lugar, a partir de los 6 meses de inanición, se dispararían los procesos autofágicos que conllevarían a una mayor pérdida de masa corporal hasta un punto crítico del 40% a partir de cual la muerte de los individuos se dispararía. Otros autores, en Gasterópodos pulmonados, ponen el límite de pérdida de peso en el 50% (De Jorge y Petersen, 1970; Russell-Hunter y Eversole, 1976; Russell-Hunter et al 1983).

## 2. SOBRE LAS VARIACIONES EN EL NUMERO RELATIVO DE LAS CELULAS DEL ADENOMERO HEPATOPANCREATICO.

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 1965, 1966a; Walker, 1970; Almendros, 1988). Nosotros hemos considerado que son tres los tipos celulares que constituyen el adenómero hepatopancreático: digestivas, excretoras y cálcicas.

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 estos tipos coincidan, es decir que algunas células que ofrecen caracteres estructurales diferentes no serían sino la observación de momentos metabólicos diferentes de un mismo tipo celular. Tal posibilidad ha sido apuntada para las células digestivas-excretoras (Fretter, 1952; Billet y Mc Gee-Russel, 1955; Almendros, 1980), células digestivas-cálcicas (David y Gotze, 1963) y excretoras-cálcicas (Thiele, 1953; Sumner, 1965).

En nuestra opinión, parece muy 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.

La situación de ayuno en los caracoles provoca en las células de la glándula digestiva variaciones estructurales tales que, si el tiempo es muy prolongado, pueden llevar hasta la muerte celular, probablemente por la acción autolítica de la gran variedad de cuerpos densos existentes en el citoplasma de estas células. Trabajos en este sentido existen pocos (Sumner, 1965; Almendros, 1980) y ninguno en lo que se refiere a estudios encaminados a determinar cómo evoluciona la proporción de los diferentes tipos celulares de la glándula digestiva de invertebrados durante el ayuno.

Nuestros resultados demuestran que la proporción de las **células digestivas** disminuye a medida que progresa el ayuno. Durante el primer mes la situación es muy semejante a la de los caracoles recién alimentados. La disminución aparece hacia los tres meses de ayuno siendo muy marcada entre los 6 y 9 meses. A partir de nueve meses de ayuno ya no aparecen células digestivas, al menos con su morfología típica.

De estos datos puede interpretarse que durante el primer mes de ayuno los individuos utilizan, como recursos nutritivos, materiales almacenados en sus numerosas vesículas de digestión manteniéndose la glándula en una situación casi invariable con respecto al estado de caracol recién alimentado. A medida que progresa el ayuno, sobre todo desde los 3 a los 9 meses, la bajada progresiva del número de células tendría una explicación funcional en que las propias células se convierten en recursos nutritivos. Esta afirmación está avalada por las numerosas observaciones en las que las células digestivas muestran un alto contenido en vacuolas autofágicas, apareciendo también imágenes de muerte celular, que son más abundantes a medida que aumenta el ayuno. El hecho de que a partir de los 9 meses de inanición no se hayan encontrado células digestivas se explica en parte por la abundante muerte celular y las pocas células digestivas que

pudieran sobrevivir se encuentran en estados finales de digestión, ofreciendo la mayor parte de su citoplasma ocupado por grandes cuerpos residuales, que las hace comparables a las células excretoras.

De los datos cuantitativos sobre la evolución de las **células excretoras** durante el ayuno se deduce que las células excretoras presentan un comportamiento diferente al de las digestivas, es decir, que a medida que aumenta el ayuno la proporción de células excretoras aumenta. En nuestra opinión este dato cuantitativo apoya la opinión de autores (Fretter, 52; Billet y Mc Gee-Russell, 1955) en el sentido de que la célula excretora es un estadio final de la digestiva en los últimos momentos de su ciclo funcional. Además está en la línea de las afirmaciones de Sumner (1965) según el cual por encima de los 65 días es imposible distinguir entre las células digestivas y excretoras. A partir de los 3 meses de inanición es cuando el número de células excretoras aumenta sensiblemente coincidiendo con el descenso pronunciado de las digestivas, lo que está a favor de que los procesos líticos eminentemente autofágicos tienen lugar en estos períodos de ayuno.

En lo que se refiere a las **células cálcicas**, su número sufre un incremento a partir del mes de ayuno y progresa hasta los 9 meses, período a partir del cual el número de células permanece prácticamente constante. Este incremento relativo podría explicarse suponiendo que no se produce un aumento en términos absolutos del número de células cálcicas, sino que dicho aumento sería debido a la muerte celular que se produce sobre todo a partir de los 6 meses de ayuno, la cual afectaría eminentemente a las células digestivas y excretoras, no afectando a las células cálcicas, que se encargan de regular el equilibrio ácido-base del fluido corporal (Ducan, 1987; Gores et al, 1988; Poste, 1971).

### 3. SOBRE LAS VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN IÓNICA

El estado de dormancia es un estado que se caracteriza por la espera de condiciones favorables para que el caracol pueda continuar sus procesos vitales de nutrición, relación y reproducción. Este estado viene determinado por diversos factores ambientales y nutricionales que, a su vez, determinan unos cambios metabólicos que son, en último término, los responsables de que el animal entre en estado de dormancia.

Durante la hibernación, los animales experimentan una bajada importante de la tasa metabólica y del pH intracelular. Para compensar esta bajada los caracoles realizan un reajuste iónico, siendo el calcio y el magnesio los iones eminentemente implicados en este proceso. Además, es importante reseñar que en el caracol los grandes reservorios de estos iones son la concha, cuya composición es fundamentalmente a base de carbonato cálcico y magnésico, y el hepatopáncreas. La hemolinfa es el vehículo de transporte de los mismos. Por ello, vamos a comentar de forma global los hallazgos referentes a las variaciones en el grosor de la concha y a los cambios en la relación Mg/Ca (como una medida de la tasa metabólica), tanto en la concha como en el hepatopáncreas, durante el ayuno prolongado.

Durante períodos relativamente cortos de ayuno, concretamente hasta los tres meses, se aprecia un ligero aumento del grosor de la concha, debido seguramente a un ligero depósito de sales, fundamentalmente carbonatos de magnesio y calcio, en las capas inferiores de la concha, esto es en el hipostraco y ostraco. Estas sales serían transportadas por la hemolinfa desde lugares



que actúan como reservorios, como el hepatopáncreas, hasta las citadas capas, a través del epitelio del manto.

Cuando analizamos los resultados sobre la evolución de la **relación Mg/Ca** en la concha durante estos primeros meses de ayuno, se aprecia que dicha relación crece muy suavemente. Este crecimiento puede deberse a diversas causas: bien a una disminución del calcio, bien a una subida del magnesio, ó bien a una subida de ambos iones, subida que afectaría en mayor proporción al magnesio que al calcio. En nuestra opinión esta última posibilidad sería la correcta, coincidiendo con las opiniones de Burton (1972), en el sentido de que ambos iones, Mg y Ca, están correlacionados. Además, estaría en concordancia el ligero incremento del grosor de la concha, que sería debido a la incorporación de sales de Mg y Ca durante estos primeros períodos de ayuno. Estos datos también son corroborados por McNabb (1985), el cual, estudiando los fenómenos de osmorregulación, llega a la conclusión de que los iones Mg y Ca están correlacionados.

En el **hepatopáncreas**, durante este primer período de ayuno, la **relación Mg/Ca** aumenta muy suavemente. Este dato puede interpretarse en el sentido de que existe una movilización de iones calcio desde el hepatopáncreas hacia la linfa para intervenir en la compensación de la acidosis metabólica y respiratoria que se produce durante la dormancia (Busa, 1984). Además, este calcio liberado desde las células cálcicas podría utilizarse, como apunta Williams (1970), para procesos de crecimiento y maduración sexual que se producen durante el estiaje.

De lo comentado hasta ahora para períodos de ayuno de hasta tres meses, se puede inferir que los caracoles de vega Helix aspersa soportan con bastante normalidad estos períodos

de ayuno, siendo las variaciones de los parámetros medidos, como el peso de los individuos, el número relativo de sus células hepatopancreáticas y balance iónico, muy poco pronunciadas. Estos períodos de ayuno pues, pueden darse de forma natural en condiciones ambientales de fuerte sequedad como ocurre en el verano mediterráneo o bien en el invierno por la bajada de las temperaturas.

Para períodos de ayuno largos, concretamente seis o más meses, la curva correspondiente a la evolución de la relación periostraco/ostraco-hipostraco sufre una fuerte inflexión con una pendiente muy acusada, que indica una disminución muy marcada del grosor presumiblemente determinada por una liberación de iones Ca y Mg desde las capas más profundas de la concha. Cuando analizamos la curva correspondiente de la evolución de la relación Mg/Ca en concha para estos períodos avanzados de ayuno, se comprueba, igual que para la curva anterior, un fuerte aumento de esta relación, posiblemente provocada por una bajada muy drástica del contenido de calcio en concha y, por tanto, por una liberación de sales cálcicas fundamentalmente carbonato cálcico. De acuerdo con Burton (1972, 1987) y Busa (1984), que este flujo de iones magnesio y calcio desde la concha tendría como objetivo contrarrestar la acidosis metabólica y respiratoria provocada por el ayuno prolongado, realizando un efecto tampón tanto a nivel del fluido extracelular como de la hemolinfa.

Del análisis de la evolución de la curva de la **relación Mg/Ca** en el **hepatopáncreas** se desprende que esta relación aumenta de forma muy suave hasta los seis meses, estabilizándose a partir de este período. Esto puede interpretarse suponiendo que desde los tres a los seis meses de ayuno es cuando fundamentalmente hay una incorporación de calcio a la célula, explicada por la necesidad de contrarrestar la bajada de  $pH_i$  que se produce durante el ayuno. Ello está de

acuerdo con lo apuntado por Alvarez-Leefmans et al (1981), en experiencias en donde produce una acidificación experimental en neuronas de Helix aspersa, comprobando que los niveles de calcio intracelular aumentan.

En conclusión, podemos afirmar que períodos de ayuno de más de tres meses son críticos para los caracoles, pues a partir de estos momentos los indicadores hasta ahora estudiados sufren fuertes cambios en su comportamiento normal.

#### 4. ACTIVIDAD FOSFATASA ACIDA EN EL AYUNO

La riqueza lisosomal de las células del hepatopáncreas de Moluscos es un hecho bien constatado en la bibliografía (Billet y Mc Gee-Russell, 1955; Sumner, 1965, 1966a, 1969; Walker, 1970; Bowen y Davies, 1971; Owen, 1972; Moore 1985, 1987, 1990, 1991; Köhler, 1989, 1990). Este sistema lisosomal está implicado en una gran variedad de funciones, entre las que destaca la digestión intracelular de alimentos (Owen, 1972), siendo este tipo de digestión el más ampliamente utilizado por los Gasterópodos Pulmonados, entre los que se encuentra el caracol común Hélix aspersa. Además, esta modalidad de digestión alcanza mayor desarrollo durante los períodos de hibernación a los que, con frecuencia, se encuentran sometidos los caracoles.

Las hidrolasas ácidas constituyen los enzimas lisosomales por excelencia, siendo la fosfatasa ácida la más representativa de las mismas y considerada como marcador lisosomal (De Duve et al, 1955). Por ello, en el estudio hemos evaluado la actividad de este enzima durante los amplios períodos de ayuno a los que han sido sometidos los caracoles. No obstante, la fosfatasa ácida puede tener una localización no lisosomal, como ocurre con la fosfatasa ácida prostática, que está contenida en gránulos de naturaleza secretora (Drenckhahn et al, 1987). En consecuencia, la verificación de otras hidrolasas, como las aril-sulfatasa y estererasas refuerzan el carácter lisosomal de la estructura en cuestión. En nuestro estudio, junto a la fosfatasa ácida, se ha utilizado las estererasas no específicas como marcadores lisosomales.

Nuestros resultados a nivel de microscopía opica, han puesto de manifiesto una actividad

fosfatasa ácida muy poco marcada que se localiza en los tres tipos celulares, preferentemente a nivel de las vacuolas de las células digestivas. Esta actividad no presenta apenas variación durante los diferentes tiempos de ayuno a los que han estado sometidos los caracoles. A microscopía electrónica, la actividad enzimática fosfatasa ácida muestra una localización en los tres tipos celulares con una distribución en las vacuolas digestivas y microvellosidades de las células digestivas, gran vacuola excretora de las células excretoras y espiras de los granos cálcicos en las células cálcicas. Esta localización persiste durante todo el ayuno, con la salvedad de que a partir de los tres meses de inanición no aparece actividad a nivel de las microvellosidades de las células digestivas. La presencia de actividad en los tres tipos celulares hepatopancreáticos y una apenas perceptible variación de la misma durante los períodos de ayuno ha sido apuntada por Sumner (1969) en Mytilus edulis y Hélix aspersa.

El hecho de que la intensidad de la actividad fosfatasa ácida, a microscopía óptica no sea muy elevada puede deberse a la existencia de cierto grado de difusión del producto primario de reacción cuando se utiliza, como en nuestro caso, el sustrato alfa naftil fosfato, posibilidad igualmente apuntada por Sumner (1969). Algunos autores, como Bowen y Ryder (1975), han indicado que la utilización de otro sustrato como el p-nitrofenil fosfato da buenos resultados en la demostración de la fosfatasa ácida en algunos invertebrados, como la planaria. La dificultad derivada de la difusión del producto primario de reacción ha sido soslayada en nuestro estudio utilizando la microscopía electrónica de transmisión como medio de observación para la demostración citoquímica de la fosfatasa ácida. En efecto, los resultados obtenidos con esta segunda técnica, utilizando como sustrato el  $\beta$ -glicerol fosfato, que da un producto de reacción final menos difusible, han permitido una localización más precisa del enzima y una mayor intensidad del producto electrodensito.

De los tres tipos celulares, es en las células digestivas donde la reacción alcanza mayor entidad, dado que son las células eminentemente implicadas en la digestión intracelular (Milot, 1937; Rosen, 1941, 1952; Prosser y Brown, 1965; Wilburg y Yonge, 1966). El hecho de que el producto de reacción se localice a nivel citoplasmático, en las pequeñas vesículas apicales y en las bolsas de mayor tamaño, indica que estos gránulos o bolsas son lisosomas implicados en diversas fases de digestión intracelular. No obstante, la actividad fosfatasa ácida también puede encontrarse libre en el citoplasma y no dentro de lisosomas, como ocurre en ciertos procesos relacionados con la muerte celular (Bowen et al, 1988). Además de esta localización citoplasmática, se ha puesto de manifiesto la presencia de una fuerte actividad a nivel de las microvellosidades de las células digestivas en todos los caracoles alimentados y ayunados hasta los tres meses. Bowen y Davies (1971) y Bowen et al, (1988) encuentran también esta localización extracitoplasmática de la fosfatasa ácida, estudiando la glándula digestiva de Arion hortensis. De igual manera, se ha descrito una actividad fosfatasa ácida no relacionada con el Golgi, que es transportada desde la superficie celular (Braun y Waheed, 1989). Es particularmente interesante esta localización extracitoplasmática de la fosfatasa ácida, ya que podría explicar las imágenes que hemos obtenido a microscopía electrónica en las que aparece actividad fosfatasa ácida en las pequeñas vacuolas apicales. De esta forma, el enzima se internalizaría desde la superficie celular hasta el interior, donde formaría vesículas de digestión o fagosomas. Al hilo de lo anteriormente expuesto, Holtzman (1989) indica la existencia de un posible mecanismo en el que el enzima sería exportado al exterior de la célula como un precursor fosforilado inactivo para posteriormente ser internalizado mediante un receptor de membrana, la manosa-6-fosfatasa (M6P). Durante esta internalización, el precursor del enzima se desfosforila y se reordena, obteniéndose de esta forma lisosomas con enzimas hidrolíticas activas. Holtzman (1989) describe la existencia de dos tipos de

receptores de la M6P, uno de ellos de 215 kd, independiente de cationes, y otro de 46 kd, catión dependiente. Por tanto la M6P parece tener un papel muy importante en la ordenación y empaquetamiento de los enzimas lisosomales, cuando éstos siguen una ruta alternativa al GERL. De esta forma, podría explicarse la no aparición de actividad en los sáculos y vesículas golgianas, si bien otros estudios, como el inmunomarcaje de la M6P, el uso de la peroxidasa de rábano o el uso de la ferritina cationizada, podrían realizarse con objeto de arrojar nuevas luces sobre el tema.

El patrón de distribución de la fosfatasa ácida desaparece en parte con el ayuno, puesto que a partir de los 3 meses de inanición no existe actividad enzimática en las microvellosidades. Esto podría explicarse suponiendo que a partir de un mes de ayuno (último grupo de experimentación en donde aparece actividad en las microvellosidades de las células digestivas) no existen alimentos a introducir en estas células absorbentes y por tanto desaparecería la necesidad de ubicación extracitoplasmática del enzima.

Las células excretoras muestran una fuerte reacción fosfatasa ácida positiva en el interior de su gran vacuola central, dato equiparable con el ofrecido por Bowen y Davies (1971). Esta gran bolsa lítica, en el esquema de digestión propuesto a través de nuestro estudio equivaldría a un gran cuerpo residual con los restos indigeribles de la digestión, equivalente a los granos de pigmento de lipofuscina. Como es bien sabido, la lipofuscina es un producto de la actividad lisosomal (Essner y Novikoff, 1960; Novikoff et al 1963; Björkerud, 1964; Miyawaki, 1965). Este resultado citoquímico constituiría un dato más en el fortalecimiento de la hipótesis de que la célula excretora corresponde a la imagen funcional de la digestiva en los últimos estadios de digestión.

La actividad fosfatasa ácida que aparece en las espiras de concreción de los gránulos cálcicos en las células cálcicas podría corresponder, como apunta Howard et al (1981), a una pirofosfatasa que, localizada a nivel de la matriz proteica del gránulo, sería la encargada de sintetizar los pirofosfatos cálcicos y magnésicos que constituyen la porción mineral de dichos granos. La presencia de dicha actividad a lo largo de todo el período de experimentación tiene su explicación o fundamento en la persistente movilización de los iones Ca y Mg durante todo el ayuno. Dichos iones van a ser necesarios para procesos de intercambio iónico a nivel de concha (Abolins-krogis, 1963b, 1968, 1986; Becker et al, 1974; Beeby y Richmond, 1988; Weiner, 1983), en procesos de maduración sexual (Durfort, 1985; Griffond y Bolsoni-Sugar, 1986; Prosi y Dallinger, 1988) y fundamentalmente para un efecto tamponador en la hemolinfa (Burton, 1965, 1970, 1974; Burton y Jaufeerally 1976; Burton et al, 1987; Busa y Nucitelli, 1984).



## 5. ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA EN EL AYUNO

De forma tradicional se vienen describiendo tres tipos de fosfatasas alcalinas (Owen y Bhalla, 1983; Garattini et al, 1985; Brière, 1986) que con gran probabilidad se corresponden con los siguientes tres tipos de isoenzimas: fosfatasas alcalinas de placenta, fosfatasas de intestino y fosfatasas de hígado. Otros tipos, como las fosfatasas puestas de manifiesto en el epitelio pigmentario retiniano, riñón y hueso, corresponden al mismo tipo de isoenzima que la del hígado.

La actividad fosfatasa alcalina se utiliza generalmente como un marcador de membrana plasmática, si bien su papel funcional no es demasiado claro. Además dicha actividad ha sido tradicionalmente relacionada con procesos de secreción proteica (Hoffman y Wright, 1985), regulación iónica (Dow y Havey, 1988; Dow y Peacock 1989), mantenimiento de la alcalinidad del jugo intestinal (Azuma et al, 1991), así como con otros procesos como los relacionados con la remodelación del conjuntivo (Deporter y Tencate, 1973; Tencate y Syrbu, 1974; Cole y Wezeman, 1987).

En el caracol, la actividad fosfatasa alcalina ha sido generalmente relacionada con procesos de absorción de nutrientes a nivel del intestino, pero en el hepatopáncreas presumiblemente la fosfatasa alcalina esté implicada en procesos de reabsorción proteica y de acumulación de iones (Kryztofiak et al, 1983; Bielawski y Kesa, 1986).

Nuestros resultados ofrecen una localización preferente de la actividad enzimática en los espacios intercelulares y en el límite entre las porciones basales celulares y el conjuntivo que envuelve al adenómero. También aparece actividad fosfatasa alcalina asociada a las gotas lipídicas de las células digestivas. Estas observaciones han sido confirmadas en los dos niveles de observación, microscopía óptica y electrónica, durante todo el tiempo de experimentación, si bien a partir de los seis meses de ayuno la localización en el conjuntivo es apenas perceptible, dada la gran desorganización que sufre este tejido a causa del ayuno prolongado.

Este patrón de distribución de la fosfatasa alcalina obtenido en nuestro estudio está en consonancia con los resultados ofrecidos por diversos autores. Así, Mayahara et al (1967), utilizando como agente de captura el citrato de plomo para la demostración de la fosfatasa alcalina no específica, encuentra actividad enzimática positiva en las células del intestino de rata a nivel de la superficie lateral de células adyacentes y en los espacios intercelulares. También Korte et al (1991), utilizando un agente acoplante el nitrato de plomo, encuentra una distribución de la actividad fosfatasa alcalina en los espacios laterales intercelulares y en las membranas basales, así como en el conectivo basal del epitelio pigmentario de la retina del conejo. Por otra parte Yoshioka et al (1988), en el epitelio del plexo coroideo de ratas, encuentra esta actividad en las membranas apicales y basolaterales de estas células. Sin embargo, nosotros también hemos obtenido una localización de FAI a nivel de las bolsas lipídicas de las células digestivas, dato no ofrecido por otros autores.

Diversas hipótesis pueden explicar esta localización laterobasal y conjuntiva de la fosfatasa alcalina en el hepatopáncreas del caracol. Quizás la más convincente sea que este enzima esté estrechamente relacionada con la degradación del colágeno por los fibroblastos, tal como apunta

Tencate y Sirbus (1974). Igualmente, Deporter y Tencate (1973) abundan en esta idea, apuntando que la matriz conjuntiva está sometida a un continuo recambio en donde van a tener un papel muy importante la fosfatasa alcalina y la colagenasa. Ambas enzimas tendrían una acción complementaria en la remodelación de esta matriz, de tal forma que la fosfatasa podría romper enlaces de tipo ester, favoreciendo la actuación de la colagenasa.

Por otra parte, la localización de fosfatasa alcalina en la membrana plasmática a nivel apical, como ocurre en células intestinales Fontaine (1981), canalículos biliares Shi et al (1988) no está en contradicción con nuestros hallazgos, porque el papel de este enzima en niveles apicales de la célula podría ser el de favorecer el transporte iónico actuando como una ATPasa (Fontaine, 1981; Shi et al, 1988; Azuma y Eguchi, 1989; Azuma et al, 1991; Ciancaglini et al 1990).

Además, la fosfatasa alcalina aparece en células de órganos en regeneración tras un daño celular provocado por la administración de diversas sustancias químicas, como es el caso de hepatocitos (Chida, 1989) y epitelio pigmentario de la retina (Korte et al, 1991).

La peculiar distribución de actividad fosfatasa alcalina sobre las gotas lipídicas obtenida en este estudio, no ha sido comunicada previamente y su significado permanece desconocido.

Las imágenes obtenidas a microscopía óptica ponen de manifiesto que durante todo el ayuno la actividad fosfatasa alcalina aparece de forma patente en el conectivo que envuelve al adenómero. Esta localización, como ya se ha discutido previamente, estaría relacionada con la actuación del enzima en la remodelación de la matriz conjuntiva. Nuestra opinión es que durante

## DISCUSION

el ayuno prolongado esta remodelación es eminentemente de degradación de la matriz conjuntiva y, por tanto, sólo de reabsorción, pero no de depósito de matriz. Esta hipótesis estaría avalada por las imágenes obtenidas a microscopía electrónica de transmisión, que muestran cómo a medida que progresa el ayuno el conjuntivo basal se hace cada vez más laxo.

## **6. ACTIVIDAD ESTERASA EN EL AYUNO**

Los resultados ofrecidos en nuestro estudio sobre el patrón de distribución de la esterasa no específica han sido obtenidos utilizando como medios de observación la microscopía óptica y electrónica de transmisión. Con microscopía óptica el producto de reacción aparece ampliamente distribuido en dos de los tres tipos celulares de los túbulos hepatopancreáticos: en las células digestivas y excretoras. En las digestivas aparece una marcada reacción en todos los tipos de gránulos y en la periferia de los mismos. Las células excretoras muestran actividad en su gran bolsa digestiva. El patrón de distribución no parece variar a través del ayuno. A microscopía electrónica las observaciones sobre la localización de la actividad esterasa a través del ayuno permiten hacer dos grandes grupos. Uno, formado por caracoles alimentados y ayunados hasta 3 meses, en el que el producto de reacción aparece de forma generalizada en los tres tipos celulares y con localización preferente en el citoplasma extravacuolar junto con una marcada reacción en la periferia de los gránulos cálcicos de las células del mismo nombre apareciendo también actividad en los espacios intercelulares. Y otro constituido por los caracoles de más de tres meses de ayuno, en los que la localización enzimática sigue estando en las tres células, si bien en lo que se refiere a su localización precisa, el producto de reacción aparece no sólo en el citoplasma extravacuolar sino también en los grumos electrodensos del interior de las grandes vacuolas. En estos estadios de ayuno no se aprecia actividad esterasa en los espacios intercelulares.

Dentro del amplio grupo de enzimas hidrolíticas que aparecen en los lisosomas, las

esterasas constituyen un grupo que actúan hidrolizando grupos ester, tienen su actuación óptima a pH ácido y pueden actuar sobre una gran diversidad de sustratos. De ahí su denominación como esterasas no específicas (Crevier y Belanger 1955).

Patrones similares de distribución de esterasa inespecífica a los hallados en nuestro estudio, han sido obtenidos en diversos Moluscos tanto marinos como terrestres, Mytilus edulis y Hélix aspersa entre otros (Sumner, 1969). Este autor encuentra una localización de esterasa no específica en las células digestivas que es citoplásmica y difusa más que granular. La reacción en las células cálcicas fue similar a la de las digestivas, aunque aparece una actividad más marcada en la periferia de los gránulos cálcicos.

La presencia de actividad esterasa con una localización extravacuolar ha sido encontrada también en otras líneas celulares de diferentes especies (Buat et al, 1988) encuentra actividad alfa-naftil-acetato esterasa localizada en la cara externa de la membrana plasmática de las células de Kurloff y en la superficie externa de la membrana que rodea a los cuerpos de Kurloff. Stadnyk et al (1990), estudiando diferentes poblaciones de macrófagos, encuentra que la localización histoquímica de actividad enzimática esterasa no específica era citoplasmática y difusa. En esta misma línea están las aportaciones de Debette et al (1989), que pone de manifiesto mediante técnicas de inmunomarcaje al electrónico la presencia de una esterasa que hidroliza beta-naftil acetato en la cara externa de la membrana plasmática de la bacteria Xanthomonas maltophilia, argumentado que dada su localización y características de solubilización esta esterasa podría jugar un papel fisiológico semejante al de una proteasa unida a membrana. Por otra parte, Baeza-Squiban et al, (1990) sugiere un papel de las esterasas en el metabolismo extracelular en Dunaliella bioculata (Volvocales).

Otros estudios previos han relacionado la actividad esterasa inespecífica con las esterproteasas, como los que sugieren la cercanía filogenética de las esterasas y las serín proteasas (Krisch, 1971; Heymann, 1980; Previero et al, 1983; Dayhoff et al, 1983; Myers et al, 1988). La separación electroforética de esterasas no específicas y esterproteasas de riñón, intestino e hígado ha indicado que muchas de las bandas de esterproteasas en los geles tienen la misma localización que las esterasas no específicas, lo que sugiere que la actividad esterasa inespecífica puesta de manifiesto por nosotros correspondería al solapamiento de una actividad esterasa inespecífica propiamente dicha junto con otras esterproteasas. Además la evidente localización citoplasmática difusa, encontrada por nosotros y otros autores (Stadnyk et al, 1990), junto con la localización extracelular hallada por otros investigadores (Debette y Preusier, 1989; Baeza-Squiban et al, 1990) sugiere la participación de este enzima hidrolítico en fenómenos de digestión no lisosómica. Además de esta implicación en procesos de digestión no lisosómica, este enzima podría estar implicado en procesos de lisis celular mediante degradación de estructuras citoplasmáticas, que en situaciones normales estarían protegidas de la acción lítica de las esterasas. De esta forma podrían explicarse nuestras observaciones en las que muchas de las células hepatopancreáticas de caracoles fuertemente ayunados, que han entrado en un proceso de muerte celular, aparecen con todo su citoplasma marcado. En este mismo sentido están las aportaciones de Oxford y Fish (1979) que argumentan la implicación de la actividad esterasa en procesos de muerte celular en Cepaea nemoralis en situación de ayuno.

## 7. MUERTE CELULAR

Tradicionalmente se han venido considerando dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. Esta clasificación ha sido presentada sucesivamente por Kerr et al (1972, 1974) , Wyllie et al (1980,84) y Fesus et al, (1991). Estas dos formas de muerte celular se dan en la mayor parte de los organismos superiores, pero en aquellos organismos filogenéticamente menos evolucionados, como es el caso de los invertebrados, este esquema general se complica, existiendo formas de muerte celular con un cierto solapamiento de características propias de uno u otro tipo de muerte celular (Wyllie, 1980).

En el caso del caracol Hélix aspersa, los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten indicar que en el hapatopáncreas hay dos mecanismos de muerte celular: uno, de tipo apoptótico, que será debido al propio recambio de las células cuando el animal está en estado alimentado y otro, necrótico, que se producirá principalmente con el cambio de las condiciones celulares propiciadas por el ayuno prolongado. No obstante, estos dos tipos de muerte celular no pueden ser asignados de forma totalmente exclusiva a estas dos situaciones nutritivas sino que existe un cierto solapamiento de ambos mecanismos. Así, de nuestras observaciones se desprende que existen síntomas muy marcados de muerte celular a partir de los tres meses de ayuno. A los seis meses de inanición se observan imágenes en donde las células digestivas han perdido sus vellosidades, el citoplasma sufre un acortamiento (los núcleos se encuentran cerca de la luz del tubo), los orgánulos citoplasmáticos han desaparecido y la cromatina de los núcleos aparece condensada. A los nueve meses de ayuno son frecuentes las imágenes de rotura celular, hecho



que se ve acentuado a los doce meses de inanición. En ningún momento se han visto imágenes de englobamiento celular por células fagocíticas. Si se hubiesen observado estas imágenes de fagocitosis podríamos haber interpretado, sin lugar a dudas, que nos encontrábamos ante un proceso de apoptosis, fenómeno frecuente cuando los tejidos son sometidos a condiciones de hipoxia química (Gores et al, 1988) ó acidosis extracelular (Zheng et al, 1991).

Todo esto nos lleva a sugerir que en el caracol existe una muerte celular programada hasta los tres meses de ayuno, y es a partir de este período y sobre todo a los 6,9 y 12 meses de inanición cuando existe este solapamiento de rasgos apoptóticos y necróticos.

Nosotros pensamos que los fenómenos de autofagia, atrofia celular y muerte celular que se dan en el caracol durante el ayuno, pueden ser entendidos desde un papel conservativo bajo condiciones de estrés. En estas circunstancias los productos de la muerte celular deben ser reciclados en beneficio de la supervivencia celular y orgánica. Así, la destrucción celular tendría un papel eminentemente nutritivo.

## **CONCLUSIONES**

Del estudio efectuado se desprenden las siguientes conclusiones:

1º.- La variación de la pérdida de peso de los distintos grupos de caracoles durante el período de experimentación permite distinguir dos etapas en la respuesta al ayuno: **hasta seis meses de ayuno**, en la que los animales experimentan una pérdida de peso gradual y poco marcada, cifrándose entre el 10 y 18%, y otro constituido por los caracoles ayunados desde los seis **hasta los doce meses** con una mayor pérdida de peso, de alrededor del 40%.

2º.- Existe una pérdida de peso crítica, que oscila entre el 40 y 50% según el individuo, a partir de la cual el caracol muere.

3º.- El ayuno prolongado produce un cambio en la proporción de los diversos tipos de células del hepatopáncreas. La proporción de células digestivas disminuye en tanto que la de células excretoras y cálcicas se incrementan.

4º.- Los cambios en la proporción de células digestivas y excretoras sugieren que ambas fomas celulares corresponden a dos etapas funcionales de un mismo tipo celular.

5º.- La evolución del grosor de la concha y de la relación Mg/Ca tanto en concha como en el hepatopáncreas sugieren una implicación directa de estos órganos en los mecanismos de movilización iónica, determinantes de la regulación del equilibrio ácido/base.

6º.- La actividad fosfatasa ácida es positiva en los tres tipos celulares de los adenómeros hepatopancreáticos con una localización específica en las microvellosidades y vacuolas de digestión de las células digestivas, en la gran vacuola de las células excretoras y en las espiras de los gránulos cálcicos de

las células cálcicas. Este patrón de distribución persiste durante todo el período de experimentación, excepto en las microvellosidades, en las que desaparece a partir de los tres meses de ayuno.

7º.- La fosfatasa alcalina muestra una localización preferente en el conjuntivo circundante a los adenómeros, así como en los espacios intercelulares de las propias células adenoméricas. El patrón de distribución de este enzima apenas muestra variación durante los distintos períodos de ayuno de nuestro estudio.

8º.- La actividad esterasa inespecífica muestra una localización preferente y específica en el citoplasma extravacuolar de las células digestivas y excretoras y en la periferia de los gránulos cálcicos de las células cálcicas. También aparece actividad, aunque de forma menos marcada, en los espacios intercelulares de los individuos alimentados y ayunados hasta los tres meses. En los grupos de experimentación de más de tres meses de ayuno desaparece la actividad enzimática en los espacios intercelulares.

9º.- La localización y el patrón de distribución de los tres enzimas hidrolíticos estudiados, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y esterases, permiten proponer la existencia en el hepatopáncreas del caracol de un modelo de digestión eminentemente intracelular, con dos modalidades: una lisosomal, en la que la fosfatasa ácida juega un papel primordial, y otra no lisosómica, en la que la esterasa alcanza el protagonismo. Estas dos formas de digestión presentan distinta importancia durante el tiempo de experimentación, de forma que hasta los tres meses de ayuno parece predominar la digestión lisosomal, en tanto que en caracoles fuertemente ayunados (más de seis meses) predomina la digestión no lisosomal.

10º.- En la glándula digestiva del caracol Helix aspersa, durante el periodo de hasta tres meses de ayuno, se observa una forma de muerte celular de tipo apoptótico, que debe estar implicada en el normal recambio celular. A partir de los seis de ayuno se aprecia muerte celular de tipo necrótico, posiblemente relacionada con el cambio de ambiente celular en el hepatopáncreas.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abadia Fenoll F., Rios A., Almendros A., Navascues J. (1982). An electron microscopic study on the muscle cells and nerve fibres in the digestive gland of the snail Cryptomphallus aspersa. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 96:873.
- Abolins-Krogis A. (1958). The morphological and chemical characterization of organic crystals in the regenerating shell of Helix pomatia. Acta Zool. 39:19.
- Abolins-Krogis A. (1960). The histochemistry of the hepatopancreas of Helix pomatia in relation to the regeneration of the shell. Ark. Zool. 13:159.
- Abolins-Krogis A. (1963a). Some features of the chemical composition of isolated cytoplasmic inclusions from the cells of the hepatopancreas of Helix pomatia. Ark. Zool. 15:393.
- Abolins-Krogis A. (1963b). On the protein stabilizing substance in the isolated g-granules and in the regenerating membranes on the shell of Helix pomatia. Arkiv. Zool. 15:475.
- Abolins-Krogis A. (1965). Electron microscope observations on calcium cells in hepatopancreas of snail Helix pomatia. Ark. Zool. 18:85.
- Abolins-Krogis A. (1968). Shell regeneration in Helix pomatia with special reference to the elementary calcifying particle. Symp. Zool. Soc. Lond. 22:75.
- Abolins-Krogis A. (1970). Electron microscope observations on calcium cells in the hepatopancreas of the snail Helix pomatia. Ark. Zool. 18:85.
- Abolins-Krogis A. (1986). The effect of carbonic anhydrase, urea and urease on the calcium carbonate deposition in the shell-repair membrane of the snail Helix pomatia. Cell Tiss. Res. 244:655.
- Ackman R.G., Hooper S.N., Ke P.J. (1971). The distribution of saturated and isoprenoid fatty acids in the lipids of three species of molluscs, Littorina littorea, Crossostrea virginica and Venus mercenaria. Comp. Biochem. Physiol. 39B:579.
- Adiyodi K.G., Adiyodi R.G. (1983). Reproductive biology of invertebrates. Wiley, New York.
- Ahearn G.A., Clay L. P. (1988a). Electroneural Na<sup>+</sup> 2Cl<sup>-</sup> leucine cotransport by lobster hepatopancreatic brush border membrane vesicles. J. Exp. Biol. 136:363.
- Ahearn G.A., Clay L. P. (1988b). Sodium- coupled sugar and amino acid transport in an acidic microenvironment. Comp. Biochem. Physiol. 90A:627.
- Ahearn G.A., Grover M. L., Dunn R. E. (1986). Effects of Na, H and Cl on alanine transport by lobster hepatopancreatic brush border membrane vesicles. J Comp. Physiol. 156:537.

- Ahearn G.A., Laurel C. (1987). Na<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> glutamate cotransport by lobster hepatopancreatic brush border membrane vesicles. 130:175.
- Allen R.D., Schroeder C., Fok A. (1989). Intracellular binding of wheat germ agglutinin by Golgi complexes, phagosomes, and lysosomes of Paramecium multimicronucleatum. J. Histochem. Cytochem. 37:195.
- Almendros A. (1980). Estudio del hepatopáncreas de Helix aspersa en situación normal y tras ayuno. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Almendros A., Rios A., Bueno J.D., Porcel D. (1988). Ultrastructure of cells from the adenomera of the digestive gland of Helix aspersa M. Inst. Phys. Conf. Ser. 93:155.
- Alvarez-Leefmans F.J., Rink T.J., Tsien R.Y. (1981). Free calcium ions in neurons of Helix aspersa measured with ion-selective micro-electrodes. J. Physiol. (London). 315:531.
- Anderson T.F. (1951). Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N.Y. Acad. Sci. 13:130.
- Anstee J.H., Bowler K. (1979). Oubain-sensitivity of insect epithelial tissues. Comp. Biochem. Physiol. 62A:763.
- Ashford T.P., Porter K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. J. Cell Biol. 12:198.
- Assaka L., Marchand C.R., Strosser M.T. (1987). Detection of a somatostatin-14 peptide in the hepatopancreas of the snail Helix aspersa. C.R. Seances Soc. Biol. Fil. 181: 187.
- Azuma M., Eguchi M. (1989) Discrete localization of distinct alkaline phosphatase isozymes in the cell surface of silkworm midgut epithelium. J. Exp. Zool. 251:108.
- Azuma M., Takeda S., Yamamoto H. (1991). Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium: its entity and role as an ATPase. J. Exp. Zool. 258:294.
- Azzalino J.D., Trainer D.G. (1985). Amylolytic activity in the hepatopancreas of Uca minax, Uca pugnax and Uca pugilator. Comp. Biochem. Physiol. 82:679.
- Baecker R. (1932). Die Mikromorphologie von Helix pomatia und einigen anderen Stylommatophoren. Z. Ges. Anat. Abt. III. 29:449.
- Baeza-Squibian A., Bouaicha N., Santa-Maria A. (1990). Demonstration of the excretion by Dunaliella bioculata of estrases implicated in the metabolism of deltamethrin, a pyrethroid insecticide. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45:39.

- Baiton D.F. (1981) The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* 91:66S.
- Bancroft J. D. (1975). Enzyme Histochemistry. En "Theory and practice of histological techniques". Ed. London Butterworths pg. 379.
- Bani G. (1962). Struttura e ultrastruttura dell'epatopancreas di Vaginulus borellianus (colosi). *Monit. Zool. Ital.* 69:157.
- Barankiewicz J., Jezewska M.M. (1976). Inosine guanosine and adenosine phosphorylase activities in hepatopancreas of Helix pomatia gasteropoda. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 54:239.
- Barfurth D. (1883). Uber den bau und tätigkeit der Gastropodenleber. *Arch. Micr. Anat.* 22:473.
- Barka T., Anderson P.J. (1962). Histochemical methods for acid phosphatase using hexazodium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10:741.
- Barnett R.J. (1962). The fine structural localisation of acetylcholinesterase at the myoneural junction. *J. Cell Biol.* 12:247.
- Barnett R.J. (1971). Acid b-galactosidase from albumen gland of Helix aspersa. *Comp. Biochem. Physiol.* 40:585.
- Barnett R.J., Palade G.E. (1959). Enzymatic activity in the M band. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6:163.
- Barnhart M.C. (1983). Gas permeability of the epiphragm of a terrestrial snail. *Physiol. Zool.* 56:436.
- Barnhart M.C. (1986). Control of acid-base status in active and dormant land snails, Otala lactea (pulmonata, helicidae). *J. Comp. Physiol.* 156B:347.
- Barnhart M.C., Mc Mahon B.R. (1987). Discontinuous carbon dioxide release and metabolic depression in dormant land snails. *J. Exp. Biol.* 128:123.
- Barnhart M.C., Mc Mahon B.R. (1988). Depression of aerobic metabolism and intracellular ph by hypercapnia in land snails Otala lactea. *J. Exp. Biol.* 138:289.
- Barret A.J. (1972). Lysosomes. A Laboratory handbook. Ed. J.T. Dingle. North Holland Publishing Co. Amsterdam. pg. 46.
- Beaulaton J. (1967a). Localisation d'activités lytiques dans la glande prothoracique du ver á soie du chêne (Antheraea pernyi) au stade prénymphal. I. Structures lysosomiques, appareil de Golgi, et ergastoplasme. *J. Microsc.* 6:179.



- Beaulaton J. (1967b). Localisation d'activités lytiques dans la glande prothoracique du ver à soie dy chène (Antheraea pernyi) au stade prenympal. II. Les vacuoles autolytiques (cytolysosomes). J. Microsc. 6:349.
- Beaulaton J. (1986). Programmed cell death. Cytochemical evidence for accumulation of calcium in mitochondria and its translocation into lysosomes: x-ray microanalysis. Histochem. J. 18:527.
- Becker G.L., Chen C.H., Greenawalt J.W., Lehninger A.L. (1974). Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab Callinectes sapidus. J. Cell Biol. 61:316.
- Beeby A., Richmond L. (1988). Calcium metabolism in two populations of the snail Helix aspersa on a high lead diet. Arch. Envirom. Contam. Toxicol. 17:507.
- 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.
- Bernar J., Tietze F., Kohn L.D., (1986). Characteristics of a lisosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. J. Biol. Chem. 261:17107.
- Beukema J., De Bruin W. (1979). Calorific values of the soft parts of tellinid bivalve Macoma balthica as determined by two methods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 37:19.
- Bielawski J., Kesa H. (1986). Seasonal variation of phosphatase activity in the hepatopancreas of the snail Helix pomatia. Comp. Biochem. Physiol. A. 83:105.
- Billet F. (1954). The beta-glucuronidase of the roman snail (Helix pomatia). Biochem. J. 57:159.
- Billet F., Mcgee-Russell S. M. (1955). B-glucuronidase in the digestive gland of the roman snail (Helix pomatia). Quart. J. Micro. Sci.96: 35.
- Björkerud S. (1964). Isolated lipofuscin granules a survey on a new field. Adv. Geront. Res. 1:257.
- Bokisch A.J. et al (1986). The action of avernectin (mk 936) on identified central neurones from Helix and its interaction with acetylcoline and gammaaminobutiric acid (gaba) reponses. Comp. Biochem. Physiol. 84(1):119.
- Bond J.S., Butler P.E. (1987). Intracellular proteases. Annu. Rev. Biochem. 56:333.
- Boron W.F., Russell J.M., Brodwick M.S. (1978). Influence of cyclic AMP on intracellular pH regulation and chloride fluxes in barnacle muscle fibers. Nature. 276:511.

- Boutry J.M., Novikoff A.B. (1975). Cytochemical studies on Golgi apparatus, GERL, and lysosomes in neurons of dorsal root ganglia in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:508.
- 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.
- Bowen I.D. (1968b). Electron cytochemical studies on autophagy in the gut epithelial cells of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Histochem. J.* 1:141.
- Bowen I. D. (1970a). The fine structural localization of acid phosphatase in the gut epithelial cells of the slug, *Arion ater*. *Protoplasma* 70: 247.
- Bowen I. D. (1970b). Golgi associated acid phosphatase in muscle and nerve from *Arion ater* l. *Protoplasma* 71:409.
- Bowen I. D., Davies P. (1971). The fine structural distribution of acid phosphatase in the digestive gland of *Arion hortensis*. *Protoplasma* 73:73.
- Bowen I. D., Lloyd D. C. (1971). Technique for electron cytochemical localization of acid hidrolases. *J. Microsc.* 94:71.
- Bowen I.D., Den Hollander J.E., Lewis G.H.J. (1982). Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis*. *Differentiation* 21:160.
- Bowen I.D. (1984). Laboratory techniques for demonstrating cell death. In: Cell ageing and cell death. Eds. Davies I., Singee D.C.. Seminar Series 25. S.E.B. Cambridge University Press. pp. 5.
- Bowen I.D., Bowen S.M., Sarraf C.E., Jones S.L. (1986). Biotechnology and the messengers of death (programed cell death). *Int. Ind. Biotechnol.* 6:170.
- Bowen I.D., Worrill N.A., Winters C.A., Mullarkey K. (1988). The use of backscattered electron imaging, x-ray microanalysis and x-ray microscopy in demonstrating physiological Scanning microsc. 2:1453.
- Bowers W.E. (1973). Lysosome in rat thoracic duct lymphocytes fractionated by zonal centrifugation. *J. Cell Biol.* 59:177.
- Branderburger J.L. et al. (1988). Transport of pinocytic vesicles in the eye of a snail, *Helix aspersa*. *Cell Tiss. Res.* 232:35.
- Brandes D., Bertini F., 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.

