

ESTRUCTURA I ULTRASTRUCTURA DEL REVESTIMENT CUTICULAR DE *DINA LINEATA* (O.F. MÜLLER, 1774) (HIRUDINEA)

Gemma Huguet Blanco i M. Lluïsa Molinas de Ferrer

Departament de Biologia del Col·legi Universitari de Girona.

C/ Hospital, 6. 17071 Girona. Spain

RESUM

La cutícula de la paret del cos de *Dina lineata* consta de tres estrats: fibrós, amorf i epicuticular. L'estrat fibrós està format per fibres de col·làgena immerses en una matriu mucopolisacàrida neutre. L'estrat amorf està constituït per la mateixa matriu de l'estrat fibrós i forma una banda més densa en el seu límit superior, on estan implantades les projeccions epicuticulars, portadores d'un revestiment filamentos probablement de naturalesa mucopolisacàrida àcida. Procedents de les cèl·lules epitelials s'internen en la cutícula microvellositats que afloren entre les projeccions epicuticulars. La cutícula està fortament unida a l'epidermis per mitjà d'hemidesmosomes.

RESUMEN

La cutícula de la pared corporal de *Dina lineata* consta de tres estratos: fibroso, amorfo y epicuticular. El estrato fibroso está formado por fibras de colágeno rodeadas por una matriz mucopolisacárida neutra. El estrato amorfo está constituido por la misma matriz del estrato fibroso y forma una banda más densa en su límite superior, donde están implantadas las proyecciones epicuticulares, portadoras de un revestimiento filamentoso probablemente de naturaleza mucopolisacárida ácida. Procedentes de las células epiteliales se internan en la cutícula microvellosidades que afloran entre las proyecciones epicuticulares. La cutícula está fuertemente unida a la epidermis por medio de hemidesmosomas.

ABSTRACT

The authors describe the body wall cuticle of *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae). The cuticle, 1,15 micrometers wide, shows three stratum, the basal fibrous stratum, the amorphous stratum and the epicuticle. The fibrous stratum contains up to twelve layers of collagen bundles arranged parallel to the body surface embedded in an amorphous neutral mucopolisaccharid matrix. The collagen fibrils, 400 Å ca. in diameter, show no striation and are thicker than non cuticular collagen and the vertebrate's collagen. The amorphous stratum is composed of the same matrix which forms a dense line in the upper surface where the epicuticular projections lay. The epicuticle consists of the epicuticular projections uniformly arranged with a density of 125 per square

micrometer ca. Covering the projections we can see a filamentous coat like a glycocalix, which can be responsible for the positive reaction to the acid mucopolisaccharides test seen in the apical surface of the cuticle. The columnar cells show an intimate relation to the cuticle because of the presence of microvilli which cross the cuticle and project in the epicuticular stratum and also because of the hemidesmosomes which firmly join the cells. At the hemidesmosomes level the cuticle shows perpendicular oriented collagen fibrils.

Key words: *Dina lineata*, cuticle, collagen, glycocalix, microvilli, hemidesmosome, electron microscopy, histochemistry, Hirudinea.

INTRODUCCIÓ

El treball que presentem a continuació és l'estudi estructural i ultraestructural de la cutícula de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774), i és el primer d'una sèrie de quatre articles en els quals es fa la descripció de la morfologia del tegument d'aquesta espècie.

El tegument dels hirudínids ha rebut poca atenció. La major part de les dades són estudis parcials del tegument d'*Hirudo medicinalis*, espècie que pel seu interès terapèutic i per ésser un excel·lent model de regeneració neuronal acapara l'atenció d'un nombre elevat d'estudiosos (Berchtold et al. 1985; Coggeshall 1966). La capacitat de regeneració i la diferenciació cel·lular de l'epiteli ha estat estudiada per J.P. Cornec (1967, 1984), en diverses espècies de les famílies *Erypobdellidae* i *Glossiphoniidae*.

Al nostre judici mancava un estudi detallat de la morfologia normal del tegument dels hirudínids que serà l'objecte del nostre treball. El model elegit per nosaltres és *Dina lineata*, de la família *Herpobdellidae*, molt comú als nostres rius i rierols.

Com és característic en els anèl·lids, el tegument de *Dina* està format per tres capes ben definides: la cutícula extracel·lular, l'epidermis monoestratificada i glandular i la dermis connectiva (Fig. 1).

