

ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO Y ULTRAESTRUCTURAL DEL EPITELIO DE REVESTIMIENTO DEL OSFRADIO DE POMACEA (*Pomacea sp.*) MEDIANTE MOAR, MET Y MEB.

Nilza Velasco P.^{a*}, Jairo Vásquez L.^b, Patricia Mosquera S.^a, Andrés Torres R.^a, Fernando Ferreira B.^a

^a Universidad del Cauca. Facultad de Educación. Unidad de Microscopia Electrónica

^b Universidad del Cauca. Facultad de Medicina. Departamento de Morfología

*Autor de correspondencia :E-mail: nilvela@unicauca.edu.co Tel: 57-3203475594 Fax: 57-28209860

Recibido: Octubre 2009. Aprobado: Enero 2010.

Publicado: Enero 2010.

RESUMEN

Este grupo de moluscos del género *Pomacea* (Gastropoda), de hábitat dulceacuícola con amplia distribución en el continente americano; necesita para su ciclo vital un pH neutro o alcalino (≥ 7) y una temperatura óptima de 24°C. Esta especie presenta un órgano olfatorio denominado osfradio; protuberancia de color amarillenta ubicada debajo del manto; este órgano sensorial es el sentido del olfato en los moluscos. Constituye el medio preciso para la obtención de información química a distancia en su ambiente; permitiéndoles discriminar entre diferentes sustancias, lo cual les facilita conductas adecuadas ante diversas situaciones que se les presentan durante su ciclo vital. Para esta investigación se utilizaron caracoles criados en cautiverio en condiciones de laboratorio. Se realizó un análisis histológico, ultraestructural y morfométrico del epitelio de revestimiento del osfradio. Se encontraron hallazgos similares con otras especies de *Pomacea*.

Palabras Claves: *Pomacea sp.*, Osfradio, Epitelio de revestimiento, Penachos ciliares, Morfometría.

HISTOMORFOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF EPITHELIA OF THE COVERING OF THE POMACEA (*Pomacea sp.*) OSEPHRADIUM USING MOAR, MET Y MEB.

ABSTRACT

The group of *Pomacea* (Gastropod) mollusks, of sweetwater habitat are widely distributed throughout the American continent; for their life cycle they need a neutral or alkaline pH (≥ 7) and an optimum temperature of 24°C. This species presents an olfactory organ denominated osphradium, a yellowish protuberance located below the mantle; this sensory organ is the mollusks' sense of smell. It constitutes the precise means of obtaining chemical information at a distance in their environment, permitting them to discriminate between different substances, which facilitate proper behavior in diverse situations presented during their life cycle. In this research project snails cultivated in captivity in laboratory conditions were used. A histological, ultra-structural and morphometric analysis of the epithelia was made of the osphradium covering. Findings were similar to those of other species of *Pomacea*.

Key Words: *Pomacea*, osephradium, Covering epithelia, Cilia panache or crest, Morphometrics

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Pomacea*, Perry, 1810 son gastrópodos dulceacuícola de amplia distribución en el continente americano conocidos más comúnmente como caracoles manzana, aunque dependiendo de la región pueden ser llamados de diferentes maneras; son habitantes de un amplio rango de ecosistemas desde charcas, canales de riego y estanques hasta lagos y ríos. La mayoría de las

especies prefieren aguas lentas con suaves corrientes y tan solo unas pocas se han adaptado a condiciones diferentes. En su ciclo vital es necesario el sostenimiento de un hábitat ecológico, con un pH neutro o alcalino (≥ 7) y una temperatura óptima de 24°C. [1]

Taxonómicamente la *Pomacea sp.* se clasifica como : [2]

Phylum: Mollusca (Cuvier, 1797)

Clase: Gastropoda (Cuvier, 1797)

Subclase: Prosobranchia (Edwards)

Orden: Mesogastropoda (Thiele, 1925)

Superfamilia: Ampullarioidea

Familia: Pilidae (Bequaert y Clench, 1937)

ó Ampullaridae (Guilding, 1828)

Género: *Pomacea* (Perry, 1810)

