

ESPECIALITZACIONS PER A LA UNIÓ CEL·LULAR DEL TEGUMENT D'*Hirudo medicinalis* (Hirudinea)

G. Huguet i M. Ll. Molinas

Departament de Biologia cel·lular. Col·legi Universitari de Girona (UAB). Hospital, 6. 17071-Girona.

RESUM

En estudiar el tegument dels hirudínids s'hi observa la neta separació de dues zones tegumentàries: l'externa, de gran cohesió, i la interna, molt laxa; en *Hirudo medicinalis* la separació de les dues zones és molt evident. Les unions responsables de la cohesió es troben a la porció apical de les cèl·lules epitelials i consisteixen en el complex d'unió, format per *zonula adherens*, unió septada i interdigitacions, i en els hemidesmosomes, que ancoren les cèl·lules amb la cutícula i la dermis, i que es troben units per feixos de tonofilaments formant un potent citosquelet. En el nivell de les unions septades es formen unes dilatacions de l'espai intercel·lular que relacionem amb el grau d'extensibilitat de l'animal.

RESUMEN

Al estudiar el tegumento de los hirudínidos se observa la clara separación de dos zonas tegumentarias: la externa, de gran cohesión, y la interna, muy laxa; en *Hirudo medicinalis* la separación de las dos zonas es muy evidente. Las uniones responsables de la cohesión se encuentran en la porción apical de la epidermis y consisten en el complejo de unión, formado por *zonula adherens*, unión septada y interdigitaciones, y en los hemidesmosomas que anclan estas células con la cutícula y con la dermis, los cuales se encuentran unidos entre sí por haces de tonofilamentos que forman un potente citoesqueleto. En el nivel de las uniones septadas se forman unas dilataciones del espacio intercelular que relacionamos con el grado de extensibilidad del animal.

ABSTRACT

This paper describes the ultrastructure of the integument of *Hirudo medicinalis* (Hirudinea, Arhynchobdellida) related to the different rate of junctions that maintain their cohesion. The integument consists in a monostratified epidermis layering upon a connective dermis and covered by a cuticle. Epithelial cells are closely joined by an apical band 3 µm thick, while the cell body is immersed in the dermis. The apical junction consists of a *zonula adherens* followed by septate junction and a set of deep interdigitations. There are a great number of hemidesmosomes in contact with the cuticle and the basement membrane. A strong cytoskeleton of tonofilaments joints apical and basal hemidesmosomes. We observe intercellular space dilatations in the septate junction that can be related to the grade of specimen extension.

Key words: *Hirudo medicinalis*, Hirudinea, integument, cuticle epidermis, intercellular junctions, contractility.

INTRODUCCIÓ

El tegument és un dels òrgans més importants del cos i forma un recobriment complet de l'animal. Les seves funcions són diverses: protecció enfront del medi extern, recepció d'estímuls, respiració i excreció són les més importants.

Les funcions del tegument depenen en gran part de les propietats de l'epidermis. Entre aquestes, fonamentalment la capacitat de les cèl·lules epitelials de mantenir contacte molt estret entre si, formant, d'aquesta manera, una capa coherent que recobreix les superfícies. L'adherència entre les cèl·lules epitelials es realitza a través d'orgànuls especialitzats i del citosquelet.

Les sangoneres tenen una gran capacitat d'extensió i de contracció corporal. El seu tegument ha de permetre l'extensibilitat i, al mateix temps, assegurar la cohesió cel·lular. És per això que hem escollit *Hirudo medicinalis*, una sangonera de l'ordre Arhynhobdellida, per a l'estudi del tegument en relació amb la contractilitat.

El tegument de les sangoneres ha estat descrit de forma general per diversos autors (vegeu-ne la revisió de Sawyer, 1986). La ultraestructura del tegument de *Dina lineata*, una sangonera del mateix ordre que *Hirudo medicinalis* però menys contràctil, ha estat estudiada per les autores (Huguet & Molinas, 1985, 1986). Berchtold et al. (1985), en l'estudi de la muda cuticular d'*Hirudo medicinalis*, fan una breu descripció del tegument. Malecha (1979) ha descrit el tegument de l'àrea copuladora de *Piscicola geometra*.