La cutícula és complexa i s'hi distingeixen dues zones principals: la cutícula pròpiament dita amb un estrat fibrós basal i un estrat amorf, i l'epicutícula constituïda per les projeccions epicuticulars, ha estat estudiada per Berchtold et al. (1985) en el context dinàmic del cicle de muda d'*Hirudo medicinalis*, i per García Más (1979), que ha estudiat la regió digestiva de *Dina lineata*. No hi han, però, estudis histoquímics i ultraestructurals detallats de la cutícula de la pared corporal dels hirudínids.

MATERIAL I MÈTODES

Els exemplars de *D. lineata* utilitzats en aquest treball provenen de rius i rierols pròxims a Girona.

Per la seva observació al microscopi òptic, s'han fixat els exemplars, prèviament anestesiats amb alcohol al 8 %, en formol al 4 % en tampó

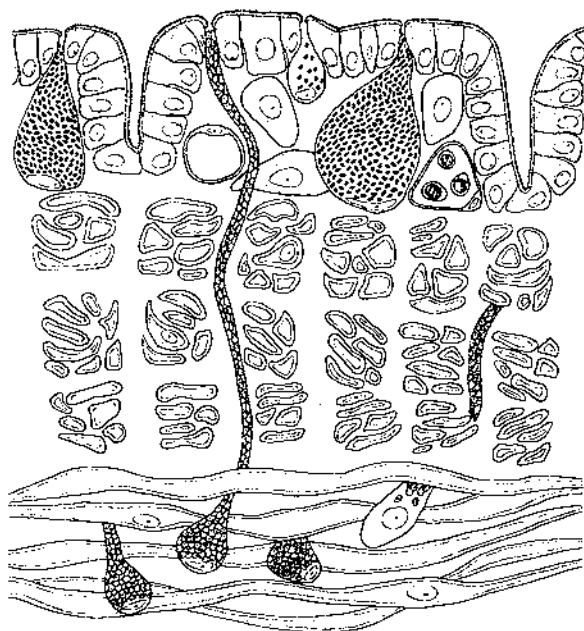


Figura 1. Esquema de la pared del cos de *Dina lineata*: (c) cutícula, (ce) cèl·lula epitelial, (cd) cèl·lula connectiva de la dermis, (cs) capilar subepidèrmic, (h) cèl·lules lliures de l'hemolimfa, (p) cèl·lula glandular piriform, (t) cèl·lula glandular tubular, (mc) musculatura circular, (md) musculatura diagonal, (ml) musculatura longitudinal.

fosfat pH 7,2. Després d'una acurada deshidratació en sèrie alcohòlica les mostres s'han inclòs en parafina o glicol metacrilat GMA (Bonet i Molinas, 1983) per obtenir-ne talls de 5 a 7 micròmetres o de 2 micròmetres respectivament.

Amb els talls obtinguts s'han realitzat les següents proves histiquímiques: A) Per a la detecció de mucopolisacàrids: PA-S blau d'alcià pH 2,5 (Bancroft 1975); B) Per a la detecció de fibres connectives: impregnació argèntica de Gomori (Bonet i Huguet 1985), mètode de Lillie per teixit connectiu (Luna 1968), mètode de Weigert per fibres elàstiques (Luna 1968), coloració per elastina de Verhoff (Humason 1967); C) Per a la detecció de proteïnes: reacció de Millon (Bancroft 1975), reacció tanno-fèrrica de Salazar (Gabe 1968), reacció de la ninhydrina-Schiff (Humason 1967), blau de Coomassie:

El blau de Coomassie s'utilitza normalment per a la detecció quantitativa de proteïnes en espectrofotometria (Bradford 1976). Donat que és un mètode molt sensible i que presenta poques interferències hem adaptat el mètode per ús histiquímic. El blau de Coomassie, que en forma anionica té un to vermellós, es transforma a blau al unir-se als grups amino de les proteïnes, pel que les zones riques amb proteïnes es tenyeixen de blau. El procediment seguit és el següent:

Solució colorant:

fosfòric 85 % 10 ml.

blau de Coomasie G 10 mg.

alcohol 95 % 5 ml.

aigua destil·lada enrasar a 100 ml.

1. Desparafineu els talls i porteu-los a alcohol 70 %.
2. Tenyiu amb la solució colorant 20 minuts.
3. Renteu amb aigua destil·lada acuradament.
4. Deshidrateu amb una sèrie alcohòlica ràpidament, ja que l'alcohol s'emporta el colorant. Aclariu amb xilol i munteu amb Entellan.

