

APORTACIONES AL CONOCIMIENTO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS BRANQUIAS DE *Diopatra neapolitana* (POLYCHAETA: ERRANTIA)

Por
DELIO TOLIVIA FERNANDEZ, ARMANDO MENENDEZ PELAEZ

y
JOSE MANUEL GARCIA FERNANDEZ

Departamento Interfacultativo de Morfología Microscópica.
Universidad de Oviedo

RESUMEN

Se estudia en este trabajo la ultraestructura de las branquias de *Diopatra neapolitana* a nivel de la cutícula, prestando especial atención a la compleja organización del sistema fibrilar localizada en la denominada «capa fibrosa».

SUMMARY

This paper reports results obtained from the study of the ultrastructural organization of the cuticle in the gills of *Diopatra neapolitana*, with special consideration to the complexity of the fibrillar system located in the so-called «fibrous layer».

INTRODUCCION

Iniciamos con este estudio una serie de trabajos encaminados al conocimiento ultraestructural de las branquias de *Diopatra neapolitana*.

La ultraestructura de la cutícula de los anélidos poliquetos ha sido tratada por numerosos autores, tanto en diversas familias como en distintas partes del cuerpo de este grupo de invertebrados. Así, WESTHEIDE y RIEGER (1978) y STORCH y WELSCH (1970) estudian la cutícula en varias especies de la familia Hesionidae. PILATO (1964), BROKELMANN y FISHER (1966), MANAVALARAMANUJAN y RAJULU (1974) dedican su atención a los Neridae. BOILLY (1967) lo hace en Syllidae. BRANDERBURG (1970) y RIEGER y RIEGER (1976) en Archianelidae. MISURACA y NAGY (1970) en Eunicidae y BUBEL (1973) en Serpulidae. Por otro lado, se ha estudiado la morfogénesis de la cutícula larvaria de algunos poliquetos (ECKELBARGER y CHIA, 1978).

Prácticamente no existe bibliografía sobre la ultraestructura de las branquias

de poliquetos; solamente tenemos referencia de un trabajo sobre esta parte del cuerpo (STORCH y ALBERTI, 1978), aunque se refiere al aspecto ultraestructural de las células epidérmicas sin dedicar especial atención a la cutícula.

El propósito de este trabajo es describir la estructura fina de la cutícula de las branquias de *Diopatra neapolitana*, haciendo hincapié en el complejo sistema de ordenación del estrato fibroso cuticular.

MATERIAL Y METODOS

Los ejemplares sobre los que se realizó este estudio fueron recolectados en El Puntal (Villaviciosa). Una vez trasladados al laboratorio se procedió a la amputación de las branquias que se sumergieron inmediatamente en el fijador previamente enfriado.

Tras una serie de ensayos encaminados a lograr una correcta fijación se lograron resultados bastante satisfactorios mediante el tratamiento de las piezas por glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfatos 0,1 M (pH = 7,4) adicionado de un 1,5 % de Cl Na.

Las branquias se mantuvieron en este fijador durante dos horas a 4°C y tras varios lavados en tampón se realizó la postfijación en OsO₄ al 1 % tamponado, a la misma temperatura y durante dos horas.

La deshidratación se realizó mediante acetona de concentración creciente, con un 2 % de Acetato de Uranilo en la acetona de 70 %.

La inclusión de las piezas se llevó a cabo en resinas Epon y Spurr, según el método descrito por KUSHIDA (1967). Tras la obtención de secciones en un ultramicrotomo LKB se procedió al contraste de las mismas mediante el citrato de plomo (REYNOLDS, 1963) y a su observación en un microscopio electrónico Phillips EM-300 y en un Zeiss EM-109.

RESULTADOS

La cutícula de las branquias de *Diopatra neapolitana* parece presentar, tanto en cortes semifinos como en microscopía electrónica, una estructura uniforme y solamente en dos ocasiones hemos podido observar la presencia de algunos cilios (4-5) muy localizados presentándose el resto de la cutícula carente de ciliatura.

La cutícula muestra un grosor uniforme, de aproximadamente 1,6 micras, y se encuentra atravesada por prolongaciones de las células epidérmicas subyacentes. En un corte perpendicular a la superficie se puede reconocer una clara estratificación, observándose con claridad las siguientes capas desde el exterior hacia el interior: (Figs. 1 y 8).

- 1.º Epicutícula (e.p.).
- 2.º Zona cuticular media (c.m.).
- 3.º Zona cuticular fibrosa (c.f.).