En aquest article es descriuen els mecanismes que determinen la forta cohesió existent entre els elements epidèrmics que asseguren l'estabilitat del tegument enfront dels moviments corporals, i es descriu, també, l'organització ultraestructural de la cutícula, que li permet una gran extensibilitat.

MATERIAL I MÈTODES

Els exemplars d'*Hirudo medicinalis* utilitzats en aquest treball provenen dels aiguamolls de l'Alt Empordà (Girona).

Per a la microscòpia òptica les mostres es fixen en formol al 4% en tampó fosfat pH 7,2, s'inclouen en glicol-metacrilat i es tenyeixen amb hematoxilina-eritrosina (Bonet & Huguet 1985).

Per a la microscòpia electrònica les peces es fixen en líquid de Karnovsky 0,1M i, abans de postfixar amb tetraòxid d'osmi, es renten amb tampó fosfat pH 7,2. La inclusió de les peces es fa en resina Spurr. Els talls ultrafins són contrastats amb el mètode convencional acetat d'uranil Reynolds abans del seu examen amb un microscopi electrònic de transmissió Philips 301 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

RESULTATS

El tegument d'*Hirudo medicinalis* consta de la cutícula extracel·lular, l'epidermis monostratificada i la dermis connectiva.

Les unions responsables de la coherència d'aquest tegument es troben situades a la porció apical de les cèl·lules de l'epidermis, mentre que la porció basal és mancada de tot tipus d'unió (Fig. 1):

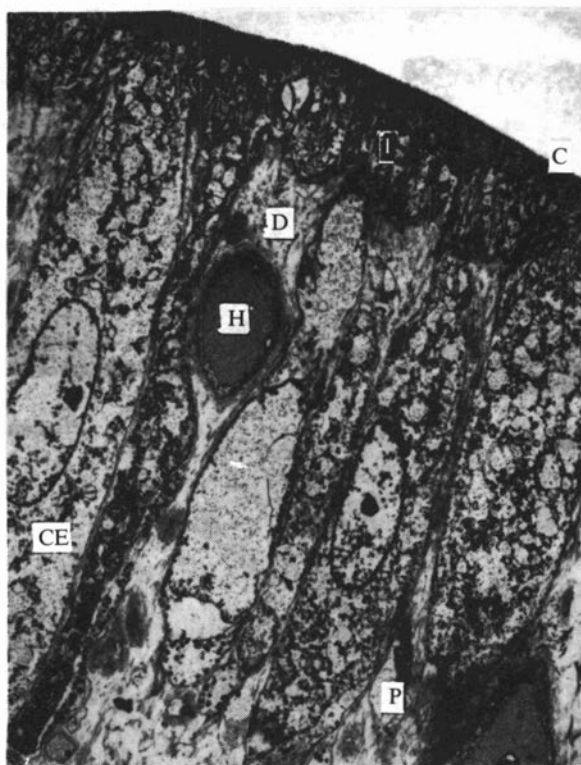


Figura 1. Visió general del tegument d'*Hirudo medicinalis*. S'hi distingeixen una porció epitelial superior, on es troba el citosquelet format per tonofilaments (T), i una porció epitelial inferior, on es troben el nucli i la resta d'òrgans citoplasmàtics. Cutícula (C), cèl·lula epitelial columnar (CE), teixit connectiu dèrmic (D), capil·lar hemocel·lòmic (H) i projecció citoplasmàtica d'una cèl·lula pigmentària (P).

La cutícula

Té un gruix que oscil·la entre 1 i 1,8 μm a la regió dorsal de l'animal; és formada per la cutícula pròpiament dita amb l'estat fibrós inferior i l'estrat amorf superior, i per l'epicutícula (Fig. 2).