Els exemplars destinats a l'observació per microscopia electrònica de transmissió s'han anestesiats amb aigua amb gas carbònic i s'han fixat amb líquid de Karnovsky 0,1 M. i posfixat amb tetraòxid d'osmi. L'inclusió de les peces s'ha fet en resina Spurr. Els talls ultrafins han estat contrastats amb el mètode convencional acetat d'uranil/Reynolds. Les observacions s'han fet amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU 12 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Per la microscòpia d'escandallatge s'ha emprat el gas carbònic per l'anestèsia i el glutaraldehid al 2,5 % en tampó fosfat pH 7,38 0,1 M com a fixador. Les mostres s'han desecat en un desecador de punt crític POLARON E-3000 utilitzant acetat d'amil com a líquid de transferència i

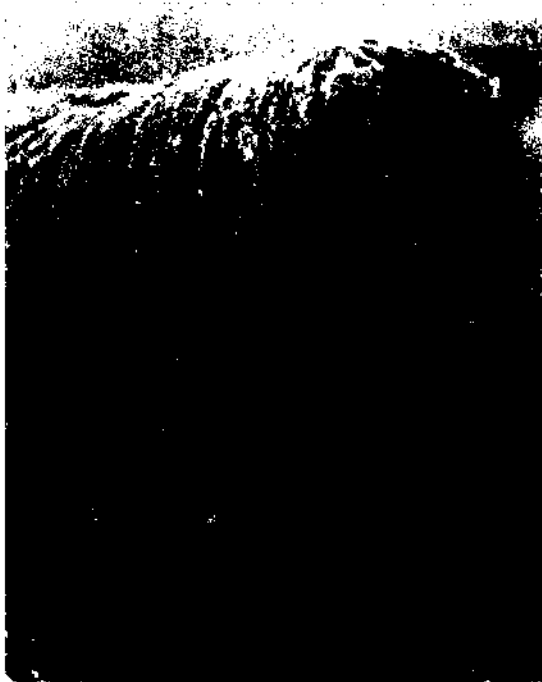


Figura 2. S.E.M. 258x Regió de la ventosa anterior en la qual s'obre la boca (b), i en la qual es poden veure nombroses papil·les sensibles (ps).

anhídrid carbònic com a líquid de transició. S'han metal·litzat amb un diode de «sputtering» POLARON E-5000 formant un recobriment de ca. 400 Å de gruix d'or. Les observacions s'han fet en un microscopi SUPER III-A ICI del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona, i en un Cambridge S 4 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

OBSERVACIONS I RESULTATS

L'observació dels exemplars de *D. lineata* al microscopi electrònic d'escandallatge mostra una superfície avellutada formada per una capa compacta amb petites protuberàncies arrodonides d'uns 170 nm de diàmetre (Fig. 2). Es continua amb la cavitat faríngea i s'interrompeix puntualment a nivell de les papil·les sensibles (Fig. 3).



Figura 3. S.E.M. 10750x Detall de la superfície del cos en la qual es pot observar la presència de petites protuberàncies (→).

Al microscopi òptic la cutícula s'observa com una capa clarament diferenciada. És fortament PA-S positiva i en el seu límit exterior presenta una banda estreta que es tenyeix amb els reactius per mucopolisacàrids àcids com el blau d'alcià pH 2,5. Les reaccions per proteïnes i fibres connectives donen resultats positius (taula I).

Taula 1. Resultats de les proves histoquímiques.

Fibres connectives		Proteïnes	
Impregnació argèntica	+	Reacció de Millon	-
Mètode de Weigert	+	Reacció tanno-fèrrica de Salazar	+
Mètode de Lillie	+		-
Mètode de Verhoff	+	Reacció de la ninhydrina-Schiff	+
	-		-
		Reacció del blau de Coomasie	+
Mucopolisacàrids			
PA-S/blau d'alcià	fina banda sup. blava, reste rosa		

+ positiu, - negatiu, ± dèbilment positiu.

El microscopi electrònic de transmissió permet constatar la complexitat estructural de la cutícula i dels lligams que manté amb les cèl·lules de l'epidermis.

Mesura aproximadament 1,15 micròmetres de gruix i s'hi distingeixen tres estrats que de dintre a fora són: fibrós, amorf i epicuticular (Fig. 4).