- Braun M., Waheed A. (1989). Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J.* 8:3633.
- Briere N., Petitclerc C., Plante G. (1983a). Presence of alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase on the parietal layer of Bowman's capsule. *Acta Histochem.* 73:237.
- Briere N., Plante G., Petitclerc C. (1983b). Electron-microscopic demonstration of alkaline phosphatase activity in the juxtaglomerular apparatus. *Cell Tiss. Res.* 234:147.
- Briere N. (1986). Alkaline phosphatase activity at unusual sites of human foetal kidney. *Cell Tiss. Res.* 234:567.
- Broadwell R.D., Balin B.J. (1985). Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans-synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo. *J. Comp. Neurol.* 242:632.
- Broghamer W. et al (1985). Prostatic acid phosphatase immunoperoxidase staining of cytologically effusions associated with adenocarcinomas of the prostate and neoplasms of undetermined origin. *Acta Cytol.* 29:274.
- Brooks S.P.J., Storey K.B. (1989). Influences of hormones, second messengers and pH on the expression of metabolic responses to anoxia in a marine whel. *J. Exp. Biol.* 145:31.
- Brooks S.P.J., Storey K.B. (1991). Studies on the regulation of enzyme binding during anoxia in isolated tissues of Busycon canaliculatum. *J. Exp. Biol.* 156:467.
- Brown B.E. (1977). Uptake of copper and lead by metal-tolerant isopod, Asellus meridianus. *Freshwater Biol.* 7:235.
- Brown B.E. (1978). Lead detoxification by a copper-tolerant isopod. *Nature* 276:388.
- Brown B.E. (1982). The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57:621.
- Buat M.L., Landemore G., Izard J. (1988). Alpha naphthyl acetate esterase activities in guinea pig kurloff cells: a cytochemical and electrophoretic study. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1109.
- Burstone M.S. (1957). Esterase activity of developing bones teeth. *Arch. Pathol.* 63:164.
- Burton R.F. (1965). Variation in the water and mineral contents of some organs of the snail, Helix pomatia. *Can. J. Zool.* 43:771.
- Burton R.F. (1970). Tissue buffering in the snail Helix aspersa. *Comp. Biochem. Physiol.* 37:193.

- Burton R.F. (1972). The storage of calcium and magnesium phosphatases and of calcite in the digestive glands of the pulmonata (gasteropoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 43A:655.
- Burton R.F. (1974). A method of narcotizing snails (Helix pomatia) and canulating the haemocoel and its application to a study of the role of calcium in the regulation of acid-base balance. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:483.
- Burton R.F., Jaufeerally F.R.(1976). The mobilization of calcium and bicarbonate by raised concentrations of potassium in the haemolymph of the snail Helix pomatia. *J. Exp. Biol.* 64:603.
- Burton R. F., Shirley M., Douglas A. M. (1987). Same effects of injected magnesium chloride in the snail, Helix aspersa: narcosis, magnesium distribution and responses to infused potassium. *Comp. Biochem. Physiol.* 86:113.
- Busa W.B., Nuccitelli R. (1984). Metabolic regulation via intracellular pH. *Am. J. Physiol.* 246:R409.
- Campbell J.W., Vorheben J.E. (1979). The purine nucleotide cycle in helix pancreas. *J. Comp. Physiol. B.* 129:137.
- Cardasis C.A., Schuel H., Herman L. (1976). Ultrastructural localization of calcium in unfertilized sea urchin eggs. *J. Cell Sci.* 31:101.
- Cardi P., Latigue M., Meunier J.M. (1988). Depolarizing effects of variations local anaesthetics on the Helix aspersa neurons: dose-response relationship. *J. Pharm. Pharmac.* 40:181.
- Carpenter J.F., Hand S.C. (1986). Arrestment of carbohydrate metabolism during dormancy and aerobic acidosis in Artemia embryos: determination of pH-sensitive control points. *J. Comp. Physiol.* B156:451.
- Carriker M.R., Bilstad N.M. (1946). Histology of the alimentary system of the snail Limnaea stagnalis. *Trans. Amer. Micr. Soc.* 65:250.
- Case R. M., Clausen T. (1973). The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. *J. Physiol.* 235:75.
- Chida K. (1989). Changes in alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase during the process of rat hepatocyte proliferation. *Acta. Histochem. Cytochem.* 2:509.
- Churchill T.A., Storey K.B. (1989). Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail Otala lactea. *Physiol. Zool.* 62:1015.
- Ciancaglini P., Pizauro J., Curti C. (1990). Effect of membrane moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix induced alkaline phosphatase by zinc ions. *J. Biochem.* 22:747.

- Clegg J.S., Conte F.P. (1980). A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. En: The brine shrimp *Artemia*, ed. G. Perssone, P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers. Wetteren, Belgium: Universa. pg. 11.
- Clyde F., Herreid I. (1977). Metabolism of land snails (*Otala lactea*) during dormancy, arousal and activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A:211.
- Cohn Z.A., Hirsch J.G., (1960). The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 112:983.
- Cole A., Wezeman H. (1987). Cytochemical localization of tartrate resistant acid-phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase in perivascular cells of cartilage canals in the developing mouse epiphysis. *Am. J. Anat.* 180:237.
- Crevier M., Belanger L.F. (1955). Simple method for histochemical detection of esterase activity. *Science* 122:556.
- Cuellar R., Cuellar L., Perez T. (1986). *Helicicultura. Cría Moderna de Caracoles*. Ed. Mundi-Prensa. pg. 113.
- Cuenot L. (1899). La fonction excrétrice du foie des gastropodes pulmonés. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 7:25.
- Dallinger R., Prosi F. (1988). Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcello scaber* Latreille. II. Subcellular fractionation of metal-accumulating lysosomes from hepatopancreas. *Cell Biol. Toxicol.* 4:97.
- Dauwalder M., Whaley W.G., Kephart J.E. (1972). Functional aspects of the Golgi apparatus. *Subcell. Biochem.* 1:225.
- David A., Bernard J., Thiernes N., Nicolas G., Cerottini J. (1979). Is the process of localized lysosomal exocytosis responsible for the cytolytic action of killer lymphocytes? *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* 288:441.
- David H., Gotze J., (1963). Elektronenmikroskopische befunde an der mitteldarmdrüse von Schnecken. *Z. Mikr. Anat. Forsch.* 70:252.
- Davis B.J., Ornstein L. (1959). High resolution enzyme localization with a new diazo reagent, "hexazodium pararosaniline". *J. Histochem. Cytochem.* 7:297.
- Davis W.L., Jones R.G., Hagler H.K. (1979). Calcium containing lysosomes in the normal chick duodenum: a histochemical and analytical electron microscopical study. *Tiss. Cell* 11:127.
- Dayhoff M.O., Barker W.C., Hunt L.T. (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.* 91:524.

- Dean R.L., Locke M., Collins J.V. (1984). Structure of the fat body, in comprehensive insect physiology. Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press. Elmsford N.Y. 155.
- Dean J.I., et al (1987). Interactions among amino acid transport system in snail Helix aspersa intestine. Rev. Esp. Fisiol. 43:297.
- Debette J., Prensier G. (1989). Immunoelectron microscopic demonstration of an esterase on the outer membrane of Xantomonas maltophilia. Appl. Environ. Microbiol. 55:233.
- Decker R.S. (1974). Lysosomal packaging in differentiating and degenerating avian lateral motor column neurons. J. Cell Biol. 61:599.
- Decker R.S., Wildenthal K. (1978). Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. Ultrastructure and cytochemical changes. Lab. Invest. 38:662.
- Denuce J. M. (1967). Phosphatase and sterases in digestive gland of crafish Orconectes virilis. Arch. Physiol. 75: 159.
- Deporter D.A., Tencate A.R. (1973). Fine structural localization of acid and alkaline phosphatases in collagen-containing vesicles of fibroblasts. J. Anat. 114:457.
- Deslous Paoli J.M., Heral M., Josset M., Boromthanasari S., Gouletquer P., Sauriau P.G. (1988). Total lipid content and lipid energetic values of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 89B:51.
- Dingle J.T. (1962). Lysosomal enzymes and the degradation of cartilage matrix. Proc. Roy. Soc. Med. 55:109.
- Dingle J.T., Barret A.J., Weston P.D. (1971). Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown. Biochem. J. 123:1.
- Dogson K.S., Powell G.M. (1959). Studies on sulphatases 26 arylsulphatase activity in the digestive juice and digestive gland of Helix pomatia. Biochem. J. 73:666.
- Dow J.A.T., Harvey W.R. (1988). Role of midgut electrogenic K pump potential difference in regulating lumen K and pH in larval lepidoptera. J. Exp. Biol. 140:455.
- Dow J.A.T., Peacock J.M. (1989). Microelectrode evidence for the electrical isolation of goblet cell cavities in Manduca sexta middle midgut. J. Exp. Biol. 143:101.
- Drenckhahn D., Waheed A., Van Etten R. (1987). Demonstration of prostatic-type acid phosphatase in non-lysosomal granules in the crypt epithelium of the human duodenum. Histochem. 88:47.

- Duerr F.G. (1966). Qualitative analysis of the uric acid, xanthine, and guanine content of several snails. *Rep. Am. Malac. Un*:66.
- Duerr F.G. (1967). The uric acid content of several species of prosobranch and pulmonates snails as related to nitrogen excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 22:333.
- Duncan C.J. (1978). Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* 34:1531.
- Duncan C.J. (1987). Role of calcium in triggering rapid ultrastructural damage in muscle: a study with chemically skinned fibres. *J. Cell Sci.* 87:581.
- Duncan D., Nall D., Morales R. (1960). Observations of the fine structure of old age pigment. *J. Gerontol.* 15:366.
- Dunn W.A., Connolly T.P., Hubbard A.L. (1986). Receptor mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: Receptor pathway. *J. Cell Biol.* 102:24.
- Dunphy W., Rothman J. (1985). Compartmental organization of the golgi stack. *Cell* 42:13.
- Durfort M. (1982). Las concreciones minerales del hepatopancreas de Trachydermon cinereus, Thiele (Molusca, Poliplacophora). *Estudio Ultraestructural.* *Iberus* 2:1.
- Durfort M. (1985). Aplicacio conjunta de metodes morfologicos citoquimicos i d 'analisi de raigs X en l'estudi de concrecions minerals intracitoplasmaticues. *Butll. Soc. Cat. Ciens. VICII*:25.
- De Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R. (1955). Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60:604.
- De Duve C. Wattiaux R. (1966). Functions of lisosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28:435.
- De Duve C. (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189:186.
- De Duve C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137:391.
- De Jorge F.B., Petersen J.A., (1970). Urea and uric acid contents in the hepatopancreas, kidney and lung of active and dormant snails, *strophocheilus* and *thaumastus* (pulmonata, mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.* 35:211.
- De Moreno J.E.A., Moreno V.J., Brenner R.R., (1975). Lipid metabolism of the yellow clam, Mesodesma mactroides-I. Composition of the lipids. *Lipids* 11(4):334.

- De Waal E.J. (1986). Quantitative changes in the lysosomal vacuolar system of rat hepatocytes during short term starvation. A morphometric analysis with special reference to macro and microautophagy. *Cell Tiss. Res.* 243:641.
- Emerson D.N., Duerr F.G. (1967). Some physiological effects of starvation in the intertidal prosobranch Littorina planaxis. *Comp. Biochem. Physiol.* 20A:45.
- English L.M., Cantley L.C. (1985). Delta endotoxin inhibits Rb<sup>+</sup> uptake, lowers cytoplasmic pH and inhibits a K<sup>+</sup> ATPase in Manduca sexta C.H.E. cells. *J. Membr. Biol.* 82:199.
- Erbengi T. (1988). Ultrastructural studies on the testicular microlithiasis. *Inst. Phys. Conf. Ser.* 93:234.
- Ericsson J.L.E. (1969). Studies on induced cellular autophagy. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. *Exp. Cell Res.* 55:95.
- Essner E., Novikoff A.B. (1961). Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:773.
- Fahimi H.D., Angermüller S., Baumgart E., Völkl A. (1988). Recent developments in ultrastructural cytochemistry of phosphatases and oxidases using the cerium technique. *Inst. Phys. Conf. Ser.* 93:503.
- Farber J. L. (1981). The role of calcium in cell death. *Life Sci.* 29: 1289.
- Farquar M.G., Baiton D.F., Baggiolini M., De Duve D. (1972). Cytochemical localization of acid phosphatase activity in granule fractions from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 54:141.
- Fesus L., Davies P.J., Piacentini M. (1991). Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *J. Cell Biol.* 56:170.
- Fontaine N. (1981). Alkaline phosphatase and calcium binding properties in the intestine of the rat. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 89: 207.
- Fox G.Q., Kirk C., Richardson G.P. (1988). An ultrastructural analysis of electromotor cell death in Torpedo marmorata and its counterpart in vitro. *Cell Tiss. Res.* 254: 455.
- Fox H. (1973). Degeneration of the tail notocord of Rana temporaria at metamorphic climax. Examination by electron microscopy. *Z. Zellforsch.* 138:371.
- Frenzel J. (1885). Über die Mitteldarmdrüse der Mollusken. *Arch. Mikr. Anat.* 25:48.
- Fretter V. (1952). Experiments with P32 and I131 on species of Helix, Arion and Agrolimax. *Quart. J. Micr. Sci.* 93:135.



- 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. Microsc.* 19:17.
- Garattini E., Margolis J., Heimer E., Felix A. (1985). Human placental alkaline phosphatase in liver and intestine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6080.
- George S.G., Coombs T.L., Pirie B.J.S. (1982). Characterization of metal containing granules from the kidney of the common mussel, Mytilus edulis. *Biochim. Biophys. Acta* 716:61.
- Gevers W. (1977). Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 9:867.
- Ghose K.C. (1963). The alimentary system of Achatina fulica *Trans. Am. Micr. Soc.* 82: 149.
- Gill D.P. (1978). Non-genetic variation in isoenzymes of acid phosphatase alkaline phosphatase and alpha-glycerophosphate dehydrogenase of Cepaea nemoralis. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B:365.
- Glücksmann A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26:59.
- Goldfischer S. (1965). The cytochemical demonstration of lysosomal aryl sulfatase activity by light and electron microscopy. *J. Histochem.* 13:520.
- Goldfischer S., Novikoff A.B., Albala A., Biempica L. (1970). Hemoglobin uptake by rat hepatocytes and its breakdown within lysosomes. *J. Cell Biol.* 44:513.
- Gomori G. (1939). *Proceeding of the society of experimental biology and medicine.* N.Y. 42:23.
- Gomori G. (1950). An improved histochemical technique for acid phosphatase. *Stain Technol.* 25:81.
- Gomori G. (1951). Alkaline phosphatase of cell nuclei. *J. Lab. Clin. Med.* 37:526.
- Gomori G. (1952). Histochemistry of esterases. *Int. Rev. Cytol.* 1:323.
- Gomot L., Deray A. (1987). Los Caracoles. *Mundo Cientifico* 69:478.
- Gores G.J., Nienimen A.L. (1988). Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am. Physiol. Soc.* C315.
- Greaves G.N., Simkiss K., Taylor M. (1984). The local environment of the metal sites in intracellular granules investigated by using x-ray absorption spectroscopy. *Biochem. J.* 221:855.

- Griffiths J., Black J. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoform in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clin. Chem.* 33:2171.
- Griffond B., Bolzoni-Sugar D. (1986). Stages of oogenesis in the snail, Helix aspersa: cytological, cytochemical and ultrastructural studies. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:461.
- Griffond B., Boer H., Wijdens J. (1986). Localization and function of an amide-like substance in the aorta of Helix aspersa. *Cell Tiss. Res.* 246:303.
- Gronowicz G., Masur S.K., Holtzman E. (1980). Quantitative analysis of exocytosis and endocytosis in the hydrososmotic response of toad bladder. *J. Memb. Biol.* 52:221.
- Grünbaum S. (1913). Sur la cellule calcigere et ses corpuscles dans le foie d'Helix. *C. R. Soc. Biol.* 75:208.
- Gunawardana U.K. (1985). Ultrastructural localization of alkaline phosphates in the testis of domestic fowl. *J. Anat.* 140:711.
- Guardabassi A., Ferreri E. (1953). Istofisiologia dell'apparato digerente di Helix pomatia. *Arch. Zool.* 38:339.
- Guy A., Thompson J.R. (1965). The biosynthesis of ether-containing phospholipids in the slug, Arion ater. *J. Biol. Chem.* 240:1912.
- Halili F., Rozhaja D.A., Elezaj I. (1986). Application of intravital staining method of different snail Helix pomatia organs in the evaluation of necrotic effects of contamination with heavy metals. *Acta Biol. Med. Exp.* 11:15.
- Hammarstöm L.E., Anderson T.R., Marks S.C., Toverud S.U. (1983). Inhibition by dithio and reactivation by iron of the tartrate-resistant acid phosphatase in bone of osteopetrotic rats. *J. Histochem. Cytochem.* 31:1167.
- Harrison J.F., Wong C.J., Phillips J.E. (1990). Hemolymph buffering in the locust Schistocerca gregaria. *J. Exp. Biol.* 154:573.
- Helminen H.J., 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. Ultrastruc. Res.* 33:528.
- Heral M., Deslous Paoli J.M. (1983). Valeur énergétique de la chair de l'huître Crassostrea gigas estimée par mesures microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta.* 6:193.
- Herreid C.F. (1977). Metabolism of land snails (Otala lactea) during dormancy, arousal and activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A:211.

- Heymann E. (1980). Carboxylesterases and amidases. En "Enzymatic basis of detoxification". Vol.2. Ed. Jakoby W.. Academic Press. New York. pg. 291.
- Hirsch G.C. (1917). Die ernährungsbiologie fleischfressender Gastropoden. I. Makroskopischer bau, nahrung, nahrungsaufnahme, verdauung, sekretion. Zool. Jahrb. 35:357.
- Hirsch J.G. (1962). Cinemicrophotographic observations on granule lysis in polimorphonuclear leucocytes during phagocytosis J. Exp. Med. 116:827.
- Hoffman C., Wright A. (1985). Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82:5107.
- Holmes R.P., Craddock G., Espeland M.A. (1989). A lack of coordination in the release of urinary lysosomal and brush border enzymes following renovascular surgery. Acta Clin. Chem. 186:1.
- Holt S.R., 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.
- Holtzman E. (1967). Lysosomes and GERL in normal and chromatolytic neurons of the rat ganglion nodosum J. Cell Biol. 33:419.
- Holtzman E. (1989). Lysosomes. Ed. Siekevitz P. Rockefeller University. New York.
- Hopkin S.P., Hames A.C., Dray A. (1989). X-ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. Eur. Microsc. Anal. 19.
- 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.
- Hopkins C. R., Baker B.I. (1968). The fine structural localization of acid phosphatase in the prolactin cell of the cell pituitary. J. Cell. Sci. 3:367.
- Horiuchi S., Lane C.E. (1966). Carbohydrates of the crystalline style and hepatopancreas of Strombus gigas Linne. Comp. Biochem. Physiol. 77:1189.
- Howard B., Mitchell P.C., Ritchie A. (1981). Composition of intra cellular granules from the metal accumulating cells of the common garden snail Helix aspersa. Biochem. J. 194:507.
- Hsu L., Tappel A.L. (1964). Lysosomal enzymes of rat intestinal mucosa. J. Cell Biol. 23:233.
- Hubendick B. (1945). Phylogenie und tiergeographie der Siphonariiden. Zool. Bidr. 14: 1.

- Hugon J., Borgers M. (1966a). A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 14:429.
- Hugon J., Borgers M. (1966b). Ultrastructure localization of alkaline activity in the absorbing cells of the duodenum of mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 14:629.
- Humbert W. (1978). Cytochemistry and x-ray microprobe analysis of the midgut of Tomocerus minor with special reference to the physiological significance of the mineral concentrations. *Cell Tiss. Res.* 187:397.
- Hussein M.A., Bowen I.D., Lewis G.H.J. (1986). The histochemical demonstration of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in Culex pipiens (Dipt. Culicidae) using a methacrylate (HEMA) embedding technique. *Proc. Roy. Micr. Soc.* 21:62.
- Idrasith L.S., Sasaki T., Yamashita O. (1988). A unique protease responsible for selective degradation of yolk protein in Bombyx mori: Purification, characterization and cleavage profile. *J. Biol. Chem.* 263:1045.
- Ireland M. P. (1986). Effectss of normal healing on zinc distribution and alkaline phosphatase activity of Helix aspersa. *J. Moll. Stud.* 52:169.
- Jamur M.C., Vugman I., Hand A. (1986). Ultrastructural and cytochemical studies of acid phosphatase in rat peritoneal mast cell developing in vivo. *Cell Tiss. Res.* 224:557.
- Jarrige P., Henry R. (1952). Etude de l'activité glucuronidasique du suc digestif d'Helix pomatia et de sa phénosulfatase. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34:872.
- Jennings R.B., Ganote C.E., Reimer K. A. (1975). Ischaemic tissue injury. *Am. J. Pathol.* 81:179.
- Jezevska M., Gorzkowski B., Heller J. (1963). Nitrogen componds in snail Helix pomatia excretion. *Acta Biochem. Polon.* 10:55.
- Jezevska M.M., Barankiewicz J. (1976). Adenosine amino hydrolase ec-3.5.4.4 in the hepatopancreas of Helix pomatia. *Bull. Cad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* 24:253.
- Jones J.D. (1961). Aspects of respiration in Planorbis corneus L. and Lymnaea stagnalis (gasteropoda: pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* 4:1.
- Jordon H.J. (1918). Phagocytosis und resorption bei Helix pomatia. *Arch. Physiol.* 2:471.
- Jorge F.B., De Petersen J.A. (1970). Urea and uric acid contents in the hepatopancreas, kidney and lung of active and dormant snails, Strophocheilus and Thaumastus (pulmonata, mollusca). *Comp.*

- Jost-Vu E., Hamilton R. L., Hornick C.A. (1986). Multivesicular bodies isolated from rat hepatocytes: Cytochemical evidence for transformation into secondary lysosomes by fusion with primary lysosomes. *Histochem.* 85:457.
- Jungreis A.M. (1977). Comparative aspects of invertebrate epithelial transport. En: "Water relations in membrane transport in plants and animals". Eds. Jungreis A.M., Kleinzeller A.. Academic Press. New York. pg. 89.
- Kado Y., Matsushima O. (1976a). Some properties of alkaline phosphatase in tissues of brackish and fresh-water clams, Corbicula japonica and C. leana. *J.Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Zool.* 26:139.
- Kado Y., Matsushima O. (1976b). Separation of alkaline phosphatase isoenzymes in digestive diverticula of brackish and fresh-water clams Corbicula japonica and C. leana. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Zool.* 26:149.
- Kasprzyk A., Mackowiak D., Obuchowicz L. (1977). The preliminary study on the activity of glucose 6 phosphatase ec-3.1.3.9 En the hepatopancreas of Helix pomatia. *Bull.Soc.Amis.Sci.Lett. Poznan Ser.D.Sci.Biol.* 17:115.
- Kerkut G.A., Lambert J.D.C., Gayton R.J. (1975). Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of Helix aspersa. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A:1.
- Kerr J.F.R. (1973). Some lysosome functions in liver cells reacting to sublethal injury. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Ed. J.T. Dingle. Vol 3. North Holland Publishing Co. Amsterdam. pg 365.
- Kerr J.F.R., Harmon B., Searle J. (1974). An electron microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres. *J. Cell Sci.* 14:571.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239.
- Kirkeby S., Moe D. (1988). A comparison between activities for non-specific esterases and esterproteases. *Acta Histochem.* 83:11.
- Koenig H. (1969). Lysosomes in the nervous system. En "Lysosomes in biology and Pathology. Vol 2. Ed. Dingle J.T., Fell H.B.. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pg 109.
- Köhler A. (1989). Cellular effects of environmental contamination in fish from the river elve and the north sea. *Mar. Environ. Res.* 28:417.

- Köhler A. (1990). Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder caught at differently polluted estuaries. *Aquat. Toxicol.* 16:271.
- Kooiman P. (1963). The occurrence of carbohydrases in digestive juice and hepatopancreas of Astacus fluviatilis and of Homarus vulgaris. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 7:197.
- Korte G.E., Rappa E., Andracchi S. (1991). Localization of alkaline phosphatase on basolateral plasma membrane of normal and regenerating retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol.* 32:3187.
- Krijgsman B.J. (1925). Arbeitsrhythmus der verdauungsdrüsen bei Helix pomatia. 1. Die natürlichen bedingungen. *Zeit. Vergl. Physiol.* 2:264.
- Krijgsman B.J. (1928). Arbeitsrhythmus der verdauungsdrüsen bei Helix pomatia. 2. Sekretion, resorption und phagozytose. *Zeit. Vergl. Physiol.* 8:187.
- Krisch K. (1971). Carboxylic ester hydrolases. The enzymes. Eds. Boyer P.D. Academic Press. N.Y. Vol.5.
- Krishnamoorthy R.V., Lakshmi G.J., Biesiot P., Venkataramiah A. (1979). Caloric densities of shellfish meat and meat fats. *J. Agric. Food. Chem.* 27:1125.
- Krumins S.A., Roth T.F. (1985). Interaction of very low density lipoproteins with chick oocyte membranes. *J. Cell. Biochem.* 26:281.
- Kryzstofiak J., Glindecka M., Bielawski L. (1983). Soluble phosphatases in the hepatopancreas of the hibernating snail Helix pomatia pulmonata. *Bull. Soc. Amis. Sci. Lett. Poznan Ser. D Sci. Biol.* 23:37.
- Kudlacz E.M., Navarro H.A., Eylers J.P. (1989). Selective linkage of B-Adrenergic receptors to functional responses in developing rat lung and liver: phosphatidic acid phosphatases, ornithine decarboxylase and lung liquid reabsorption. *J. Develop. Physiol.* 12:129.
- Lackner R. (1985). Interference of proteases in the determination of pyruvate kinase activities in the hepatopancreas of Helix pomatia artifact or a possible regulatory mechanism. *Comp. Biochem. Physiol B.* 82:279.
- Langdon C.J., Waldock M.J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of Cassostrea gigas. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61:431.
- Lee D., Holland R.K., Groufsky A.K. (1979). Integrity of lysosomes in the isolated perfused rat liver before and after exposure to dimethylsulphoxide. *Cryobiol.* 16:18.
- Leon Y. A., Bulbrook R.D., Corner E.D.S. (1960). Steroid sulphatase, arylsulfatase and b-glucuronidase in the mollusca. *J. Biochem.* 75: 612.

- Lewis P.R. (1977). Metal precipitation methods for hydrolytic enzymes. Staining methods for sectioned material. Ed. Lewis P.R. y Knight D.P. North-Holland. pg.137.
- Lockshin R.A. (1969). Lysosomes in insects. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Eds. J.T. Dingle, H.B. Fell. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pg. 364.
- Lockshin R.A. (1980). Muscle turnover in vertebrates and lower animals. En "Degradative process in heart and skeletal muscle". Ed. Wildenthal K. Elsevier Amsterdam. pg. 225.
- Lockshin R.A. (1981). Cell death in metamorphosis. En "Cell death in biology and pathology". Ed. Bowen I.D., Lockshin R.A. Chapman and Hall. London.
- Ma M.H., Biempica L. (1971). The normal human liver cell (emphasis on lisosomes). Am. J. Path. 62:353.
- Mahmoud T. (1981). Contribution à l'étude des lipides et des acides gras de l'huître Crassostrea gigas du bassin d'Arcachon. Tésis Doctoral. Univ de Bordeaux II.
- Marshall S. (1985). Degradative processing of internalized insulin in isolated adipocytes: dual pathway for intracellular processing of insulin. J. Biol Chem. 260:13517.
- Mason A.Z., Simkiss k. (1982). Sites of mineral deposition in metal accumulating cells. Exp. Cell. Res. 139:383.
- Maunsbach A.B. (1966). Observations on the ultrastructure and acid phosphatase activity of the cytoplasmic bodies in rat kidney proximal tubule cells. J. Ultrastructure Res. 16:197.
- Mayahara H., Hirano H., Saito T., Ogawa K. (1967). The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase. Histochem. 11:88.
- McGee-Russell S.M. (1955). A cytological study of tissues cocerned in the secretion of shell in the snail, Helix pomatia. Tesis Doctoral. Univ. Oxford.
- McGuire M.C., Kline W.S. (1988). Localization of acid phosphatase, esterase and lysozyme within alveolar macrophages of rodent lung. J. Histotechnol. 11:95.
- McMunn C.A. (1900). On the gastric gland of mollusca and decapod crustacea: its structure and functions. Phil. Trans. Roy. Soc. B. 193:1.
- McNabb R.A. (1985). Osmoregulation in desiccated dormant snails (Helix aspersa); gasteropoda pulmonata. Physiol Zool. 58:637.

- Menton M.L., Junge J., Green M.H. (1944). Coupling azo dye test for alkaline phosphatase in kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 5:420.
- Michelson E.H., Dubois L. (1971). An electrophoretic analysis of the crystalline style of *oncomelania*(mollusca: hydrobiidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 38B:263.
- Miller F. Palade G.E., (1964). Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* 23:519.
- Millot N. (1937). On the morphology of the alimentary canal, process of feeding, and physiology of digestion of the nudibranch mollusc *Jorunna tomentosa*. *Phil. Trans. Roy. Soc. (B).* 228:173.
- Miyawaki H. (1965). Histochemistry and electron microscopy of iron-containing granules, lysosomes, and lipofuscin in mouse mammary glands. *J. Nat. Can. Inst.* 34:601.
- Moe H., Rostgard J., Behnke O. (1965). On the morphology and origin of virgin lysosomes in the intestinal epithelium of the rat. *J. Ultrastruct. Res.* 12:396.
- Moore M.N. (1985). Cellular responses to pollutants. *Mar. Poll. Bull.* 16:134.
- Moore M.N. (1990). Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem.* 22:187.
- Moore M.N. (1991). Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals. *Histochem.* 23:495.
- Moore M.N., Viarengo A. (1987). Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. *Experientia* 43:320.
- Mori K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53:361.
- Moriguchi K., Hirai K., Shike S. (1989). Stimulated intraphagosomal Release of eosinophil peroxidase and acid phosphatase in the rats spontaneously infected with *Mycoplasma pulmonis*: A cytochemical Study. *Exp. Mol. Pathol.* 51:220.
- Morton J.E. (1955). The functional morphology of *Otina otis*, a primitive marine pulmonate. *J. Mar. Biol. Ass.* 34:113.
- Murray C.M. (1975). The distribution and function of lysosomes in condylar cartilage. *J. Anat.* 119:85.
- Myers M., Richmond R.C., Oaskeshott J.G. (1988). On the origin of esterases. *Mol. Biol. Evol.* 5:113.
- Nachlas M.M., Seligman A.M. (1949). The histochemical demonstration of esterase. *J. Nat. Can. Inst.* 9:415.



- Nakazima M. (1956). On the structure and function of the midgut gland. *Jap. J. Zool.* 2:469.
- Navascués J., Almendros A., Abadía-Fenoll F. (1978). Estudio sobre la ultraestructura de los gránulos cálcicos en el hepatopáncreas del caracol. *Morf. Norm. Patol.* 2A:233.
- Navascués J., Almendros A., Aijón A., Abadia-Fenoll F. (1978). Estudio a microscopía electrónica de las formaciones granulares del hepatopancreas de Helix hortensis. *Morf. Norm. Patol.* 2A:401.
- Navascués J., Almendros A., Abadía Fenoll F., Valverde F. (1980). Estudio de las mitocondrias del hepatopáncreas de Helix hortensis. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol).* 78:169.
- Nayeemunnisa (1972). Aspects of nitrogen excretion during aestivation in the amphibious snail Pila globosa. Evidence for neuroendocrine involvement in the pattern of excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 42A:1049.
- Nayler W.C. (1985). Calcium and cell death. *Eur. Soc. Cardiol.* 4:33.
- Neely A.N., Cox J.R., Fortney J.A. (1977). Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion. *J. Biol. Chem.* 252:6948.
- Nichols B.A. (1976). Normal rabbit alveolar macrophages. II. Their primary and secondary lysosomes as revealed by electron microscopy and cytochemistry. *J. Exp. Med.* 144:920.
- Novikoff A.B. (1957). Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles of rat liver. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 10:92.
- Novikoff A.B., Essner E., Quintana N. (1963). Relations of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and lysosomes. *J. Micros.* 2:3.
- Novikoff A.B., Essner E., Quintana N. (1964a). Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proc.* 23:1010.
- Novikoff A.B., Essner E., Quintana N. (1964b). A suggested role for the small vesicles of the Golgi apparatus. *Exc. Med. Int. Cong. Ser.* 77:33.
- Novikoff A.B. (1965). Observations on the staining reactions of hepatic lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 13:23.
- Novikoff A.B. (1967). Lysosomes in nerve cells. En "The neuron". Ed. H. Hyden. Elsevier Publishing Company Amsterdam. pg. 319.
- Novikoff A.B. (1976). The endoplasmic reticulum:a cytochemist's view (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 73:2781.

- Novikoff P.M., Novikoff A.B., Quintana N., Haun J. (1971). Golgi apparatus, GERL and lysosomes of neurons in rat dorsal ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* 50:859.
- Novikoff A.B., Shin W.Y. (1964). The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microsc.* 3:187.
- Núñez E.A., Becker D.V. (1970). Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. I. Ultrastructural changes during the preearly and mid-hibernation periods with some comments on the origin of autophagic vacuoles. *Am. J. Anat.* 129:369.
- Omura Y., Veno S., Veck M. (1986). Cytochemical demonstration of acid phosphatase activity in the pineal organ of the rainbow trout, Salmo gairdneri. *Cell Tiss. Res.* 245:171.
- Opresko L.K., Wiley H.S. (1987). Receptor mediated endocytosis in Xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* 262:4109.
- Orci L., Halban P., Amherdt M. (1984). A Clathrin-Coated, Golgi-Related compartment of the insulin secreting cell accumulates proinsulin in the presence of monensin. *Cell* 39:39.
- Orzel R. (1967). Arylsulfatase and b-glucuronidase activity in the various species of tropical molluscs. *Can. J. Zool.* 45:134.
- Owen G. (1955). Observations of the stomach and digestive diverticula of the lamellibranchia. I. The anisomyaria and eulamellibranchia. *Quart. J. Microsc. Sci.* 96:517.
- Owen G. (1966). Digestion. En "Physiology of Mollusca". Vol.2 Ed. Wilbur y Yonge. Academic Press. New York pg. 53.
- Owen G. (1970). The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve, Caridium edule. *Phil. Trans. Roy. Soc. (B)*258:245.
- Owen G. (1972). Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog.* 60:299.
- Owen R.L., Bhalla D.K. (1983). Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse peyer's patch cells. *Ame. J. Anat.* 168:199.
- Oxford G.S., Fish L.J. (1979). Ultrastructure localization of esterase and acid phosphatase in digestive gland cells of fed and starved Cepaea nemoralis. *Protoplasma.* 101:181.

- Pearse A.G.E. (1968). Histochemistry: theoretical and applied. London Churchill. Vol.I. 3rd Ed.
- Pearse A.G.E., (1972). Histochemistry: theoretical and applied. London Churchill Vol.II. 3rd Ed.
- Petitclerc C., Gerard E. (1980). Renal transport of phosphate: role of alkaline phosphatase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59: 311.
- Piretti M.V., Serrazanetti G.P., Viviani R. (1982) Investigation of the sterol constituents from the tissues of Scapharca inaequivalvis. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B:211.
- Piretti M.V., Taioli F., Pagliuca G. (1987). Investigation of the seasonal variations of sterol and fatty acid constituents in the bivalve molluscs Venus gallina and Scapharca inaequivalvis. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B:1201.
- Piretti M. V., Viviani R. (1976). Investigation of the constituent sterols of Venus gallina. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B:229.
- Piretti M.V., Zuppa F., Pagliuca G. (1988). Investigation of the seasonal variations of fatty acid constituents in selected tissues of the bivalve mollusc Scapharca inaequivalvis. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B:183.
- Pontes J.E. (1983). Biological markers in prostate cancer. *J. Urol.* 130:1037.
- Pollero R.J., Re M.E., Brenner R.R. (1979). Seasonal changes of the lipids of the mollusc Chalamys tehuelcha. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A:257.
- Poquet M. (1982). Datos ultraestructurales de las concreciones minerales en las células epiteliales del intestino medio de Lernanthropus kroyerii van Beneden (crustacea copepoda), parásito de Dicentranchus labrax. *Bol. R. Soc Esp. Hist.* 80:119.
- Poquet M. (1986). Origen de las concreciones minerales en las células intestinales de copépodos parásitos. Estudio microanalítico y ultraestructural. *Misc. Zool.* 10:121.
- Poste G. (1971). Sub-lethal autolysis. Modifications of cell periphery by lysosomal enzymes. *Exp. Cell Res.* 67:11.
- Previero A., Coletti-Previero M.A., Galzinga L. (1983). Cryptic functions of enzymes in chemical catalysis. *Monatsh. Chem.* 114:1059.
- Prosser C.L., Brown F.A. (1965). *Fisiología Comparada*. Ed. W.B. Saunders Co. London.
- Prosi F., Dallinger R (1988). Heavy metals in the terrestrial isopod Porcellio scaber latreille. I Histochemical and ultrastructural characterization of metal-containing lysosomes. *Cell Biol. Toxicol.* 4:81.

- Rasmussen H. (1981). Calcium and cAMP as synarchic messengers. New York: Wiley.
- Reale E., Luciano L. (1967). Kritische elektronenmikroskopische studien über die localisation der aktivität alkalischer phosphatase im hauptstück der niere von mäusen. *Histochem.* 8:302
- Rees B.B., Hand S.C. (1990). Heat dissipation, gas exchange and acid-base status in the land snail Helix during short-term estivation. *J. Exp. Biol.* 152:77.
- Rees B.B., Malhotra D., Shapiro J.I. (1991). Intracellular pH decreases during entry into estivation in the land snail Helix strigosa. *J. Exp. Biol.* 159:525.
- Reid R.G.B. (1966). Digestive tract enzymes in the bivalves Lima hians and Mya arenaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 17:417.
- Reid R.G.B. (1968). The distribution of digestive tract enzymes in lamellibranchiate bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 24:727.
- 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.
- Rios A., Almendros A., Abadía-Fenoll F. (1980). Estudio de las variaciones morfológicas en los granúlos cálcicos del hepatopáncreas de Helix aspersa (m) en situación de ayuno. *Cuad. Cienc. Biol.* 6-7:153.
- Rios A., Almendros A., Navascués J., Abadía-Fenoll F. (1980). Caracteres estructurales de los elementos lagunares existentes en el conectivo de la glándula digestiva de Helix aspersa. *Morf. Norm. Patol.* 4A:363.
- Robinson J.M., Karnovsky M.J. (1983). Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. *J. Histochem. Cytochem.* 31:1197.
- Rondelaud D., Chaisemartin C., Barthe D. (1976). Données histologiques et histochimiques sur le transfert de deux métaux (Fe et Cu) chez Lymnae trunculata Müller (Mollusques Gastéropodes Pulmonés). *Annals. Limnol.* 12:269.
- Rosen B. (1930). Die proteolyse bei Helix pomatia und vivipara vivipara. *Z. Vergl. Physiol.* 12:774.
- Rosen B. (1941). Intrazelluläre cerdauung bei Helix pomatia. *Zool Jahrb.* 60:241.
- Rosen B. (1950). Proteases in the digestive gland of lamellibranchs. *Ark. Kemi.* 1:205.
- Rosen B. (1952). The problem of phagocytosis in Helix pomatia. *Ark. Zool.* 3:33.

- Rosen B. (1965). Zur verbreitung der nahrungs-phagocytose unter den invertibraten. *Ark. Zool.* 16:331.
- Rosenbaum R.M., Ditzion B. (1963). Enzymatic histochemistry of granular components in digestive gland cells of the roman snail Helix pomatia. *Biol. Bull.* 124:211.
- Rozhaja D.A., Halili F., Elezaj I. (1984). Catalase activity in snails Helix pomatia exposed to the pollutants of lead metallurgy. *Acta Biol. Med. Exp.* 9:27.
- Rozsa k.S., Zhuravlev V. (1981). Central regulation and coordinaion of the activity of cardio-renal system and pneumostoma in the suboesophageal ganglia of Helix pomatia L. *Com. Biochem. Physiol.* 69A:85.
- Rubenstein M., Guinan P.D., Mckiel C.F. (1988). Review of acid phosphatase in the diagnosis and pronognosis of prostatic cancers. *Clin. Physiol. Biochem.* 6:241.
- Runhan N.W., Isarankura K., Smith B.J. (1965). Methods for narcotizing and anaesthetizing gasteropods. *Malacol.* 2:231.
- Russell-Hunter W.D., Eversole A.G. (1976). Evidence for tissue degrowth in starved freshwater pulmonate snails (Helisoma trivolvis) from tissue, carbon, and nitrogen analyses. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A:447.
- Russell-Hunter W.D., Aldridge D.W. Tashiro J.S., Barry S., Payne S. (1983). Oxygen uptake and nitrogenous excretion rates during overwinter degrowth conditions in the pulmonate snail, Helisoma trivolvis. *Com. Biochem. Physiol.* 74:491.
- Ryder T.A., Bowen I. D. (1975). A method for fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 23:235.
- Sagrista E. (1988). La glándula digestiva de Palaemonetes zariquieyi. Estudio morfométrico. *Misc. Zool.* 12:89.
- Sagrista E., Durfor M. (1990). Ultrastructural study of hemocytes and phagocytes associated with hemolimphatic vessels in the hepatopancreas of Paleomonetes zariquieyi. *J. Morphol.* 206:173.
- Sagrista E., Durford M. (1991). Membranous tubular system in R-cell of decapod hepatopancreas investigated using electron opaque tracers. *Cell Tiss. Res.* 266:585.
- Salama A. H., Eisenmann D.R., Zaki A.E. (1990). Efect of colchicine on lysosomal structure in maturation ameloblast of the rat incisor. *Cell Tiss. Res.* 260:565.
- Saunders J.W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* 154:604.

- Schiaffino S., Hamzlinkova V. (1972). Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. *J. Ultrastruc. Res.* 39:1.
- Schin K.S., Clever U. (1965). Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of Chironomus tetans. *Science* 150:1053.
- Scmimdt-Nielsen K. (1971). Desert snails: problems of heat, water and food. *J. Exp. Biol.* 55:385.
- Sellinger O.Z., Rucker D.L., de Balbian Verster F. (1964). Cerebral lysosomes. I. A comparative study of lysosomal N-acetyl-b-D-glucose minidase and mitochondrial aspatatic transaminasa of rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 11:271.
- Skelton J.K., Bowen I.D. (1988). The cytochemical localization and backscattered electron imaging of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing Calliphora vomitoria larvae. *Sci Applic.* 6:503.
- Shi Y.X., Araki N., Fujimoto T., Ogawa K. (1988). Use of glycine buffer for the lead citrate method of non-specific alkaline phosphatase cytochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 21:81.
- Shields H.M., Bair F.A., Bates M.L. (1982). Localization of immunoreactive alkaline phosphatase in the rat small intestine at the light microscopic level by immunocytochemistry. *Gastroenterol.* 82:39.
- Simkiss K. (1981). Cellular discrimination processes in metal accumulating cells. *J. Exp. Biol.* 94:317.
- Simkiss K., Jenkins K., McLellan J., Wheeler E. (1982). Methods metal incorporation into intra cellular granules. *Experientia* 38:333.
- Smith A.L., Bird J.W.C. (1976). Distribution of lysosome populations in rat cardiac tissue. En "Recent advances in studies of cardiac structure and metabolism". Eds. P. Harris, R.J. Bing, A. Fleckenstein. University Park Press. Baltimore. Vol.7 pg. 41.
- Smith R.E., Farquhar M. (1966). Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.* 31:319.
- Sollock R.L., Varhaben J.E., Campbell J.W. (1979). Transaminase reactions and glutamate dehydrogenase ec-1.4.1.2 in gasteropod hepatopancreas. *J. Comp. Physiol. B.* 129:129.
- Sorrell J.M., Weiss L. (1982). The cellular organization of fibroblastic cells and macrophages at regions of uncalcified cartilage resorption in the embryonic chick femur as revealed by alkaline and acid phosphatase histochemistry. *Anat. Rec.* 202:491.
- Sorokin L.V. (1985). Influence of serotonin on acetylcholine-induced contractions of the smooth muscle of the pharyngeal retractor of the snail Helix pomatia. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 21:160.