A l'estrat fibrós s'observen feixos de fibres electrodenss disposades paral·lelament a la superfície epitelial, formant capes obliqües entre si. Les fi-

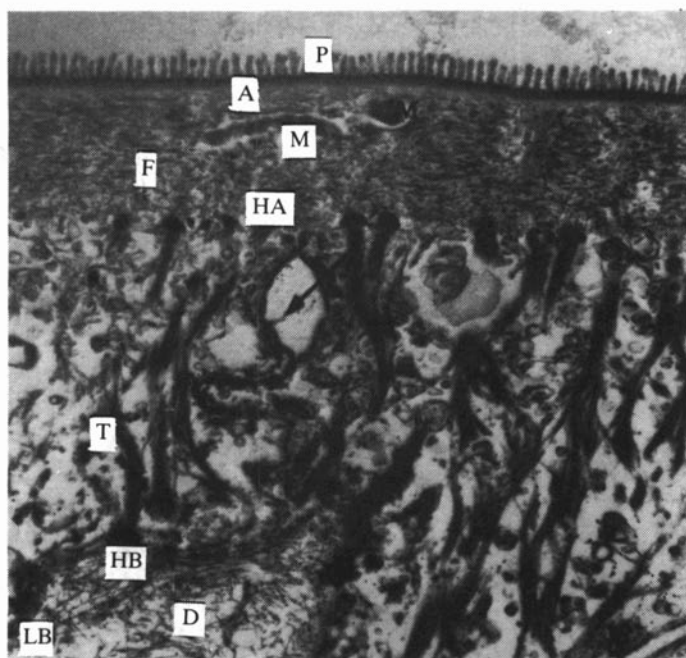


Figura 2. Cutícula i porció apical de les cèl·lules epitelials. En el nivell del complex d'unió es pot observar una dilatació de l'espai intercel·lular (→). Fibres de col·làgena (F), estrat amorf (A), projeccions epicuticulars (P), microvellositat epitelial (M), hemidesmosoma apical (HA), hemidesmosoma basal (HB), tonofilaments (T), làmina basal (LB) i teixit connectiu dèrmic (D).

bres són immersides en una matriu que és la mateixa que constitueix l'estrat amorf i que forma una banda més densa en el seu límit superior. L'estrat fibrós fa entre 0,6 i 1,2 μm i l'estrat amorf, entre 0,1 i 0,2 μm .

L'epicutícula és formada per les projeccions epicuticulars implantades sobre l'estrat amorf. Les projeccions tenen una distribució uniforme de 290 μm^2 aproximadament, són lleugerament còniques i fan uns 0,2 μm d'alçària per 0,04 de diàmetre a la base i 0,03 a l'apex.

L'epidermis

És formada per una capa monostratificada de cèl·lules columnars que fan uns 5 \times 30 μm (Fig. 1). Entre aquestes cèl·lules columnars es troben els conductes secretors de nombroses glàndules mucoses unicel·lulars (Fig. 3).

Les cèl·lules epitelials tenen una zona de gran coherència que ocupa una banda apical d'uns 3 μm de profunditat i que conté les unions especialitzades, i un citoesquelet de tonofilaments. A la banda apical és pràcticament nul·la la presència d'òrgans citoplasmàtics excepte nombroses vesícules de secreció,