A estas capas cuticulares se añade por fuera una cubierta de textura gránulo-filamentosa (c.e.).

Epicutícula

Es la más fina de las tres capas (600-800 Å). Aparece al M.E. como una banda continua bastante uniforme y con un cierto grado de ondulación que es atravesada por prolongaciones digitiformes de las células epidérmicas. En la epicutícula cabe reconocer dos zonas: la más externa, de densidad media y textura granular homogénea y la más interna, de mayor densidad, con un grosor tres o cuatro veces menor y textura también homogénea (Fig. 1).

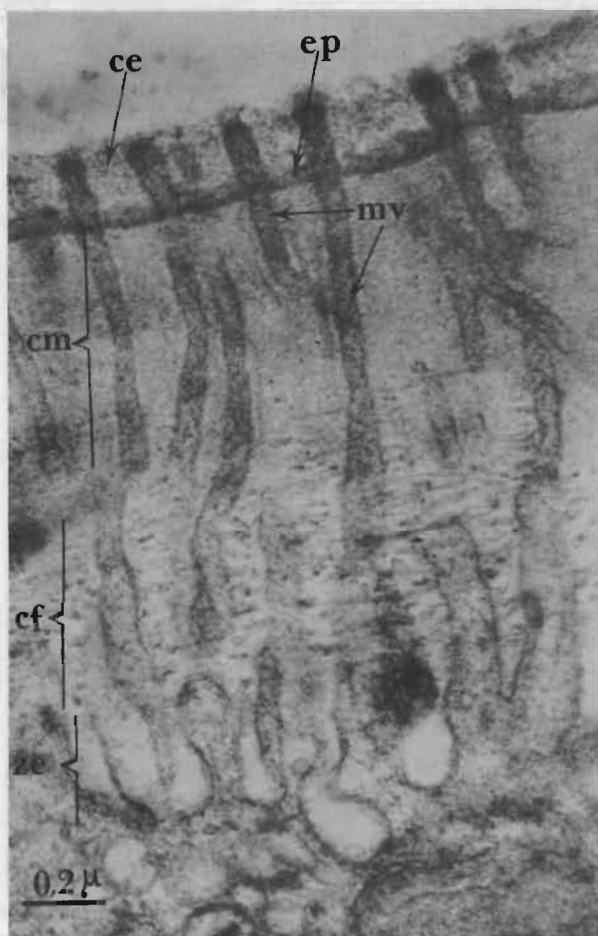


Fig. 1

Sección transversal de la cutícula en la que se observan la cubierta externa (ce), la epicutícula (ep) con sus dos zonas, la capa media (cm), la capa fibrosa (cf) y la zona esponjosa (ze). También se aprecia cómo los microvilli (mv) atraviesan la cutícula hasta el exterior (× 58.500)

Zona cuticular intermedia

Se sitúa inmediatamente por debajo de la anterior; presenta una matriz finamente granulosa en la que se pueden apreciar además fibrillas muy tenues de trayecto aparentemente irregular. El grosor de esta segunda capa es aproximadamente de 0,6 micras y presenta una densidad media a los electrones.

Las prolongaciones celulares al atravesar esta capa se ven rodeadas de un estrecho halo prácticamente transparente a los electrones (Fig. 2). En el límite de este halo con la matriz se observa en muchas ocasiones, tanto en secciones transversales como longitudinales, la presencia de una fina línea electrondensa (Fig. 2).

Zona cuticular fibrosa

La zona más interna de la cutícula presenta un grosor aproximado de 0,75 micras y, tanto en corte transversal como longitudinal de la branquia, puede observarse que posee una densa trama de fibras de grosor y densidad variables cuyo trayecto parece discurrir preferentemente según planos paralelos a la superficie (Fig. 1), pero siguiendo un curso sinuoso entre las digitaciones celulares que atraviesan esta capa.