- Speeg K.V., James J.R., Campbell W. (1968). Purine biosynthesis and excretion in Otala lactea: an evaluation of the nitrogen excretory potential. *Comp. Biochem. Physiol.* 26:579.
- Spurr A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.* 26:31.
- Stadnyk A.W., Befus A.D., Gauldie J. (1990). Characterization of nonspecific esterase activity in macrophages and intestinal epithelium of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 38:1.
- Stone H.C., Wilson S.B., Overnell J. (1986). Cadmium binding components of scallop (Pecten maximus) digestive gland. Partial purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 85:269.
- Storey K.B. (1986). Aspartate activation of pyruvate kinase in anoxia tolerant molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 83:807.
- 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.
- Straus W. (1967). Lysosomes, phagosomes and related particles. En "Enzyme Cytology". Ed. D.B. Roodyn. Academic Press. London. pg. 239.
- Sumner A.T. (1965). The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*. *J. Microsc. Sci.* 106:173.
- Sumner A.T. (1966a). The fine structure of digestive-gland cells of *Helix*, *Succinea* and *Testacella*. *J. Roy. Microsc. Soc.* 85:181.
- Sumner A.T. (1966b). The fine structure of the digestive gland cells of *Anodonta*. *J. Roy. Microsc.* 85:417.
- Sumner A.T. (1969). The distribution of some hydrolytic enzymes in the cells of the digestive gland of certain lamellibranchs and gasteropods. *J. Zool.* 158:277.
- Tappel A.L. (1969). Lysosomal enzymes and other components. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Ed. J.T. Dingle and H.B. Fell. North Holland Publishing Co. Amsterdam. Vol.2 pg. 207.
- Tanaka T., Marioka T., Asayasaka N. (1987). Tartrate-resistant acid phosphatase in osteoclasts and preosteoclasts by low temperature embedding in lowicryl K4M. *Acta Histochem. Cytochem.* 20:693.
- Taylor M.G., Simkiss K., Greaves G.N., Harries J. (1988). Corrosion of intracellular granules and cell death. *Proc. R. Soc. Lond.* B234:463.

- Telford M. (1970). Comparative carbohydrase activities of some crustacean tissue and whole animal homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 34:81.
- Tencate A.R., Syrbu S. (1974). A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast. *J. Anat.* 117:351.
- Thiele G. (1953). Vergleichende untersuchungen über den feibau und die funktion der mitteldarmdrüse einheimischer gastropoden. *Z. Zellforsch.* 38:87.
- Thompson G.A. (1965). The biosynthesis of ether-containing phospholipids in the slug, Arion ater. *J. Biol. Chem.* 240:1912.
- Topping T.M., Travis D.F. (1974). An electron cytochemical study of mechanisms of lysosomal activity in the rat left ventricular mural miocardium. *J. Ultrastruct. Res.* 46:1.
- Trainer D.G., Tillinghast E.K. (1982). Autolytic activity of the crystalline style of Mya arenaria (bivalvia, mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.* 72A:99.
- Treadwell P.E. (1965). Association of the lysosomes of the reticuloendothelial system with mouse anaphylaxis. *J. Immunol.* 94:692.
- Trump B.F., Mergner W.J. (1974). Cell injury. En "The inflammatory process". Eds Zweifach B.W., Grant L., Academic Press. New York Vol 1, pg. 115.
- Tsujita T., Miyada T. (1988). Purification of rat kidney carboxyesterase and its comparison with other tissue esterases. *J. Biochem.* 103:327.
- Ugolev A.M. (1960). Parietal contact digestion. *Bull. Exp. Biol. Med.* 49:12.
- Vaes G. (1969). Lysosomes and cellular physiology of bone resorption. En "Lysosomes in biology and pathology". Ed. Dingle J.T., Fell H.B.. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. Vol.1 pg. 217.
- Van Weel P.B. (1950). Contribution to the physiology of the glandular media intestine of the Africa giant snail, Achatina fulica, during the first hours of digestion. *Physiol. Comp. Oecol.* 2:1.
- Viarengo A., Moore M.N., Pertica M. (1985). Detoxication of cooper in the cells of the digestive gland of mussel: The role of lysosomes and thioneins. *Sci. Tot. Environm.* 44:135.
- Volk H.W., Kuglar P. (1987). Cytochemical demostration of phosphatases in membrane-recycling structures of endodermal cells. *Histochem.* 86:525.
- Voogt P.A. (1972). Lipids and sterol components and metabolism in the mollusca. En "Chemical Zoology".



Eds. Florkin M., Scheer B. Academic Press, New York. Vol7:245.

- Voogt P.A. (1975). Investigation of the capacity of synthesizing 3-beta-sterols in mollusca-XIII. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (*Anysomyaria*). *Comp. Biochem. Physiol.* 50B:499.
- Vorhaben J.E., Scott J.F., Campbell J.W. (1980). D-manitol oxidation in the land snail *Helix aspersa*. *J. Biol. Chem.* 255:1950.
- Vorhaben J.E., Klotz A.V., Campbell J.W. (1984). Activity and oxidative metabolism of the land snail *Helix aspersa*. *Physiol. Zool.* 57:357.
- Wagge L.E. (1951). The activity of amoebocyte and of alkaline phosphatases during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 92:307.
- Walker G. (1970). The cytology, histochemistry and ultrastructure of the cell types in the digestive gland of the slug, *Agriolimax reticulatus*. *Protoplasma.* 71:91.
- Walter L.D., Jones R.G., Hagler H.K., Farmer G.R., Goodman D.B.P. (1987). Histochemical and elemental localization of calcium in the granular cell subapical granules of the amphibian urinary bladder epithelium. *Anat. Rec.* 218:229.
- Wallace R.A. (1985). Vitelogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En "Developmental Biology" (L.W. Browder ed.) Vol 1. Plenum Press. New York pg. 127.
- Wattiaux R., Wibo M., Baudhuin P. (1963). Influence of the injection of Triton WR-1339 on the properties of rat liver lysosomes. En "Ciba Foundation Symposium on Lysosomes". Eds. A.V.S. Reuck and M.P. Cameron. Little, Brown and Co. Boston. pg. 176.
- Weber R. (1964). Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis. *J. Cell Biol.* 22:481.
- Weber R. (1969). Tissue involution and lysosomal enzymes during anuran metamorphosis. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Eds. J.T. Dingle, H.B. Fell. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. Vol. 2 pg. 437.
- Weiner S. (1983). Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry.* 22:4145.
- Whittehead D.L., Saleuddin A.S. (1978). Steroids promote shell regeneration in *Helix aspersa* mollusca pulmonata. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 59:5.
- Whitwam R.E., Storey K.B. (1990). Pyruvate kinase from the land *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J. Exp. Biol.* 154:321.

- Wilbur K., Yonge C.M. (1966). Physiology of mollusca. Vol II. Academic Press. New York.
- Wildenthal K. (1975). Lysosomes and lysosomal enzymes in the heart. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Ed. J.T. Dingle and R.T. Dean. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. Vol 4. pg 167.
- Williams E.E. (1970). Seasonal variations in the biochemical composition of the edible winkle Littorina littorea. Comp. Biochem. Physiol. 33:655.
- Willson I.B. (1951). Mechanism of hidrolysis. II. New evidence for an acylated enzyme as intermediate. Biochem. Biophys. Acta. 7:520.
- Wilson D.B. (1986). Ultrastructure localization of acid phosphatase in the hindbrain of mouse embryo. J. Histochem. Cytochem. 34:507.
- Wojtowicz M.B., Brockerhoff H. (1972). Isolation and some properties of the digestive amylase of the american lobster (Homarus americanus). Comp. Biochem. Physiol. 42B:295.
- Wojtowicz M.B. (1972). Carbohydrates of the digestive gland and the crystalline style of the atlantic deep-sea scallop (Placopecten magellanicus, gmelin). Comp. Biochem. Physiol. 43A:131.
- Wollman S.H., Spicer S.S., Burstone M.S. (1964). Localization of esterase and acid phosphatase in granules and colloid droplets in rat thyroid epithelium. J. Cell Biol. 21:191.
- Wollman S.H. (1969). Secretion of thyroid hormones. En "Lysosomes in Biology and Pathology". Eds. J.T. Dingle and H.B. Fell. North Holland Publishing Co. Amsterdam. Vol.2 pg. 483.
- Wright J.C., Machin J. (1990). Water vapour absorption in terrestrial isopods. J. Exp. Biol. 154:13.
- Wyllie A.H., Kerr F.R., Currie A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68:251.
- Wyllie A.H. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. En "Cell death in Biology and Pathology". Eds. Bowen I.D., Lockshin R.A.. Ed. Chapman and Hall. London. pg 9.
- Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J. Pathol. 142:67.
- Yajima T., Kumegawa M., Komoda T., Sakagishi Y. (1983). Induction of rat duodenal alkaline phosphatase activity by bile in vitro. Acta Histochem. Cytochem. 16:383.
- Yajima T. (1986). Acid phosphatase activity and intracellular collagen degradation by fibroblasts in vitro.

- Yamaguchi Y., Hayashi C., Miyai K. (1987). Acid phosphatase activity in beta-glucuronidase sulfatase preparation from Helix pomatia. *Clim. Chem.* 33:418.
- Yokota S., Asayama K. (1990). Peroxisomes of the rat cardiac and soleus muscles increase after starvation. *Histochem.* 93:287.
- Yokota S., Oda T., Ichiyama A. (1988). Immunocytochemical localization of catalase in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 29:805.
- 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.
- Yoshioka T., Tanaka T., Otani O. (1988). Alkaline phosphatase activity of the IVth ventricular choroidal epithelium of rats during embryonic and neonatal development. *Histol. Histopathol.* 3:173.
- Zacks S.I., Blumberg J.M. (1961). The histochemical localization of acetylcholine esterase in the fine structure of neuromuscular junctions of mouse and human intercostal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 9:317.
- Zecevic D., et al., (1985). Temperature acclimation influence on transient outward and inward currents in an identified neurone of Helix pomatia. *J. Exp. Biol.* 117:369.
- Zheng L.M., Zychlisky A., Liu C.C. (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell Biol.* 112:279.

**APENDICE.I**

TABLA I

RELACION PESO AYUNO/ PESO ALIMENTADO

|    | 1 Mes | 3 Meses | 6 Meses | 9 Meses | 12 Meses |
|----|-------|---------|---------|---------|----------|
| 1  | .9    | .86     | .64     | .65     | .69      |
| 2  | .89   | .84     | .65     | .68     | .57      |
| 3  | .76   | .77     | .64     | .51     | .60      |
| 4  | .87   | .77     | .55     | .62     | .58      |
| 5  | .89   | .83     | .57     | .52     |          |
| 6  | .91   | .72     | .53     |         |          |
| 7  | .90   | .80     |         |         |          |
| 8  | .86   | .91     |         |         |          |
| 9  | .86   | .84     |         |         |          |
| 10 | .91   | .84     |         |         |          |

Número de variables 5.

Número de casos 10.

Las casillas que no muestran dato es debido a la muerte del individuo.

|          | 1 Mes | 3 Meses | 6 Meses | 9 Meses | 12 Meses |
|----------|-------|---------|---------|---------|----------|
| Medias   | .875  | .821    | .596    | .596    | .61      |
| Des. Ti. | .0042 | .054    | .048    | .068    | .047     |

TABLA II

ANALISIS DE VARIANZA DE LA PERDIDA DE PESO

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| 1 MES       | .875  |
| 3 MESES     | .818  |
| 6 MESES     | .597  |
| 9 MESES     | .595  |
| 12 MESES    | .610  |
| MEDIA TOTAL | .741  |

| FUENTE | SUM CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP  | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|--------|-------|
| ENTRE  | 1.081   | 4       | .270    | 95.551 | .000  |
| DENTRO | .184    | 65      | 2.82E-3 |        |       |
| TOTAL  | 1.265   | 69      |         |        |       |

Fex > Fte se rechaza Ho, no todas las medias son iguales. El ayuno no afecta por igual a todos los grupos de caracoles. La pérdida de peso va a depender del tiempo.

TABLA III

ANALISIS DE VARIANZA DE LA PERDIDA DE PESO ENTRE LOS GRUPOS 1 Y 3.

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| 1 MES       | .875  |
| 3 MESES     | .818  |
| MEDIA TOTAL | .847  |

| FUENTE | SUN CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP  | F TEO  |
|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
| ENTRE  | .033    | 1       | .033    | 14.011 | 6.0E-4 |
| DENTRO | .89     | 38      | 2.35E-3 |        |        |
| TOTAL  | .122    | 39      |         |        |        |

Fex > Fteo se rechaza la hipotesis nula H0.

TABLA IV

ANALISIS DE VARIANZA DE LA PERDIDA DE PESO ENTRE LOS GRUPOS 6, 9 Y 12.

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| 6 MESES     | .597  |
| 9 MESES     | .595  |
| 12 MESES    | .610  |
| MEDIA TOTAL | .600  |

| FUENTE | SUN CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|-------|-------|
| ENTRE  | 1.21E-3 | 2       | 6.09E-4 | .174  | .8413 |
| DENTRO | .095    | 27      | 3.50E-3 |       |       |
| TOTAL  | .096    | 29      |         |       |       |

$F_{exp} < F_{teo}$  se acepta la hipotesis  $H_0$ , con lo que quiere decir que el ayuno actua de forma similar sobre los grupos de 6, 9 y 12 meses.



TABLA V

TABLA DE FRECUENCIAS DEL NUMERO DE CELULAS DIGESTIVAS

Esta relación se ha obtenido contando diez células de un modo aleatorio en cada uno de los 20 casos, comprobándose cuales eran digestivas.

|    | NORMAL | 1 MES | 3 MESES | 6 MESES | 9 MESES | 12 MESES |
|----|--------|-------|---------|---------|---------|----------|
| 1  | 7      | 8     | 8       | 8       | 0       | 0        |
| 2  | 7      | 9     | 7       | 7       | 0       | 0        |
| 3  | 8      | 8     | 7       | 7       | 0       | 0        |
| 4  | 9      | 9     | 7       | 6       | 0       | 0        |
| 5  | 10     | 9     | 8       | 6       | 0       | 0        |
| 6  | 5      | 9     | 8       | 6       | 0       | 0        |
| 7  | 8      | 8     | 8       | 7       | 0       | 0        |
| 8  | 10     | 8     | 8       | 6       | 0       | 0        |
| 9  | 9      | 9     | 8       | 8       | 0       | 0        |
| 10 | 10     | 9     | 8       | 8       | 0       | 0        |
| 11 | 8      | 9     | 4       | 5       | 0       | 0        |
| 12 | 7      | 7     | 5       | 5       | 0       | 0        |
| 13 | 7      | 7     | 7       | 6       | 0       | 0        |
| 14 | 7      | 7     | 6       | 5       | 0       | 0        |
| 15 | 5      | 7     | 6       | 5       | 0       | 0        |
| 16 | 8      | 6     | 7       | 5       | 0       | 0        |
| 17 | 9      | 7     | 7       | 5       | 0       | 0        |
| 18 | 8      | 8     | 8       | 5       | 0       | 0        |
| 19 | 9      | 7     | 8       | 5       | 0       | 0        |
| 20 | 8      | 9     | 7       | 6       | 0       | 0        |

TABLA VI

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE CELULAS DIGESTIVAS

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| NORMAL      | 7.95  |
| 1 MES       | 8     |
| 3 MESES     | 7.1   |
| 6 MESES     | 6.05  |
| MEDIA TOTAL | 7.275 |

| FUENTE | SUN CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP  | F TEO  |
|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
| ENTRE  | 50.25   | 3       | 16.75   | 12.276 | 1.2E-6 |
| DENTRO | 103.7   | 76      | 1.364   |        |        |
| TOTAL  | 153.95  | 79      |         |        |        |

No se acepta la hipotesis nula  $H_0$ , para los grupos sobre los que se hace el analisis.

TABLA VII

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE CELULAS DIGESTIVAS

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| NORMAL      | 7.95  |
| 1 MES       | 8     |
| MEDIA TOTAL | 7.975 |

| FUENTE | SUN CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|-------|-------|
| ENTRE  | .025    | 1       | .025    | .017  | .8979 |
| DENTRO | 56.95   | 38      | 1.49    |       |       |
| TOTAL  | 56.975  | 39      |         |       |       |

Fteo > Fexp el comportamiento del grupo de individuos alimentados y de un mes de inanición, es similar, correspondiendoles medias iguales estadísticamente.

TABLA VIII

## TABLA DE FRECUENCIAS DEL NUMERO DE CELULAS EXCRETORAS

Esta relación se ha obtenido contando diez células de un modo aleatorio, comprobándose cuales eran excretoras.

|    | NORMAL | 1 MES | 3 MESES | 6 MESES | 9 MESES | 12 MESES |
|----|--------|-------|---------|---------|---------|----------|
| 1  | 2      | 1     | 0       | 1       | 3       | 3        |
| 2  | 1      | 0     | 0       | 1       | 4       | 4        |
| 3  | 1      | 1     | 0       | 1       | 2       | 3        |
| 4  | 0      | 0     | 1       | 2       | 4       | 2        |
| 5  | 0      | 0     | 1       | 2       | 2       | 4        |
| 6  | 1      | 0     | 0       | 2       | 3       | 3        |
| 7  | 1      | 1     | 0       | 1       | 4       | 4        |
| 8  | 0      | 0     | 1       | 2       | 3       | 3        |
| 9  | 1      | 0     | 1       | 1       | 2       | 3        |
| 10 | 0      | 0     | 1       | 1       | 3       | 2        |
| 11 | 1      | 1     | 2       | 2       | 2       | 5        |
| 12 | 1      | 1     | 3       | 2       | 2       | 4        |
| 13 | 1      | 1     | 1       | 1       | 3       | 3        |
| 14 | 1      | 1     | 2       | 2       | 1       | 5        |
| 15 | 2      | 2     | 0       | 2       | 2       | 3        |
| 16 | 1      | 2     | 1       | 2       | 3       | 4        |
| 17 | 0      | 2     | 2       | 2       | 3       | 3        |
| 18 | 1      | 1     | 1       | 3       | 3       | 4        |
| 19 | 1      | 1     | 0       | 1       | 4       | 3        |
| 20 | 1      | 1     | 2       | 1       | 2       | 3        |

TABLA IX

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE CELULAS EXCRETORAS

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| NORMAL      | .65   |
| 1 MES       | .90   |
| 3 MESES     | 1.05  |
| 6 MESES     | 1.60  |
| 9 MESES     | 2.75  |
| 12 MESES    | 3.40  |
| MEDIA TOTAL | 1.72  |

| FUENTE | SUN CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|-------|-------|
| ENTRE  | 123.275 | 5       | 24.65   | 43.47 | 8E-4  |
| DENTRO | 64.65   | 114     | .567    |       |       |
| TOTAL  | 187.925 | 119     |         |       |       |

$F_{teo} < F_{exp}$  no se acepta la Hipotesis nula  $H_0$ .

TABLA X

TABLA DE FRECUENCIAS DEL NUMERO DE CELULAS CALCICAS

Esta relación se ha obtenido contando diez células de un modo aleatorio, comprobándose cuales eran cálcicas.

|    | NORMAL | 1 MES | 3 MESES | 6 MESES | 9 MESES | 12 MESES |
|----|--------|-------|---------|---------|---------|----------|
| 1  | 1      | 1     | 2       | 1       | 7       | 7        |
| 2  | 2      | 1     | 3       | 2       | 6       | 6        |
| 3  | 1      | 1     | 3       | 2       | 8       | 7        |
| 4  | 1      | 1     | 2       | 2       | 6       | 8        |
| 5  | 0      | 1     | 1       | 2       | 8       | 6        |
| 6  | 4      | 1     | 2       | 2       | 7       | 7        |
| 7  | 1      | 1     | 2       | 2       | 6       | 6        |
| 8  | 0      | 2     | 1       | 2       | 7       | 7        |
| 9  | 0      | 1     | 1       | 1       | 8       | 7        |
| 10 | 0      | 1     | 1       | 1       | 7       | 8        |
| 11 | 1      | 0     | 4       | 3       | 8       | 5        |
| 12 | 2      | 2     | 2       | 3       | 8       | 6        |
| 13 | 2      | 2     | 2       | 3       | 7       | 7        |
| 14 | 2      | 2     | 2       | 3       | 9       | 5        |
| 15 | 3      | 1     | 4       | 3       | 8       | 7        |
| 16 | 1      | 2     | 2       | 3       | 7       | 6        |
| 17 | 1      | 1     | 1       | 3       | 7       | 7        |
| 18 | 1      | 1     | 1       | 4       | 7       | 6        |
| 19 | 0      | 2     | 2       | 3       | 6       | 7        |
| 20 | 1      | 0     | 1       | 3       | 8       | 7        |

Número de variables 6.  
 Número de casos 20.

TABLA XI

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE CELULAS CALCICAS

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| NORMAL      | 1.20  |
| 1 MES       | 1.10  |
| 3 MESES     | 1.85  |
| 6 MESES     | 2.40  |
| 9 MESES     | 7.25  |
| 12 MESES    | 6.60  |
| MEDIA TOTAL | 3.40  |

| FUENTE | SUM CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP  | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|--------|-------|
| ENTRE  | 771.900 | 5       | 154.380 | 228.38 | 8E-14 |
| DENTRO | 76.900  | 114     | .675    |        |       |
| TOTAL  | 848.800 | 119     |         |        |       |

TABLA XII

## RELACION PERIOSTRACO / OSTRACO-HIPOSTRACO

|    | NORMAL | 1 MES | 3 MESES | 6 MESES | 9 MESES | 12 MESES |
|----|--------|-------|---------|---------|---------|----------|
| 1  | .08    | .055  | .04     | .065    | .068    | .112     |
| 2  | .08    | .043  | .042    | .069    | .073    | .114     |
| 3  | .068   | .042  | .036    | .07     | .073    | .111     |
| 4  | .061   | .041  | .037    | .069    | .07     | .113     |
| 5  | .063   | .03   | .04     | .077    | .094    | .1       |
| 6  | .069   | .036  | .038    | .073    | .1      | .1       |
| 7  | .085   | .04   | .037    | .074    | .12     | .1       |
| 8  | .09    | .05   | .035    | .074    | .12     | .11      |
| 9  | .09    | .05   | .035    | .066    | .12     | .12      |
| 10 | .09    | .03   | .034    | .066    | .13     | .13      |
| 11 | .069   | .073  | .026    | .087    | .13     | .129     |
| 12 | .065   | .08   | .031    | .077    | .075    | .13      |
| 13 | .065   | .08   | .03     | .077    | .07     | .12      |
| 14 | .074   | .088  | .031    | .073    | .084    | .11      |
| 15 | .062   | .088  | .033    | .078    | .074    | .1       |
| 16 | .064   | .088  | .034    | .083    | .074    | .1       |
| 17 | .07    | .069  | .035    | .073    | .079    | .1       |
| 18 | .077   | .075  | .035    | .092    | .083    | .09      |
| 19 | .077   | .077  | .032    | .091    | .083    | .1       |
| 20 | .077   | .08   | .03     | .08     | .082    | .12      |
| 21 | .064   | .042  | .026    | .1      | .082    | .13      |
| 22 | .07    | .041  | .027    | .098    | .16     | .14      |
| 23 | .07    | .048  | .028    | .098    | .13     | .14      |
| 24 | .07    | .04   | .03     | .1      | .13     | .145     |
| 25 | .06    | .039  | .032    | .1      | .14     | .139     |
| 26 | .058   | .039  | .032    | .092    | .147    | .14      |
| 27 | .063   | .03   | .029    | .086    | .14     | .142     |
| 28 | .06    | .029  | .03     | .079    | .14     | .142     |
| 29 | .056   | .026  | .032    | .079    | .14     | .146     |



|    |      |      |      |      |      |      |
|----|------|------|------|------|------|------|
| 30 | .055 | .026 | .03  | .09  | .13  | .149 |
| 31 | .057 | .038 | .027 | .085 | .13  | .125 |
| 32 | .075 | .035 | .03  | .078 | .054 | .122 |
| 33 | .081 | .035 | .031 | .077 | .062 | .116 |
| 34 | .09  | .036 | .032 | .08  | .068 | .117 |
| 35 | .08  | .041 | .03  | .074 | .063 | .123 |
| 36 | .085 | .042 | .027 | .075 | .05  | .117 |
| 37 | .09  | .043 | .026 | .083 | .042 | .11  |
| 38 | .077 | .038 | .028 | .092 | .05  | .115 |
| 39 | .077 | .029 | .03  | .099 | .048 | .11  |
| 40 | .091 | .03  | .032 | .119 | .048 | .116 |
| 41 |      |      | .026 | .089 |      | .125 |
| 42 |      |      | .028 | .082 |      | .122 |
| 43 |      |      | .03  | .082 |      | .116 |
| 44 |      |      | .033 | .077 |      | .117 |
| 45 |      |      | .032 | .075 |      | .123 |
| 46 |      |      | .033 | .077 |      | .117 |
| 47 |      |      | .036 | .078 |      | .11  |
| 48 |      |      | .035 | .077 |      | .115 |
| 49 |      |      | .034 | .078 |      | .113 |
| 50 |      |      | .034 | .086 |      | .116 |

Los cuadros en blanco indican datos que faltan por diversas razones.

TABLA XIII

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RELACION PERIOSTRACO / OSTRACO-HIPOSTRACO

|             | MEDIA |
|-------------|-------|
| NORMAL      | .073  |
| 1 MES       | .049  |
| 3 MESES     | .032  |
| 6 MESES     | .082  |
| 9 MESES     | .092  |
| 12 MESES    | .118  |
| MEDIA TOTAL | .074  |

| FUENTE | SUM CUA | GRAD LI | MED CUA | F EXP   | F TEO |
|--------|---------|---------|---------|---------|-------|
| ENTRE  | .225    | 5       | .045    | 126.637 | 1E-13 |
| DENTRO | .094    | 264     | 3.5E-4  |         |       |
| TOTAL  | .319    | 269     |         |         |       |

$F_{exp} > F_{teo}$  se rechaza la hipotesis nula  $H_0$ .

TABLA XIV

RELACION Mg/Ca DURANTE EL AYUNO

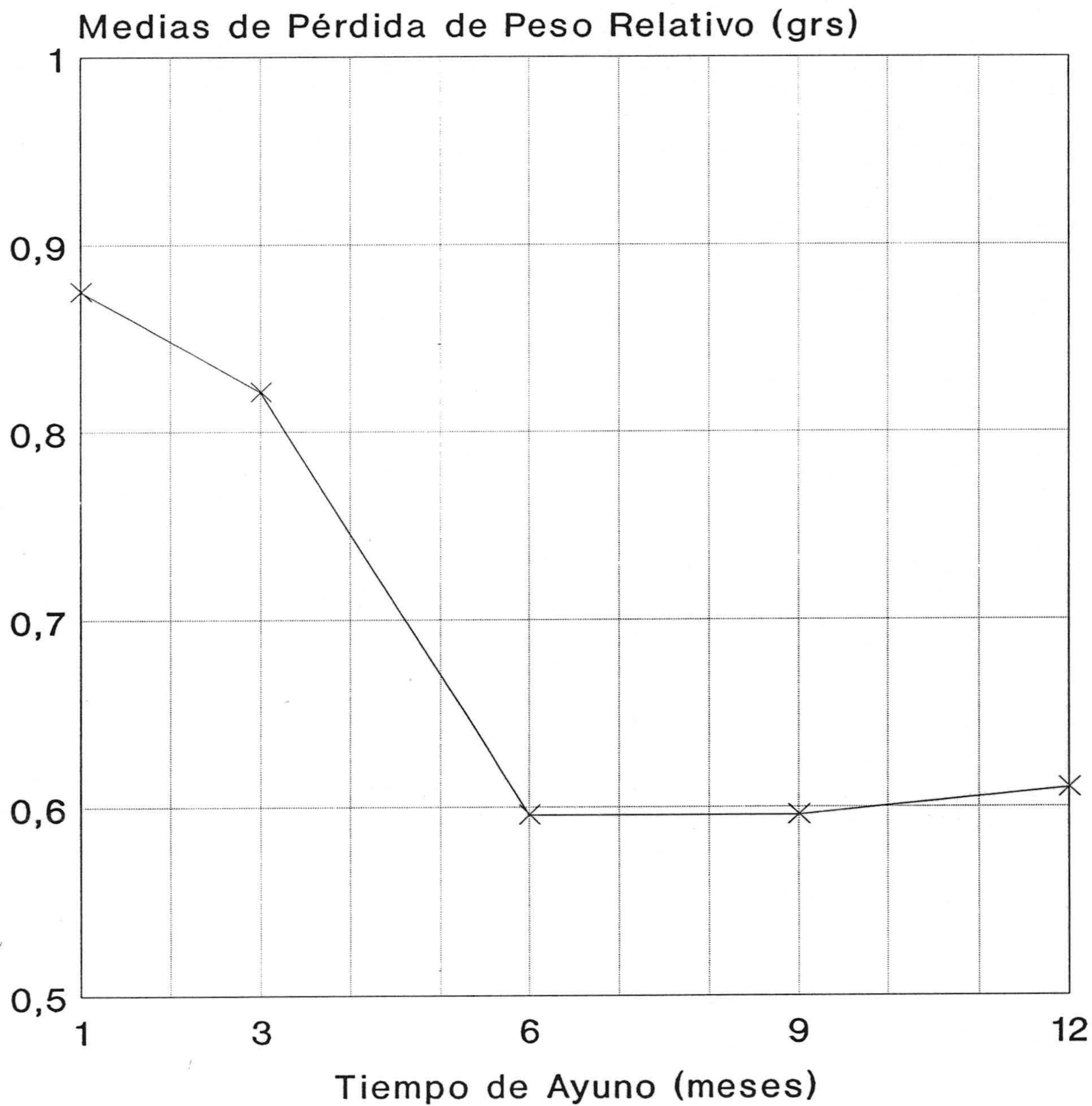
|          | CASCARA | TEJIDO  |
|----------|---------|---------|
| NORMAL   | .000258 | .476316 |
| 1 MES    | .000452 | .456889 |
| 3 MESES  | .000560 | .505095 |
| 6 MESES  | .001740 | .539216 |
| 9 MESES  | .001970 | .544079 |
| 12 MESES | .002370 | .550324 |

|             | MEDIA   |
|-------------|---------|
| CASCARA     | 1.22E-3 |
| TEJIDO      | .512    |
| MEDIA TOTAL | .257    |

Se realiza la recta de regresión y se obtiene  $r = .9257$  y  $r^*r = .8569$

**APENDICE.II**

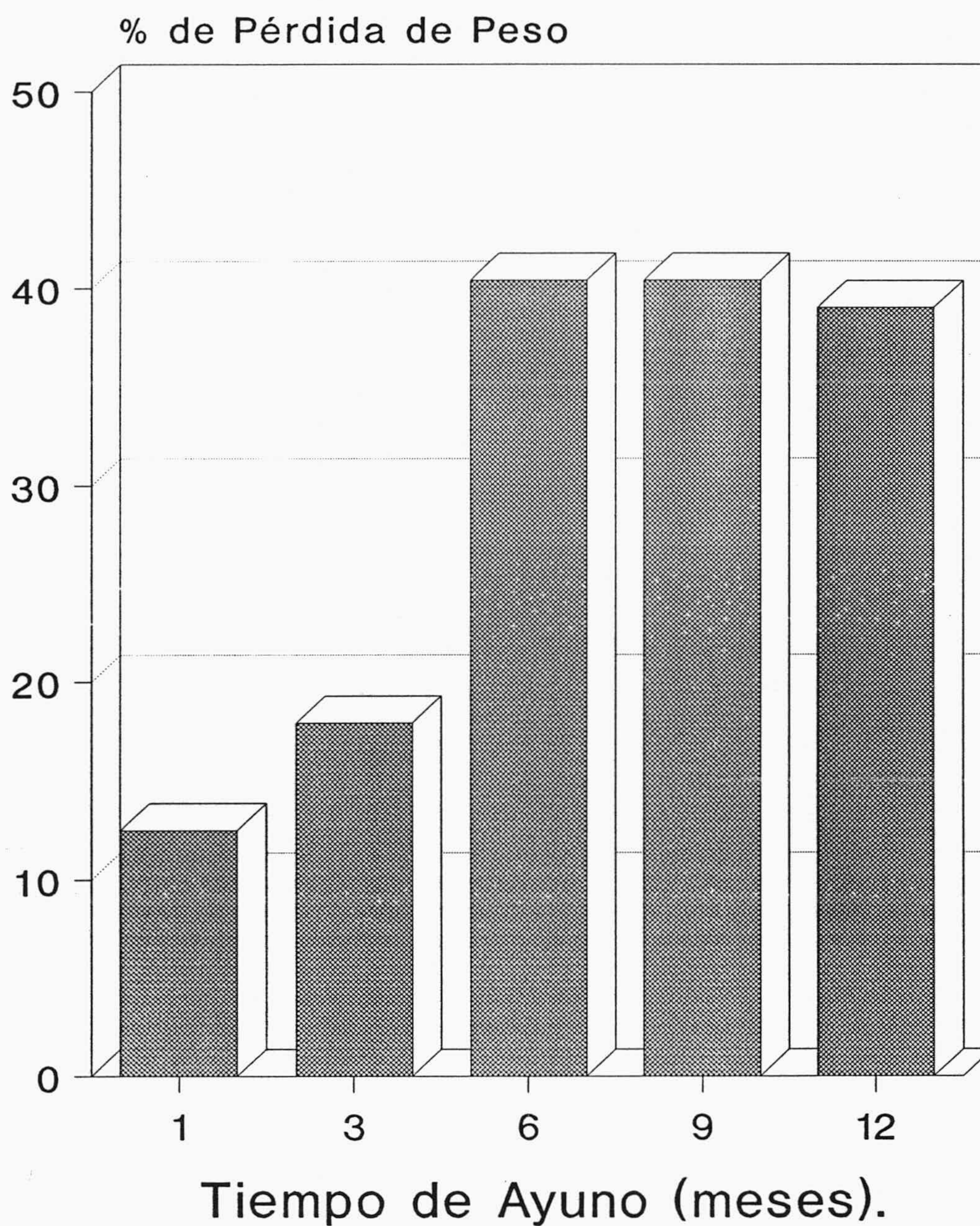
# Pérdida de Peso



## Gráfica I.

Se observa una inflexión de la curva que se estabiliza a los seis meses.

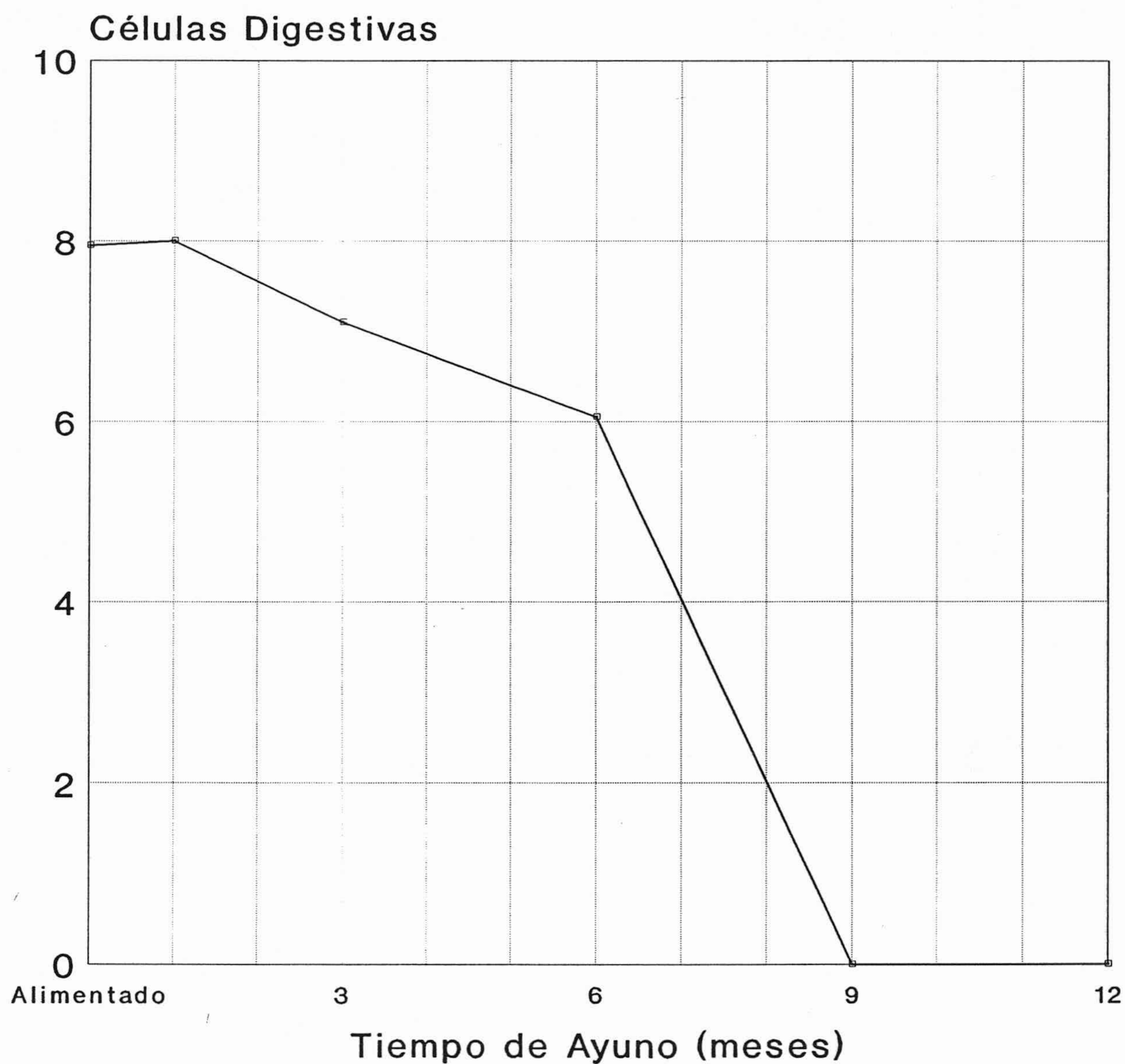
# % Pérdida de Peso



## Gráfica II.

Se comprueba la existencia de dos grupos  
1-3 y 6-12 meses de ayuno.

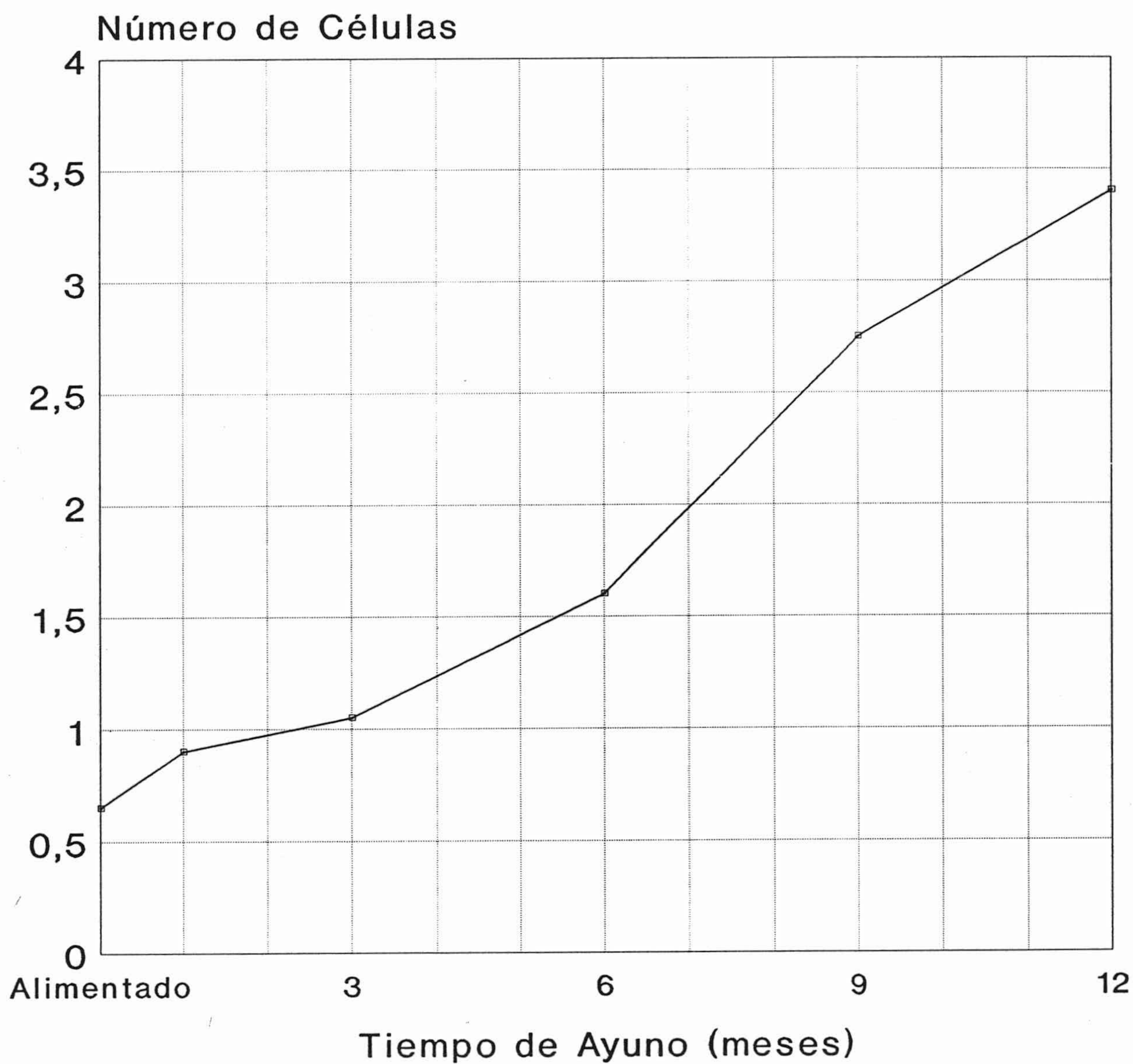
# Número de Células Digestivas en Ayuno



## Gráfica III.

Existe una inflexión en 3-6 meses para caer hasta cero en 9-12 meses de ayuno.

# Número de Células Excretoras en Ayuno

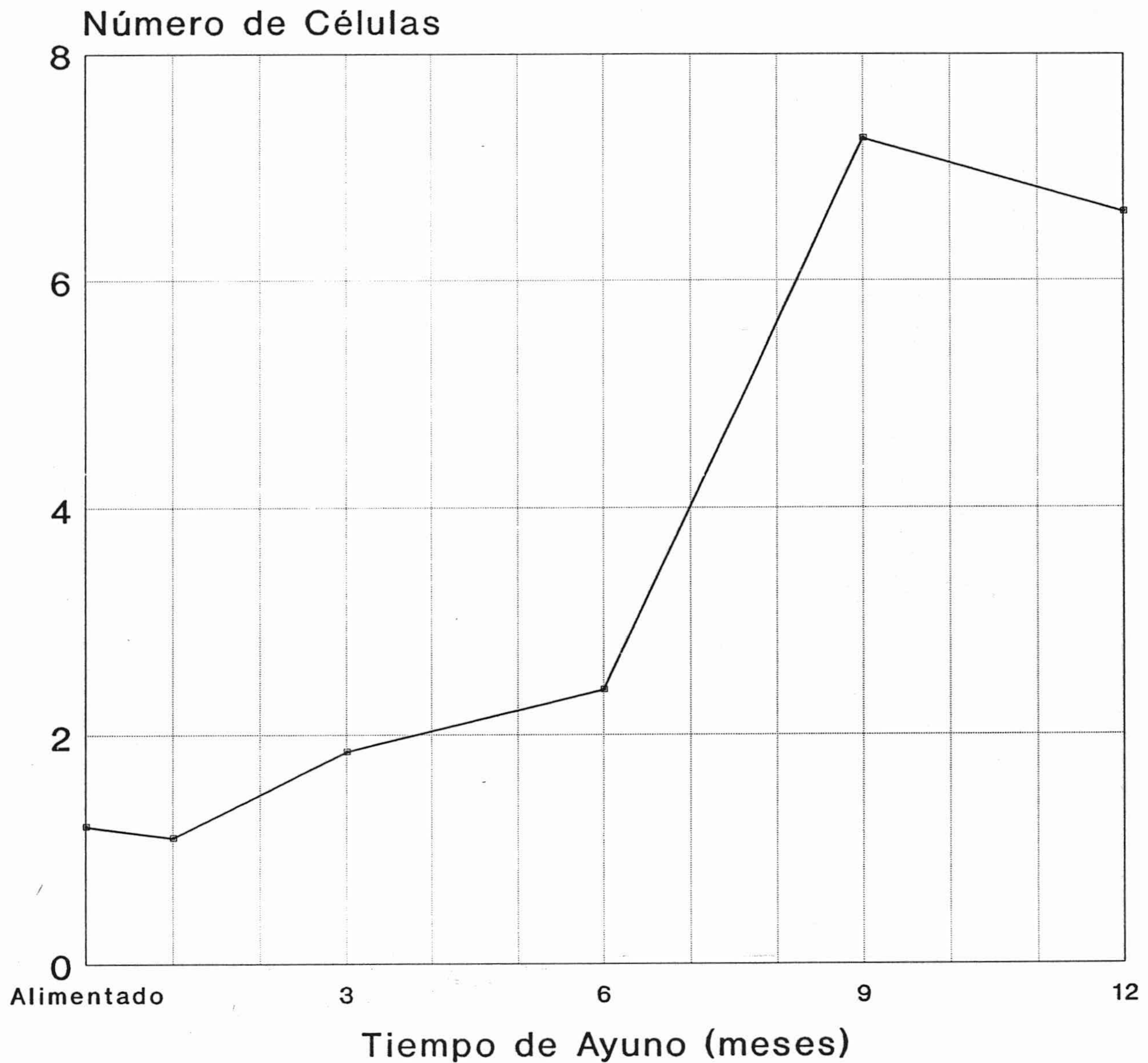


## Gráfica IV.

En el periodo de 3-6 meses de ayuno se produce una inflexión.