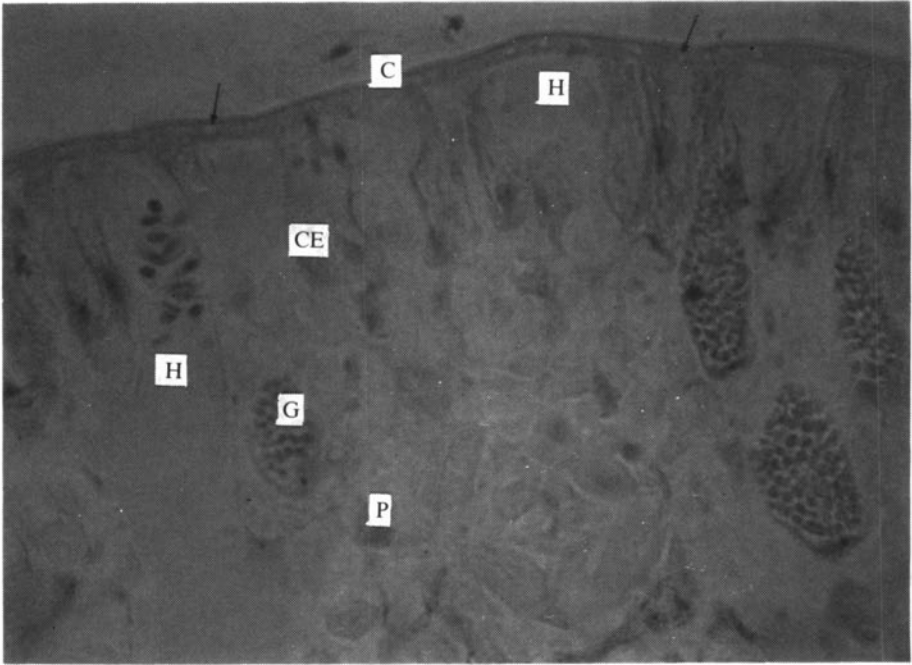


Figura 3. Imatge obtinguda per microscòpia òptica del tegument d'*Hirudo medicinalis*. Dilatacions dels espais intercel·lulars (→), cutícula (C), cèl·lula epitelial columnar (CE), capil·lar hemocelòmic (H), cèl·lula pigmentària (P) i glàndula mucosa (G).

d'uns 150 nm de diàmetre. S'hi observa la presència de microvellositats que s'internen en la cutícula (Fig. 2).

Les porcions basals de les cèl·lules columnars, que ocupen les 9/10 parts del citoplasma, queden separades, immergides en la dermis, amb la qual limiten per una conspícua làmina basal. Als espais intercel·lulars s'observa sovint la presència de capil·lars d'hemolimfa i de projeccions citoplasmàtiques de cèl·lules pigmentàries. El nucli està situat en posició basal, és oval i fa uns $8,5 \times 3 \mu\text{m}$. S'hi pot veure un nucleol d'uns $0,7 \mu\text{m}$ de diàmetre. El citoplasma és el d'una cèl·lula en síntesi activa, amb abundància de reticle endoplasmàtic rugós, ribosomes lliures, dictiosomes, mitocondris i glicogen. Presenta una distribució zonal amb l'aparell de Golgi i els mitocondris situats immediatament per sobre del nucli.

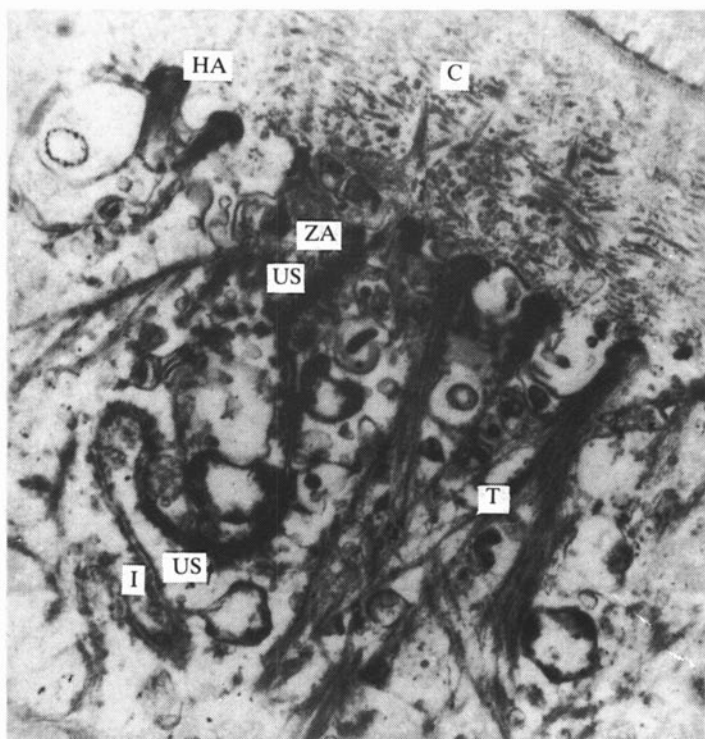


Figura 4. Porció apical d'una cèl·lula epitelial columnar on es poden veure el complex d'unió i els hemidesmosomes apicals (HA) en contacte amb la cutícula (C). *Zonula adherens* (ZA), unió septada (US), interdigitacions (I) i tonofilaments (T).