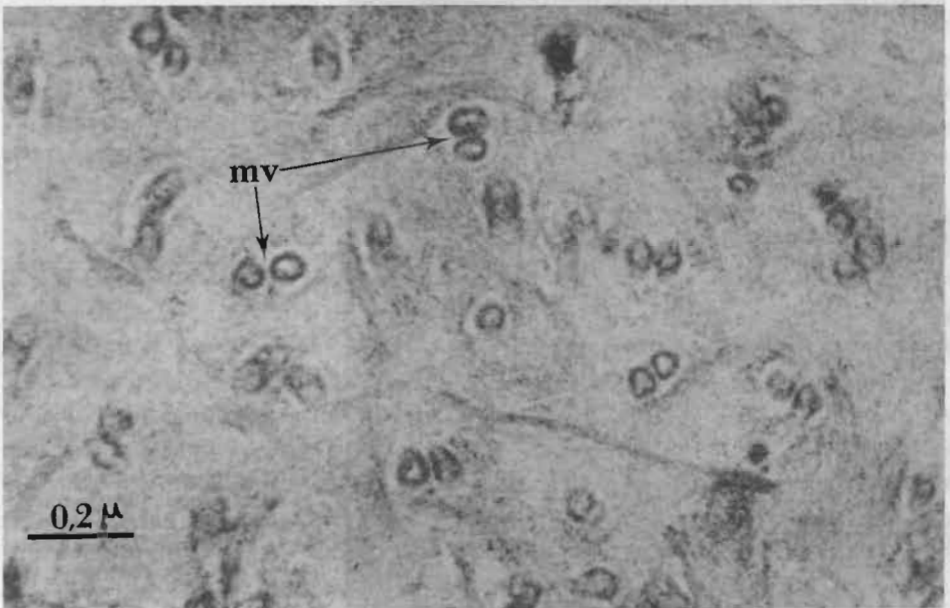


Fig. 2.-Sección tangencial de la capa media cuticular en donde se aprecian varios dobletes de microvilli (mv) rodeados de halo y la línea electrondensa que limita a estos ($\times 74.000$).

En secciones paralelas a la superficie o ligeramente oblicuas se puede apreciar con facilidad que las fibras presentan un alto grado de ordenación, de tal forma que el estrato más profundo de esta zona fibrosa posee un grupo de fibras paralelas entre sí y limitando entre cada dos una fila de digitaciones citoplásmicas. En niveles más superficiales el sistema adquiere mayor complejidad, apareciendo un segundo grupo de fibras, también paralelas entre sí pero en dirección cruzada con el primer grupo, dando origen a la formación de áreas rómbicas interfibrilares en cada una de las cuales se localiza una digitación (Fig. 3).

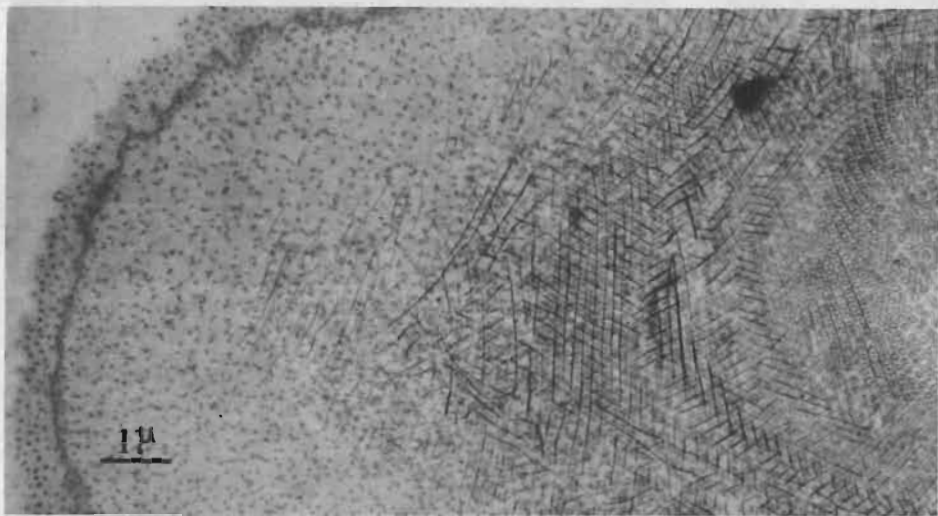


Fig. 3.—Sección oblicua de la cutícula en la que se puede ver la compleja y ordenada disposición de las fibras, así como de los microvilli que discurren entre ellas, observándose en los situados más al interior las formaciones granulares electrondensas ($\times 10.200$).

El grado de complejidad todavía se ve aumentado en zonas más externas al aparecer un tercer grupo de fibras, nuevamente paralelas entre sí y que al cruzarse con los dos grupos anteriores ocasionan la descomposición de los rombos antes citados en un doble conjunto de triángulos y hexágonos, situándose las digitaciones en el interior de estos últimos.

En las zonas más externas de esta capa, limitantes con la capa cuticular media, se aprecia una progresiva pérdida de ordenación en el sistema fibrilar, de tal forma que llega a presentarse como distribuido al azar.