Especie: *Pomacea sp.*

Se han realizado muchos estudios científicos sobre la historia de vida, estructura y el comportamiento del caracol manzana [2-5] que permiten deducir la relación existente entre el habitat y la estructura de sus poblaciones, dado que determinadas perturbaciones afectan la dinámica relativa de la especie. Por consiguiente, se convierte en un bioindicador de calidad de aguas, debido a su capacidad de presentar cambios estructurales ante la exposición a ciertos tensores. [6]

Dentro de los componentes anatómicos que presenta la *Pomacea* encontramos un órgano denominado osfradio, el cual se aprecia como una protuberancia de color amarillenta ubicada debajo del manto (figura 1).

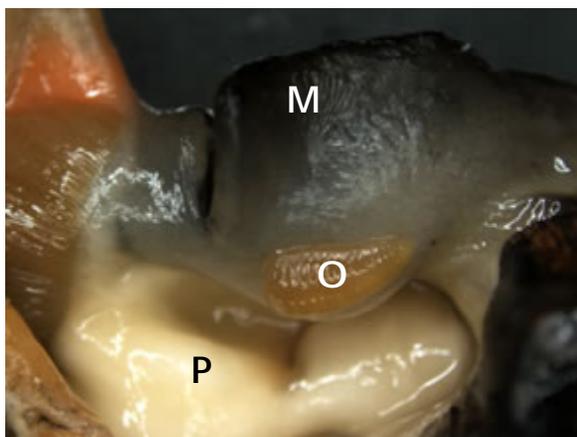


Fig.1. Se observa la ubicación del osfradio (O), inmediatamente por debajo del manto (M) y por encima del pulmón (P).

Este órgano sensorial es considerado como el responsable del sentido del olfato en los moluscos. De acuerdo a investigaciones, el osfradio se ha definido como una estructura que permite la obtención de información

química presente en su medio ambiente; permitiéndole discriminar entre diferentes sustancias, aún a larga distancia. Al mismo tiempo, facilita las conductas adecuadas ante diversos estímulos presentes en su hábitat. [7]

La *Pomacea* es residente habitual de los humedales, los cuales son considerados ecosistemas estratégicos por jugar un papel importante en el mantenimiento y regulación hídrica y además son refugios de diversidad de flora y fauna. Estas características de los humedales proporcionan una importancia significativa para la sociedad y por lo tanto requieren de un manejo especial debido al deterioro de sus procesos naturales; como la contaminación por vertimientos, mala disposición de residuos sólidos [8].

Dentro de estos humedales, los gasterópodos son una parte importante de las cadenas tróficas, ya sea como herbívoros, carnívoros u omnívoros. Algunos son parásitos, y muchos se especializan en el consumo de materiales difíciles de comer o poco digeribles. Además se convierten en una fuente importante de alimentos para otros animales. Cuando sobreviene una perturbación en el medio acuático, conlleva a un profundo impacto en la estructura de las poblaciones, que se manifiesta por un cambio en la dominancia relativa de las especies, así como también sustituciones tanto en la fauna como en la flora, que en casos extremos puede provocar la desaparición completa de la biocenosis [9].

En este trabajo se estudian las características histológicas y ultraestructurales del epitelio de revestimiento del osfradio de la *Pomacea sp.*, clase de caracol más abundante en el suroccidente colombiano, propiamente en la laguna de Sonso o Chircal, localizada en el Departamento del Valle del Cauca sobre la margen del río Cauca, entre los municipios de Yotoco, Buga y Guacarí. Con una extensión de 2045 hectáreas de las cuales 745

corresponden a zona lagunar y 1300 a zona amortiguadora [8] (Figura 2)