Especialitzacions per a la unió cel·lular

El complex d'unió, responsable de la forta cohesió lateral de les cèl·lules epitelials, és format per una *zonula adherens* seguida d'una unió septada i d'una sèrie d'interdigitacions (Fig. 4).

La *zonula adherens* té una longitud de 80 a 110 nm i l'espai intercel·lular al seu nivell és d'uns 33 nm.

Immediatament per sota, s'hi troba una unió septada, caracteritzada per la presència de material dens en forma de septes a l'espai intercel·lular. La longitud d'aquesta unió septada és de 2 a 3 μm . La peridiocitat dels septes és d'1 per cada 16 nm i l'espai intercel·lular és de 28 nm. Sovint la unió septada es veu interrompuda intermitentment per petites zones sense septes, d'una longitud de 100 a 700 nm, on l'espai intercel·lular es fa més estret: de 20 nm d'amplària.

Per sota de la unió septada les membranes s'interdigiten i penetren profundament en el citoplasma de les cèl·lules veïnes. L'espai intercel·lular en el nivell de les interdigitacions és de 20 nm.

Per sota de la *zonula adherens* s'observa sovint la presència de dilatacions en forma de sàcul de l'espai intercel·lular, el contingut de les quals es veu buit

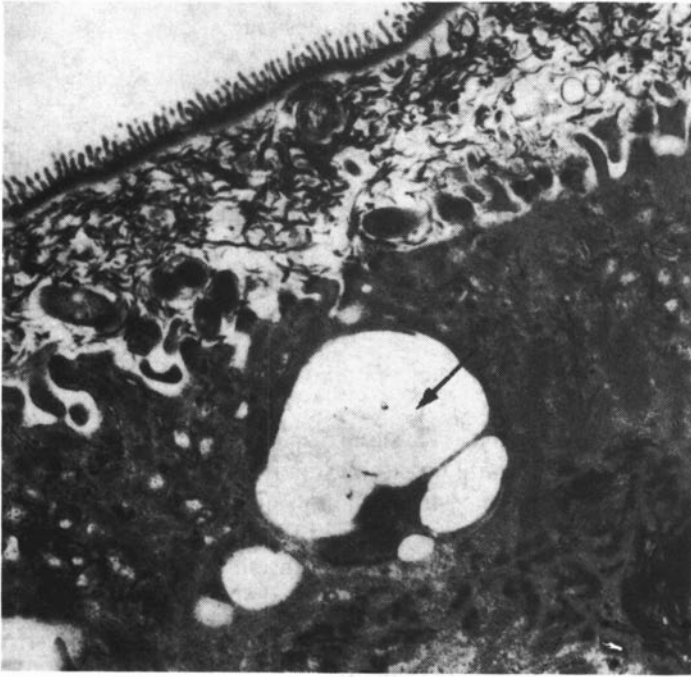


Figura 5. Dilatacions de l'espai intercel·lular (→) en el nivell del complex d'unió de les cèl·lules epitelials columnars.

als electrons (Fig. 3). Les dilatacions poden ser úniques (Fig. 2) o múltiples (Fig. 5). Depenent dels exemplars, les dilatacions són més conspícues o menys. Hem observat dilatacions oscil·lant entre 0,5 i 2,5 μm de diàmetre.

Les dilatacions s'insereixen en el complex d'unió d'uns 300 a 800 nm per sota de la *zonula adherens* i van seguides de la unió septada o de les interdigitacions.

Nombrosos hemidesmosomes distribuïts per la superfície apical de les cèl·lules epitelials uneixen fortament aquestes cèl·lules a la cutícula. Aquests hemidesmosomes són força protuberants, tenen una alçària d'uns 200 nm i un diàmetre de 180 nm (Fig. 4). De la seva superfície exterior surten petites fibril·les d'uns 35 nm de llargària que ancoren les cèl·lules a la cutícula.

Els hemidesmosomes basals estan situats immediatament a continuació de les interdigitacions, dintre de la banda apical, i queden units a la làmina basal. Aquests hemidesmosomes són menys protuberants que els apicals. De la superfície externa dels hemidesmosomes basals també surten petites fibril·les que penetren en la dermis, encara que no s'observen tan ben definides com a la superfície apical.