En diversas ocasiones hemos observado que los extremos terminales de las fibras parecen escindirse en dos o más fibrillas más delgadas, las cuales divergen y discurren según trayectorias variadas (Fig. 4), pareciendo relacionarse directamente con la malla fibrilar descrita en la zona cuticular media.

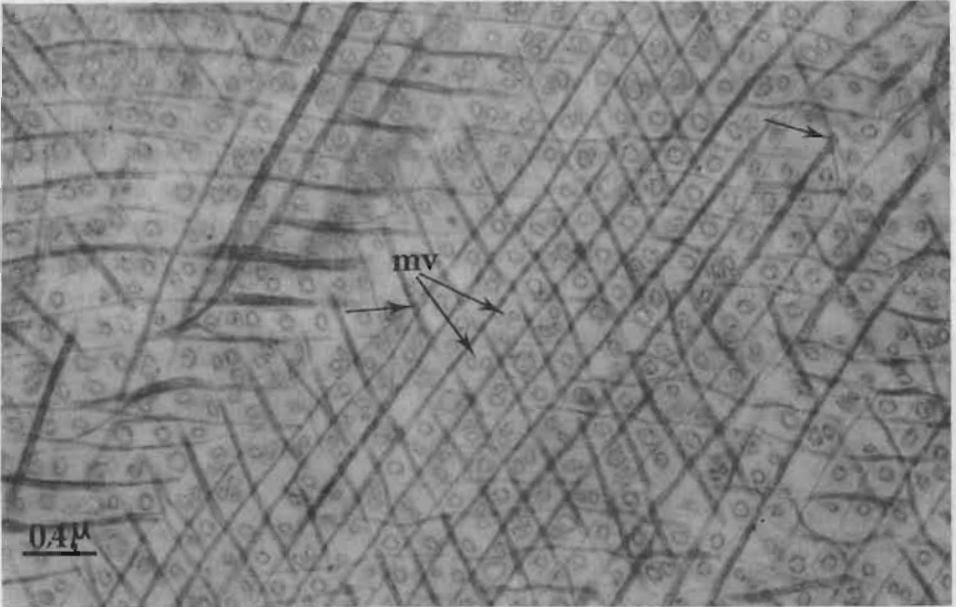


Fig. 4.-Sección oblicua de la capa fibrosa en donde se observa la presencia de dobletes de microvilli (mv) en las áreas rómbicas de la trama fibrilar. También se aprecia en varios puntos la bifurcación de fibras (flechas) ($\times 29.000$).

Prolongaciones digitiformes

Las células epidérmicas de las branquias presentan en su zona apical un complejo sistema de largas microvellosidades que penetran en las capas cuticulares atravesándolas en su totalidad, según trayectorias preferentemente perpendiculares a la superficie (Fig. 1).

En su zona basal presentan un grosor de 0,1 micra y dejan entre sí espacios de contorno irregular aparentemente vacíos, que en unión con las microvellosidades, forman una capa de textura esponjosa de unas 0,18 micras en la que es frecuente observar la presencia de imágenes que sugieren procesos de pinocitosis (Fig. 1).

En muchas ocasiones se aprecia en el interior de las microvellosidades, en su zona basal, la presencia de estructuras densas, a modo de varillas longitudinales, que se continúan un cierto trecho en el citoplasma apical de la célula epidérmica (Fig. 5). También es frecuente ver, en secciones transversales de las prolongaciones digitiformes, formaciones electrondensas a modo de gránulos, situados inmediatamente por debajo de la membrana y en número de uno, dos o tres por cada microvellosidad (Fig. 6) y que presumiblemente se corresponden con las anteriores.