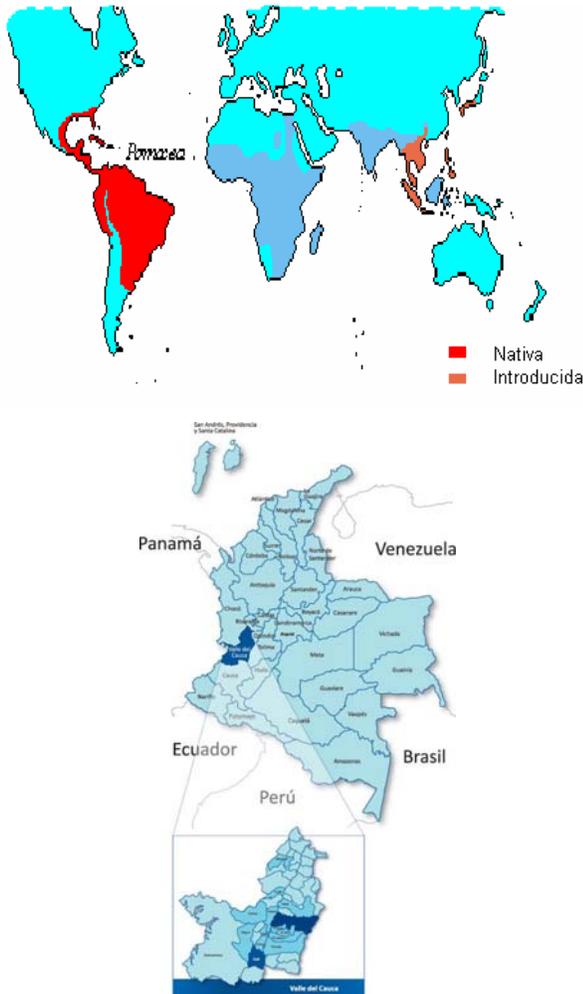


Fig. 2. Ubicación de la laguna de Sonso

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada por los autores, a la fecha no se encuentran estudios específicos sobre la histología y la ultraestructura del epitelio de revestimiento del osfradio de la especie *Pomacea sp*

Por consiguiente, es muy importante aportar información básica sobre la histología y la ultraestructura de estas especies, con el fin de facilitar su preservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo describe y analiza la microarquitectura del epitelio de revestimiento del osfradio, utilizando las técnicas de Microscopía Óptica de Alta Resolución

(MOAR), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopía Electrónica de Barrido MEB.

Para este estudio se utilizaron caracoles criados en acuarios de vidrio (50x 30 x40 cm de largo, ancho y alto respectivamente) bajo condiciones controladas de laboratorio, a una temperatura media de 30°C y 75% de humedad relativa. La iluminación artificial se mantuvo durante 12 horas diarias, su alimentación fue a base de zanahoria (*Daucus carota*), lechuga (*Lactuca sativa*) y buchón de agua(*Eichhornia crassipes*) (figura 3).



Fig.3. Acuario donde se observan las condiciones de crianza

Se seleccionaron de manera aleatoria especímenes de seis semanas de edad, los cuales fueron anestesiados con solución isotónica de $MgCl_2$ durante 20 minutos y posteriormente se procedió al retiro de la concha y disección del osfradio [10]

Las muestras utilizadas para el análisis histológico mediante microscopía óptica se fijaron en formaldehído al 10% durante 12 horas, a una temperatura de 35°C, con posterior inclusión en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes seriados de 5µm de espesor con los límites de error de un micrótopo convencional. (micrótopo rotatorio LKB®). Las secciones histológicas obtenidas se tiñeron con la técnica de rutina de Hematoxilina-Eosina.

Las muestras utilizadas para el análisis ultraestructural mediante Microscopía Electrónica de Transmisión se fijaron en glutaraldehído al 2% durante 6 horas, se postfijaron en Tetróxido de Osmio (OsO_4) al 2%, incluyéndose en Polybed 812.

Posteriormente, se realizaron cortes en ultramicrotomo (Leica UCT®) de 1 μm para MOAR teñidos con azul de toluidina y de 90 nm para MET, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Tanto en el análisis histológico convencional como en el análisis histológico con MOAR se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 80i, adquiriéndose imágenes de estas preparaciones mediante una cámara digital Nikon DS-MV2. Las observaciones ultraestructurales fueron realizadas con un Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 1200EX®).