Els hemidesmosomes estan units per un potent citosquelet format per tonofilaments, que ocupa la porció apical de les cèl·lules epitelials. Els tonofilaments es troben formant feixos que van d'un hemidesmosoma apical a un de

basal, seguint un recorregut perpendicular a la superfície epitelial i lligant les unions cuticulars amb les unions dèrmiques (Fig. 2).

DISCUSSIÓ

El tegument d'*Hirudo medicinalis* és característic dels hirudínids. S'hi distingeixen dues zones ben delimitades: la superior, de gran coherència interna, i la inferior, laxa. A la porció superior, les cèl·lules es mantenen estretament unides entre si, amb la cutícula i amb la dermis. En la porció inferior, els cossos cel·lulars queden lliures entre la dermis, sense cap tipus d'unió especialitzada (Fig. 6).

El citoplasma de les cèl·lules epitelials està molt polaritzat. A la porció apical es troben únicament els nexes d'unió, el potent citosquelet format per tonofilaments perpendiculars a la superfície epitelial i algunes vesícules secretores. La porció basal manté un citoplasma ric, capacitat per a la síntesi.

La cutícula presenta una estructura molt similar a la descrita a *Dina lineata* per les autores (1985). És més gruixuda i l'entrecruament dels feixos de fibres és més evident que a *Dina lineata*. Pensem que l'extensibilitat de la cutícula és possible gràcies al desplaçament relatiu de les fibres en la matriu amorfa.

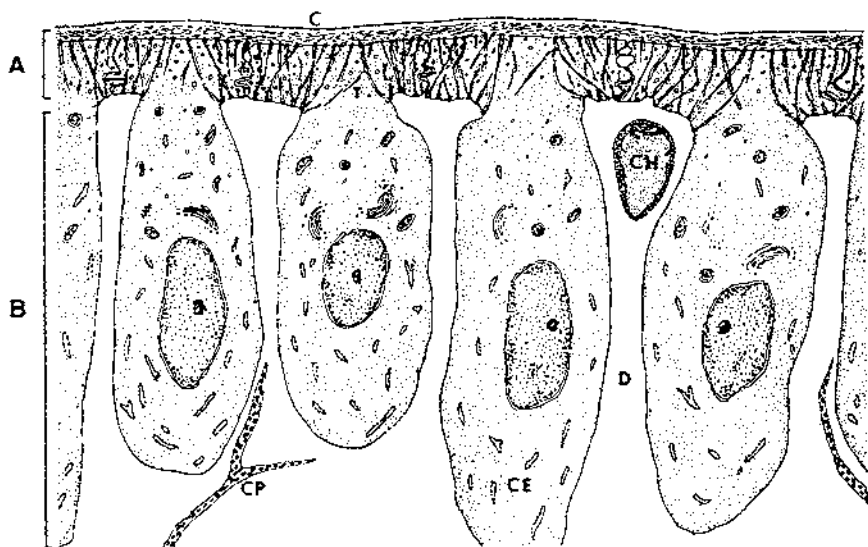


Figura 6. Esquema de l'epidermis d'*Hirudo medicinalis* on es poden observar dues zones clarament diferenciades: la porció apical (A), amb un potent citosquelet format per tonofilaments (T), i la porció basal (B), portadora de la resta d'orgànuls citoplasmàtics. Entre les cèl·lules epitelials (CE), hi penetra el teixit connectiu dèrmic (D) en el qual podem veure un capil·lar hemocelòmic (CH) i les projeccions citoplasmàtiques de les cèl·lules pigmentàries (CP). Cutícula (C).