Al penetrar en la capa fibrosa las microvellosidades quedan englobadas en la

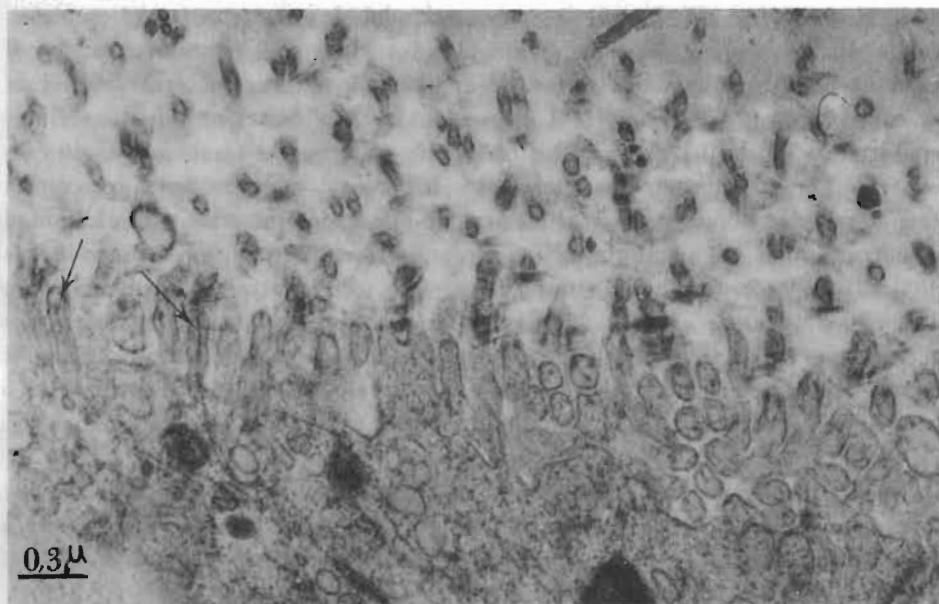


Fig. 5.—Sección transversal de la cutícula en la que se puede apreciar la presencia de formaciones electrondensas longitudinales (flechas), en el interior de los microvilli ($\times 33.750$).

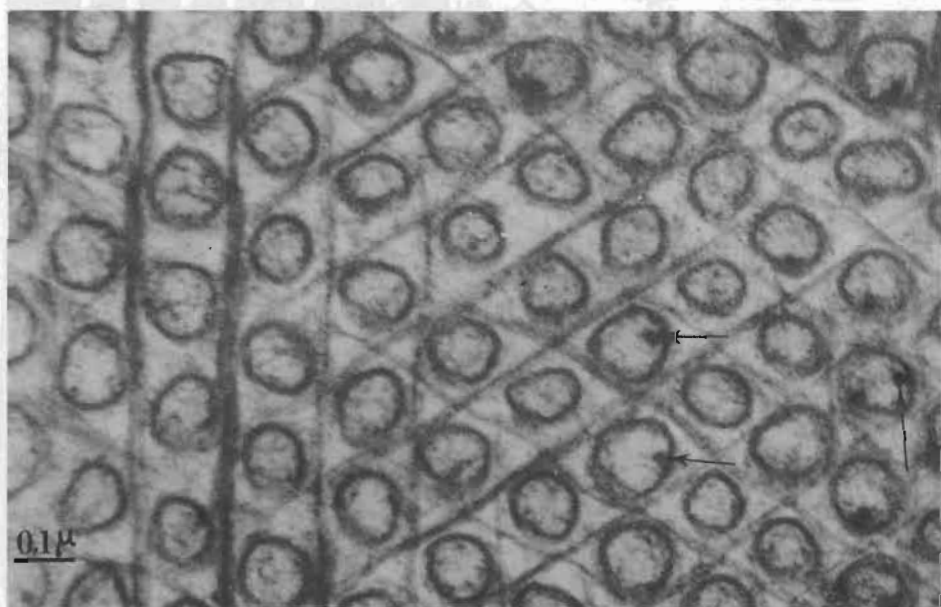


Fig. 6.—Sección tangencial al nivel del tercio interno de la capa fibrosa. Obsérvese la disposición de los microvilli según un patrón hexagonal y las formaciones electrondensas (flechas) ($\times 91.000$).

mallá de la misma. En los niveles más profundos de esta zona se siguen observando en las prolongaciones celulares las formaciones electrondensas con el mismo aspecto y situación descritos, desapareciendo a partir del tercio inferior de la capa fibrosa. A este nivel el grosor de las prolongaciones de las células epidérmicas es de 0,1 micras. Por otro lado, ya desde el tercio medio de esta capa, se aprecia que muchas microvellosidades se dividen en dos o tres ramas secundarias de menor diámetro. Las ramas originadas por una microvellosidad discurren juntas, siguiendo la misma dirección que la principal y ocupando una de las áreas rómbicas de la red fibrilar (Fig. 4) mientras ésta mantiene su ordenación, ya que en la zona más superficial de la capa fibrosa las ramas secundarias de las prolongaciones celulares se distribuyen de modo irregular, si bien en muchos casos se sigue manteniendo la contigüidad entre las parejas o tríos de ramificaciones, situación que permanece en la capa cuticular media (Fig. 2).

Las prolongaciones de las células, al atravesar la cutícula, se localizan de una forma ordenada, que es particularmente aparente en el tercio inferior de esta cubierta, en donde se observa con claridad su disposición según un patrón hexagonal de 0,18 micras de lado (Fig. 6).