Figura 4. T.E.M. 33570x Tall transversal a nivell de la cutícula on es poden veure els diferents estrats cuticulars i les unions que manté amb l'epidermis; (pe) projeccions epicuticulars, (ma) matriu amorfa, (bm) banda de condensació de la matriu amorfa, (fc) fibres de col·làgena, (fr) fibril·les de col·làgena, (hd) hemidesmosomes, (tf) tonofilaments i (mv) microvellositats.

L'estrat fibrós, basal, d'un gruix mig de 550 nm. que pot oscil·lar entre 330 i 620 nm., està format per una matriu clara en la que estan immerses fibres electrodenses d'un diàmetre aproximat 40 nm. que es disposen en capes paral·leles a l'epidermis. Es compten fins a dotze capes de fibres.

L'estrat amorf segueix sense solució de continuïtat a l'estrat fibrós. Està format per la matcixa matriu amorfa que envolta les fibres i presenta dues zones, una basal de 160 a 200 nm. i l'altre superior, d'uns 140 nm., en la que progressivament augmenta la densitat de la matriu en acostar-se al límit superior.

L'epicutícula està constituïda per les projeccions epicuticulars que tenen una matriu lleugerament més clara que la del límit superior de l'estrat amorf que les suporta i que són portadores d'un revestiment filamentós que recorda a un glicocàlix (Fig. 5). Les projeccions epicuticulars estan



Figura 5. T.E.M. 40000x Secció a nivell de la cutícula en la qual es pot veure el revestiment filamentós de l'epicutícula (→).

distribuides uniformement, amb una densitat aproximada de 125 per micrometre². Són més o menys cilíndriques amb un lleuger engruïment en la seva part basal (Fig. 4). Mesuren uns 180 nm. d'alçària i de diàmetre 75 nm. a la base i 53 a l'apex.

Al parlar de la cutícula s'han de mencionar les formacions de les cèl·lules de l'epidermis que hi queden íntimament relacionades. Són les microvellositats i els hemidesmosomes.

Les microvellositats, molt esparces, travessen la cutícula i afloren a l'exterior entre les projeccions epicuticulars amb un aspecte semblant al d'aquestes però una mica més curtes i gruixudes (Fig. 4), mesurant aproximadament 840 nm. de llargària total i 99 nm. de llargària fora de la cutícula, 57 nm. d'amplària a l'interior de la cutícula, 95 nm. d'amplària a l'exterior en la base, i 47 nm. d'amplària a l'exterior a l'apex. Les

microvellositats són més electrodenses que la matriu amorfa de la cutícula i lleugerament més electrodenses que el citosol de les cèl·lules epitelials de les que provenen.

La superfície de l'epidermis que està en contacte amb la cutícula forma unes papil·les curtes que penetren en la cutícula i que corresponen a l'estructura d'un hemidesmosoma (Fig. 4). Aquests hemidesmosomes, similars als existents en la part basal de les cèl·lules epitelials, són ovals i el seu diàmetre major té dimensions de l'ordre de 170 nm. Els desmofilaments, molt notables, es continuen cap l'interior de la cèl·lula epitelial, mentre que petites fibril·les d'uns 90 nm. de llargària s'estructuren perpendicularment a la cara externa de la membrana plasmàtica per internar-se en la zona inferior de la cutícula.

DISCUSSIÓ

El revestiment cuticular de la paret del cos de *D. lineata* és continu i d'un gruix força uniforme de ca. 1,15 micròmetres, lleugerament inferior al que presenta l'estomodeu d'aquesta mateixa espècie, que té un gruix de 1,9 micròmetres (Garcia Más, 1979).

Els resultats positius en les proves per proteïnes i fibres connectives permeten corroborar la naturalesa col·làgena de les fibres, que ja ha estat demostrada en oligoquets per Fujimoto i Adams (1964) i en poliquets per Kimura (1971) i Kimura i Tanzer (1977).

Es tracta d'una col·làgena que difereix de la de vertebrats tan per l'absència de periodicitat com per les proporcions relatives dels aminoàcids (Richards, 1984) i per un pes molecular més elevat (Josse i Harrington, 1964; Kimura, 1971).