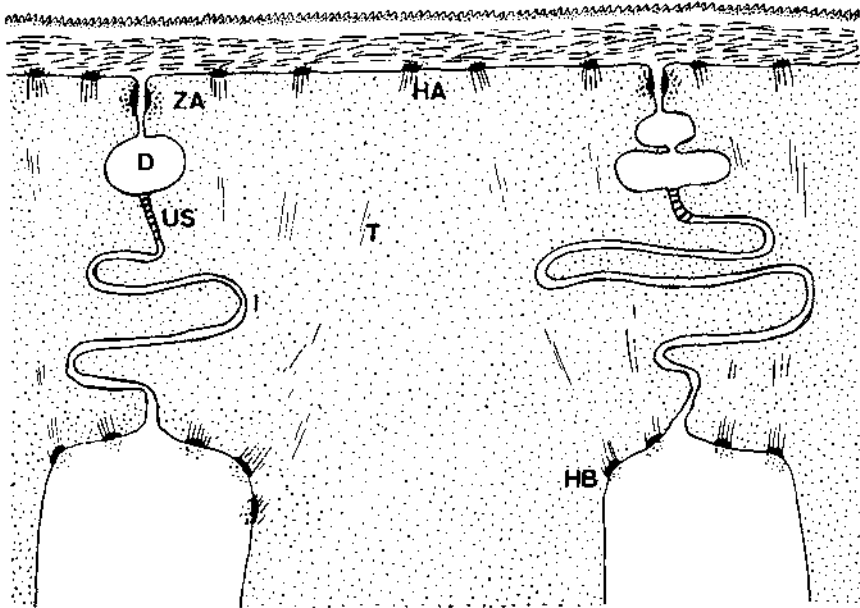


Figura 7. Esquema de la porció apical de l'epidermis. Hemidesmosomes apicals (HA), hemidesmosomes basals (HB), tonofilaments (T), zonula adherens (ZA), unió septada (US), interdigitacions (I) i dilatacions de l'espai intercel·lular (D).

El sistema d'unions especialitzades, a la banda apical de les cèl·lules epitelials, té una organització geomètrica estructurada que coordina els seus diferents elements per assegurar la cohesió de l'epiteli dels hirudínids. Aquestes unions formen una xarxa interconnectada per tonofilaments que permet a l'epiteli d'estendre's sota les tensions i de continuar mantenint la cohesió (Fig. 7).

Les dilatacions dels espais intercel·lulars són, en *Hirudo medicinalis*, molt més conspicues i freqüents que en altres espècies d'hirudínids. Malecha (1979) observa, a *Piscicola geometra*, petites dilatacions en el nivell de les unions septades, d'un diàmetre d'uns $0,15 \mu\text{m}$. Aquestes dilatacions, bé que molt més petites, són equivalents a les observades a *Hirudo medicinalis*.

El paper de les dilatacions no és conegut. El fet que siguin buides als electrons i que no s'observin vesícules en el citoplasma adjacent, descarta una possible funció d'excreció.

Les variacions en diàmetre i en nombre de dilatacions visibles en els diferents exemplars poden estar relacionades amb el grau d'extensibilitat en què es trobaven els animals. La presència de les dilatacions suposa, aparentment, una àrea laxa enmig d'una zona molt estructurada, com és la paret lateral de les cèl·lules epitelials en el nivell del complex d'unió. Les dilatacions poden contribuir a esmoreir les tensions ocasionades en un estat de gran extensió de l'animal, que, d'aquesta manera, no han d'afectar tan intensament els components dels complexos d'unió (Fig. 7).

Bibliografia

- BERCHTOLD, J.P., SAUBER, F. & REULAND, M. (1985). Étude ultrastructurale de l'évolution du tégument de la sangsue *Hirudo medicinalis* L. (Annélide, Hirudinée) au cours d'un cycle de mue. *Int. J. Inv. Repr. and Develop.* 8: 127-138.
- BONET, S. & HUGUET, G. (1985). Tècniques habituals de coloració per a seccions semifines de material inclòs en Glicol metacrilat (G.M.A.). *Scientia gerundensis*. 10: 23-32.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1985). Estructura i ultraestructura del revestiment cuticular de *Dina lineata*. *Scientia gerundensis*. 11: 39-49.
- (1986). Estructura i ultraestructura de les cèl·lules epitelials de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774), (Hirudinea). *Scientia gerundensis*. 12: 5-13.
- MALECHA, J. (1979). Contribution a l'étude de la biologie de l'Hirudinée Rhynchobdelle *Piscicola geometra* L. Tesi presentada a l'Université des Sciences et Techniques de Lillie I.
- SAWYER, R.T. (1986). *Leech Biology and Behaviour*. Clarendon Press Oxford. Swansea.