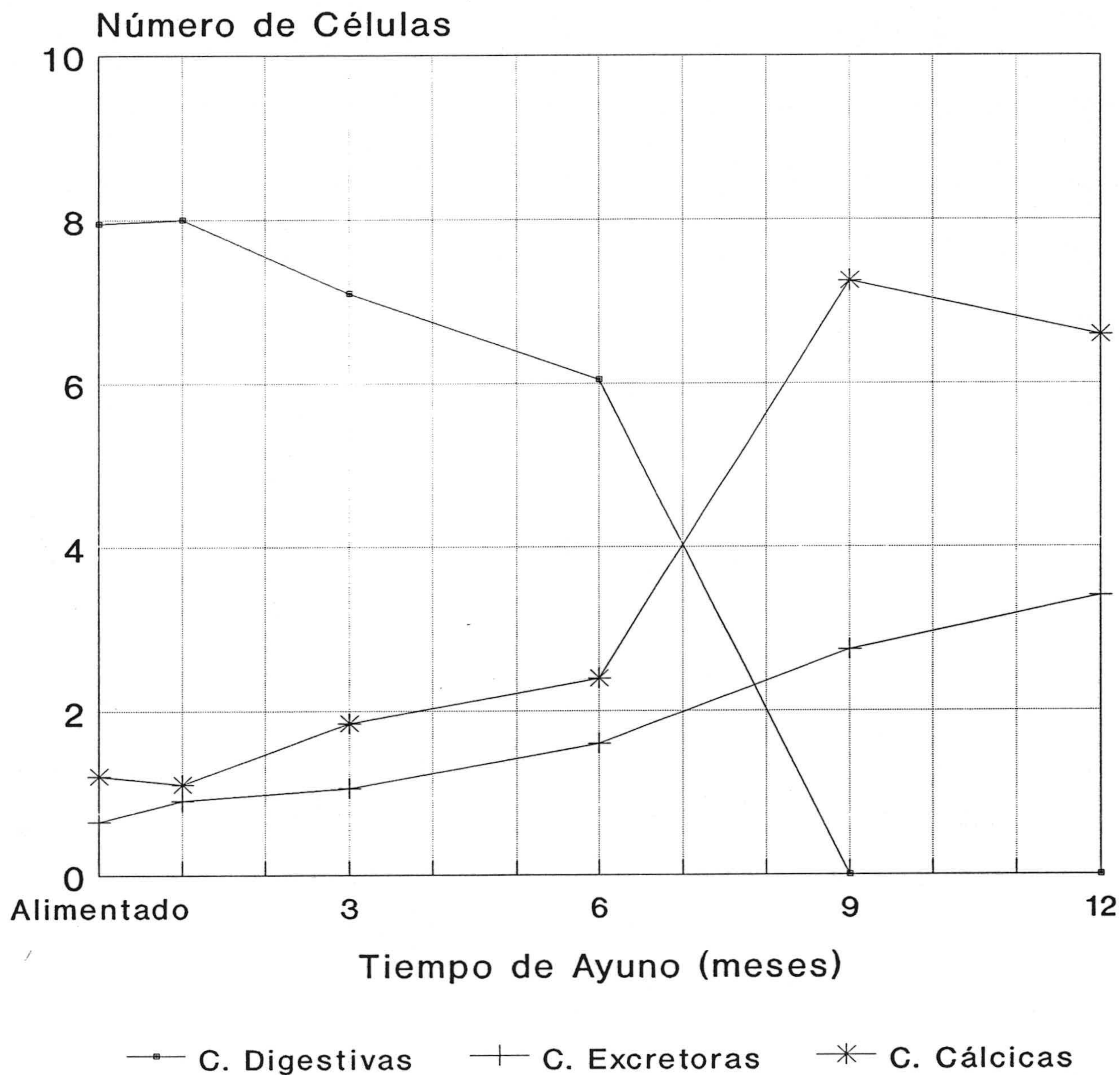


# Número de Células Cálcicas en Ayuno



Gráfica V.  
La pendiente se hace más pronunciada a  
patir de los seis meses de inanición.

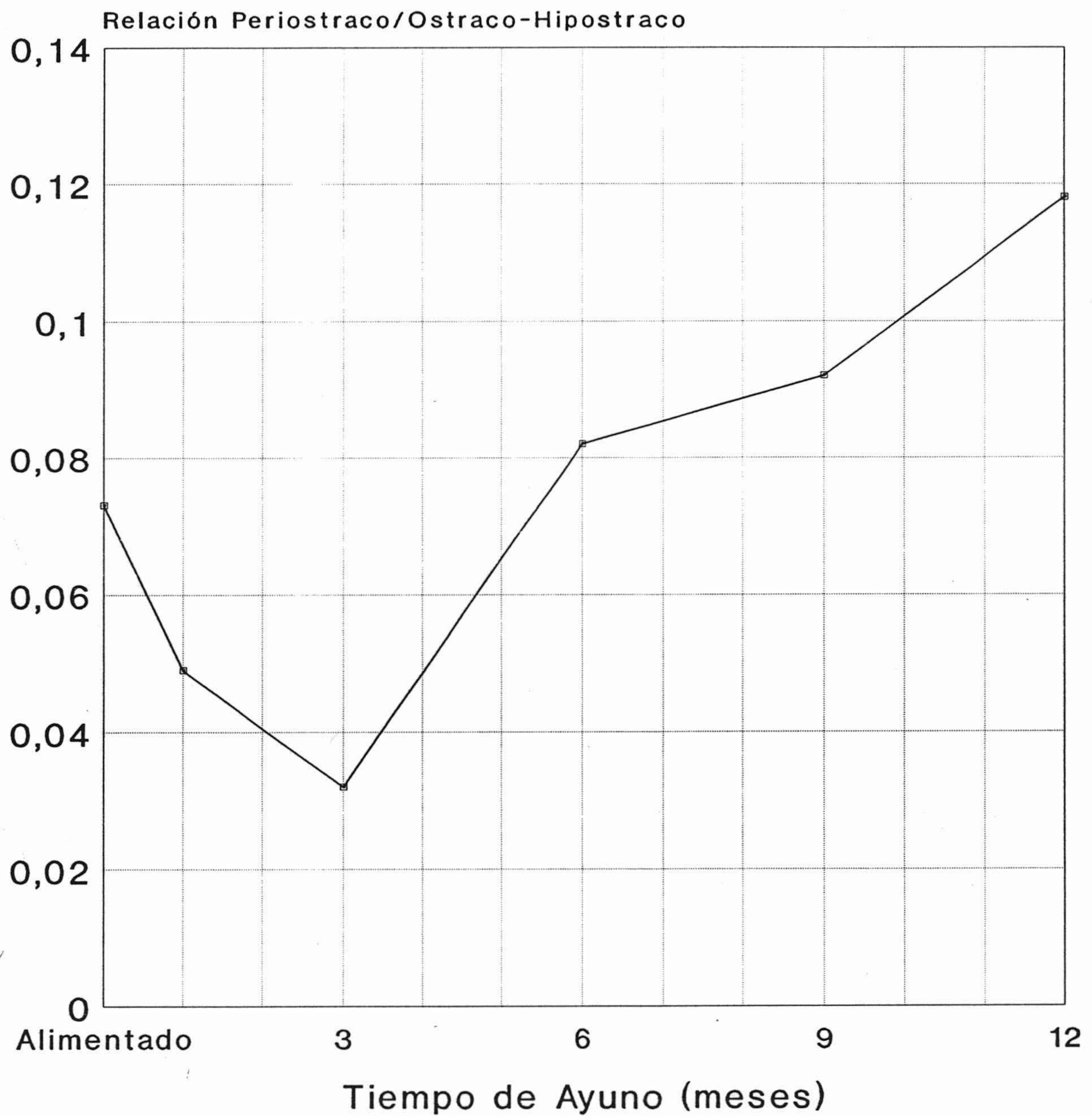
# Relación Tipos Celulares



Gráfica VI.

Se comprueba que los cambios numéricos se hacen más patentes a los seis meses.

# Espesor de la Concha

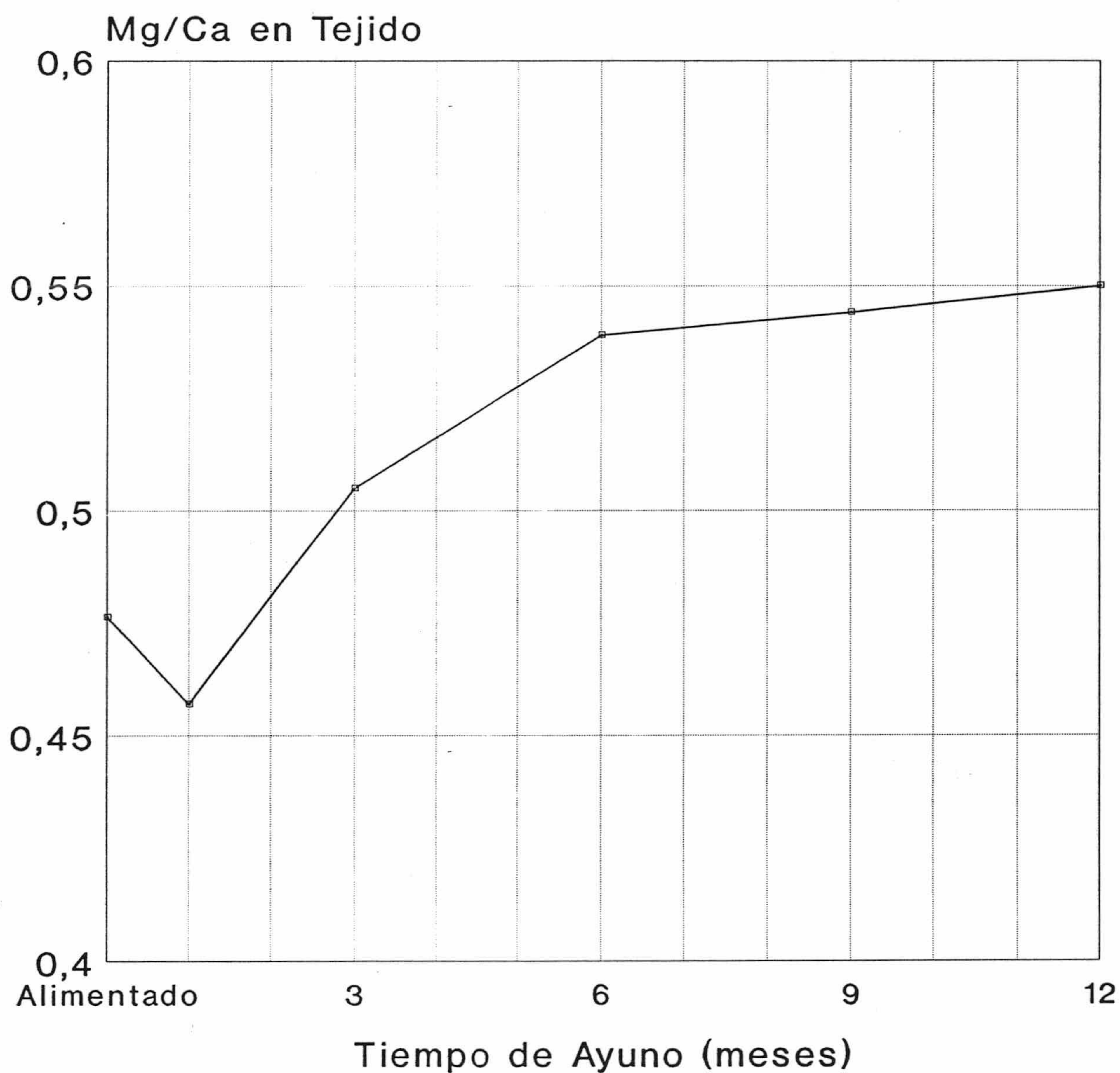


Gráfica VII.

A los 3 meses se produce una fuerte inflexión con un cambio de sentido

# Hepatopáncreas

## Mg/Ca en el Ayuno

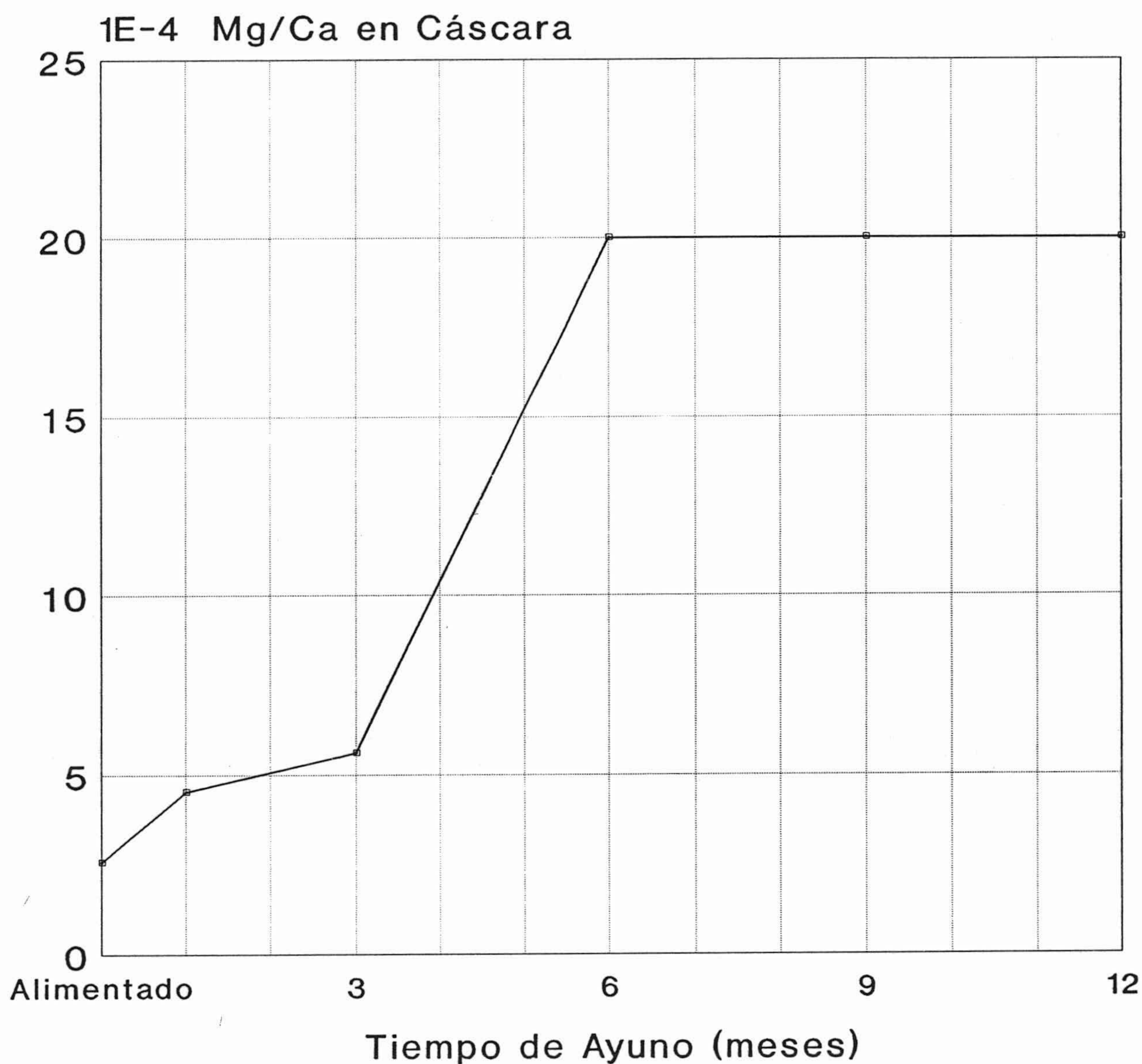


### Gráfica VIII.

Los cambios en la relación ocurren en el rango 1-6.

# Concha

## Mg/Ca en el Ayuno

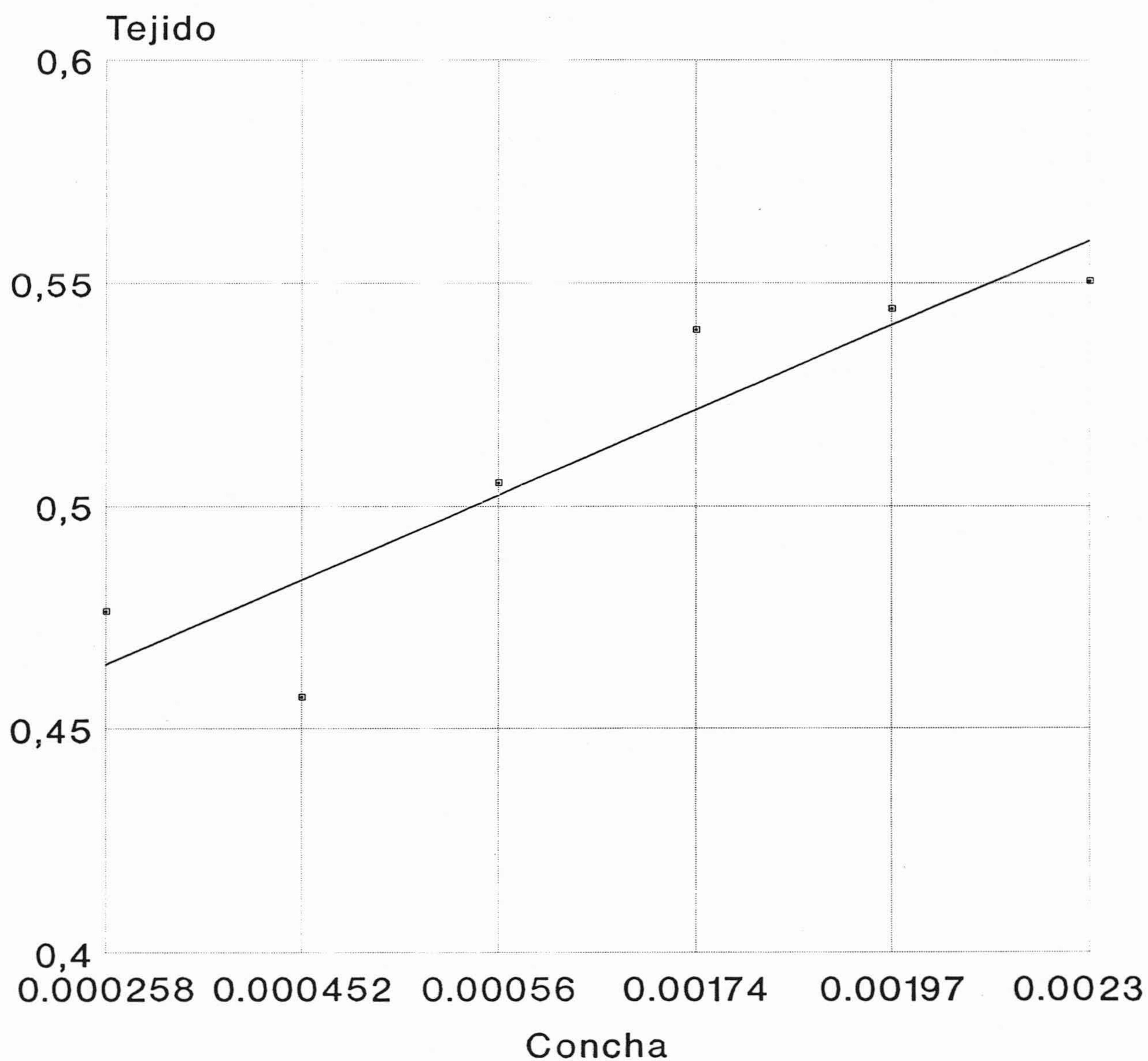


### Gráfica IX.

La inflexión se produce en 1-6, el punto medio de la pendiente es 3

# Recta de Regresión

## Tejido/Concha



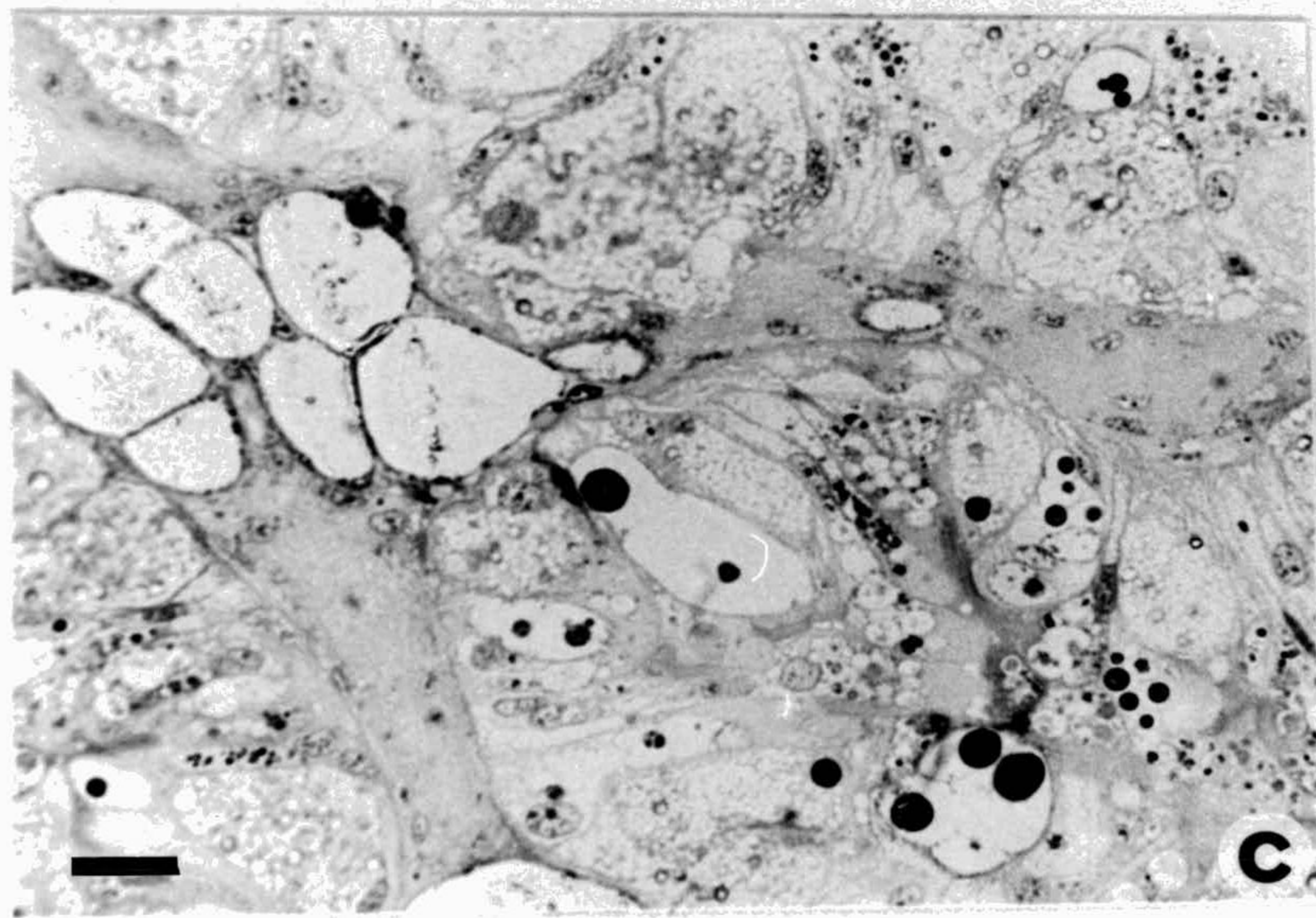
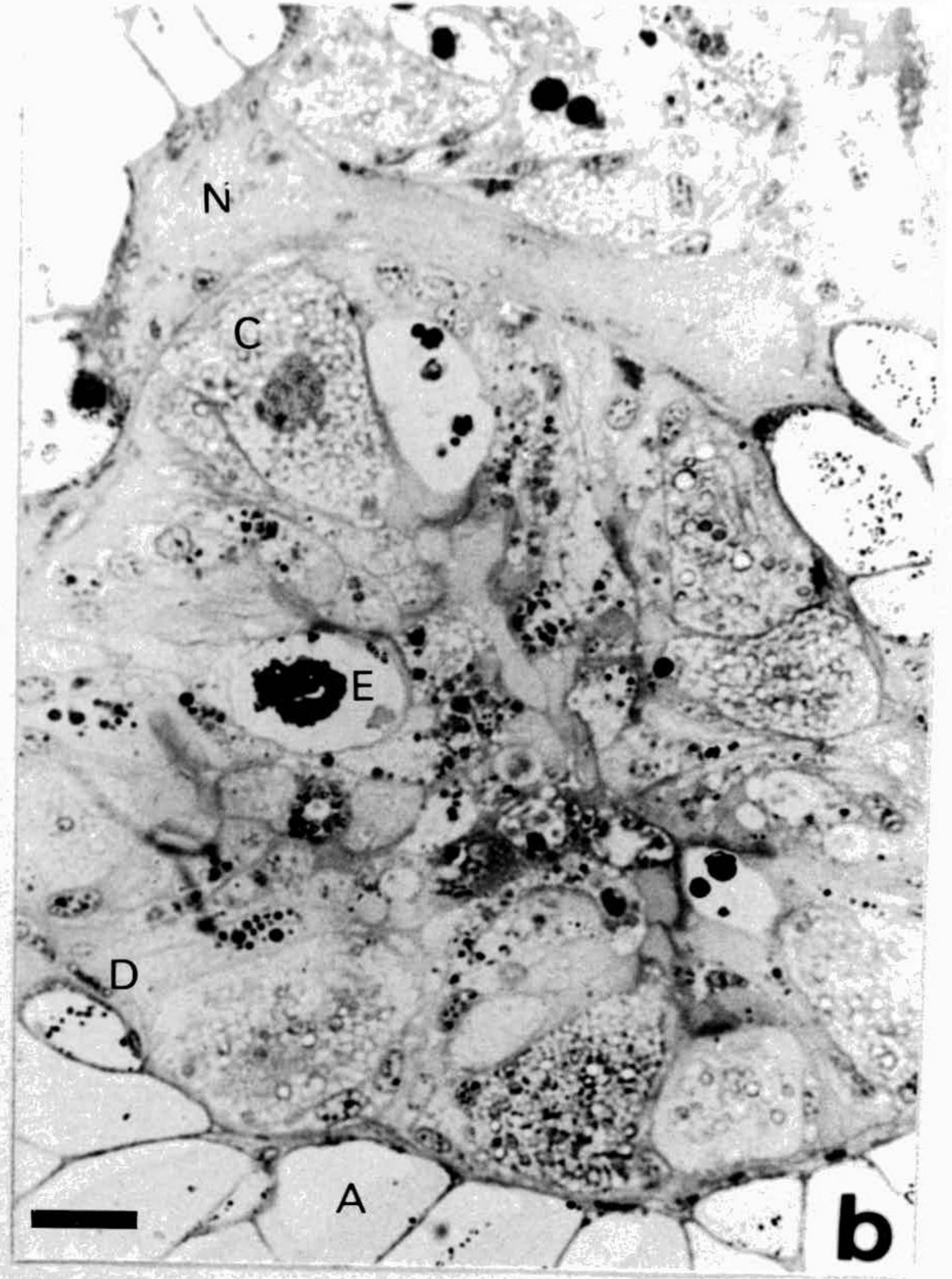
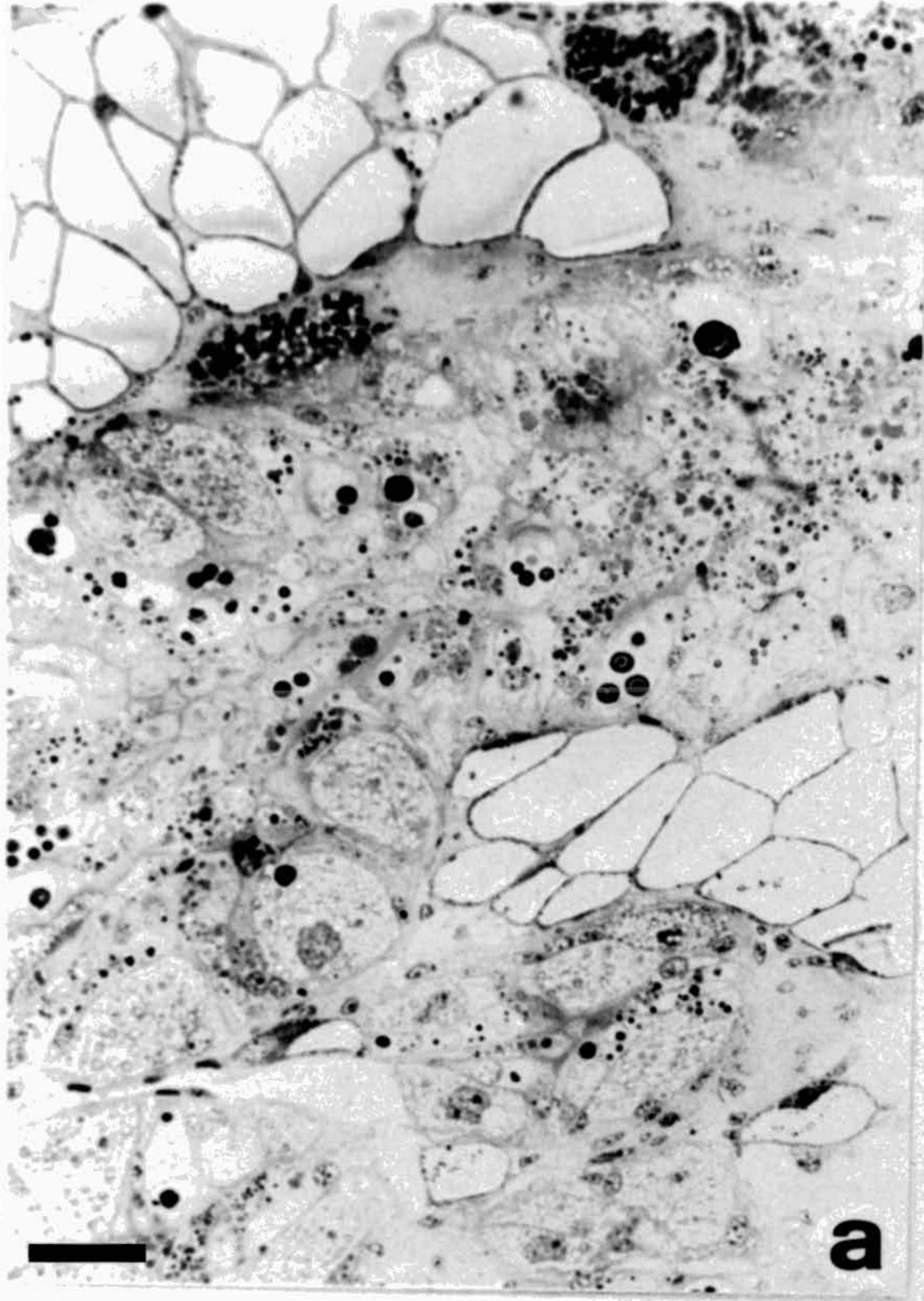
### Gráfica X.

Recta de Regresión de la relación Mg/Ca  
Eje (x) Concha, Eje (y) Tejido.

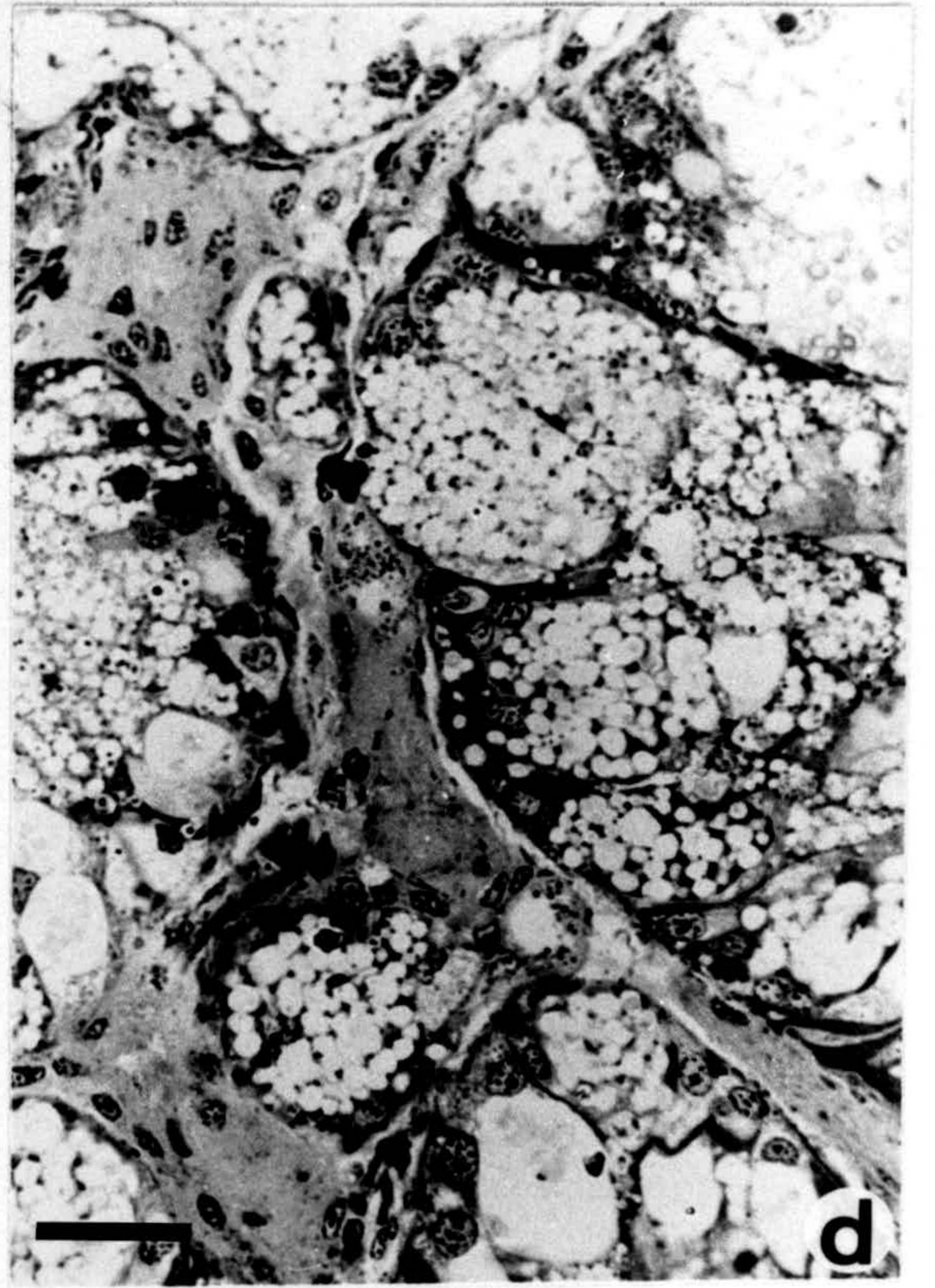
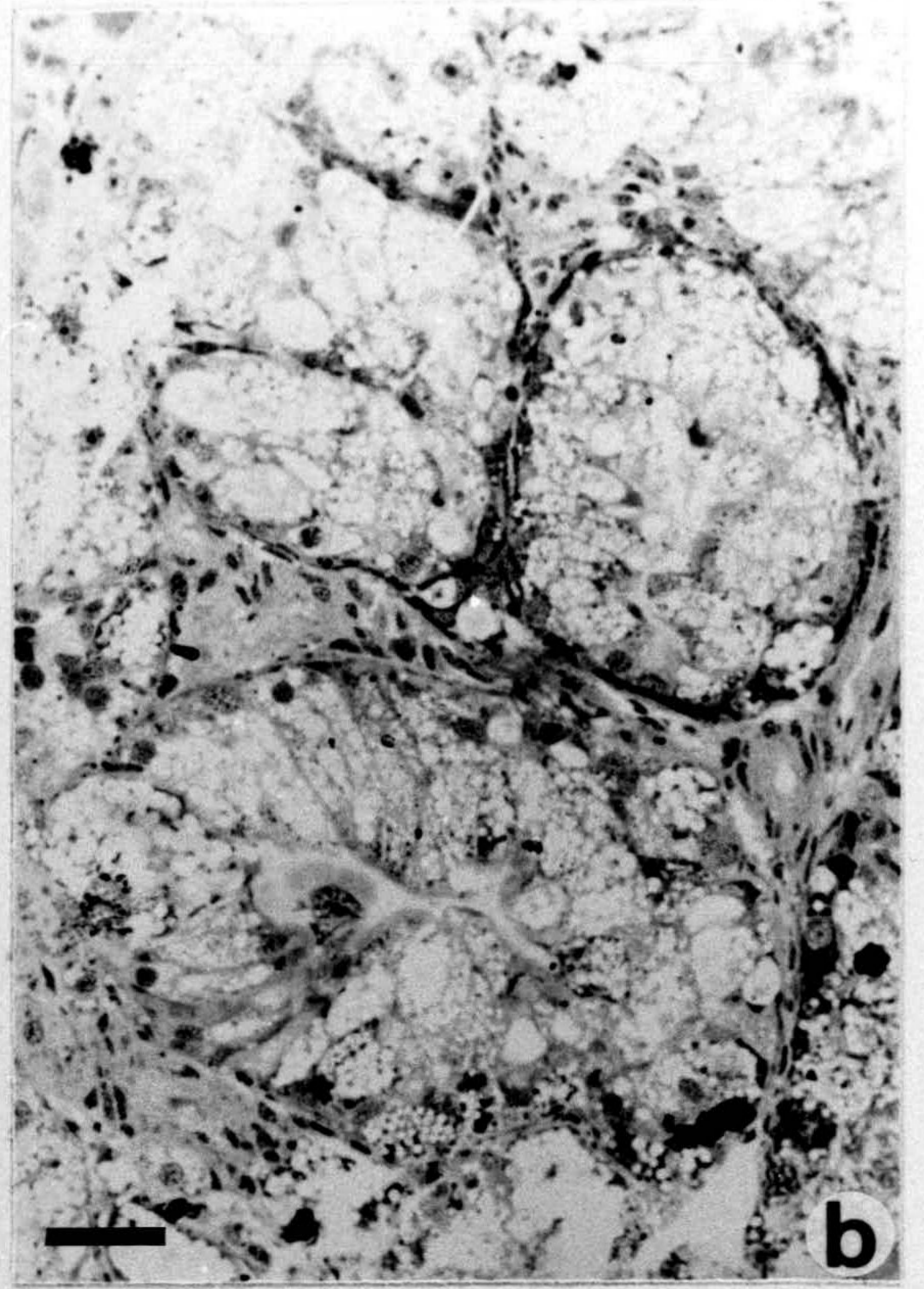
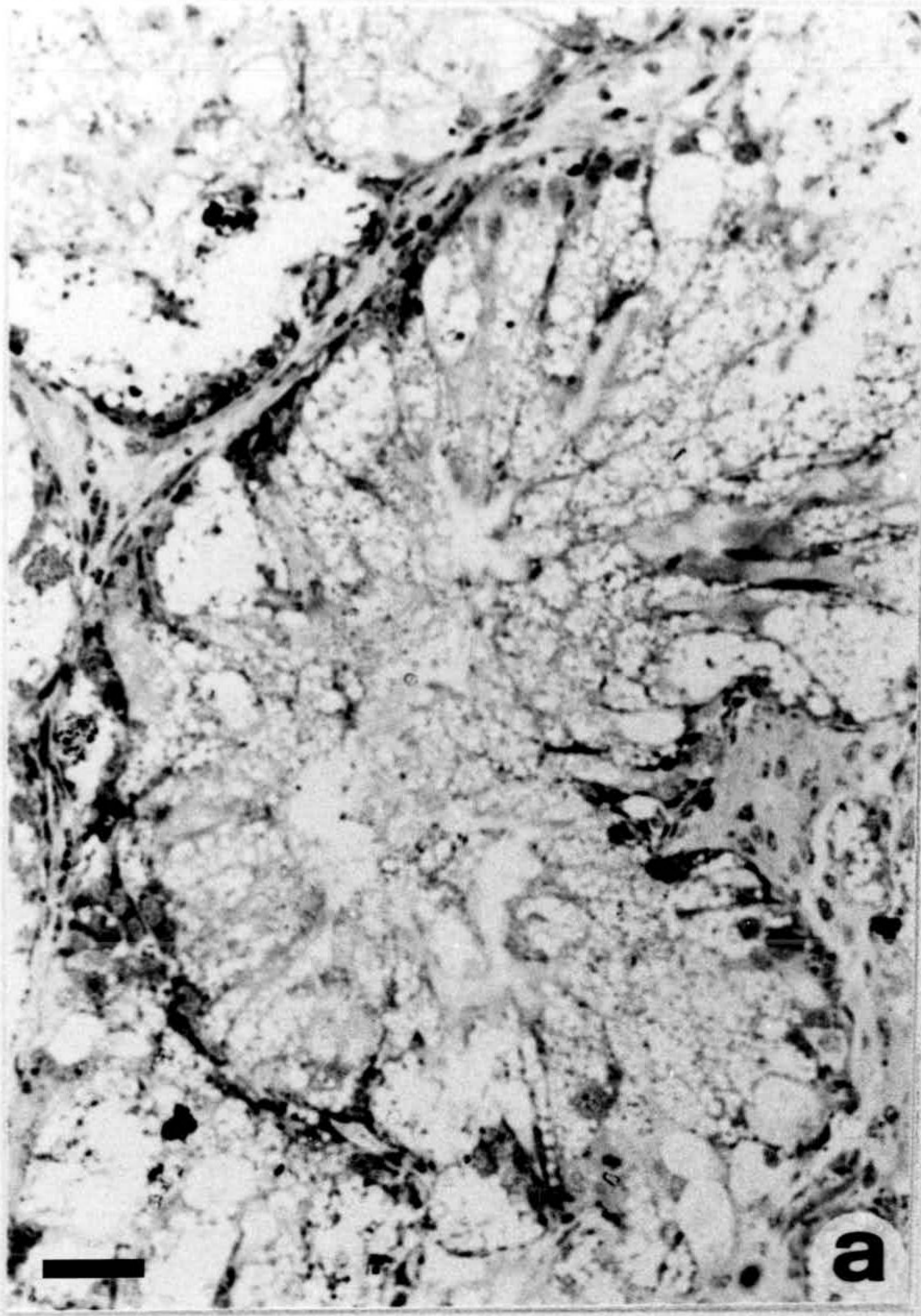
**APENDICE.III**

**Figura I.** Microfotografías, con microscopía óptica, correspondientes a diversas secciones adenómericas de individuos alimentados. Se pueden observar los tres tipos celulares que constituyen el adenómero. Además, de un abundante tejido adiposo que circunda los adenómeros. Tinción con Azul de Toluidina. Las barras indican 10 micras.