Para MEB las muestras de osfradio se deshidrataron con mezclas de alcohol-acetona y el secado se realizó mediante la técnica de punto crítico con el equipo SANDRI-795®, para llegar al punto crítico del CO_2 se elevó la temperatura a 31°C y la presión a 1150 psi, posteriormente se cubrió con oro y se observó en el microscopio JEOL JSM 5310 LV®. Como paso siguiente, se hizo el análisis de las muestras, con el fin de identificar las características del epitelio de revestimiento del osfradio. Se realizó un estudio morfométrico con las muestras teñidas con Hematoxilina- Eosina (HE) utilizando el software de libre distribución Image J (National Institute of Health, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El osfradio en las diferentes especies de caracoles, presenta una morfología adaptada a su dieta alimenticia, es así como, las especies herbívoras presentan un osfradio estructuralmente simple, mientras que en las especies carnívoras es más complejo [7, 11-14]. La pomácea presenta un hábito alimenticio herbívoro, por lo cual su osfradio es estructuralmente simple.

La morfología general del osfradio de la *Pomacea* sp, presenta forma similar a una almendra (Figuras 4,5), con una región basal que está relacionada con el sistema pulmonar y otra región dorsal, recubierta en su mayor parte por epitelio de revestimiento cilíndrico ciliado (Figuras 6, 7), que emiten invaginaciones a su interior, de forma tubular denominadas lamelas (Figura 6). Dicho epitelio está fuertemente adherido a la lámina basal, la cual se observa bien delimitada [10].

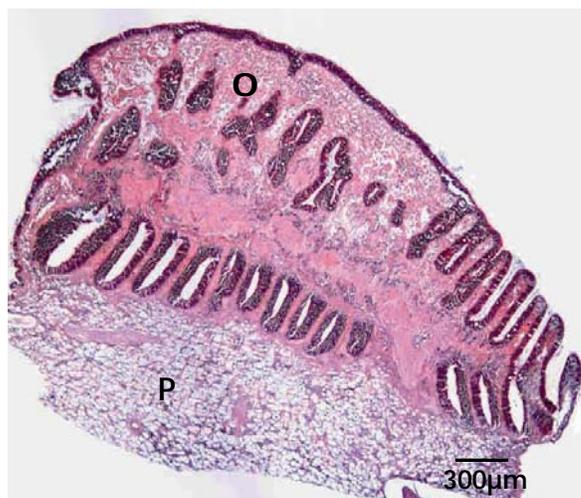


Fig. 4. Corte histológico teñido con HE. Osfradio(O) pomácea, Pulmón (P). Microscopía Óptica de Alta Resolución 4x

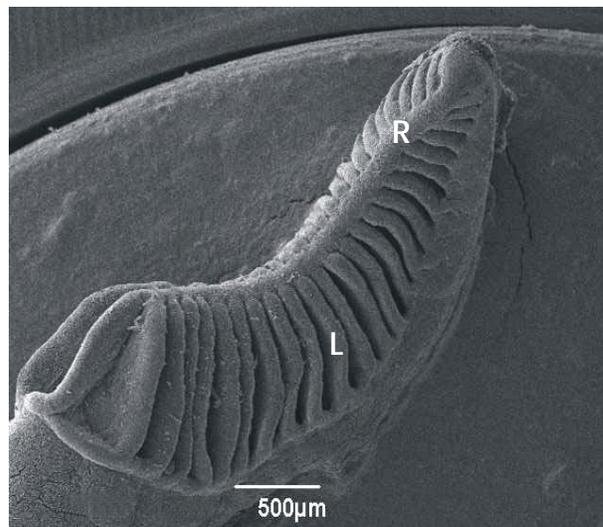


Fig. 5. Micrografía de Osfradio (Os) de *Pomacea* sp. Mostrando Lamelas (L), Rafe (R). Microscopía Electrónica de Barrido