En *D. lineata* hem pogut constatar que aquestes fibres, de 400 Å de diàmetre, són més gruixudes que les que es troben als teixits connectius d'aquesta espècie i que les fibres col·làgenes dels vertebrats, i que no presenten estriacions visibles al microscopi electrònic.

Una característica diferencial en espècies d'hirudínids i oligoquets és el nombre de capes de fibres així com el diàmetre d'aquestes (Berchtold et al. 1985). Dintre dels oligoquets, per exemple, *Eisenia* té 15 capes (Burke, 1974), *Lumbricus* 24 o més (Coggeshall, 1966) i *Branchiobdella pentodonta*. En els hirudínids, el nombre de capes de fibres sembla ser menor, havent-hi 7 en *Batrachobdella picta* (Desser i Weller, 1977) i de 6 a 8 en *Piscicola geometra* (Rutschke, 1970).

En la cutícula corporal de *D. lineata* hem comptat fins a 12 capes de col·làgena, fet que concorda amb les dades de Garcia Más (1979) per la regió bucofàríngea d'aquesta espècie.

El caràcter fortament PA-S positiu i el fet de que solament la porció apical retengui el blau d'alcià ens fa pensar que la cutícula té un contingut elevat de mucopolisacàrids neutres que, d'acord amb Damas (1969) que també ha detectat mucopolisacàrids neutres associats a proteïnes tipus

col·làgena, podrien constituir la substància amorfa que forma la matriu en la que estan immerses les fibres de col·làgena i la matriu de l'estrat amorf.

El revestiment filamentós de les projeccions epicuticulars també ha sigut mencionat a la cutícula bucofaringea de *Dina* per Garcia Más (1979). La banda exterior que queda tenyida amb el blau d'alcià pH 2,5 podria correspondre a aquesta estructura que tindria caràcter mucopolisacàrid àcid. Segons Desser i Weller (1977) aquest material filamentós sembla ser un mucopolisacàrid similar al glicocàlix. Burke (1974), mitjançant el roig de ruteni, arriba a la conclusió de que aquest material podria tractar-se de complexos proteïna-polisacàrids. D'altre banda Damas (1969, 1972) ha detectat en l'epicutícula una fracció mucopolisacàrida àcida associada a proteïnes.

La superfície avellutada formada per petites protuberàncies que observem en microscòpia electrònica d'escandallatge es corresponen, per les mides i per la distribució, a les projeccions epicuticulars junt amb el recobriment del glicocàlix. Distribuïdes uniformement en hirudínids i oligoquets, en poliquets sovint estan disposats irregularment o poden ser absents (Berchtold et al. 1985). Es desconeix la funció de les projeccions. Segons Richards (1974) el seu paper seria el d'una xarxa que permetés mantenir una capa permanent de mucopolisacàrids.

La presència de microvellositats de les cèl·lules epitelials i les unions per hemidesmosomes han estat citades en tots aquells estudis referents a la cutícula dels anèl·lids.

Les microvellositats s'han descrit amb els noms de canaliculs (Rutschke 1970), «microvillar proceses» (Desser i Weller 1977), prolongacions citoplasmàtiques (Garcia Más, 1979) i microvellositats (Damas 1969). Segons Murray et al. (1981) intervenen en l'organització de les capes de col·làgena; l'abundància de microvellositats en els períodes de generació (Burke 1974) afermen aquesta hipòtesi. Altres autors (Berchtold et al. 1985) sugereixen la possibilitat de que siguin l'origen de les projeccions epicuticulars per degeneració. No es coneix el destí de les microvellositats després de la col·locació de les projeccions epicuticulars, Berchtold et al. (1985) pensen que podrien retraure's. Tampoc està clar si una mateixa categoria de microvellositats és responsable de la formació de les projeccions epicuticulars i de l'organització de les fibres de col·làgena. Rutschke (1970) sembla ser l'únic autor que postula que serveixin de vehicle per la secreció.

La presència d'hemidesmosomes, amb abundància de desmofilaments que els interconnecten en l'interior de les cèl·lules epitelials i amb processos fibrosos que penetren en la cutícula que segons Kelly (1960) corresponen a fibril·les de col·làgena, reforça en gran manera la cohesió entre la cutícula i l'epidermis, la qual cosa és de gran importància en animals tan extremadament contràctils com les sangoneres.