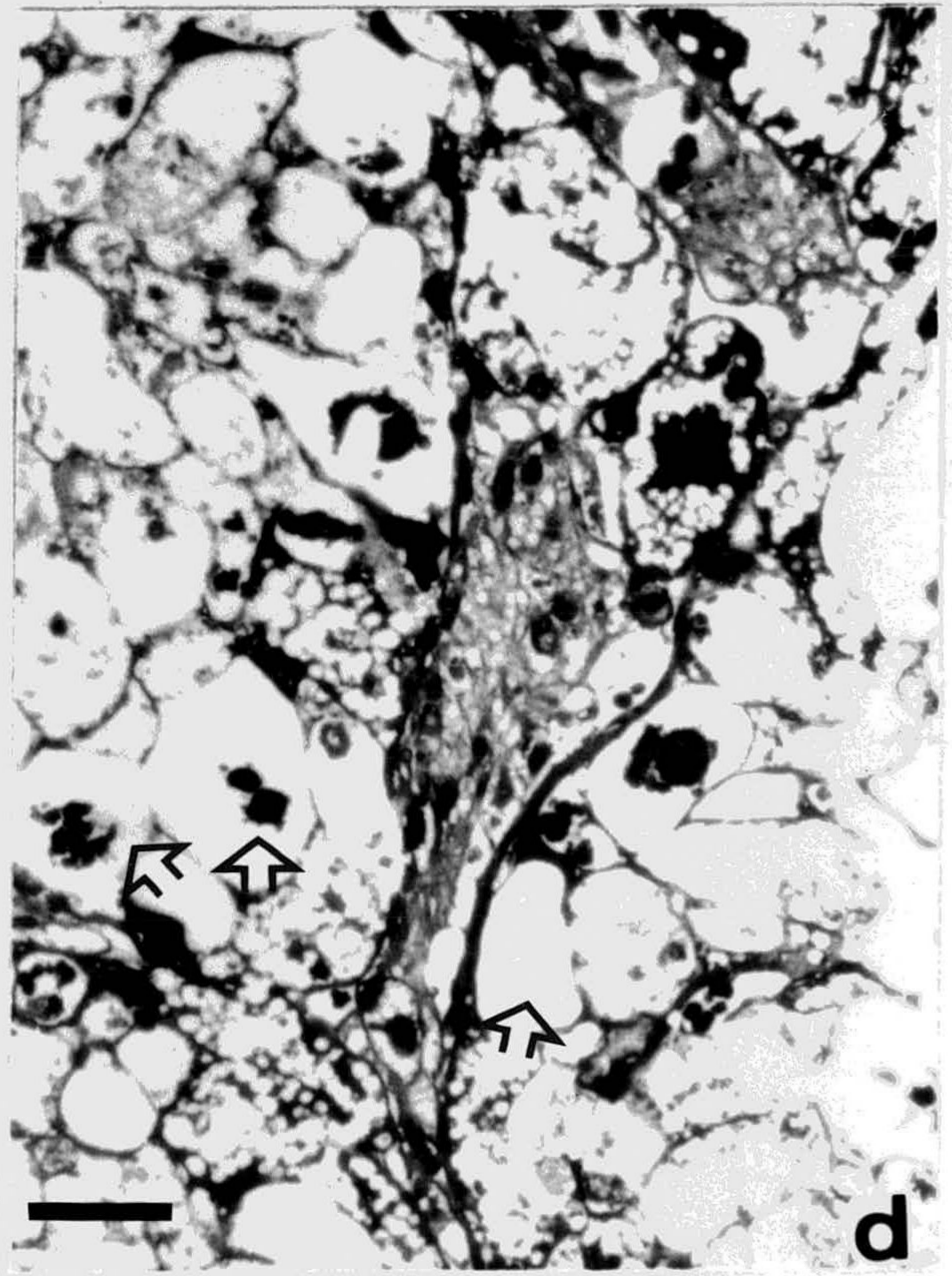
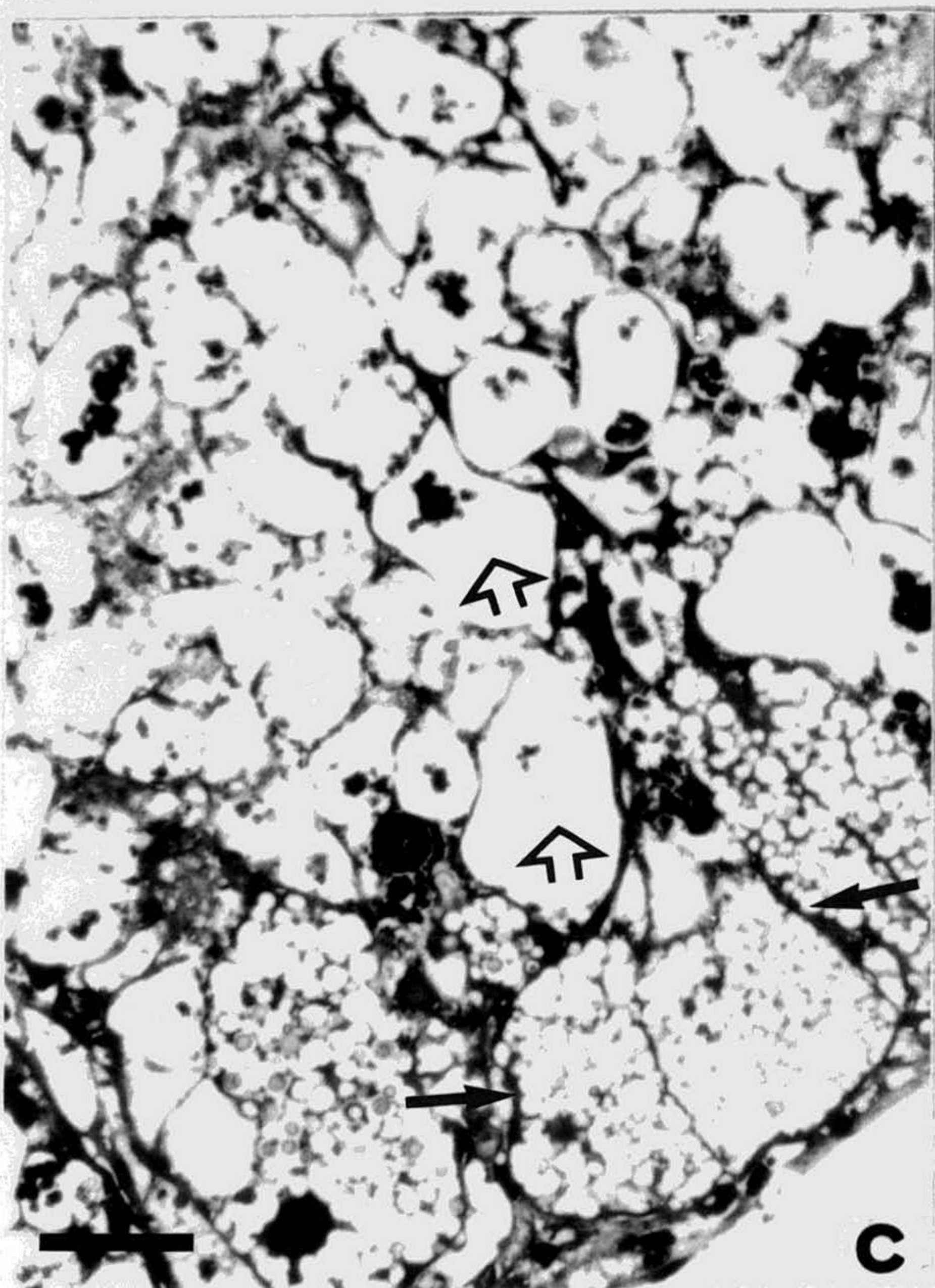
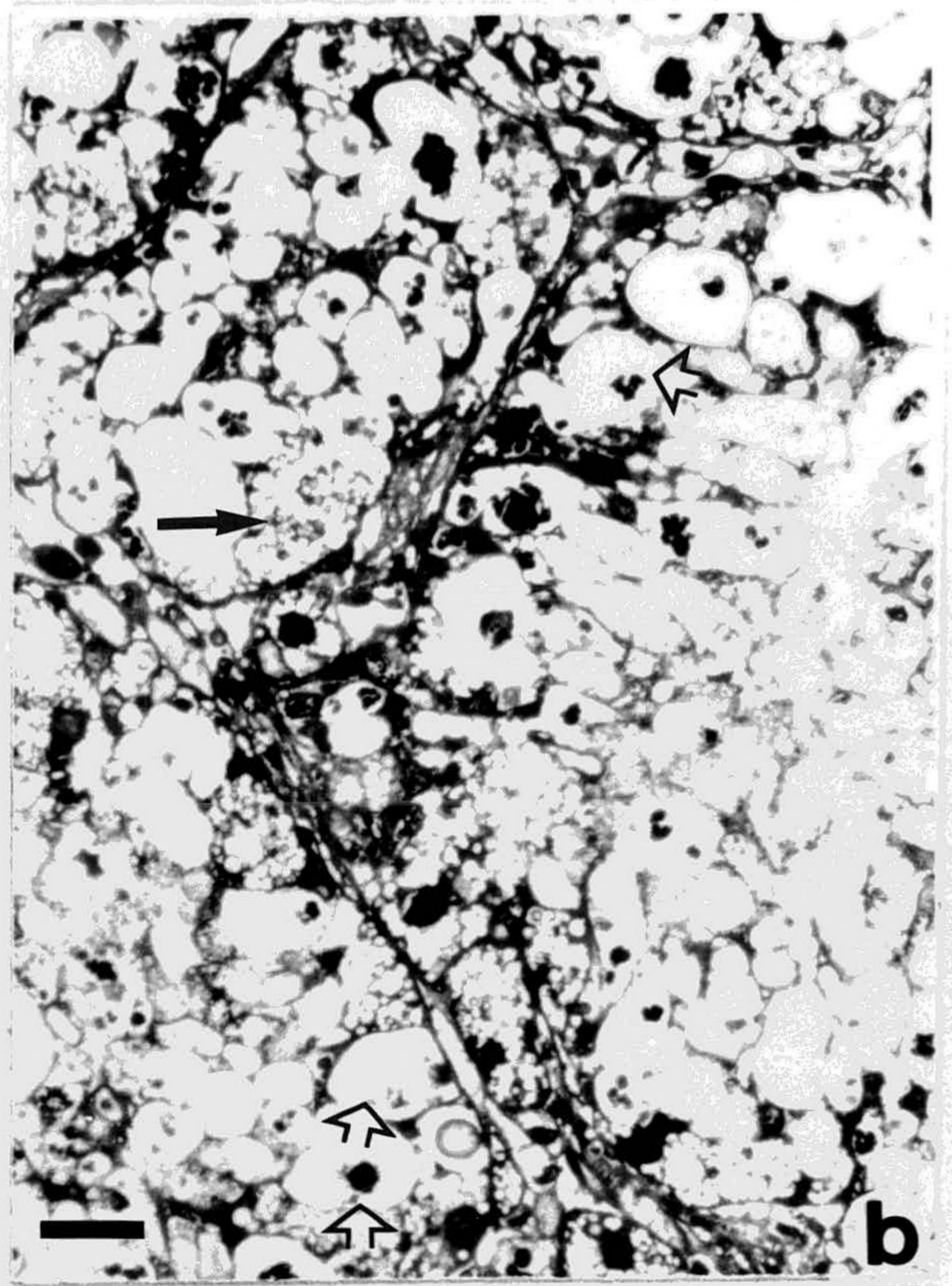
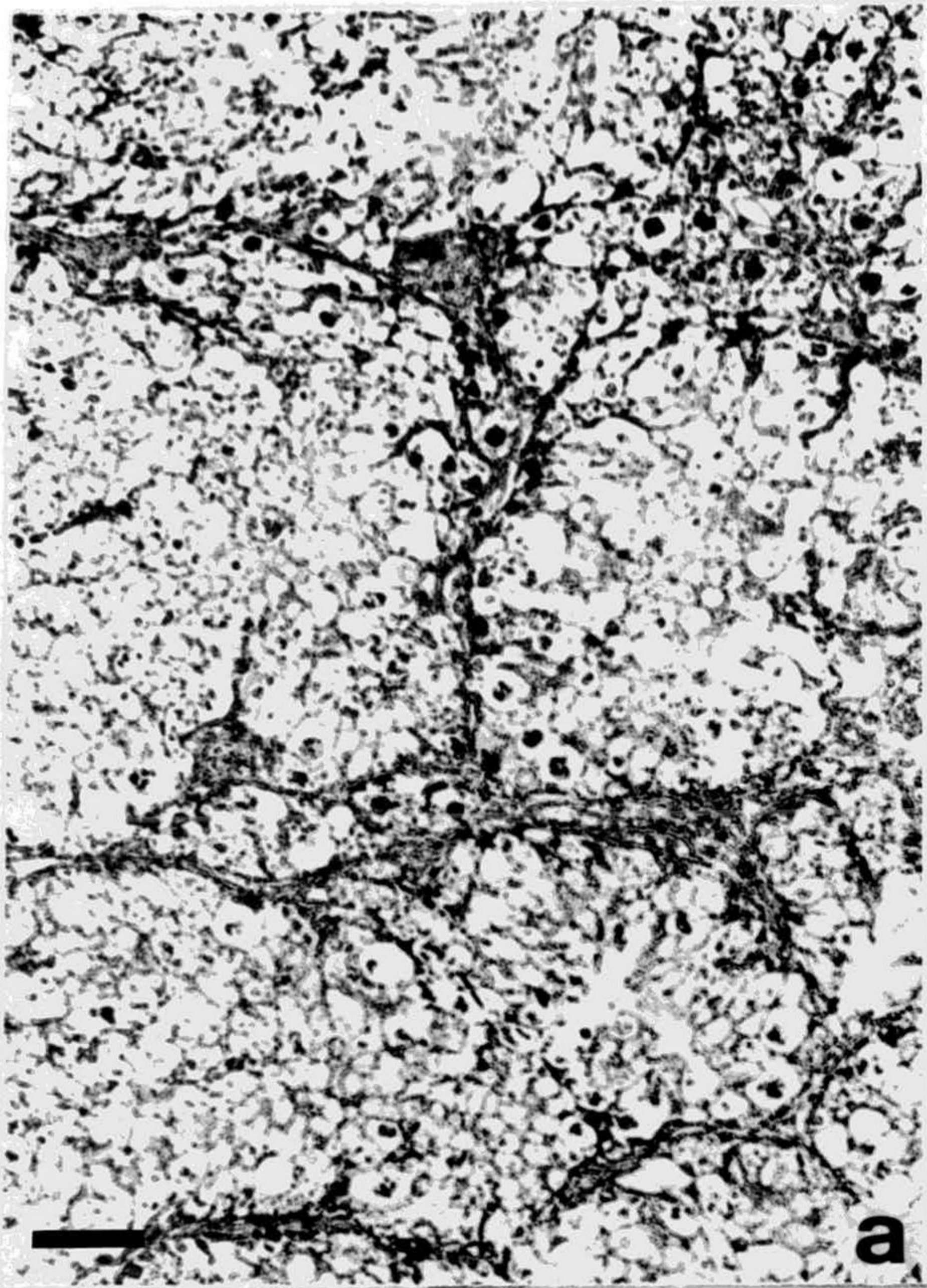




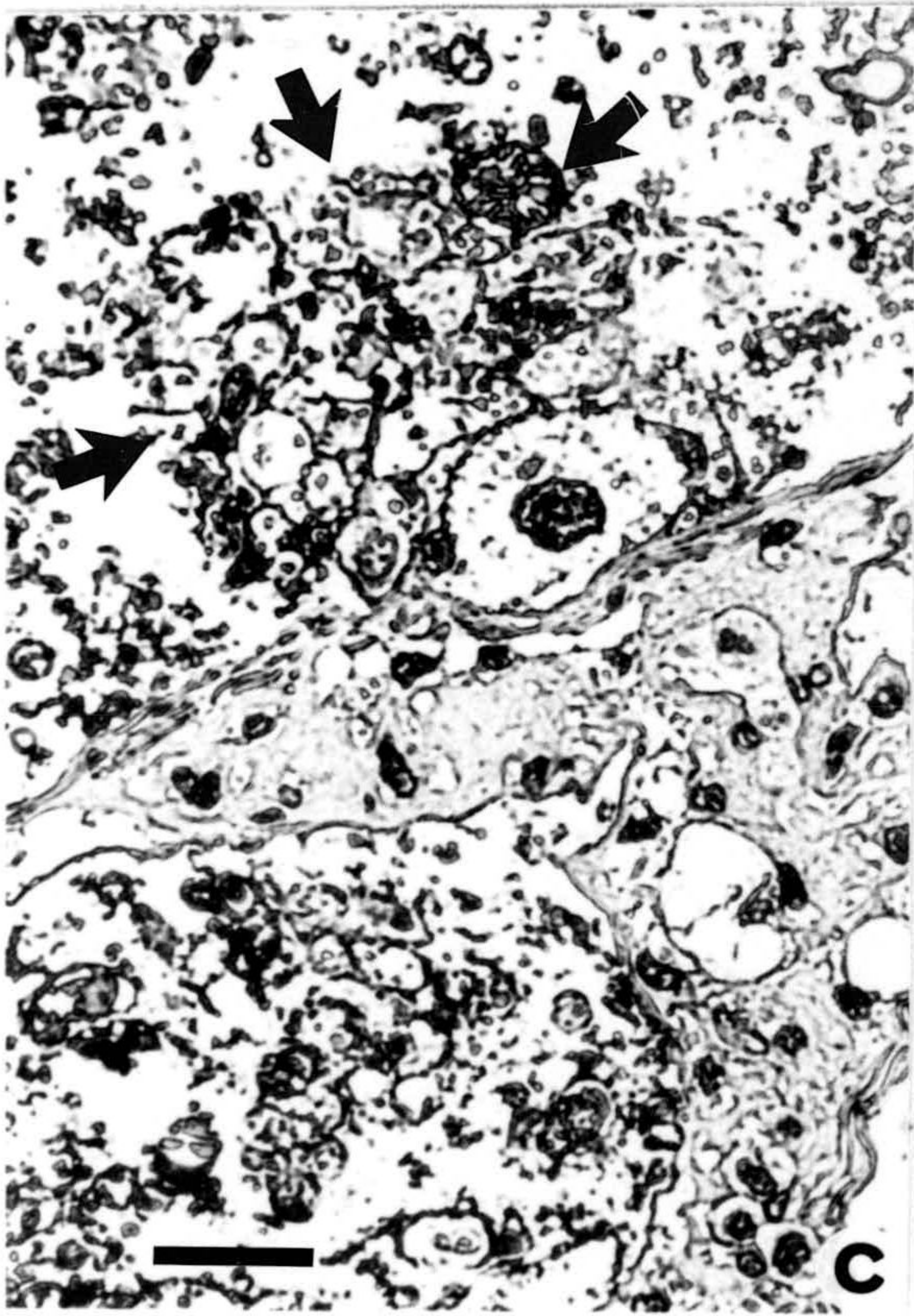
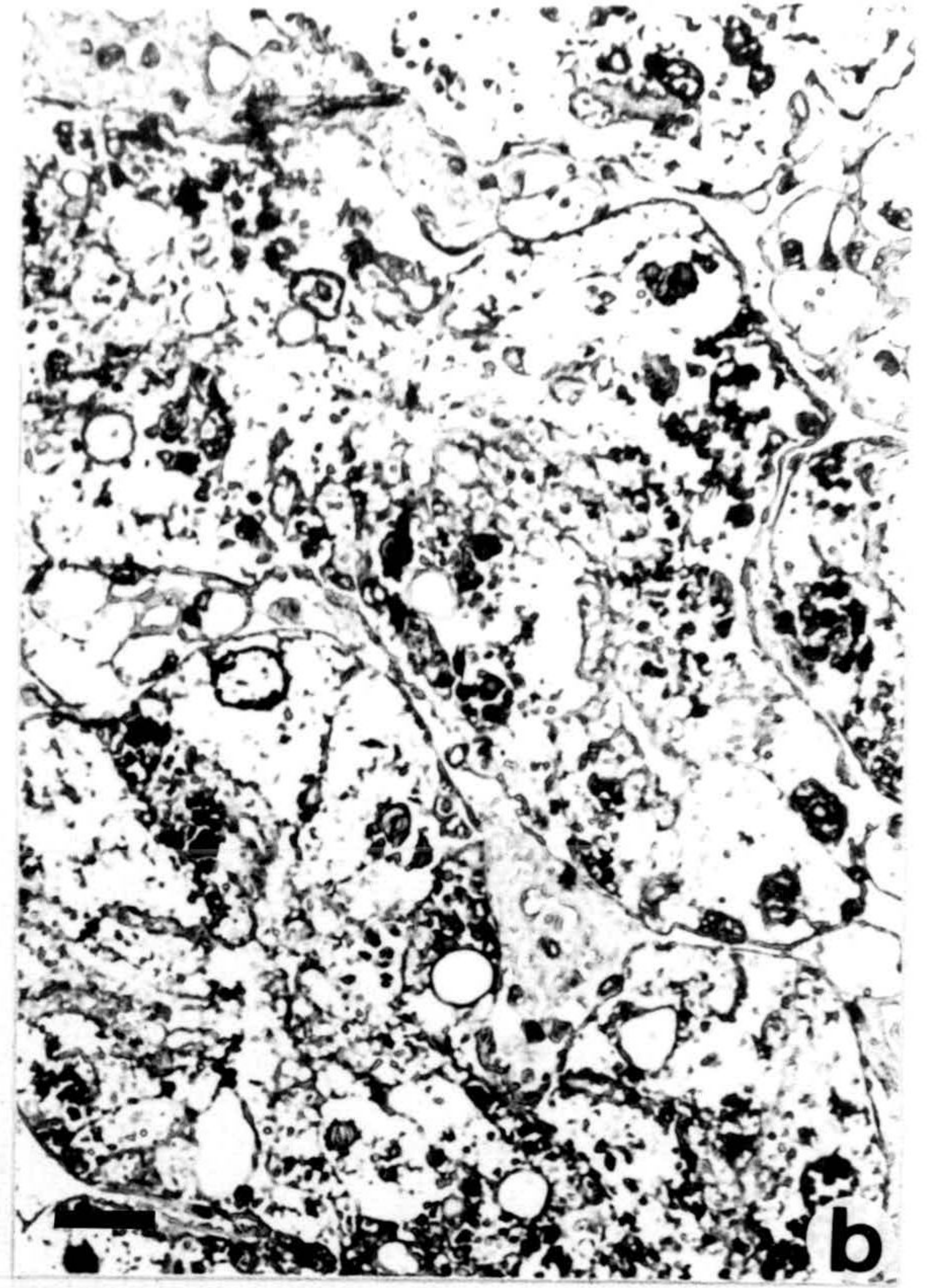
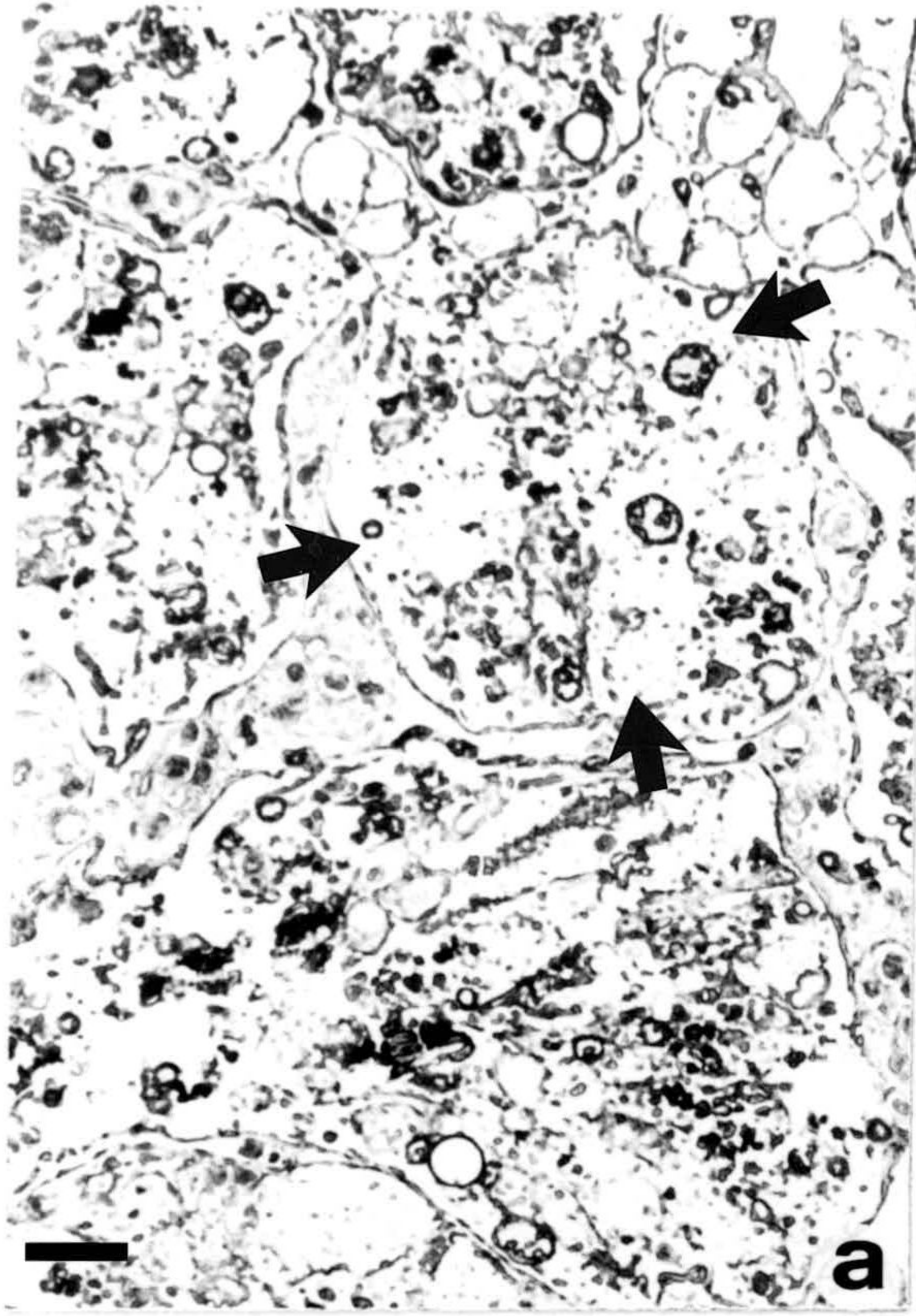
**Figura II.** Microfotografía correspondiente a individuos que han ayunado durante un mes. El aspecto general de los adenómeros es muy similar a los individuos recién alimentados. (a) (b) (c) La barra indica diez micras, (d) 30 micras.



**Figura III.** Imagenes correspondientes a individuos que han estado durante nueve meses sin alimentarse. Los adenómeros presentan gran número de células rotas. No aparecen células digestivas y sí un abundante número de células excretoras (E) y cálcicas (C). a/ 30 micras y b/ c/ d/ 10 micras.

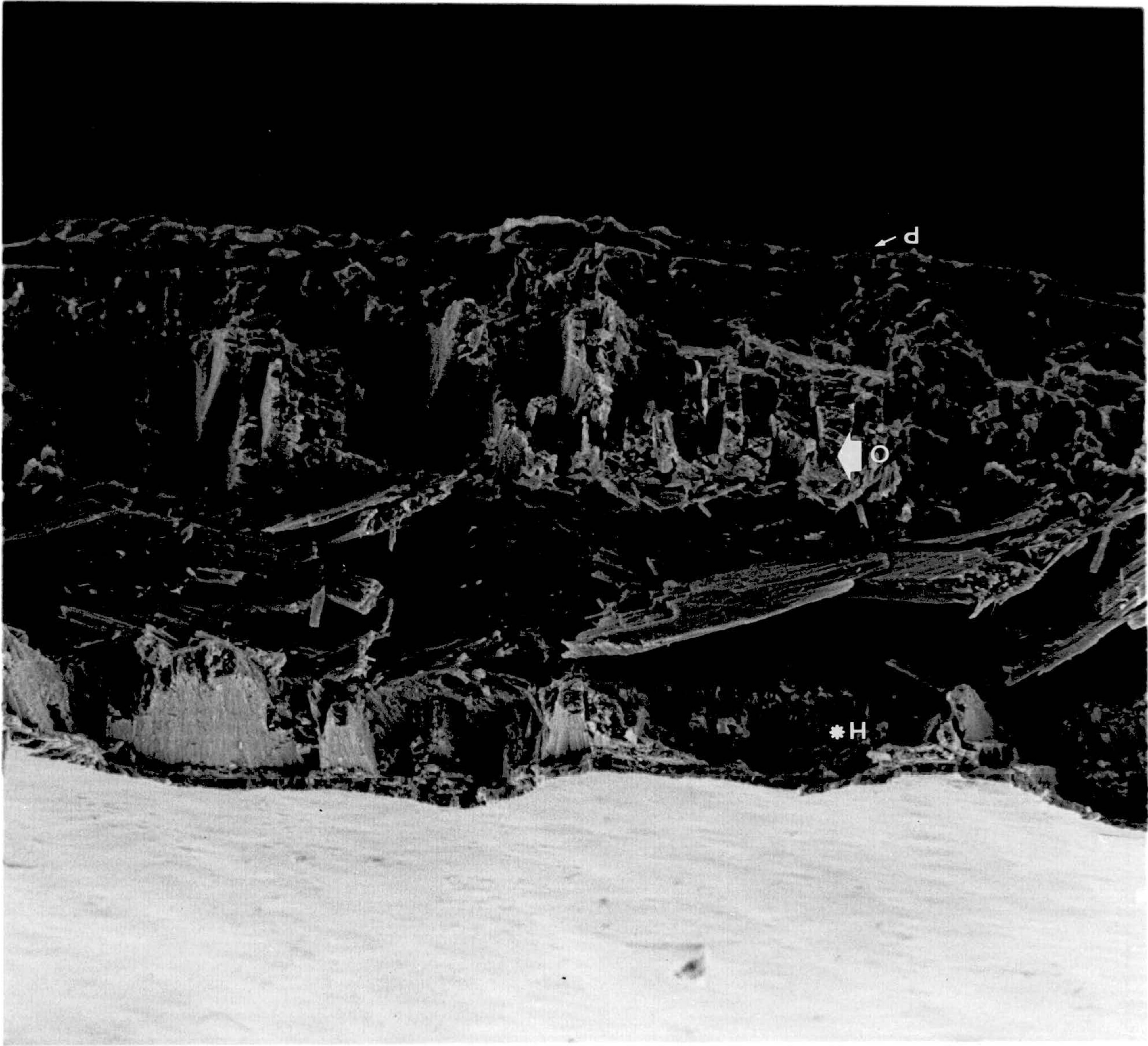


**Figura IV.** Imagenes de adenómeros hepatopancreáticos de caracoles que han estado durante doce meses de ayuno. El tejido aparece muy desorganizado con adenómeros que contienen gran número de células rotas. La barra muestra 10 micras.

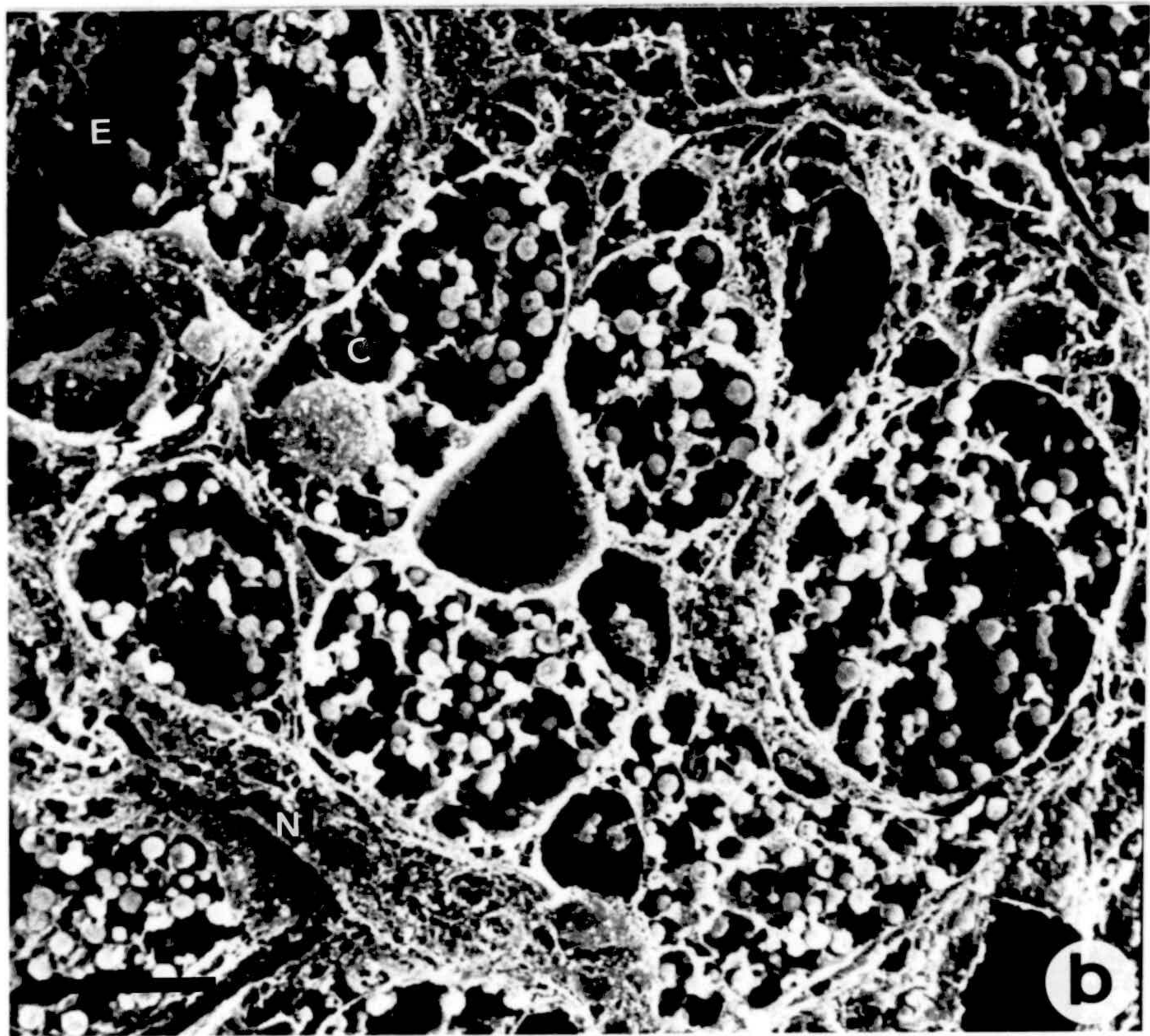
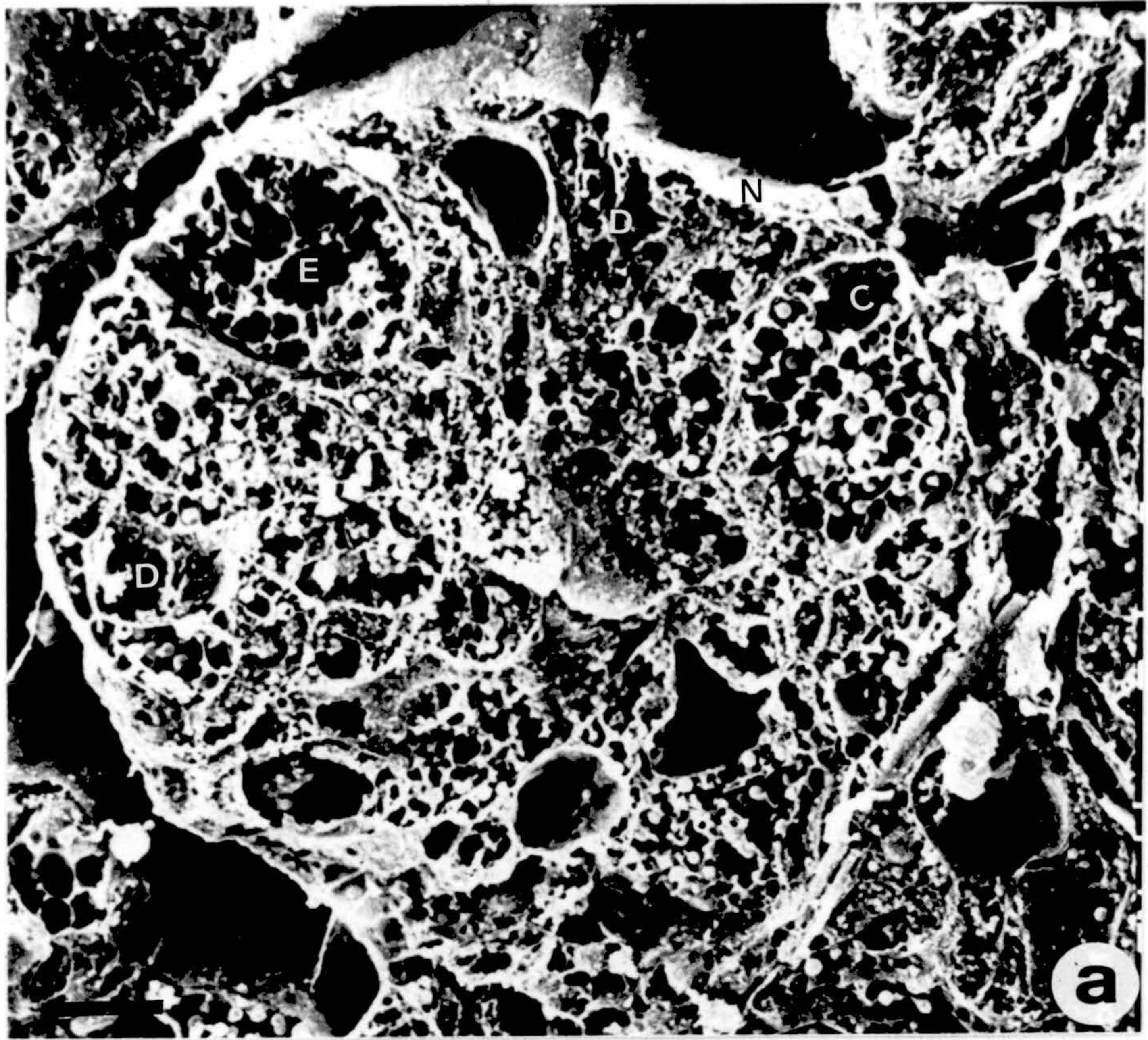


**Figura V.** Imagen SEM de la Concha del caracol Helix aspersa. Se muestran las distintas capas que la constituyen. (P) Periostraco. (O) Ostraco. (H) Hipostraco.

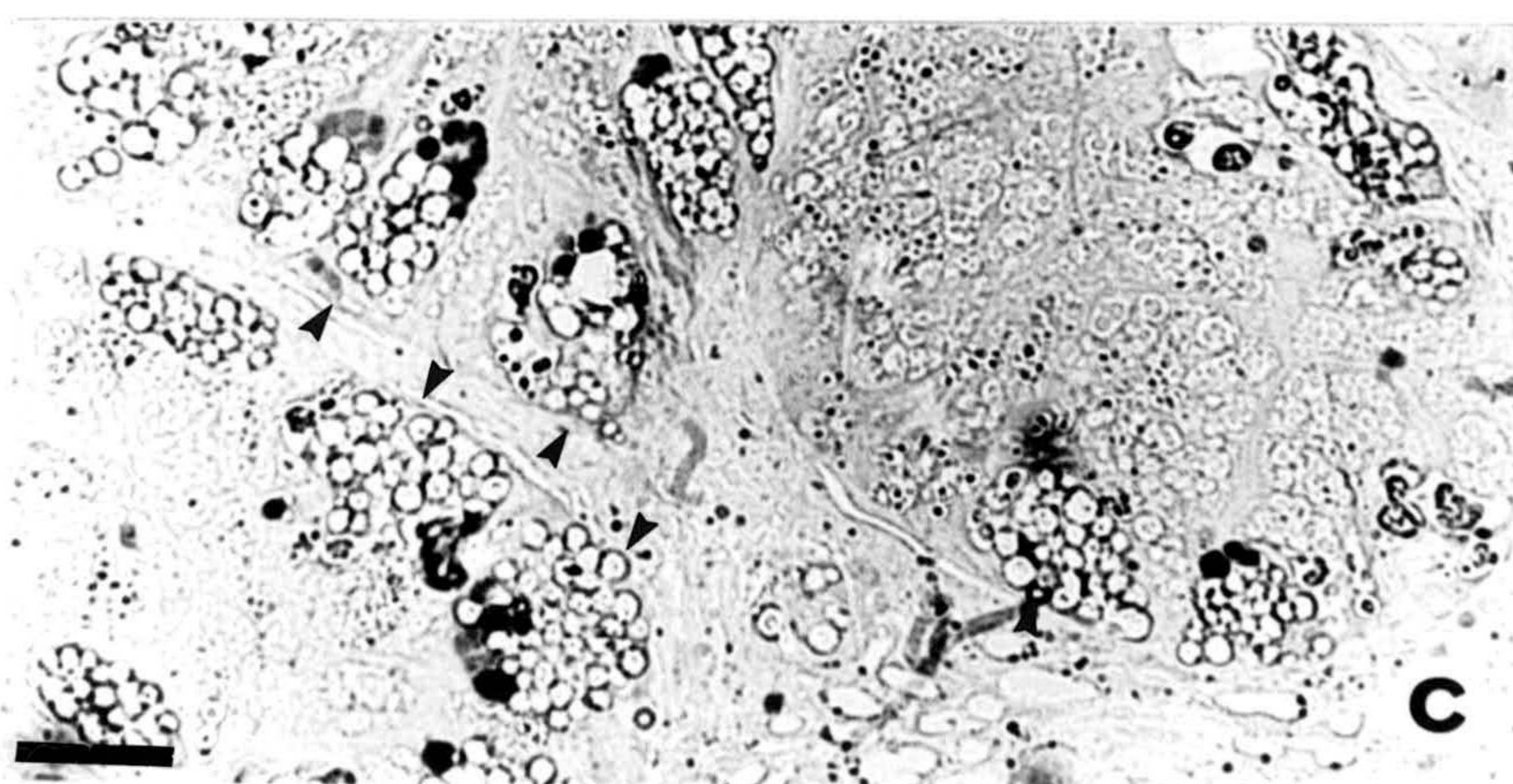
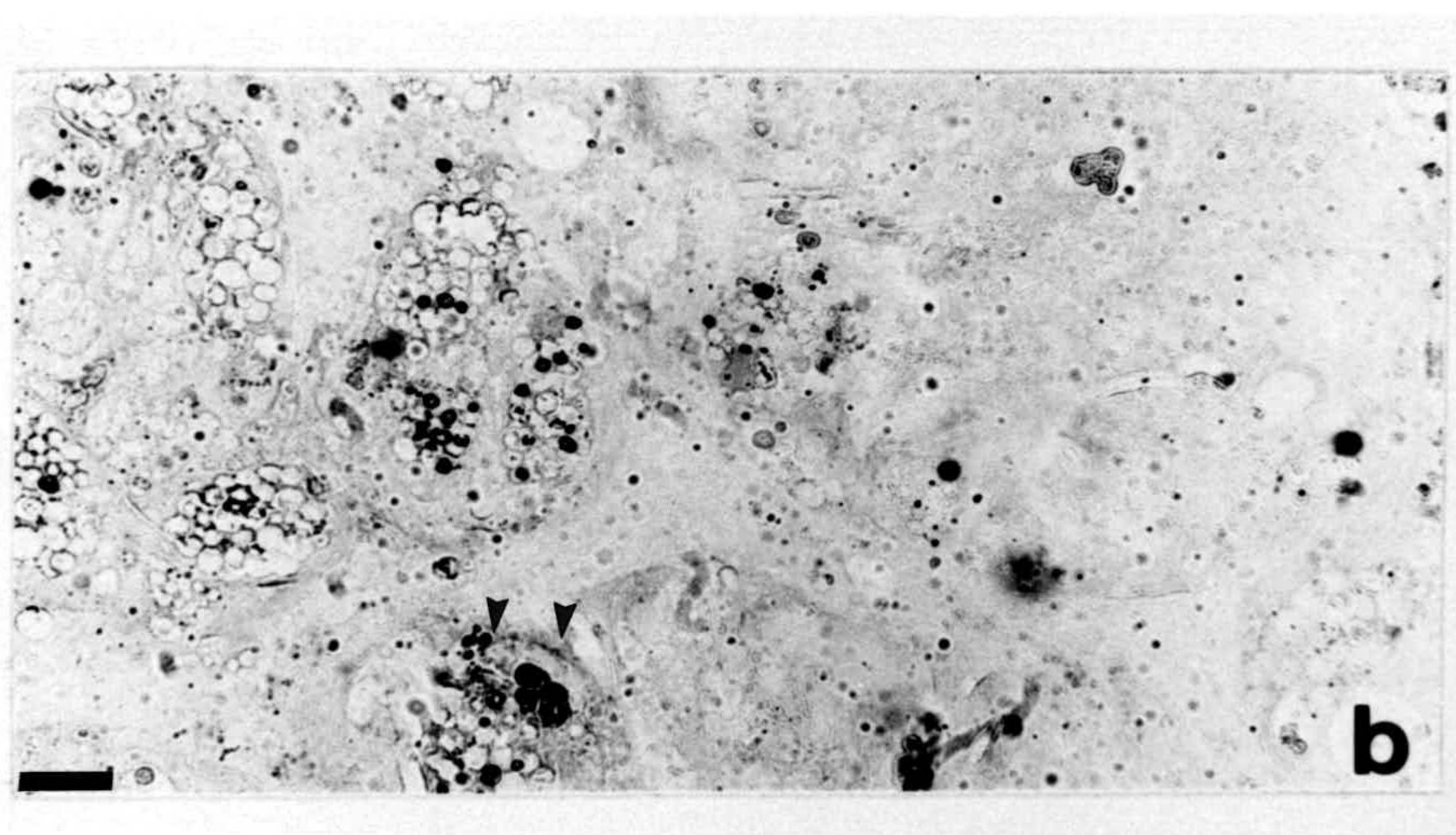
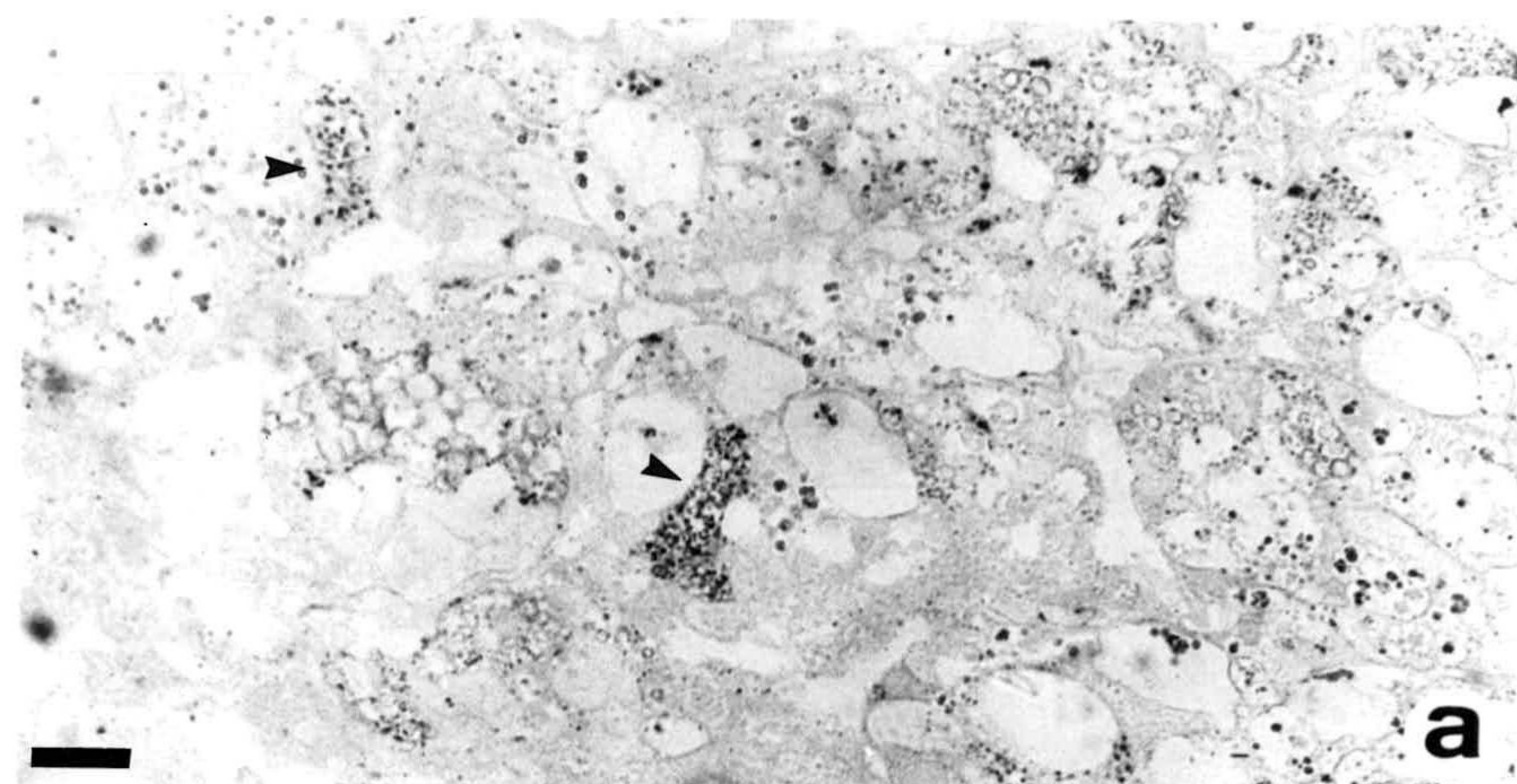




**Figura VI.** Imagenes SEM de adenómeros hepatopancreáticos, mostrando los diversos tipos celulares y el conjuntivo que le circunda. (D) célula digestiva (E) célula excretora (C) célula cálcica (N) conjuntivo. La barra indica 20 micras.