Tras atravesar la capa media las microvellosidades llegan hasta la epicutícula, que también perforan, formando unas proyecciones citoplásmicas extracuticulares de una longitud de 0,13 micras, las cuales presentan en su ápice un



Fig. 7.—Sección transversal de la cutícula en la que se ve cómo algunos microvilli presentan proyecciones dilatadas ($\times 20.000$).

refuerzo de material electrondenso situado bajo la membrana celular (Fig. 1). Tales proyecciones aparecen en ocasiones prolongadas en una expansión globosa de forma y tamaño variables (Fig. 7).

Revestiendo la epicutícula y rellenando los espacios situados entre las proyecciones citoplásmicas extracuticulares se dispone un material de aspecto laxo y textura gránulo-filamentosa que recuerda a un glicocáliz (Fig. 1).

De lo anteriormente expuesto puede concluirse que las células epidérmicas de las branquias de *Diopatra neapolitana* aparecen revestidas, excepto a nivel de sus microvellosidades, por las siguientes capas (Fig. 8): 1.º cubierta externa (c.e.); 2.º epicutícula (e.p.); 3.º capa cuticular media (c.m.); 4.º capa cuticular fibrosa (c.f.); 5.º capa esponjosa basal (z.e.).

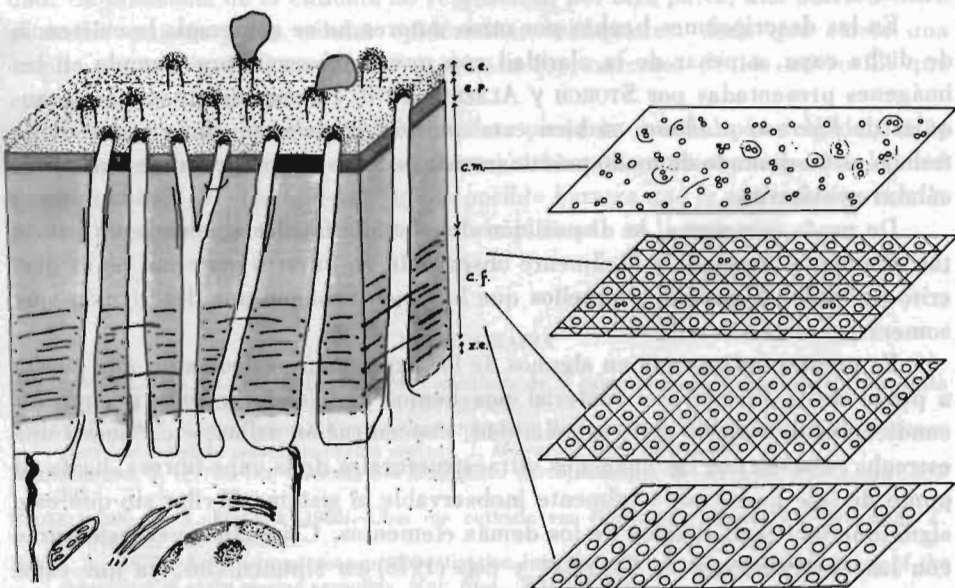


Fig. 8.—Esquema de la organización de la cutícula branquial de *Diopatra neapolitana* y de la disposición del sistema fibrillar en varios niveles.

DISCUSION

La organización de la cutícula según el modelo de capas superpuestas de fibras paralelas entre sí en cada capa y de dirección cruzada con la de las fibras de capas inmediatas, embebidas en una matriz gránulo-filamentosa es muy común en anélidos.

Primeramente fue citada en oligoquetos por REED y RUDALL (1948) y confirmada posteriormente por diversos autores, como RICHARDS (1974).

Una estructura semejante del tegumento se da en los poliquetos (PILATO,

1964; BOILLY, 1967; BROKELMANN y FISHER, 1966; MICHEL, 1969; MISURACA y NAGY, 1970; STORCH y WELSCH, 1970; BANTZ y MICHEL, 1971; CHIEN y col., 1972; WELSCH y STORCH, 1973).

Sin embargo el único trabajo de que tenemos referencia sobre branquias de poliquetos (STORCH y ALBERTI, 1978) no aporta ningún dato sobre la organización ultraestructural de la cutícula. Por otra parte, los estudios llevados a cabo sobre esta cubierta no se refieren a las branquias, por lo que las particularidades observadas por nosotros podrían deberse a diferencias regionales de la organización cuticular. La existencia de una capa subepicuticular equivalente a la que nosotros designamos como «zona media» (c. m.) ha sido indicada solamente por MISURACA y NAGY (1970) en la cutícula corporal de *Diopatra neapolitana* y *Eunice mediterranea*.