Bibliografia

- BANCROFT, J.D. 1975. *Histochemical techniques*. Ed. Butterworth. London.
- BERCHTOLD, J.P., SAUBER, F., et REULAND, M. 1985. Étude ultrastructurale de l'évolution de tégument de la sanguisue *Hirudo medicinalis* L. (Annélide, Hirudinée) au cours d'un cycle de mue. *Int. J. Inv. Repr. and Develop.* 8: 127-138.
- BONET, S. i HUGUET, G. 1985. Tècniques habituals de coloracions semifines de material inclòs en glicol metacrilat (G.M.A.). *Scientia gerund.* 10 (en premsa).
- BONET, S. i MOLINAS, M. 1983. Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Ann. Sec. Cièn. Col. Univ. Girona (U.A.B.)* 9: 21-29.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BURKE, J.M. 1974. An ultrastructural analysis of the cuticle, epidermis and esophageal epithelium of *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *J. Morphol.* 142: 301-320.
- COGGESHALL, R.E. 1966. A fine structural analysis of the epidermis of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *J. Cell. Biol.* 28: 95-108.
- CORNEC, J.P. 1967. Étude des modifications histologiques observées à la suite d'amputations chez *Hellobdella stagnalis* (Hirudinée Rhynchobdelle). *Bull. Soc. Zool. de France, T 92, n.º 4*: 779.
- CORNEC, J.P. 1984. Modifications ultrastructurels après amputation dans le territoire de régénération postérieure de l'Hirudinée Rhynchobdelle *Hellobdella stagnalis*. *Arch. Anat. Micros. T 73, n.º 4*: 269-289.
- DAMAS, D. 1969. Données histochemiques sur la cuticule de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée Rhynchobdelle). *Arch. Zool. exp. gén.* 110: 417-433.
- DAMAS, D. 1972. Durcissement de la cuticule des machoises chez *Hirudo medicinalis* (Annélide, Hirudinée) aboutissant aux structures dentaires: étude histochemique et ultrastructurale. *Arch. Zool. exp. gén.* 113: 401-421.
- DESSER, S.S., and WELLER, I. 1977. Ultrastructural observations on the body wall of the leech, *Batracobdella picta*. *Tissue and Cell.* 9: 35-42.
- FARNESI, R.M. 1973. Ultrastructural examination of the cuticle in *Branchiobdella pentodonta*. *Whit. Boll. Zool.* 40: 371-373.
- FUJIMOTO, J. and ADAMS, E. 1964. Intraspecies composition differences in collagen from cuticle and body of *Ascaris* and *Lumbricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 437-442.
- GABE, M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson et cie. Paris.
- GARCIA MAS, I. 1979. Ultraestructura de la cutícula bucofaringea de *D. lineata* (O.F. Müller, 1774) (Hirudinea Erpobdellidae). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 77: 361-371.
- HUMASON, G.L. 1967. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and Company USA.
- JOSSE, J. and HARRINGTON, W. 1964. Role of pyrrolidine residues in the structure and stabilization of collagen. *J. molec. Biol.* 9: 269-287.
- KELLY, D.E. 1960. *J. Cell. Biol.* 28:51 En: De Robertis i De Robertis, 1983. Biología celular y molecular. Ed. El Ateneo. Barcelona.
- KIMURA, S. 1971. Studies on masive invertebrate collagens. IV Structural difference in collagens from cuticle and intestinus of *Neanthes diversicolor*. *Bull. Jab. Soc. Sci. Fish.* 37: 432-440.
- KIMURA, S. and TANZER, N.L. 1977. *Nereis* cuticle collagen: Isolation and characterization of two distinct subunits. *Biochemistry* 16: 2554-2560.

- LUNA, L.G. 1968. *Histologic staining methods*. McGraw-Hill Book Company. USA.
- MURRAY, L.W., TANZER, M.L. and COOKE, P. 1981. *Nereis* cuticle collagen: Relationship of fiber ultrastructure. *Ultrastruct. Res.* 76: 27-45.
- RICHARDS, K.S. 1974. The ultrastructure of the cuticle of some British lumbricids (Annelida). *J. Zool.*, London 172: 303-316.
- RICHARDS, K.S. 1984. *Annelida: cuticle*. In Bereiter-Hann, A.G. Matoltsy and K.S. Richards (eds.). *Biology of the integument 1 Invertebrates*, Springer-Verlag 312-322.
- RUTSCHKE, E. 1970. Zur substruktur der cuticula der Egel (Hirudinea). *Z. Morphol. Tiere.* 67: 97-72.