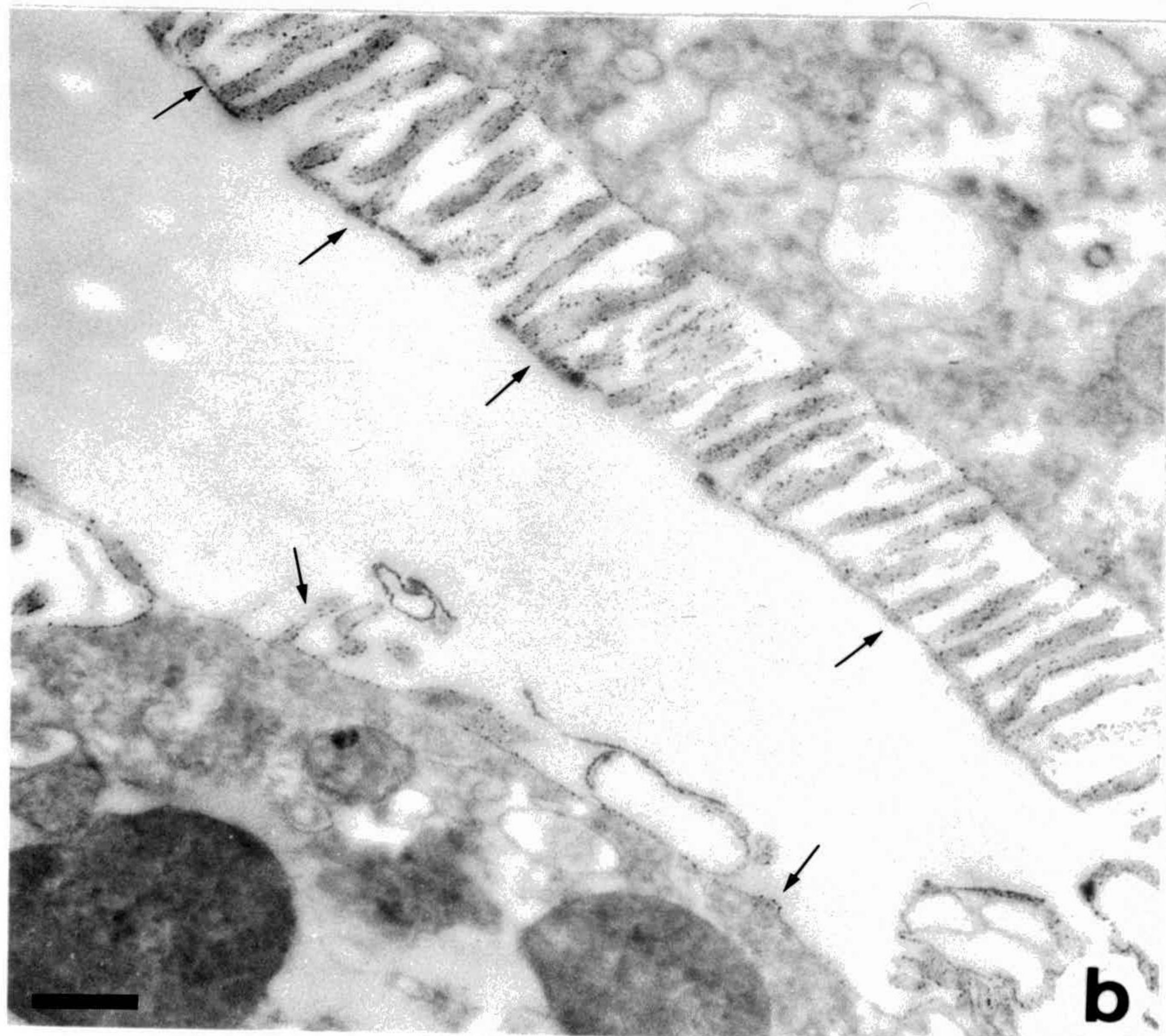
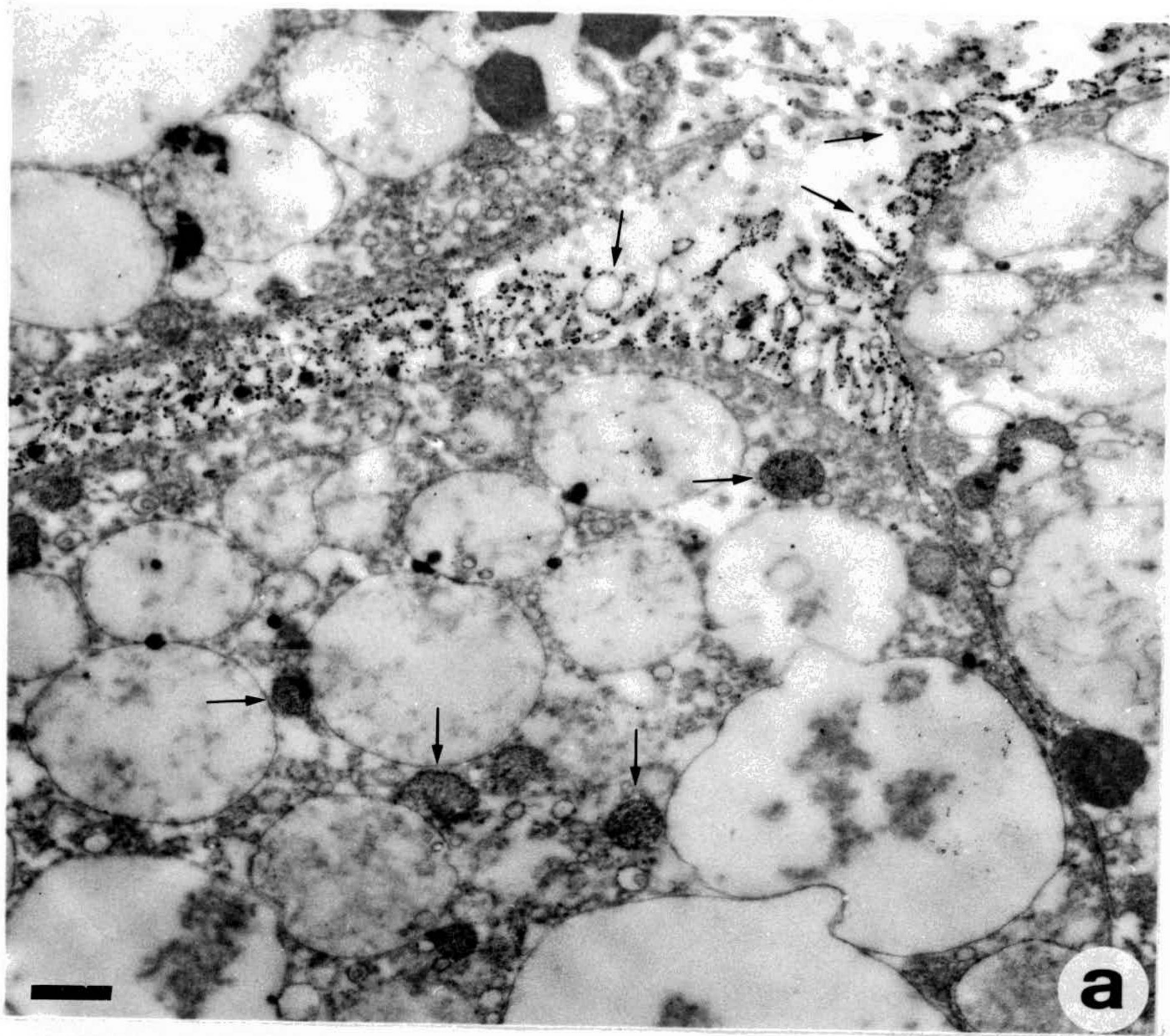


**Figura VII.** Micrografías de actividad fosfatasa ácida. (a) estado alimentado (b) un mes de ayuno (c) más de tres meses de inanición. En (a) se señala actividad en células digestivas. (b) en células excretoras. (c) en células cálcicas. La barra indica 10 micras.



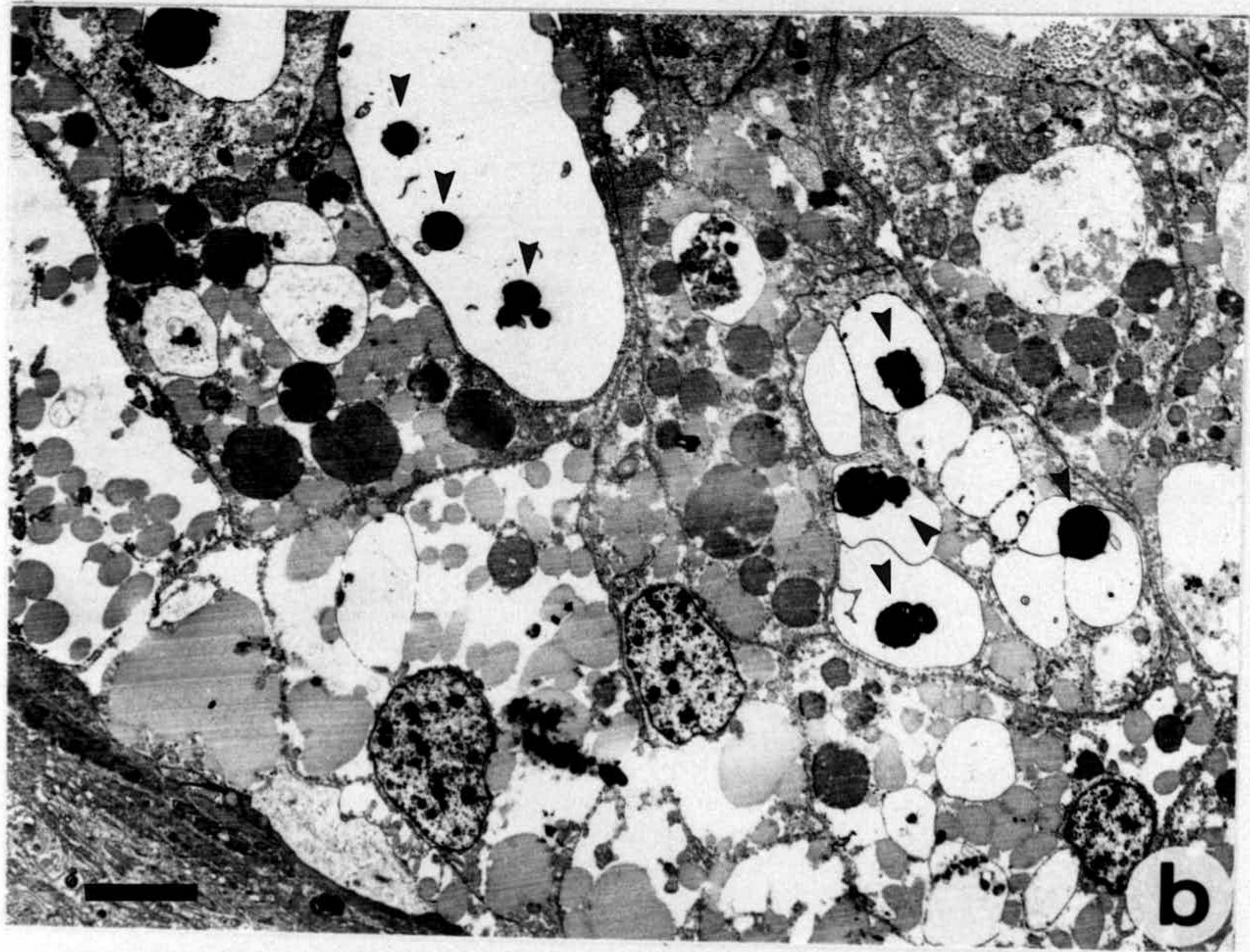
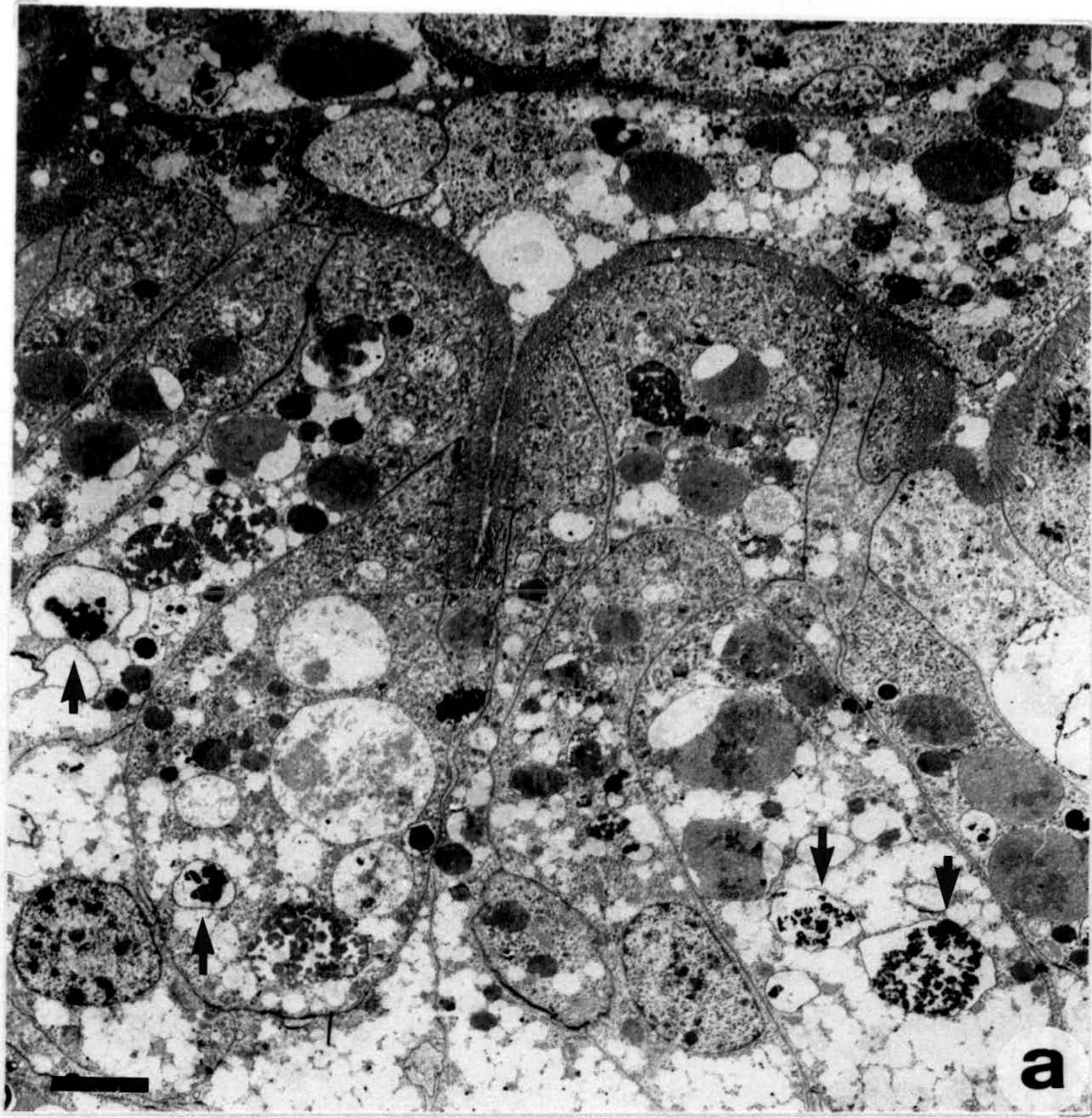
**Figura VIII.** Células digestivas con actividad fosfatasa ácida en microvellosidades y pequeñas bolsas

líticas. a/ la barra indica 1 micra b/ barra .6 micras.

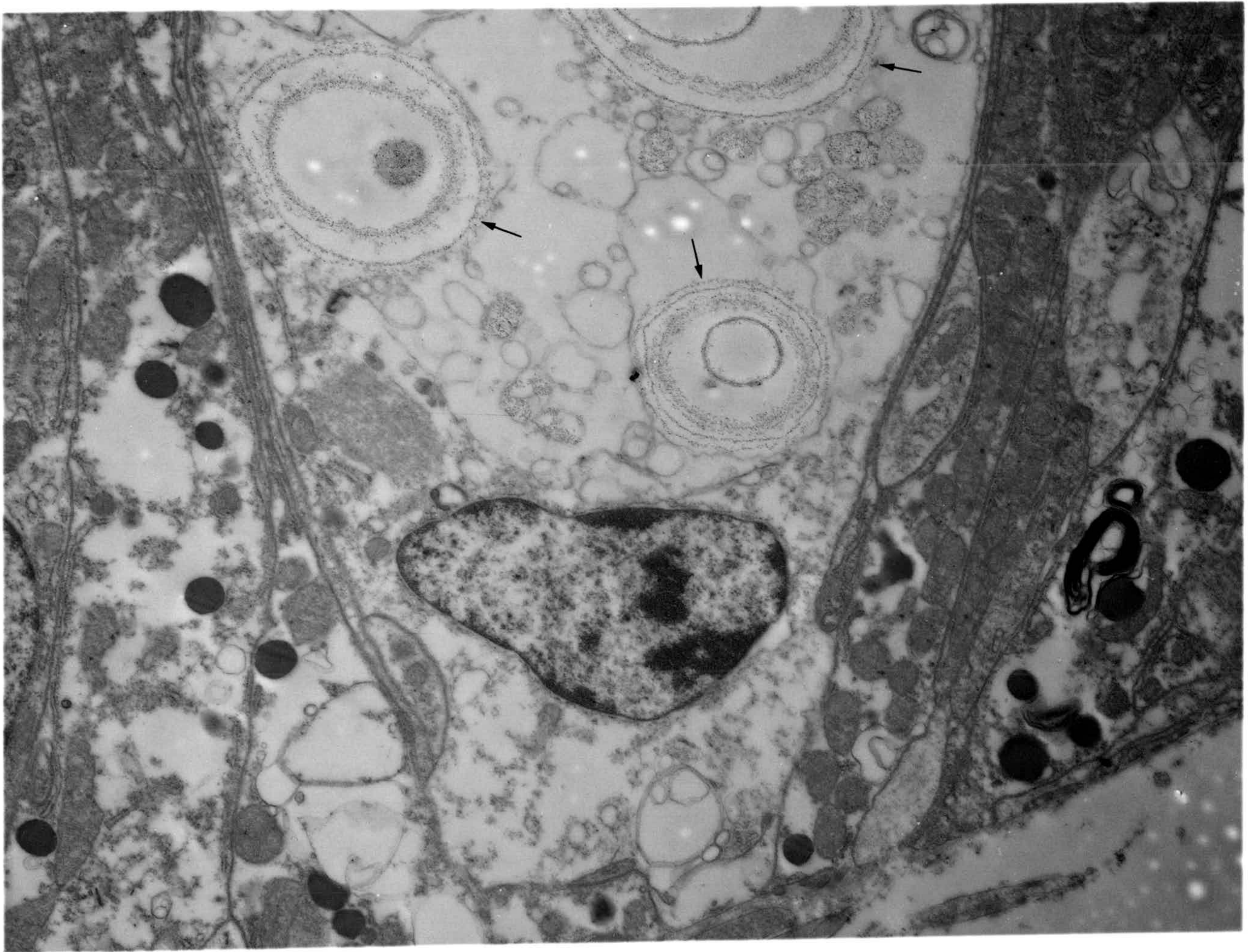


**Figura IX.** Imagen TEM en donde se puede ver una visión general de la distribución de la actividad fosfatasa ácida en células digestivas (flechas) y excretoras (cabeza de flecha) en estado normal. La barra indica 8.9 micras.

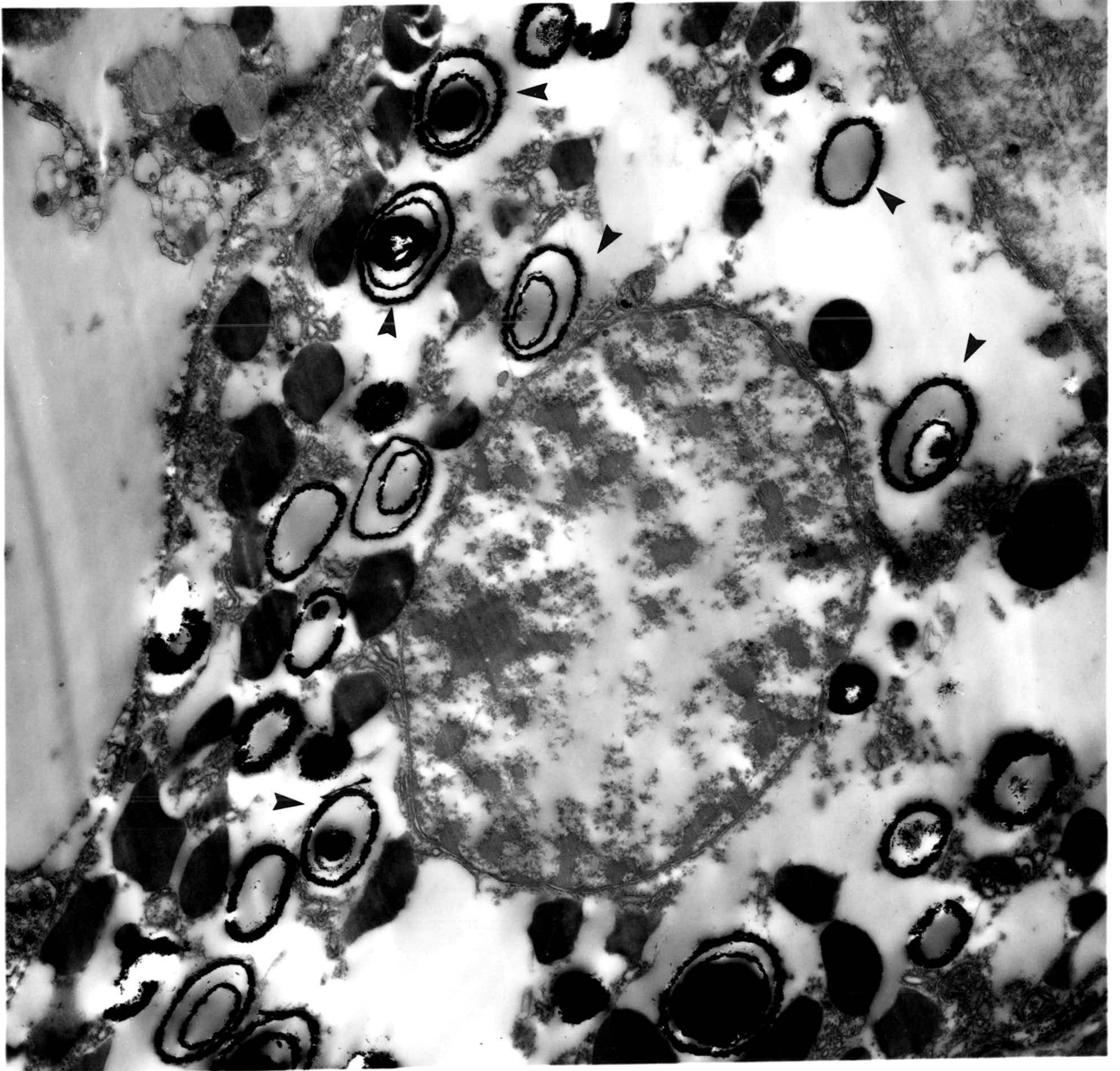




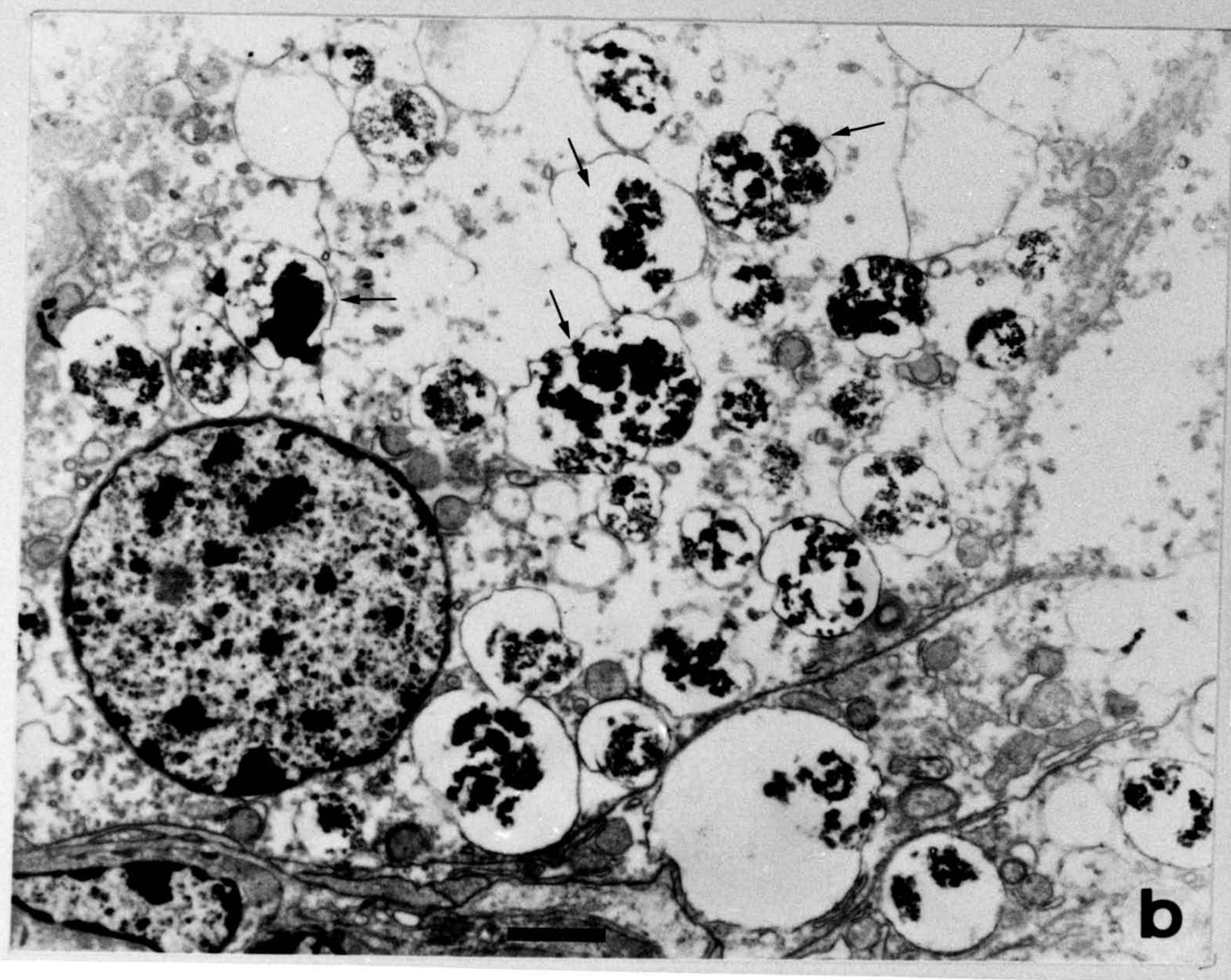
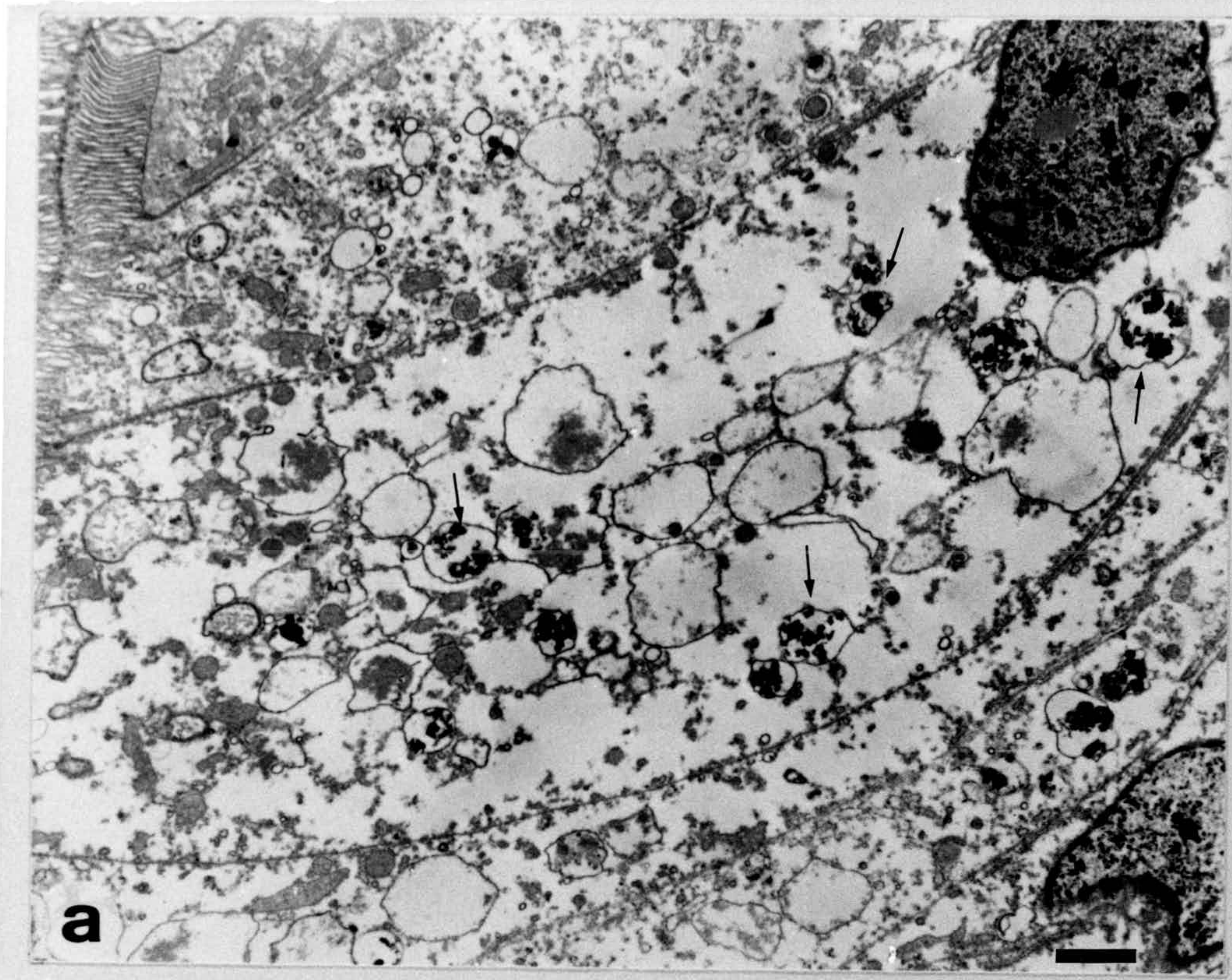
**Figura X.** Imagen correspondiente a una típica célula cálcica, mostrando sus granos cálcicos en proceso de maduración. Aparece una suave actividad en los granos cálcicos. La barra indica una micra.



**Figura XI.** Imagen de una célula cálcica madura. Se puede apreciar una fuerte reacción positiva a la fosfatasa ácida en los anillos que constituyen el grano. La barra indica una micra.

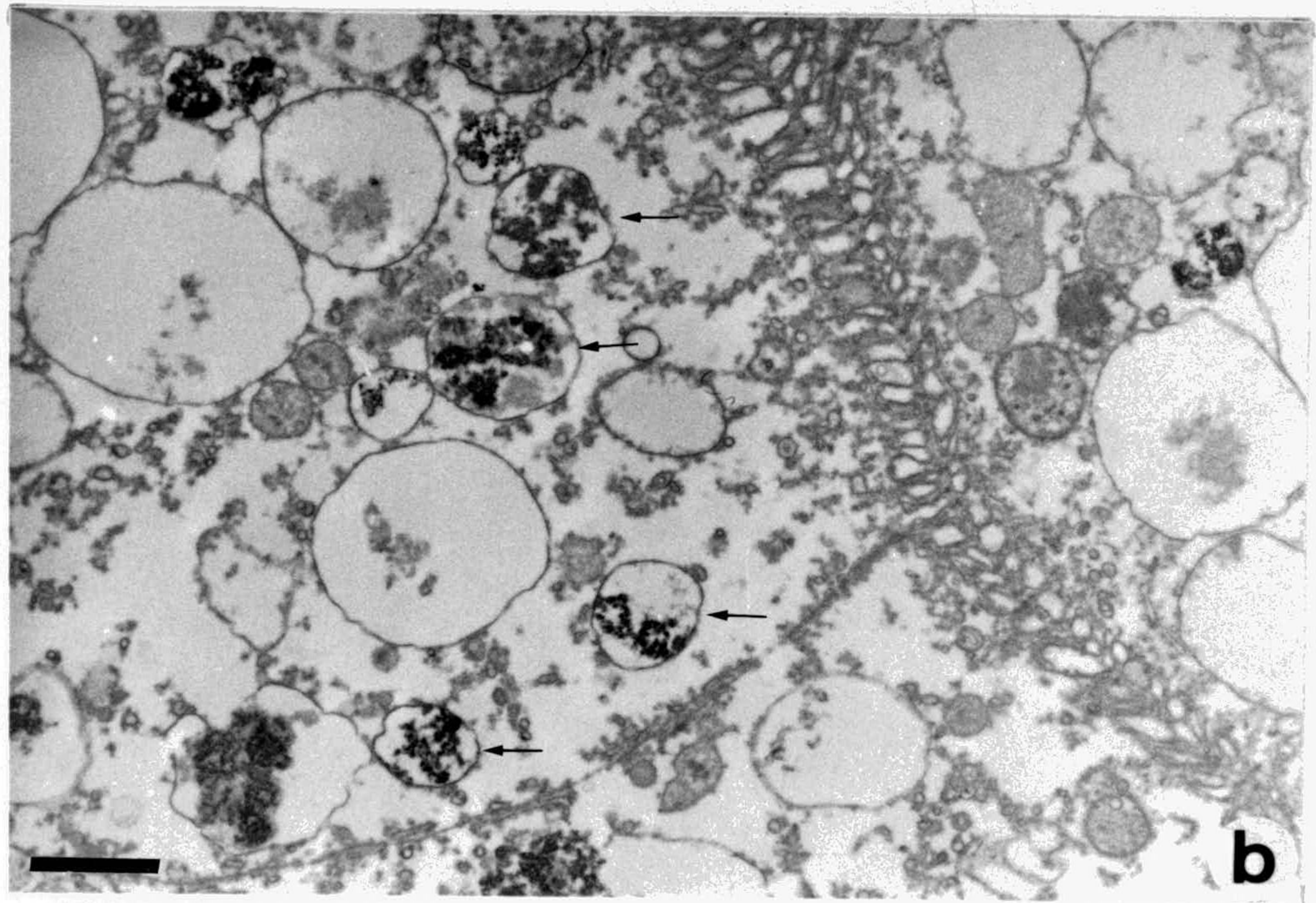
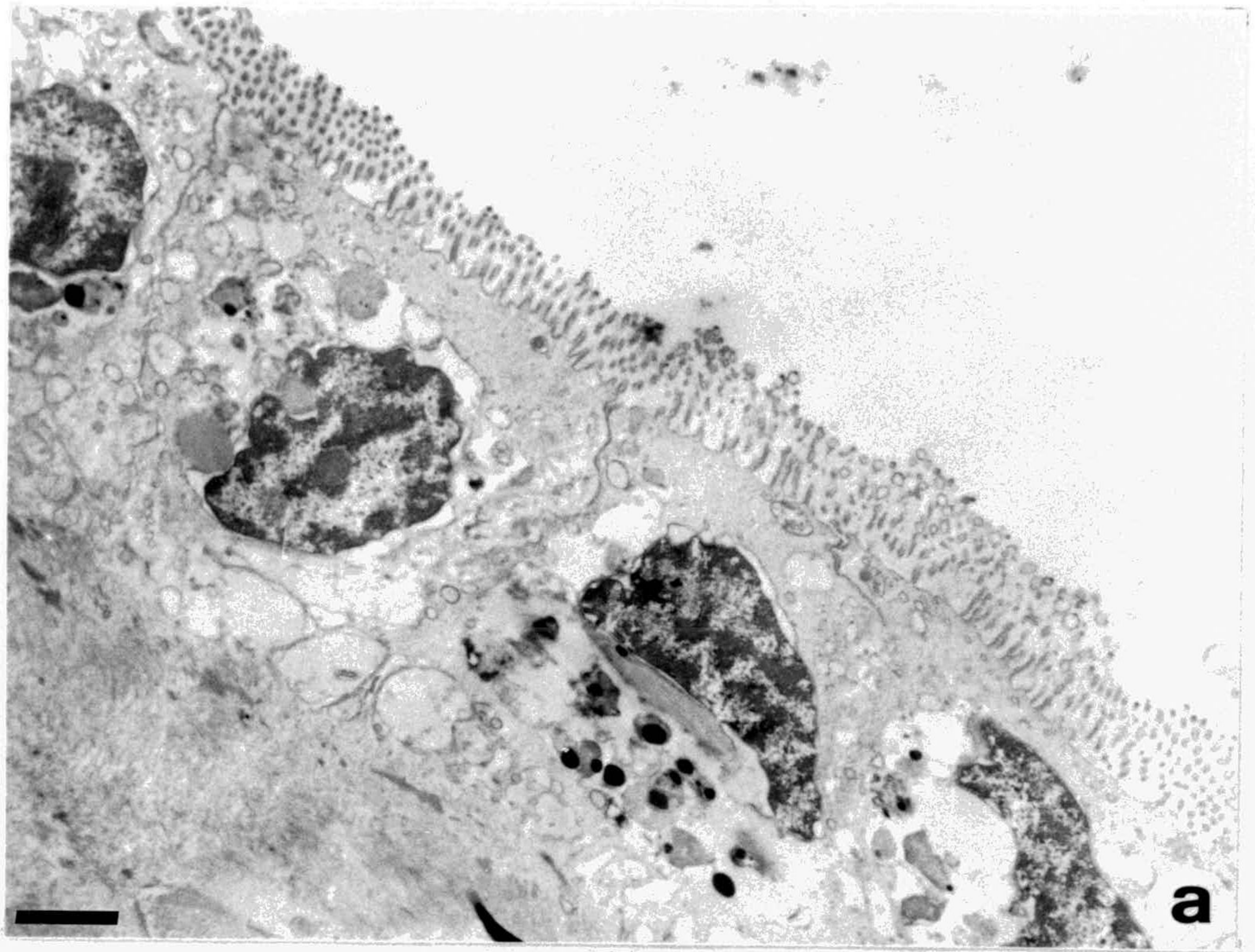


**Figura XII.** Imagenes correspondientes a la actividad fosfatasa ácida con un periodo de ayuno de seis meses. Se observan vesículas de digestión con actividad enzimática además de los núcleos picnóticos. Las barras indican 2 micras.