En las descripciones hechas por otros autores no se contempla la existencia de dicha capa, a pesar de la claridad con que se observa, por ejemplo en las imágenes presentadas por STORCH y ALBERTI (1978) correspondientes a las branquias de *Pherusa plumosa*, si bien esta omisión se debe sin duda a que dicho trabajo está orientado de modo prácticamente exclusivo a la ultraestructura de las células epidérmicas.

De modo semejante, la disposición del sistema fibrilar siguiendo un patrón tan altamente ordenado y fácilmente observable en nuestro material, no es descrito por muchos autores y aquellos que lo hacen exponen una descripción muy somera.

Es preciso indicar que en algunos de los experimentos dedicados a la puesta a punto de la fijación del material nos hemos podido dar cuenta de que las condiciones de fijación (pH, osmolaridad, concentración salina, etc.) tienen una estrecha relación con las imágenes ultraestructurales de la capa fibrosa, hasta tal punto de que puede ser totalmente inobservable el sistema fibrilar sin que esto signifique una mala fijación de los demás elementos. Coincidimos en este punto con las observaciones de GOFFINET y col. (1978) en sipuncúlidos, ya que estos autores indican que con los métodos habituales de fijación y contraste seguidos por ellos y otros investigadores las fibras no son evidentes.

La inexistencia de estriación transversal en las fibras cuticulares de nuestro material coincide con los datos obtenidos por otros autores como BANTZ y MICHEL (1971) y STORCH y WELSCH (1970).

Por otro lado, la presencia de subfibrillas muy tenues es también citada por WESTHEIDE y RIEGER (1978), si bien este autor observa que tales subfibrillas aparecen entrelazadas entre sí formando fascículos relativamente laxos, mientras que en nuestro caso la agregación es más intensa y solamente se aprecia la descomposición en fibrillas en las zonas terminales.

El contacto directo de las prolongaciones celulares con el medio externo parece ser una disposición común en la cutícula de los oligoquetos (KRALL, 1968;

POSTWALD, 1971; GOODMAN y PARRISH, 1971; BURKE, 1974) y en la mayoría de los poliquetos (WESTHEIDE y RIEGER, 1978; STORCH y ALBERTI, 1978; ECKELBARGER y CHIA, 1978), salvo casos muy particulares en los que los microvilli aparecen aislados del medio externo, situación que, por otra parte, es la que se encuentra en sipuncúlidos (GOFFINET y col., 1978).

La presencia en oligoquetos de corpúsculos superficiales ha sido citada por REED y RUDALL (1948) y RUSKA y RUSKA (1961) y su naturaleza, consistente en hinchamientos distales de los microvilli epidérmicos fue demostrada por HESS y HENZEL (1967), lo cual coincide con nuestras observaciones.

Los datos morfológicos ultraestructurales obtenidos nos indican que la cutícula es una formación que reúne en sí una rigidez mecánica y una cierta plasticidad. La presencia de la cutícula no representa, por otra parte, una barrera entre el medio externo y las células epidérmicas branquiales, dado que existe una amplia superficie de intercambio gracias a los extremos de los microvilli que contactan con el exterior.

Por otra parte, la cutícula branquial se presenta mucho más delgada que la del resto del cuerpo y con una organización bastante menos compacta, lo cual apunta también en el sentido de que la posible barrera que la cutícula representa para el intercambio de sustancias está simplificada en la branquia.