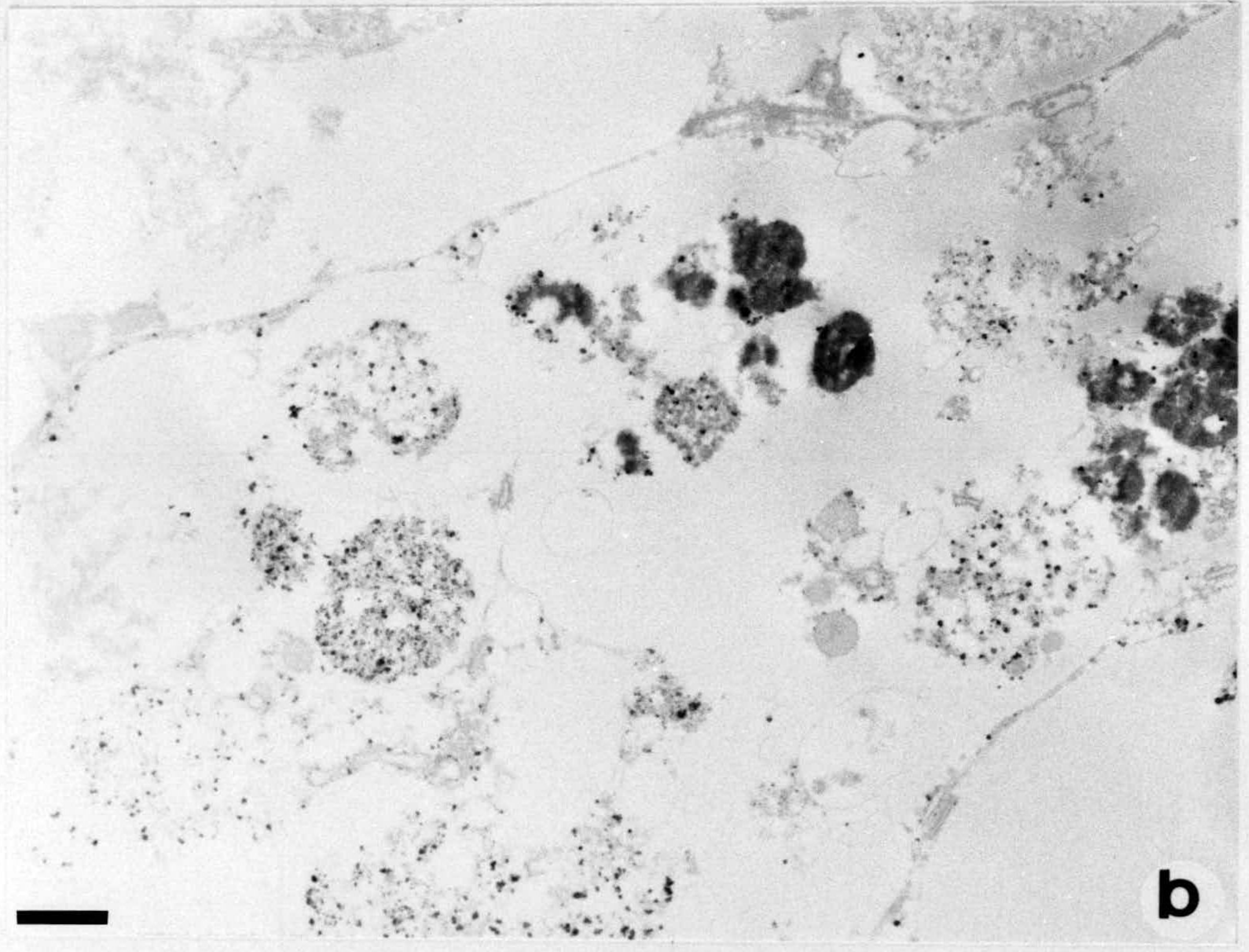
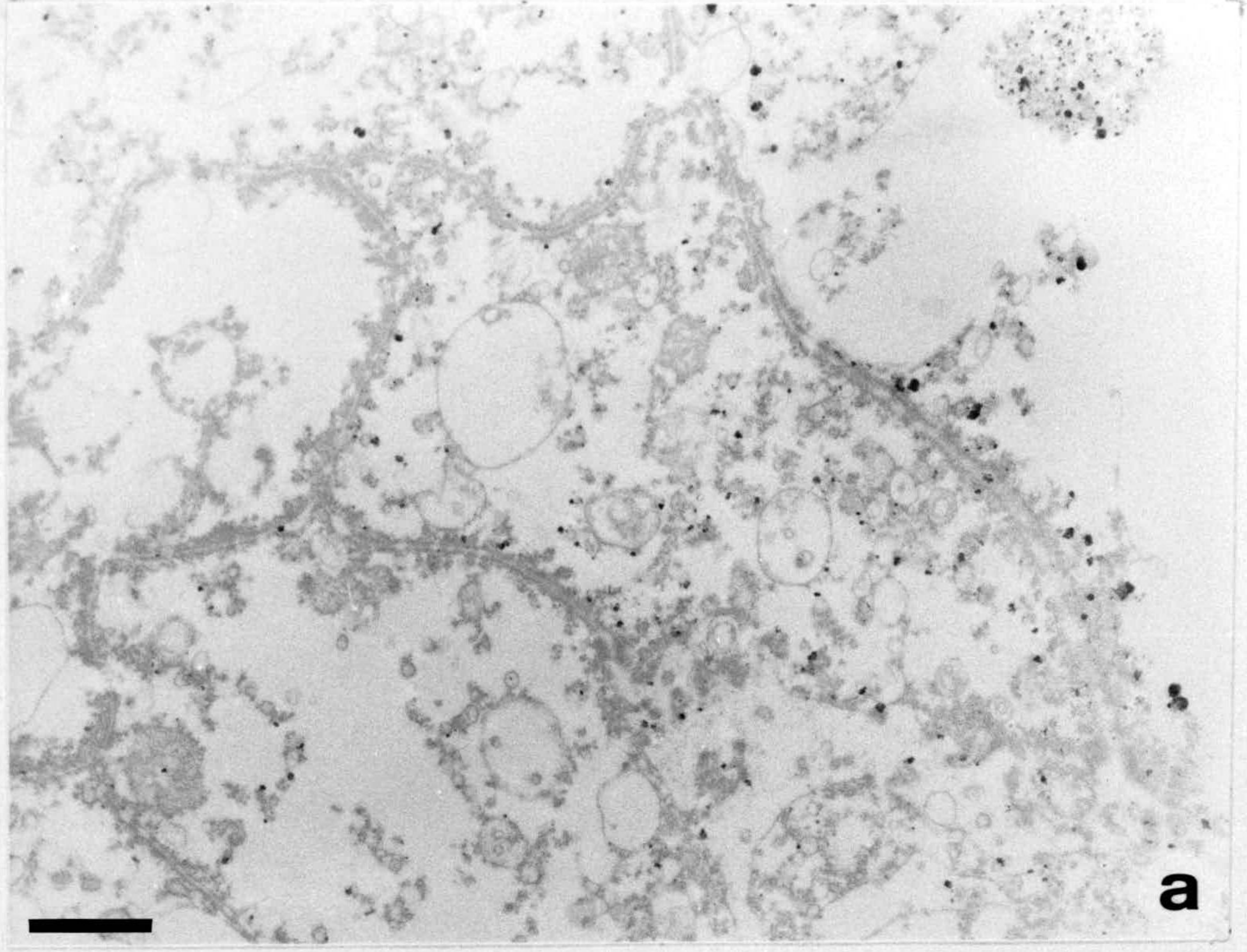


**Figura XIII.** Imagen en donde se pueden apreciar células digestivas de individuos sometidos a nueve meses de experimentación. La actividad fosfatasa ácida se encuentra en algunas vesículas de digestión (b). Las células se ven acortadas en su tamaño y así vemos en la imagen (a) núcleos muy cercanos a la luz. La barra indica 2 micras.

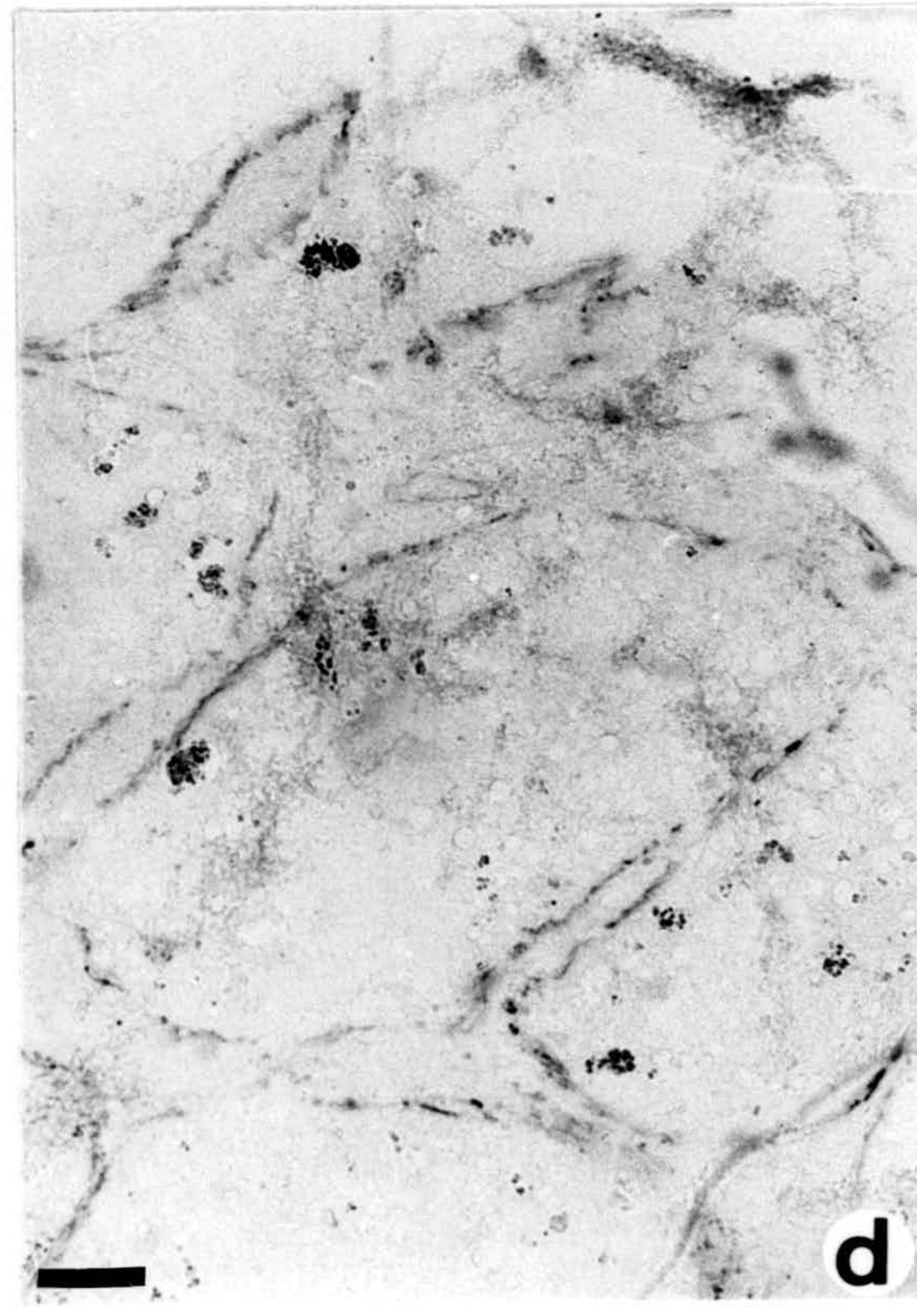
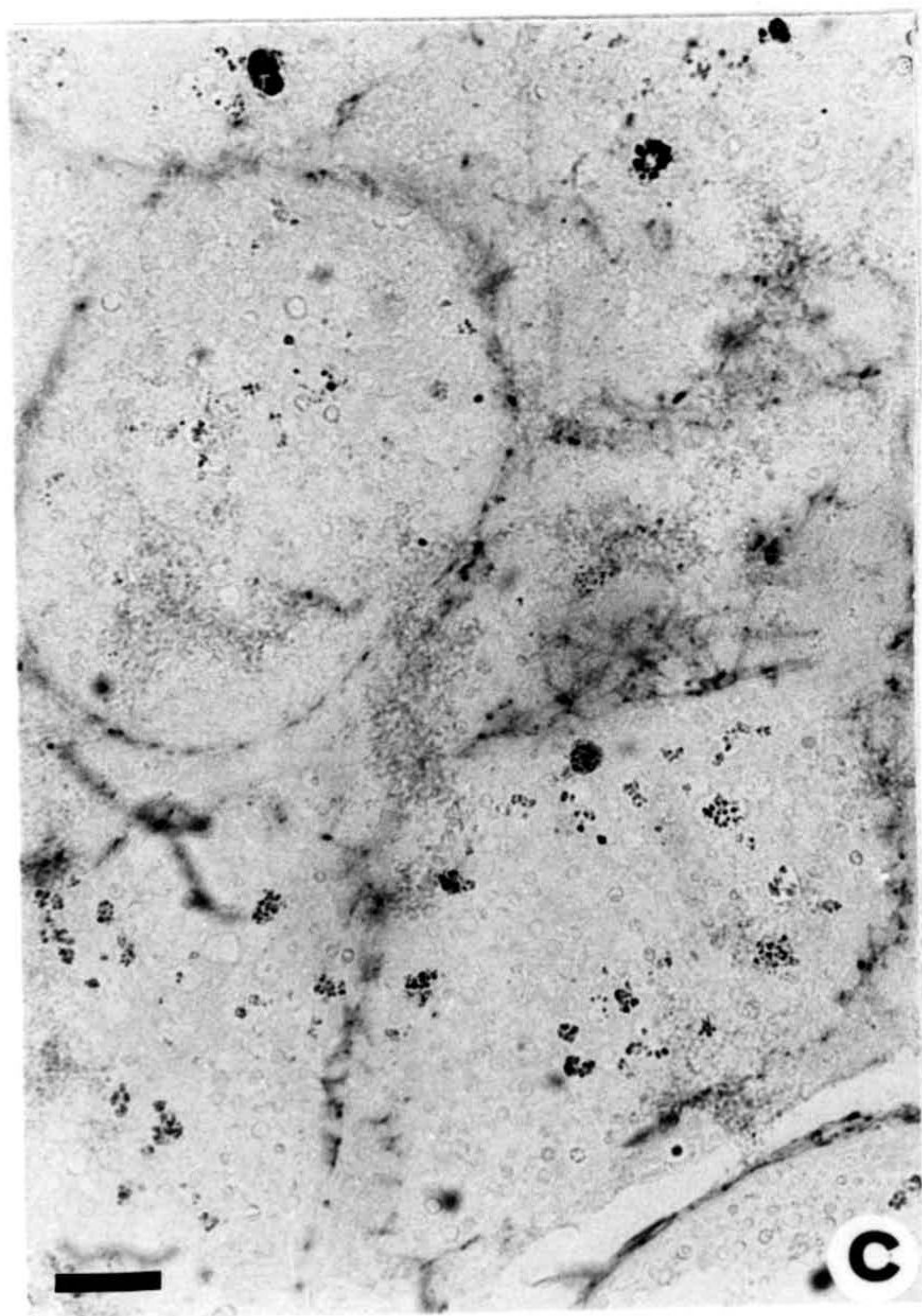
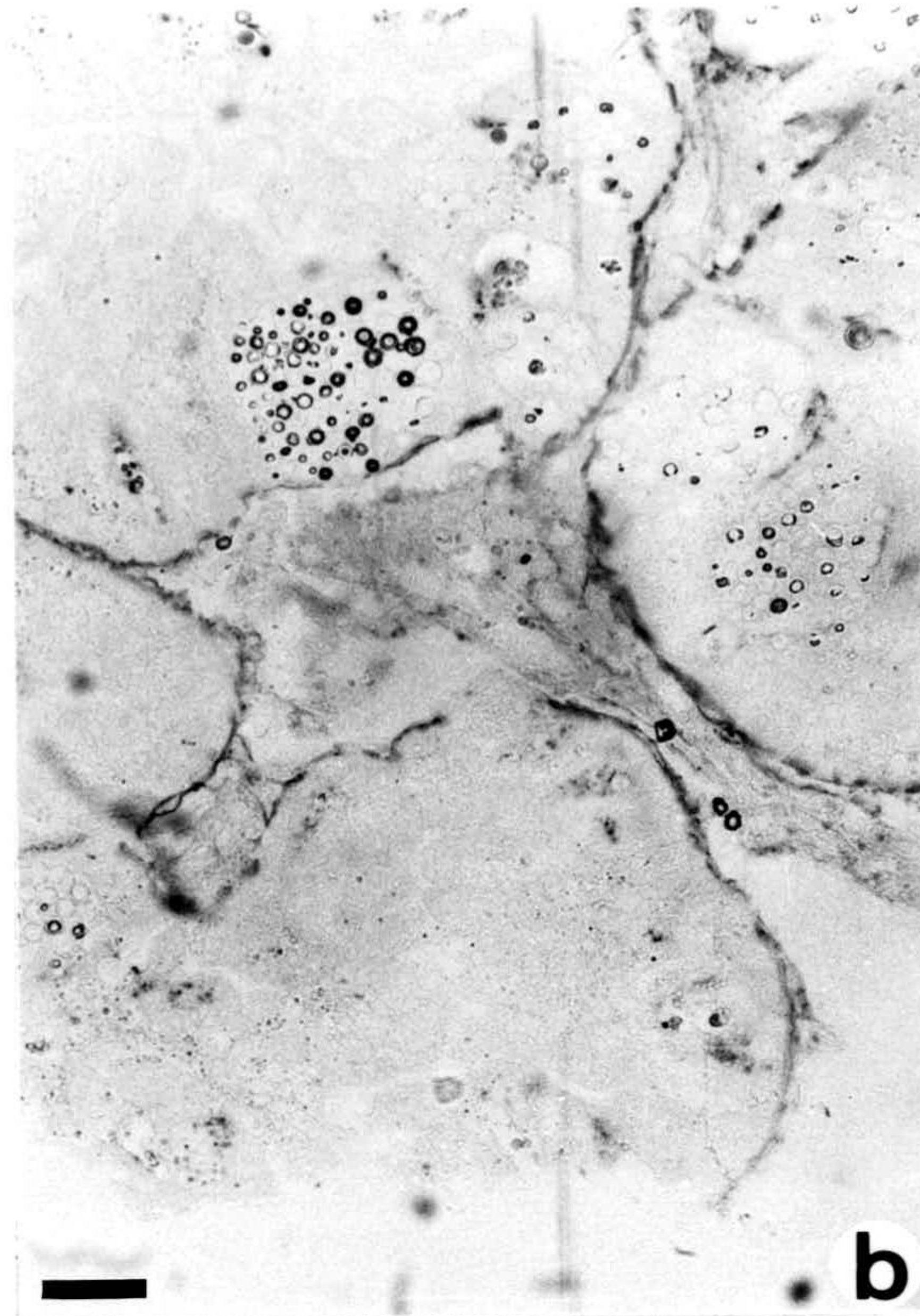
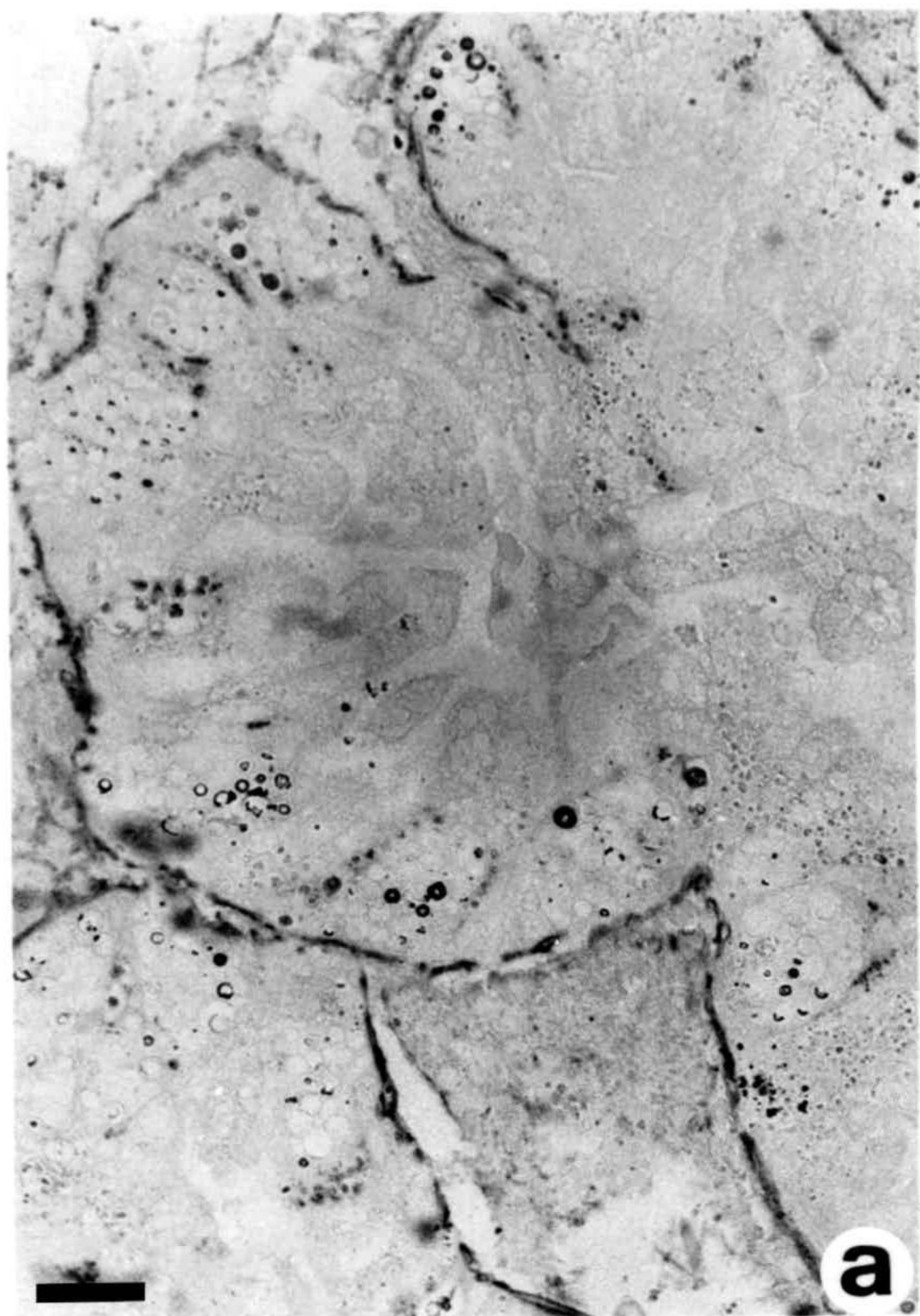




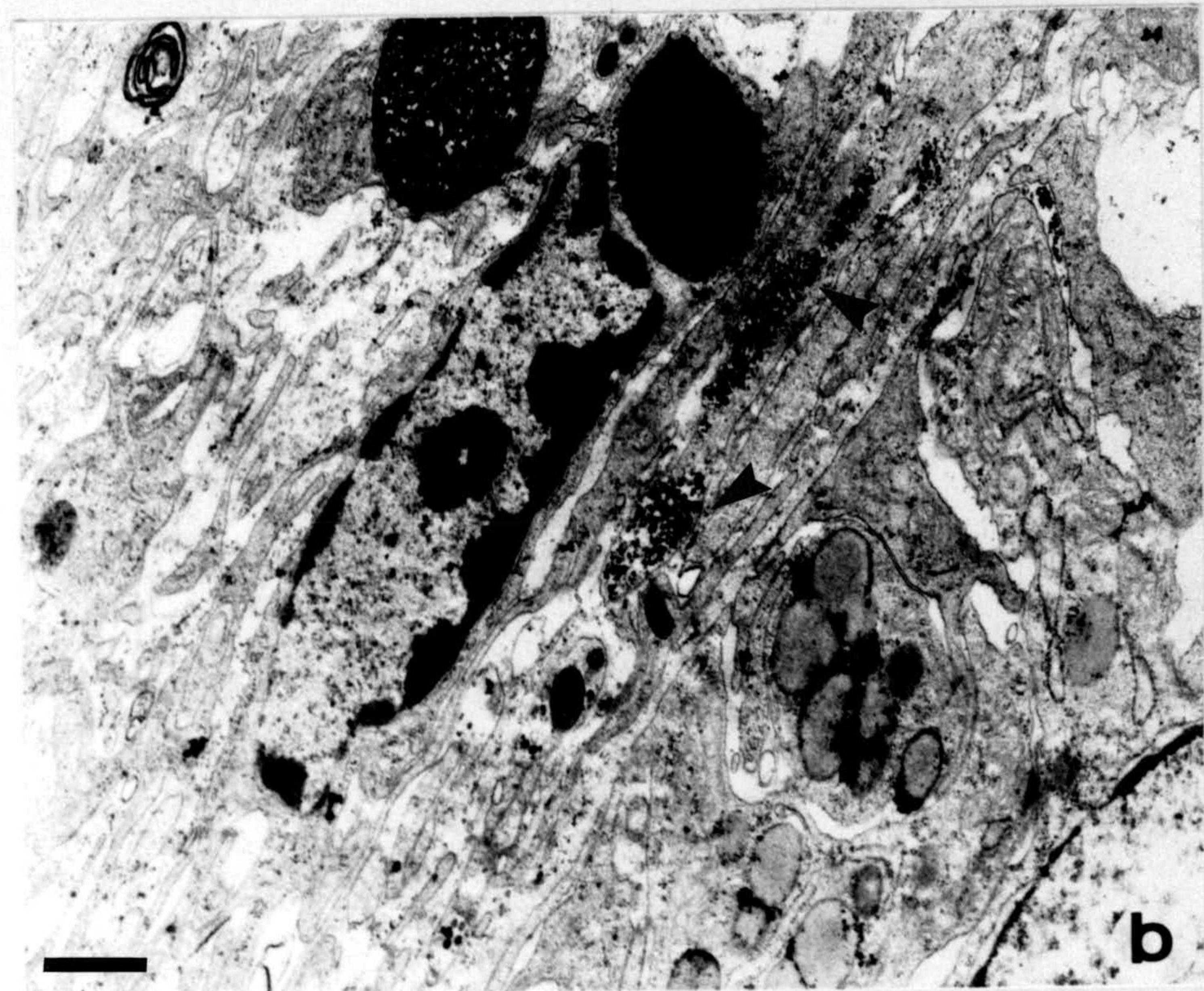
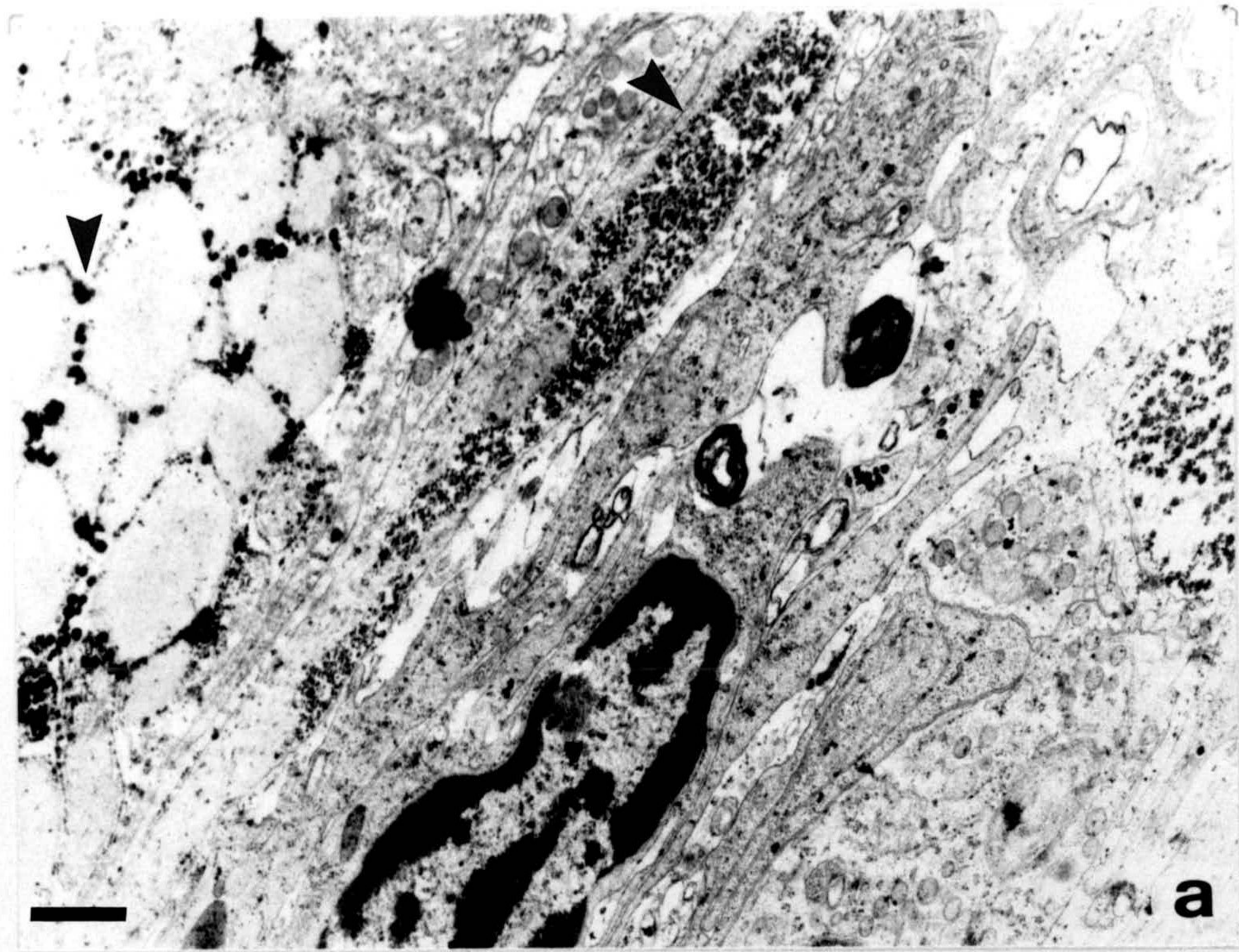
**Figura XIV.** Imagen en donde se puede apreciar restos de rotura celular con algo de actividad fosfatasa ácida en los mismos. El periodo de experimentación es de doce meses. La barra indica 1 micra.



**Figura XV.** Actividad fosfatasa alcalina a nivel de microscopía óptica. Se observa la actividad entorno al adenòmero. (a) normal (b) un mes (c) tres meses (d) doce meses. La barra indica 10 micras.

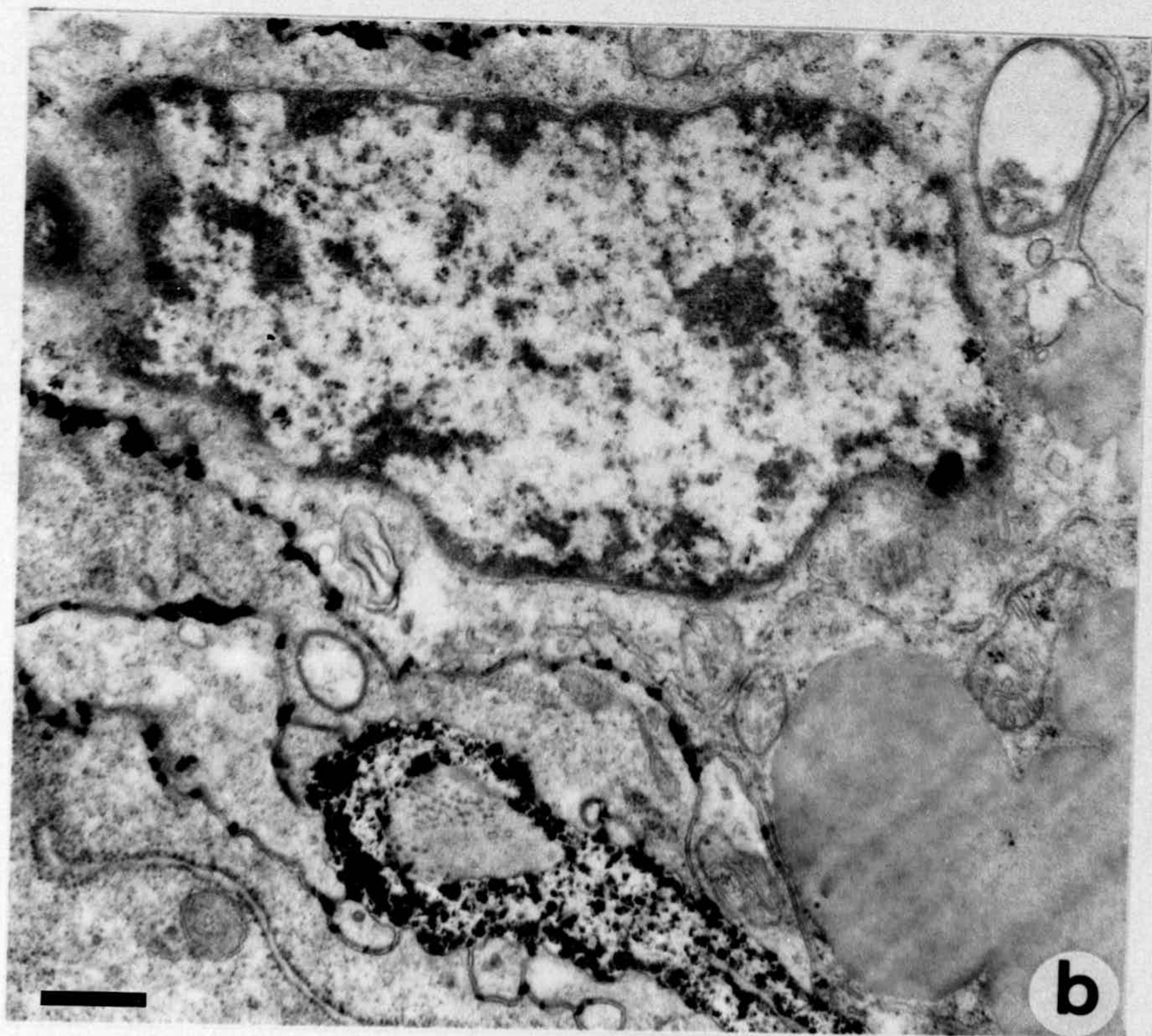
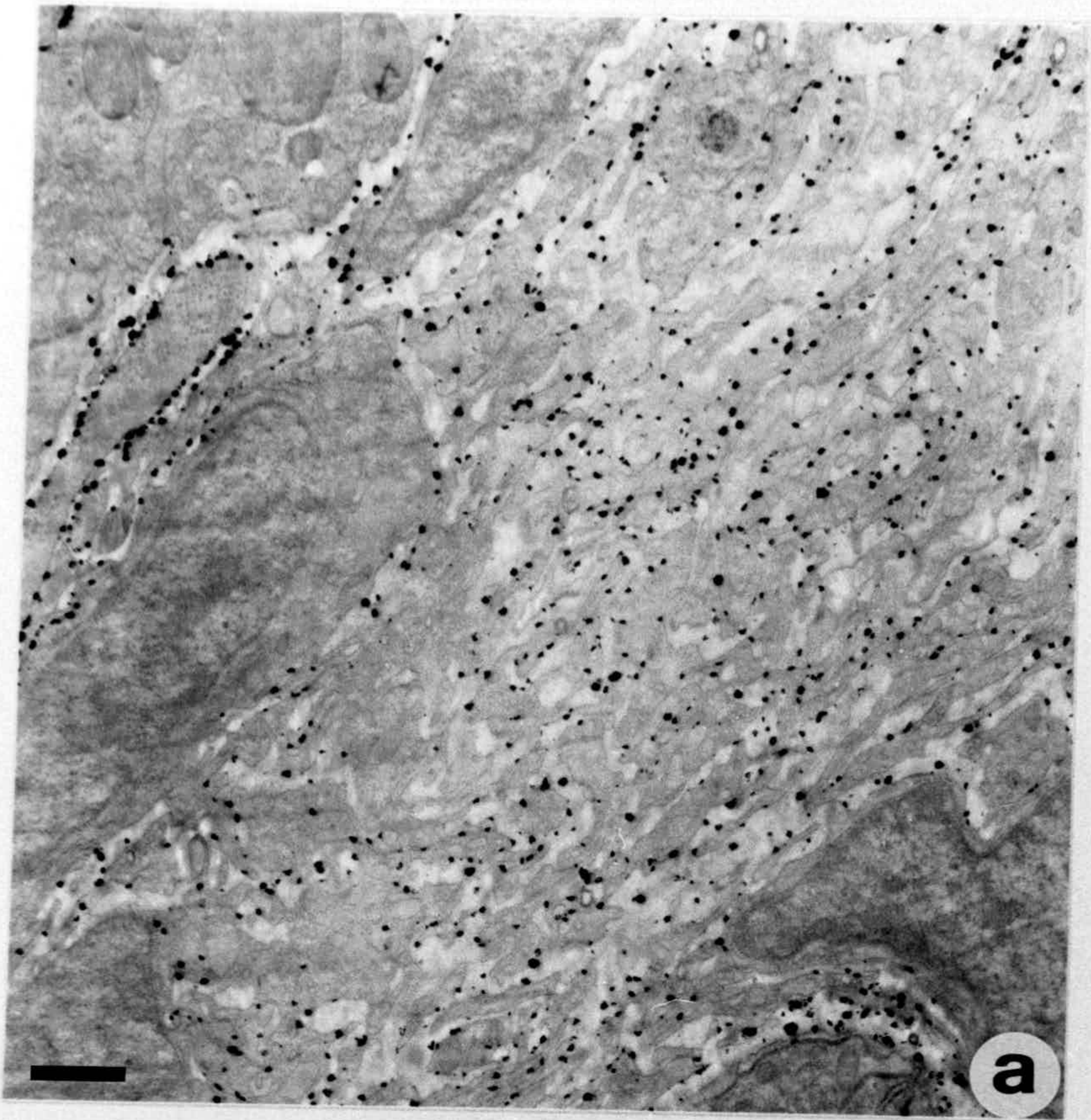


**Figura XVI.** Imagenes donde se pueden apreciar elementos conjuntivos rodeando al adenómero. La actividad Fosfatasa Alcalina se localiza en algunos espacios intercelulares asociada a las membranas plasmáticas. También aparece actividad bordeando las gotas lipídicas. Los individuos se encuentran en estado normal. La barra corresponde a 1 micra.

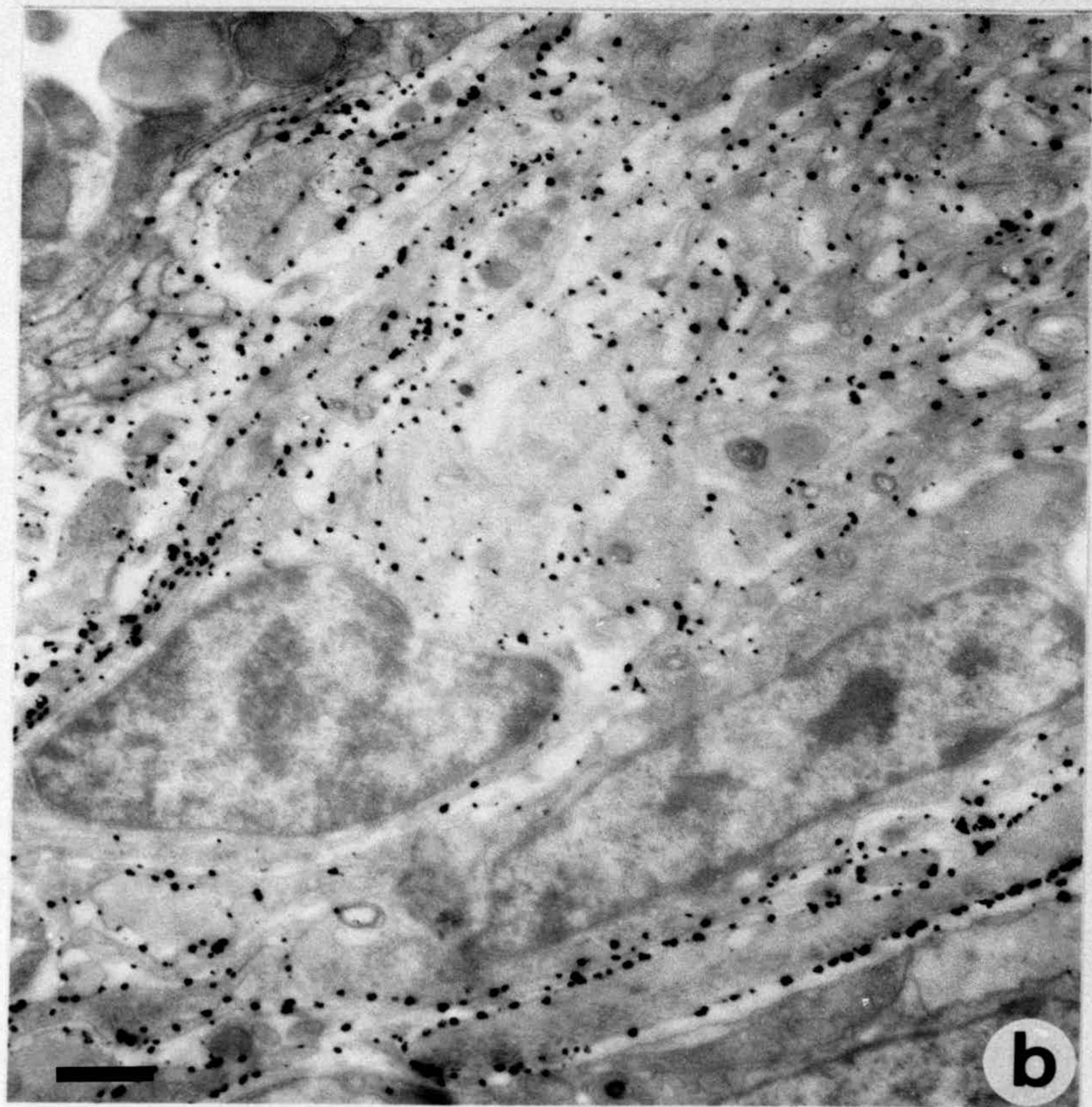
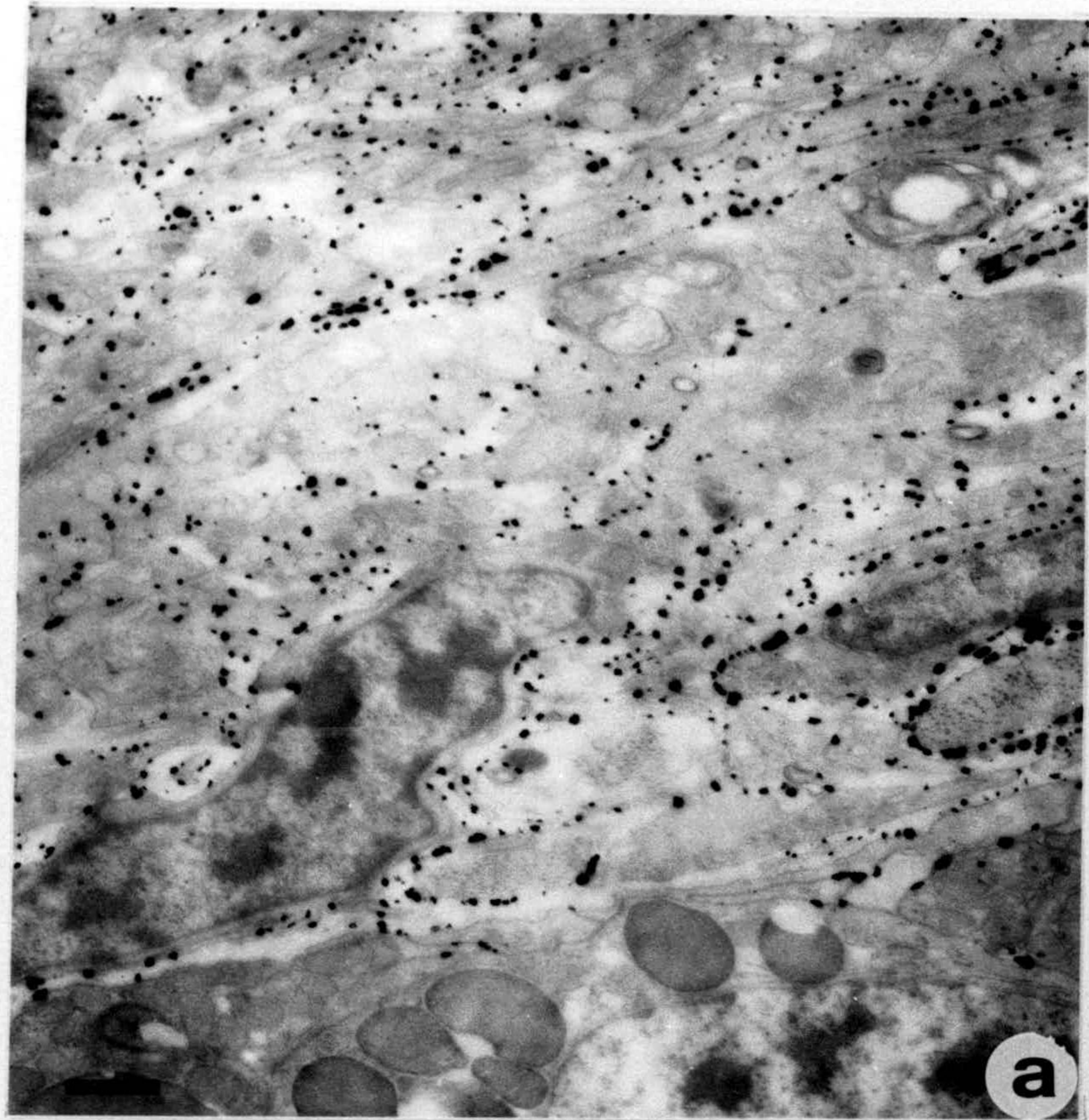


**Figura XVII.** Imagen de actividad Fosfatasa Alcalina localiza en los espacios intercelulares asociada a las membranas de las células del conjuntivo de individuos con un mes de ayuno. Tras un ayuno de un mes.  
a/ 1 micra b/ .6 micras.

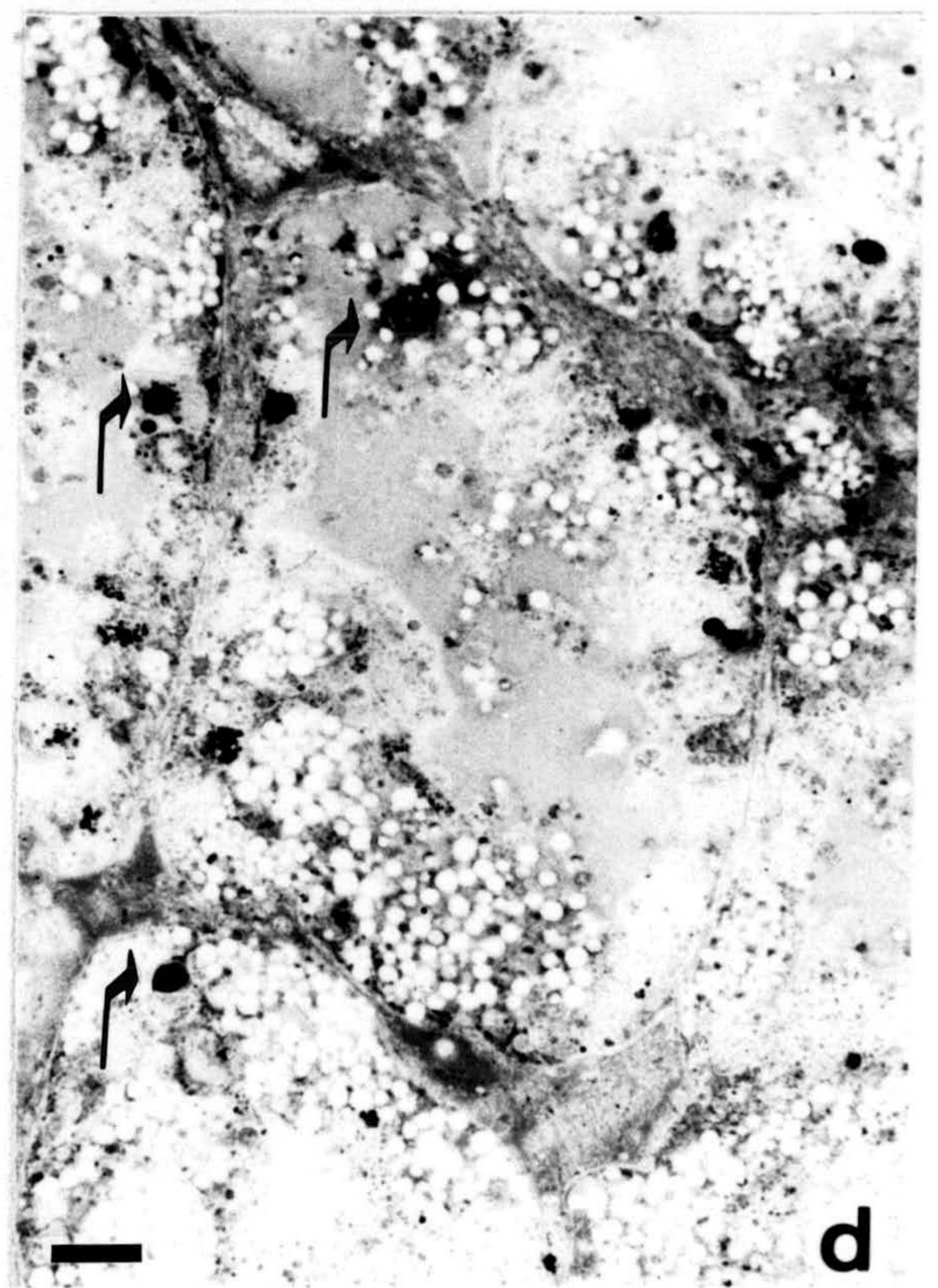
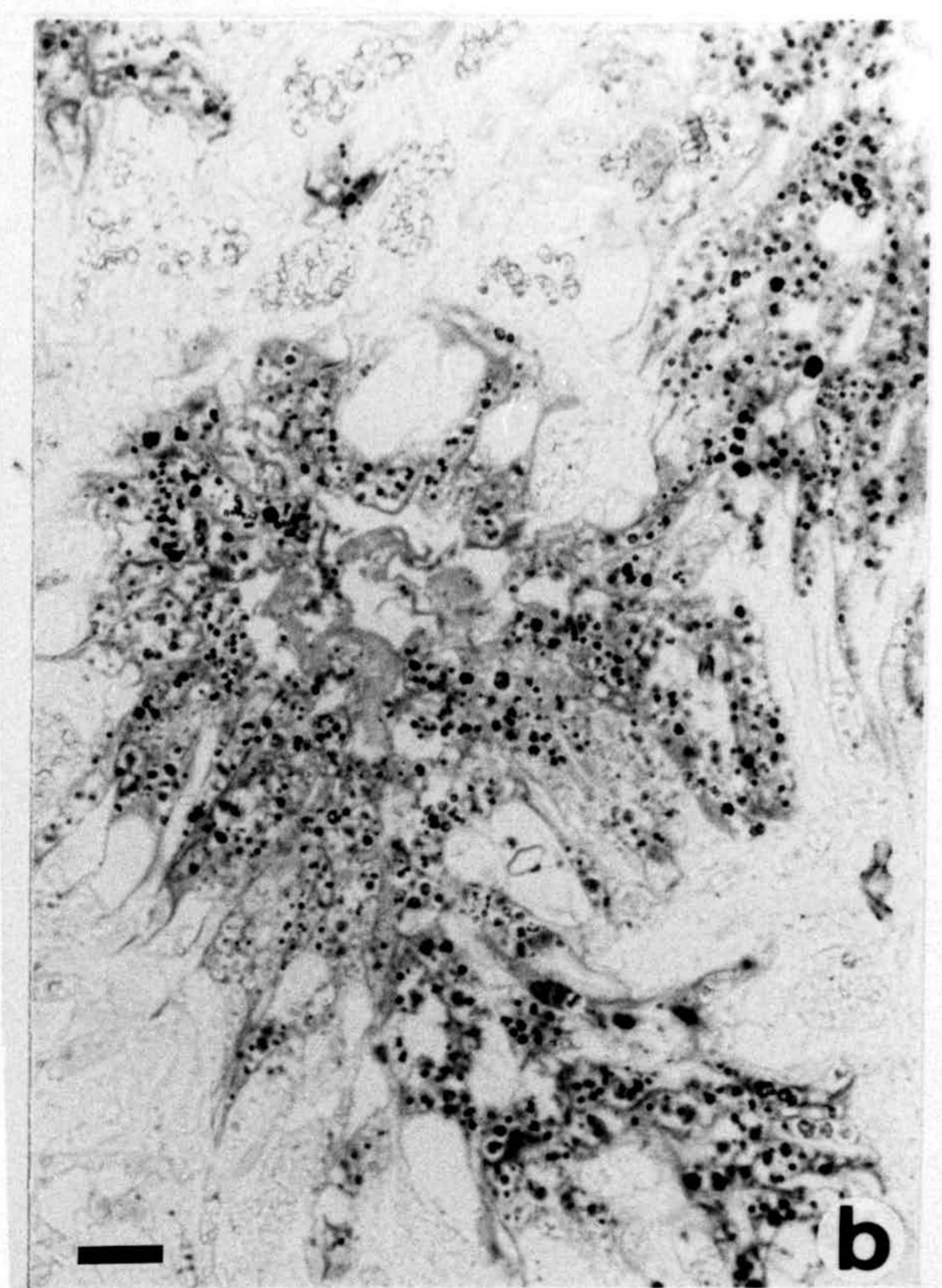
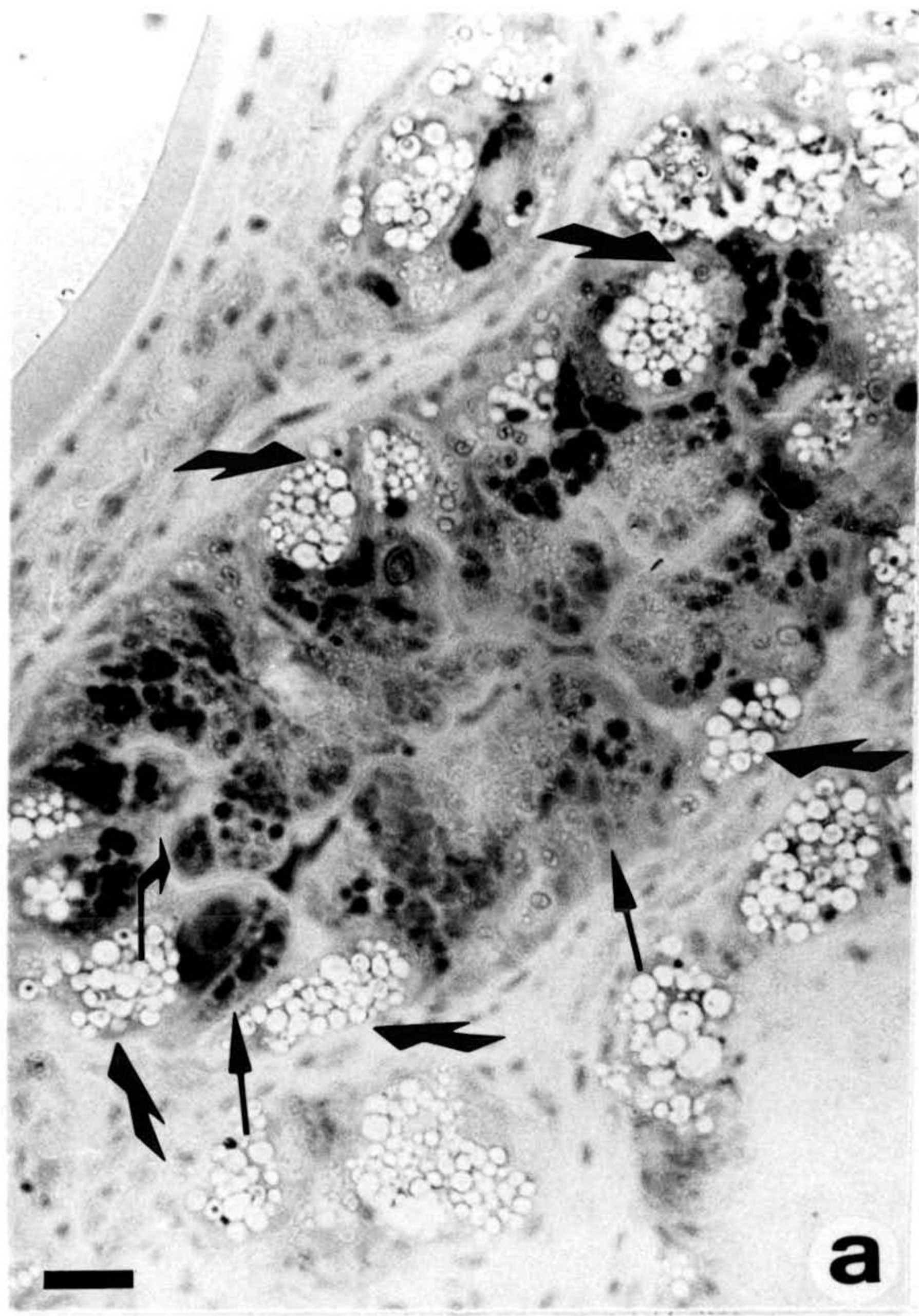




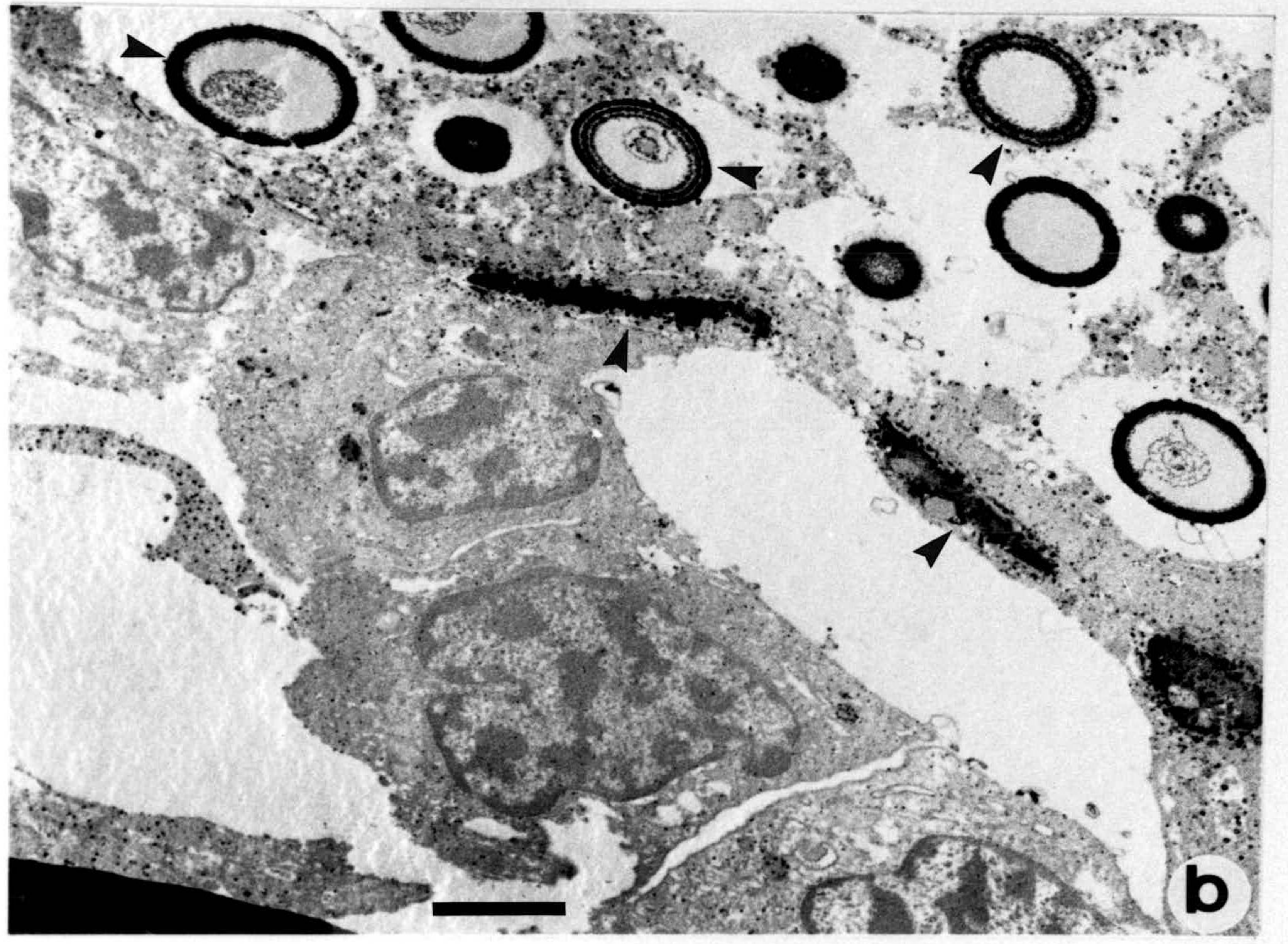
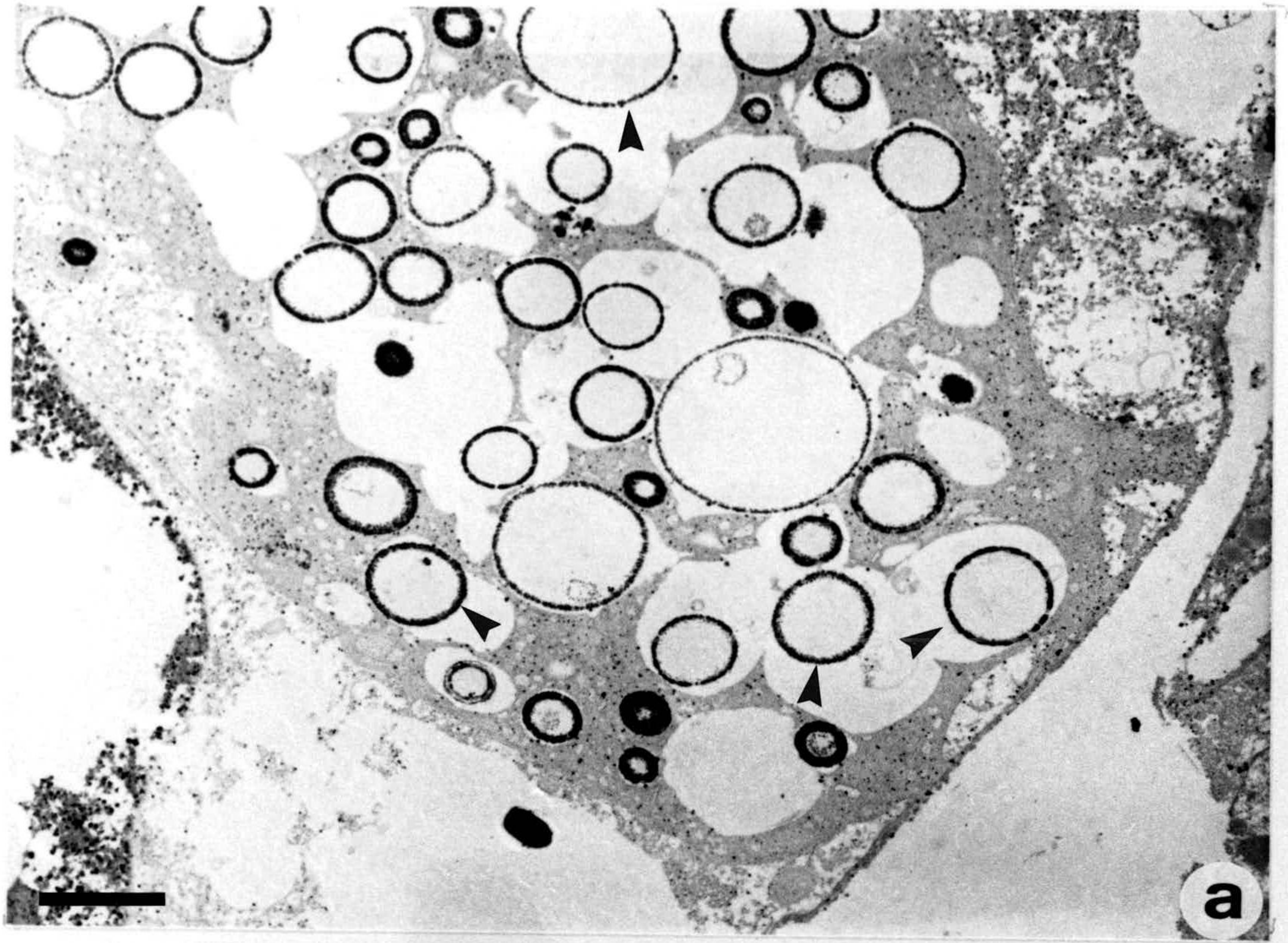
**Figura XVIII.** Imágenes del conjuntivo basal correspondientes a caracoles con tres meses de ayuno, mostrando un patrón enzimático idéntico al que ofrecía el conjuntivo de los animales con un mes de ayuno. En este caso el conjuntivo aparece con una estructura más laxa. La barra indica una 1



**Figura XIX.** Actividad esterasa inespecífica con microscopía óptica (a) un mes (b) tres meses (c) 6 meses y (d) 12 meses de ayuno. (↔) indica actividad en célula digestiva. (↘) muestra actividad en vacuola excretora. (➡) señala la célula cálcica en donde no se aprecia actividad. La imagen (d) muestra un adenómero en donde se aprecia una intensa lisis celular. La barra indica 10 micras

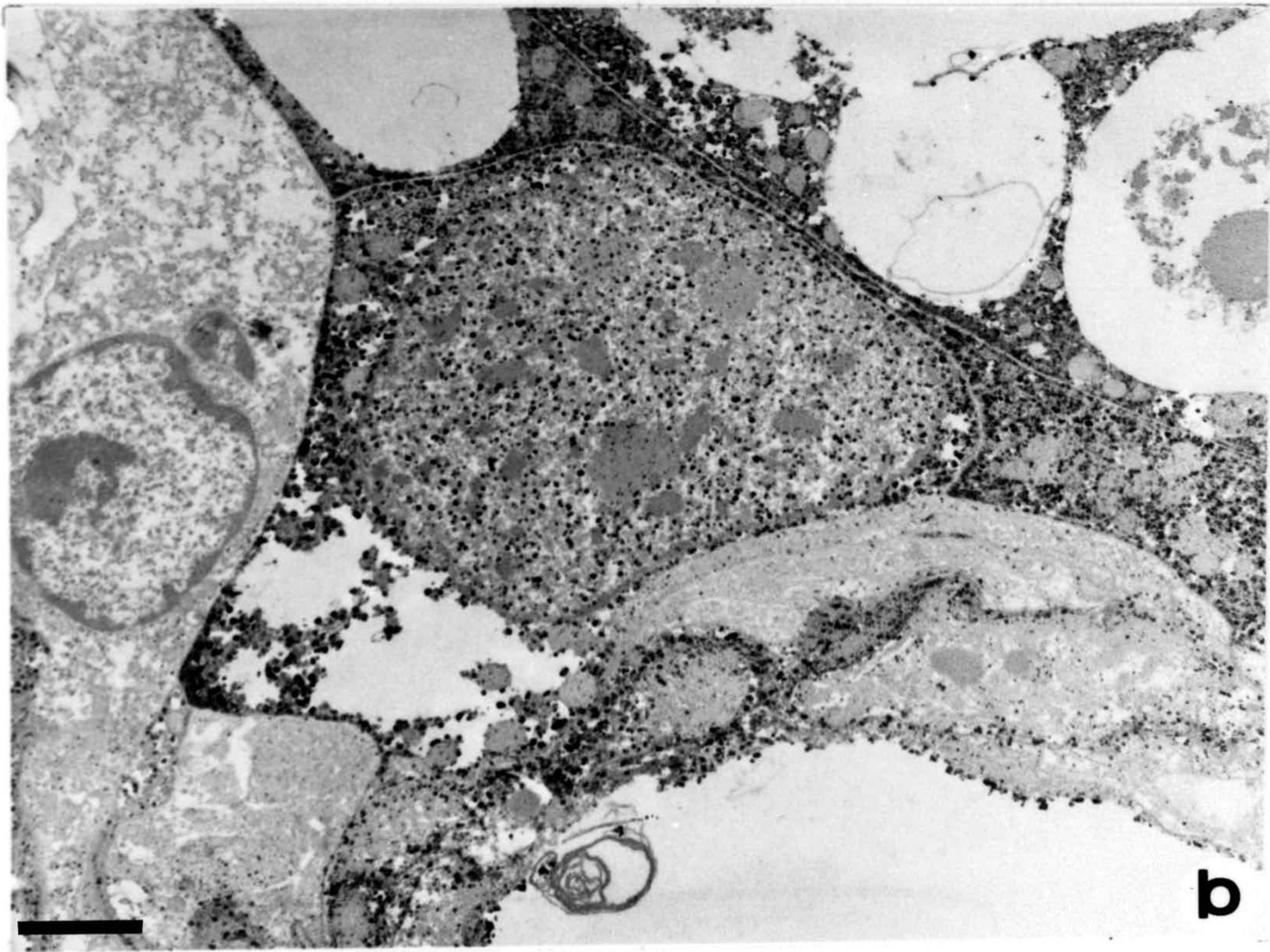
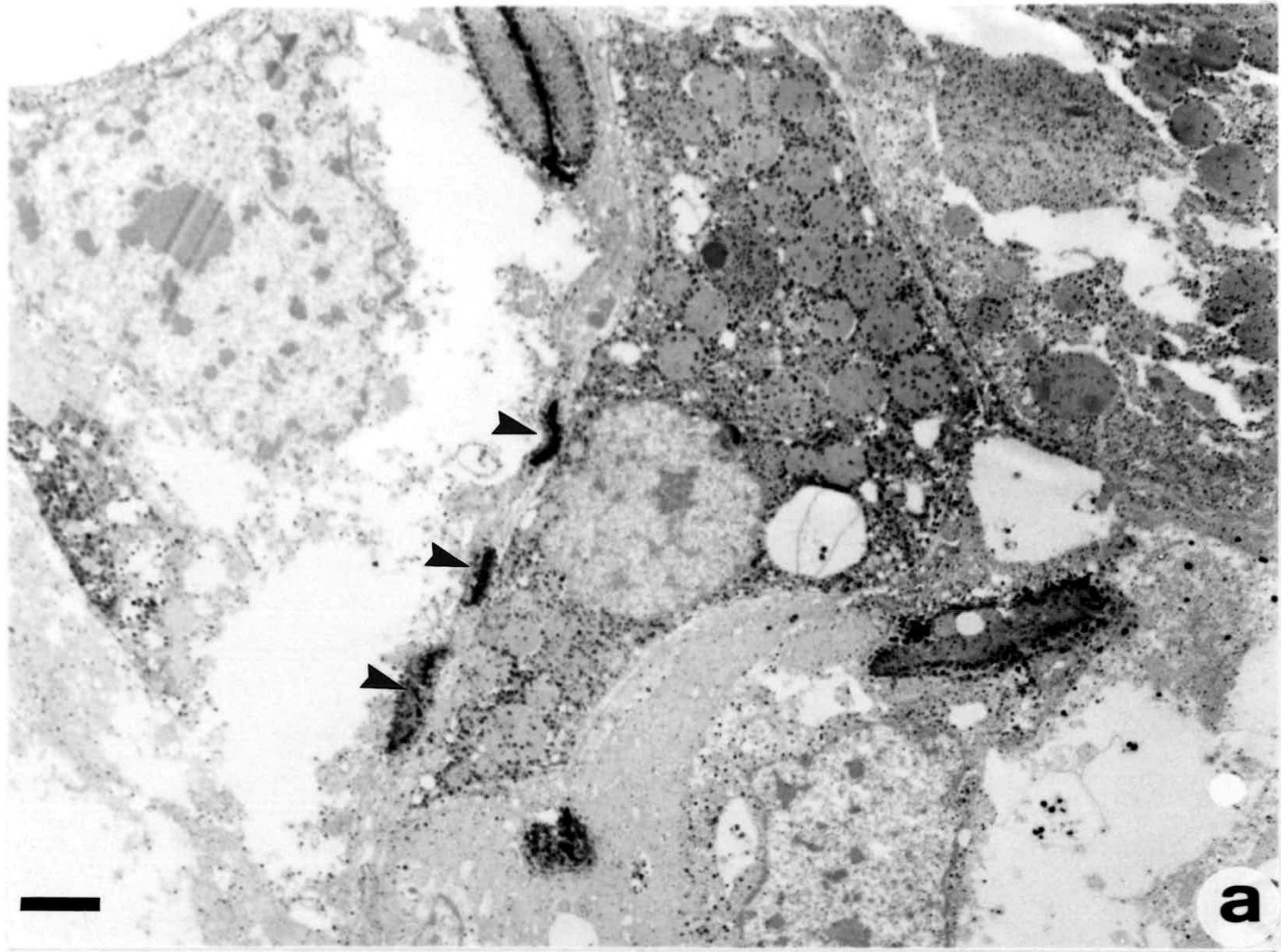


**Figura XX.** Actividad Esterasa Inespecífica en animales alimentados. (a) célula cálcica con gran actividad en los granos cálcicos (b) actividad en granos cálcicos y en la matrix extracelular más proxima a las células . La barra corresponde a 2 micras.

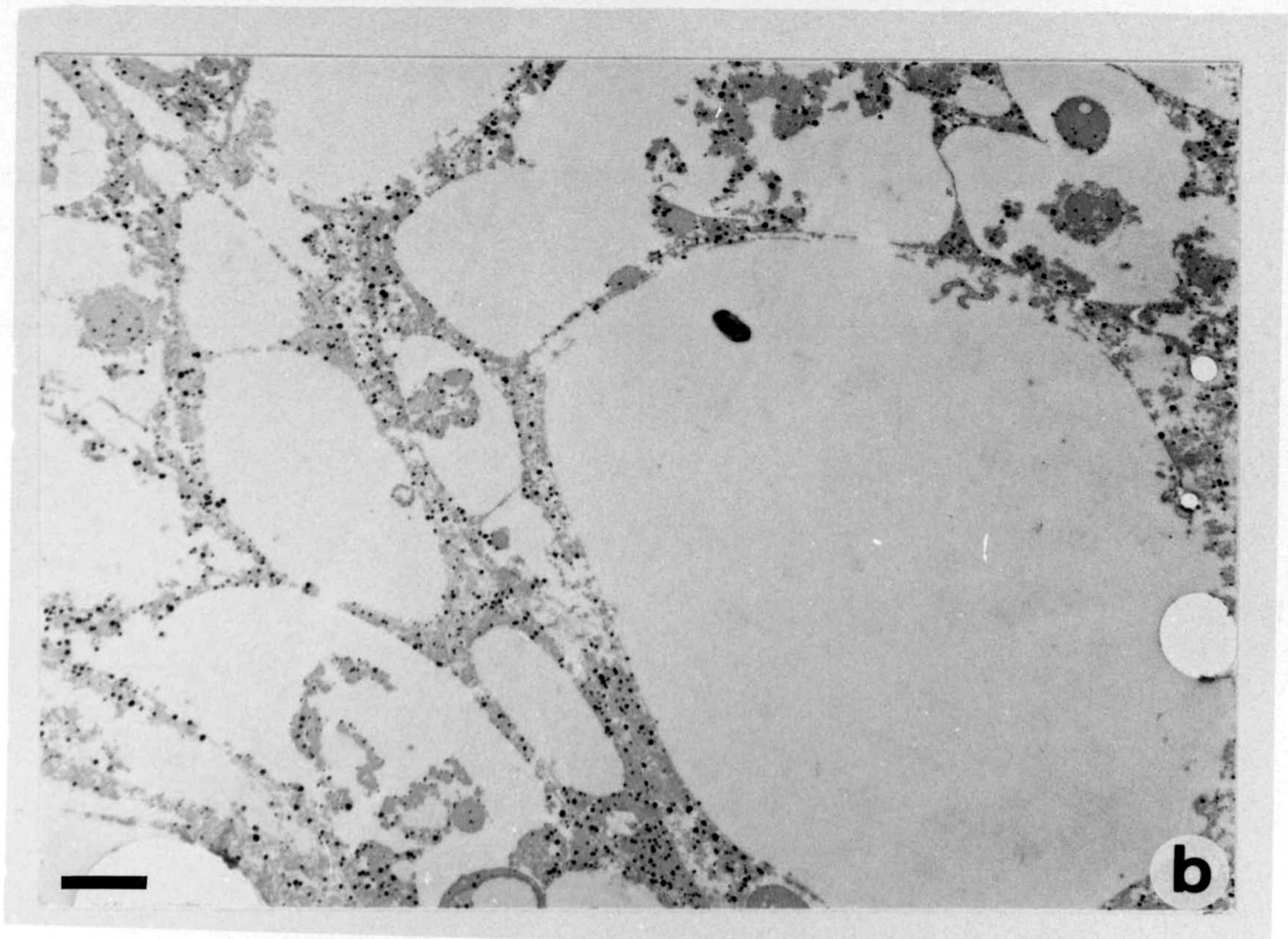
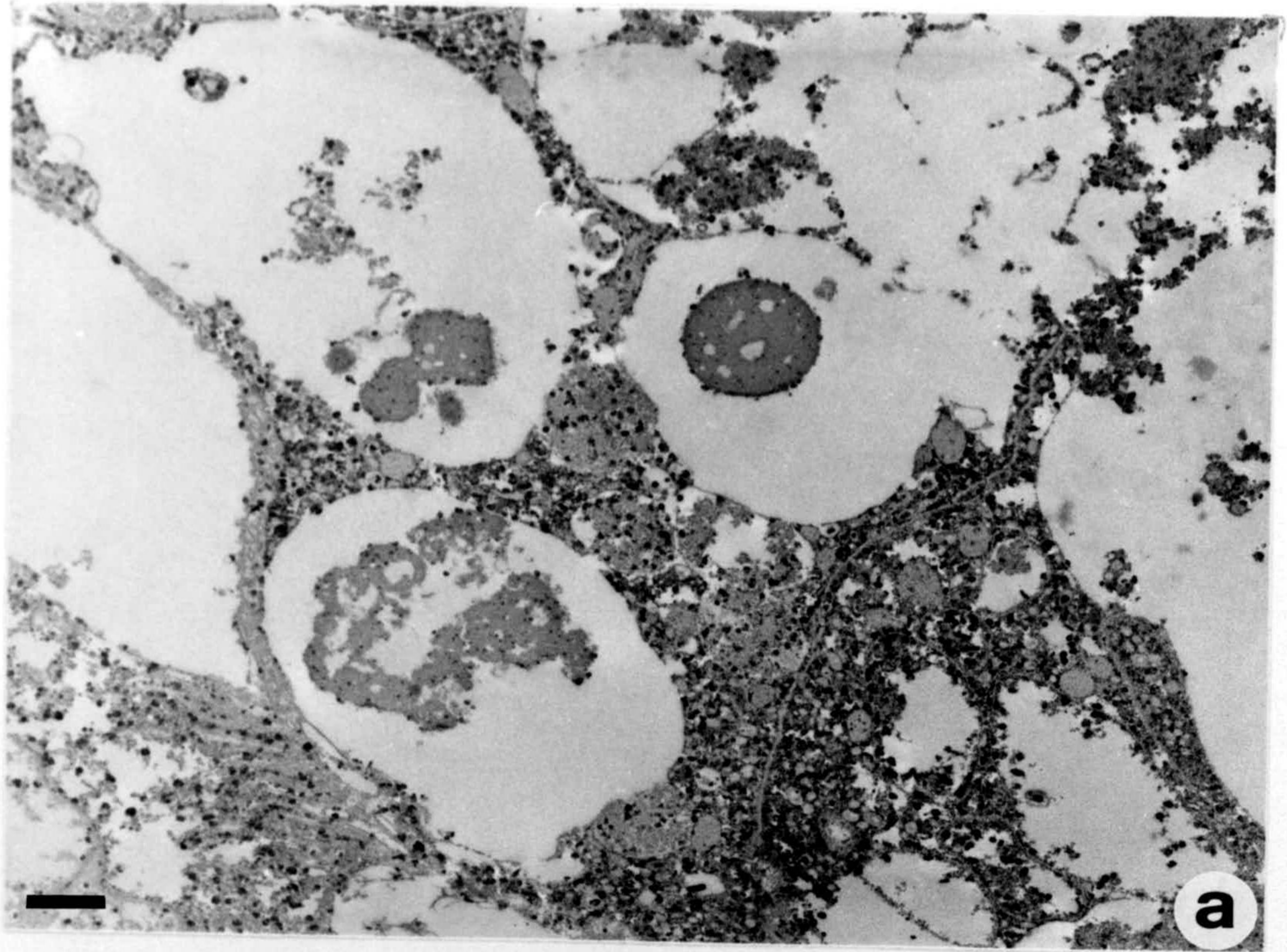


**Figura XXI.** Actividad Esterasa Inespecífica . (a) célula que muestra actividad en el citoplasma y en la matrix extracelular que circundan la misma. (b) actividad positiva en citoplasma y en núcleo. Estas imágenes corresponden a individuos ayunados por un periodo de tiempo de tres meses . La barra muestra 2 micras.

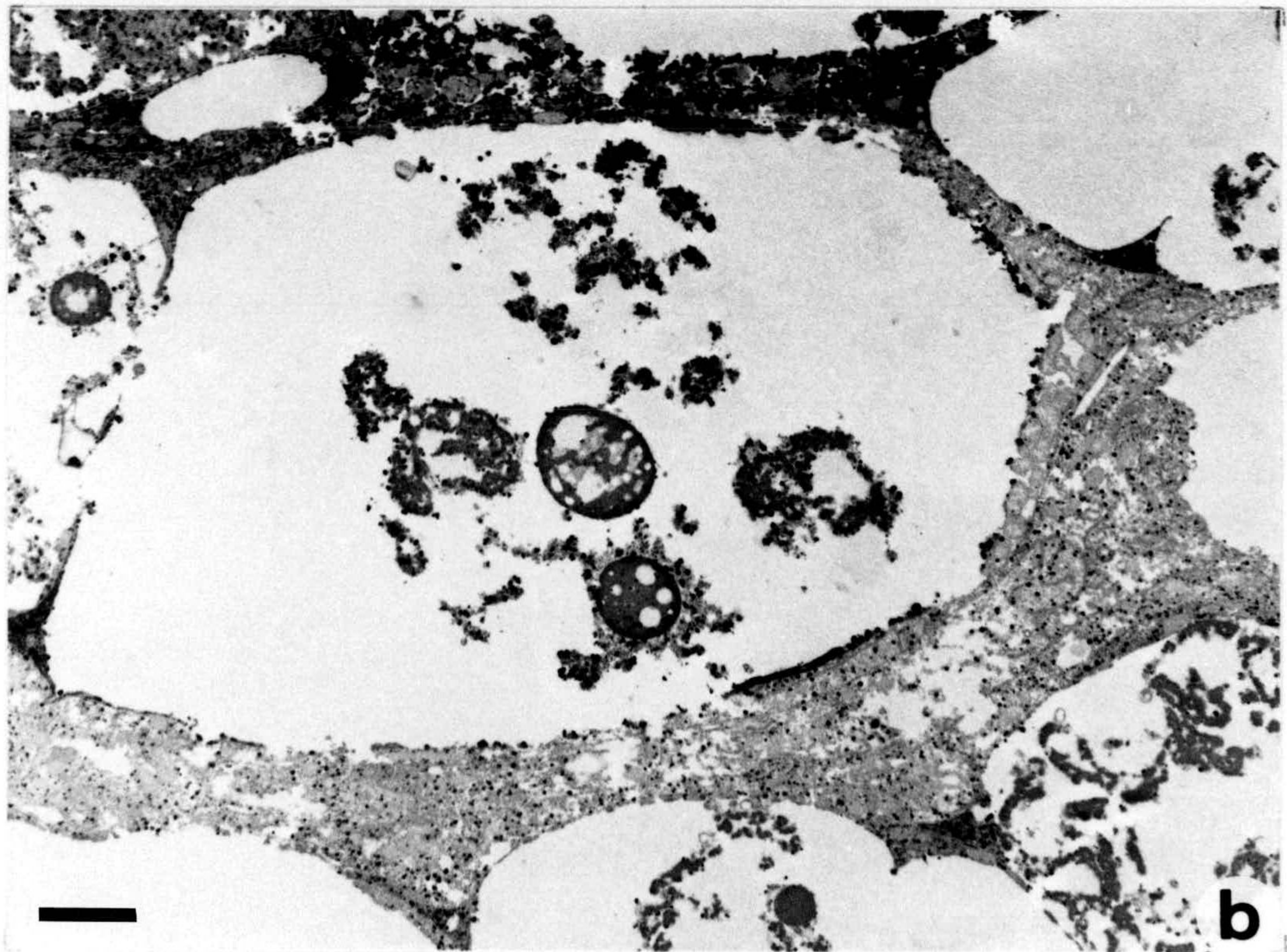
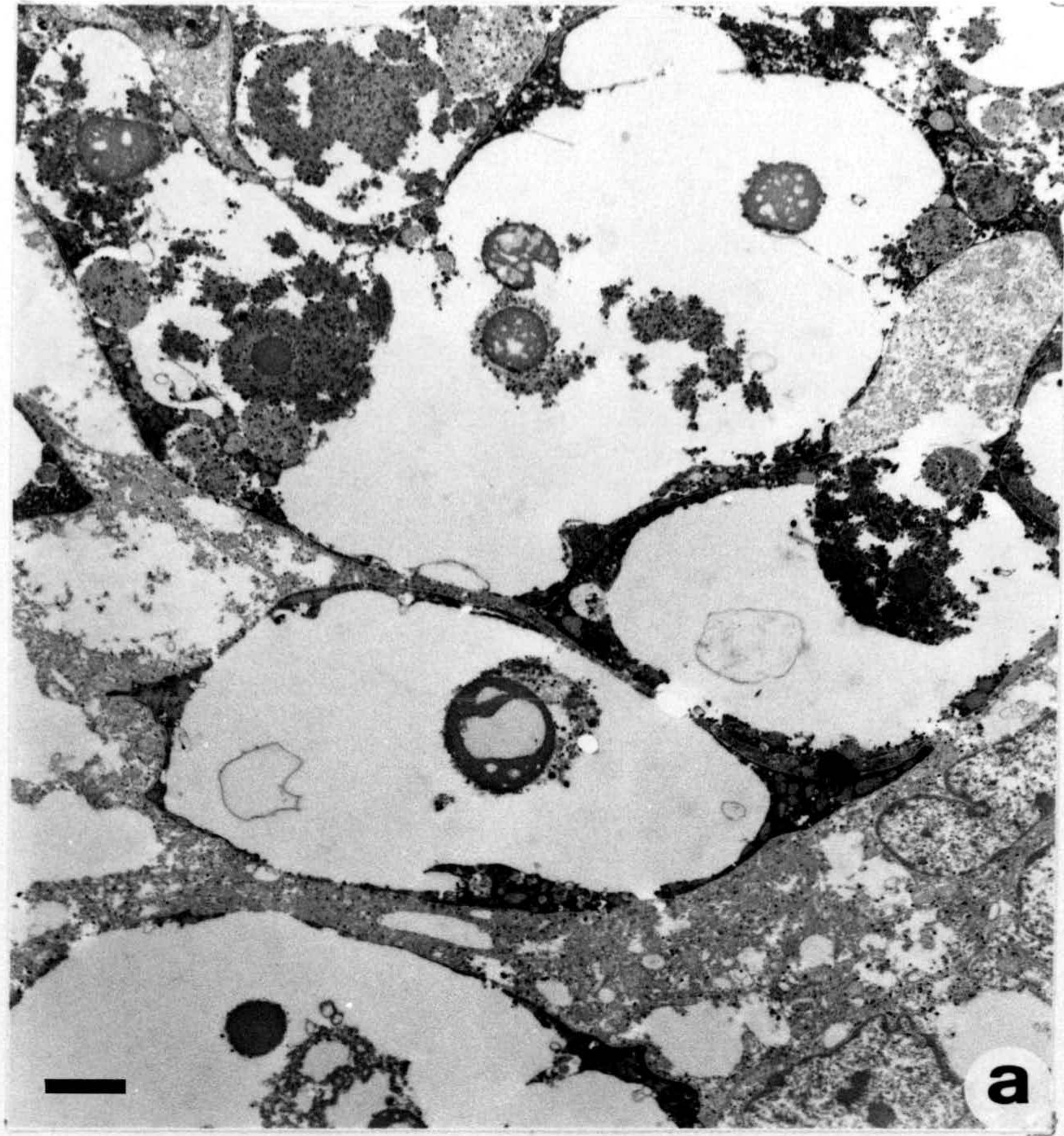




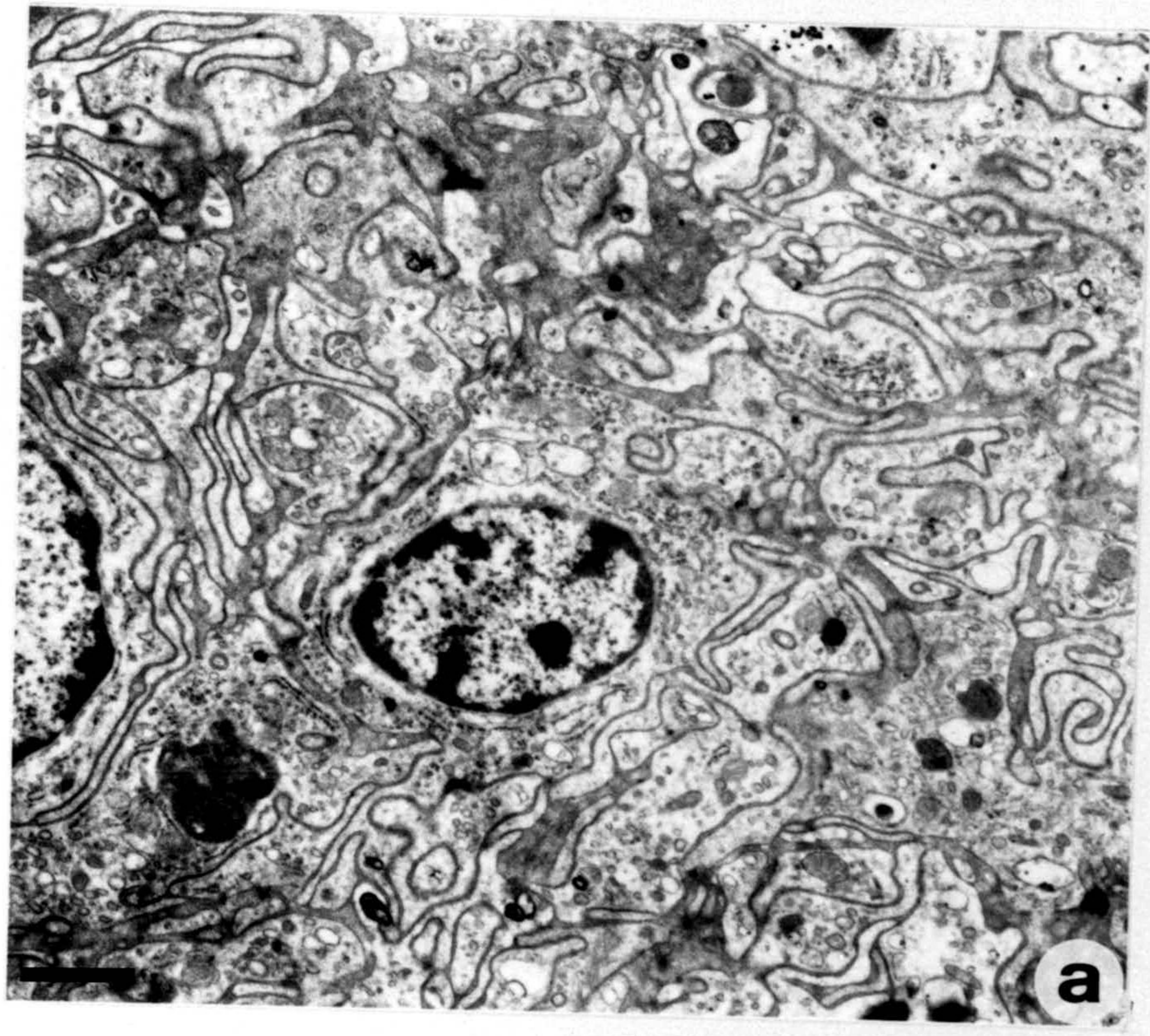
**Figura XXII.** Actividad Esterasa Inespecífica en citoplasma y vacuolas de células digestivas. (a) barra una micra. (b) barra dos micras. Periodo de estudio corresponde a 6 meses.



**Figura XXIII.** Actividad Esterasa Inespecífica en vacuolas de células excretoras. Correspondiente a animales de seis meses de inanición. Barra corresponde a 2 micras.



**Figura XXIV.** Imagen del conjuntivo tras tres meses de ayuno prolongado, se puede apreciar como este es "laxo", el núcleo de fibroblasto que se observa presenta la cromatina adherida sobre la membrana nuclear. La barra indica 2 micras.



**Figura XXV.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión en donde se pueden apreciar células con un periodo de ayuno de seis meses. Estas no muestran ninguna actividad ya que corresponde a controles. (a) detalle de la vellosidades. Barra .5 micras. (b) células digestivas con el citoplasma vacuolizado. Barra 2 micras (c) células del conjuntivo, mostrandose este de forma laxa. Barra 2 micras.