BIBLIOGRAFIA

- BANTZ, M. y C. MICHEL (1971).—Revêtement cuticulaire de la gaine de trompe chez *Glycera convoluta* (annelide polychète). *Z. Zellforsch.*, **118**: 221-242.
- BOILLY, B. (1967).—Contribution à l'étude ultrastructurale de la cuticule épidermique et pharyngienne chez une annélide polychète (*Syllis amica*). *J. Micros.* (Paris), **6**: 469-484.
- BRANDERBURG, J. (1970).—Die Cuticula des *Dinophilus* (Archannelida). *Z. Morphol. Tierre*, **68**: 300-307.
- BROKELMANN, J., A. FISCHER (1966).—Über die cuticula von *Platynereis dumerilii* (Polichaeta). *Z. Zellforsch.*, **70**: 131-135.
- BUBEL, A. (1973).—An electromicroscope investigation into the cuticle and associated tissues of the operculum of some marine serpulids. *Mar. Biol.*, **23**: 147-164.
- BURKE, J. M. (1974).—An ultrastructural analysis of the cuticle, epidermis and esophageal epithelium of *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *J. Morphol.*, **142**: 301-320.
- CHIEN, P. K., G. C. STEPHENS y P. L. HEALEY (1972).—The role of ultrastructure and physiological differentiation of epithelia in amino acid uptake by the bloodworm, *Glycera*. *Biol. Bull.*, **142**: 219-235.
- ECKELBARGER, K. J. y FU-SHIANG CHIA (1978).—A Correlated Scanning and Transmission Electron Microscopic Study from Egg Envelope Formation to Larval Metamorphosis. *Cell. Tiss. Res.*, **186**: 187-201.
- GOFFINET, G., M. F. VOSS-FOUCART y S. BARZIN (1978).—Ultrastructure of the cuticle of the sipunculans *Golfingia vulgaris* and *Sipunculus nudus*. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **97**, **4**: 511-523.
- GOODMAN, D. y W. B. PARRISH (1971).—Ultrastructure of the epidermis of the ice-worm, *Mesenchytraeus solifugus*. *J. Morph.*, **135**: 71-86.
- HESS, R. T. y D. B. HENZEL (1967).—The fine structure of the epicuticular particles of *Enchytraeus fragmentosus*. *J. Ultrastructur. Res.*, **19**: 487-498.
- KRALL, J. F. (1968).—The cuticle and epidermal cells of *Dero obtusa* (family Naididae). *J. Ultrastructur. Res.*, **25**: 84-93.
- KUSHIDA, H. (1967).—A new polyester embedding method for ultrathin sectioning. *J. Electron Microscopy*, **9**: 113.

- MANAVALARAMANUJAN, R. y J. S. RAJULU (1974).—An investigation on the chemical nature of the cuticle of a polychaete *Nereis diversicolor* (Annelida). *Acta Histochem.*, **48**: 69-81.
- MICHEL, C. (1969).—Ultrastructure et histochimie de la cuticule pharyngienne chez *Eulalia viridis* (annélidé polychète errante Phyllodocidae). *Z. Zellforsch.*, **98**: 54-73.
- MISURACA, G. y J. Zs.-NAGY (1970).—Some new structural data concerning the cuticle of Eunicidae (Polychaeta, Annelida). *Pubb. Staz. Zool. Napoli*, **38**: 249-261.
- PILATO, G. (1964).—Osservazioni sulla ultrastruttura della cuticola dei polycheti Nereidi. *Boll. Acad. Gioc. Sci. Nat. Catania, Ser. IV*, **8**: 210-220.
- POTSWALD, H. E. (1971).—The structural analysis of the epidermis and cuticle of the oligochaete *Aelosoma bengalense*. *J. Morphol.*, **135**: 185-212.
- REED, R. y K. M. RUDALL (1948).—Electron microscope studies on the structure of earthworm cuticles. *Biochim. Biophys. Acta*, **2**: 7-18.
- REYNOLDS, E. S. (1963).—The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**: 208-212.
- RICHARDS, K. S. (1974).—The ultrastructure of the cuticle of some British lumbricids (Annelida). *J. Zool. London.*, **172**: 303-316.
- RIEGER, R. M. y G. E. RIEGER (1976).—Fine structure of the archiannelid cuticle and remarks on the evolution of the cuticle within the spiralia. *Acta. Zool.*, **57**: 53-68.
- RUSKA, C. y H. RUSKA (1961).—Die Cuticule der Epidermis des Regenwurmes (*Lumbricus terrestris*). *Z. Zellforsch.*, **53**: 759-764.
- SPURR, A. R. (1969).—A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 31.
- STORCH, V. y U. WELSCH (1970).—Über die Feinstruktur des Polychaeten Epidermis. *Z. Morph. Tiere*, **66**: 310-322.
- STORCH, V. y G. ALBERTI (1978).—Ultrastructural observations on the gills of polychaetes. *Helv. Wis. Meeresunters.*, **31**: 169-179.
- WELSCH, U. y V. STORCH (1973).—*Einführung in die Cytologie und Histologie der Tiere*. Fischer Verlag, Stuttgart, 244 pp.
- WESTHEIDE, W. y R. M. RIEGER (1978).—Cuticle ultrastructure of Hesionid Polychaetes (Annelida). *Zoomorphologie*, **91**: 1-18.