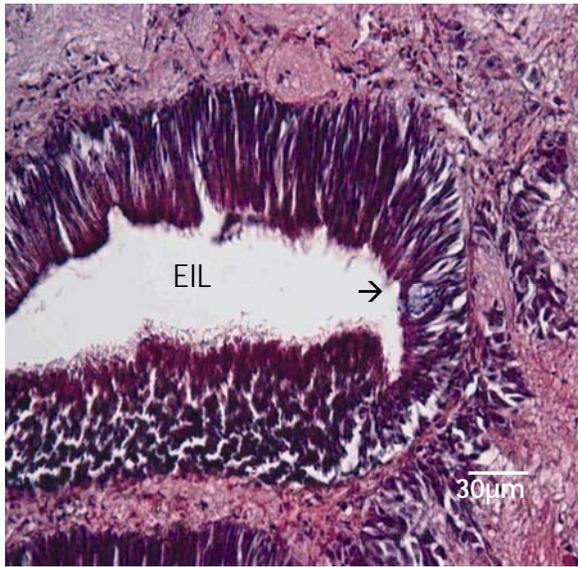


Fig. 6. Corte histológico teñido con HE. Espacio interlamelar de osfradio de pomácea. EIL: Espacio Interlamelar, Flecha: Célula secretora. Microscopía Óptica

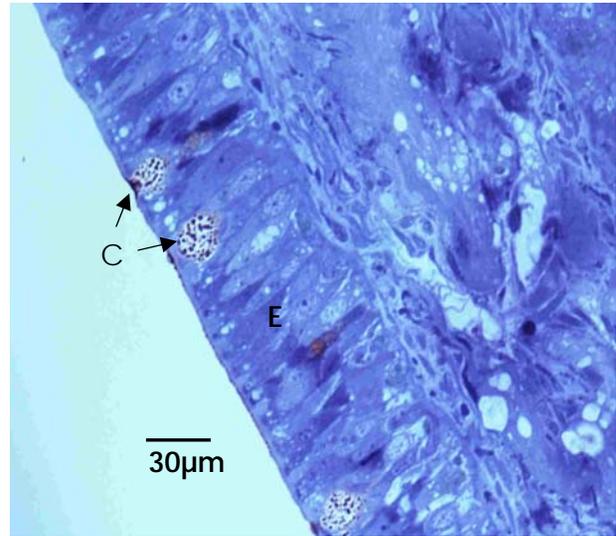


Fig. 8. Corte histológico epitelio de revestimiento del osfradio de *Pomacea sp.*, teñido con Azul de Toluidina. Células Secretoras (CS) presentes en el epitelio (E). 40X.

A lo largo de todo el epitelio que recubre el osfradio encontramos prolongaciones ciliares a manera de penachos, siendo más denso en los espacios interlamelares.

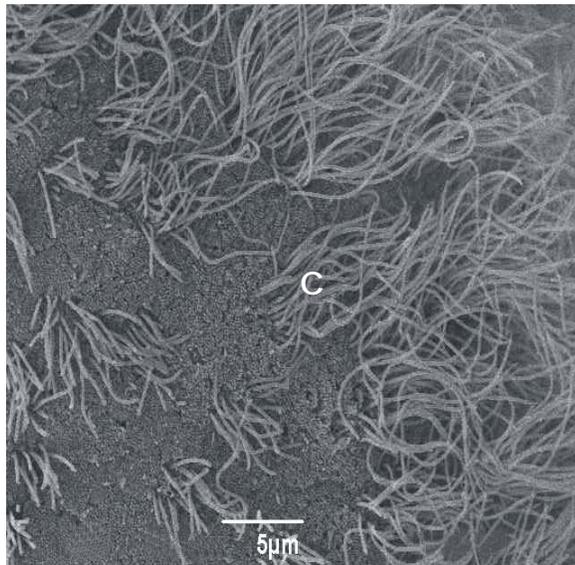


Fig.7. Micrografía Electrónica de Barrido de los Penachos Ciliares en la superficie epitelial. 13 Kv

Inmerso en el epitelio cilíndrico lamelar, se observó una población de células secretantes de moco (Figuras 6, 8,9), observándose a distintos niveles del espesor del epitelio, lo cual está relacionado con su actividad funcional (Figura 8).

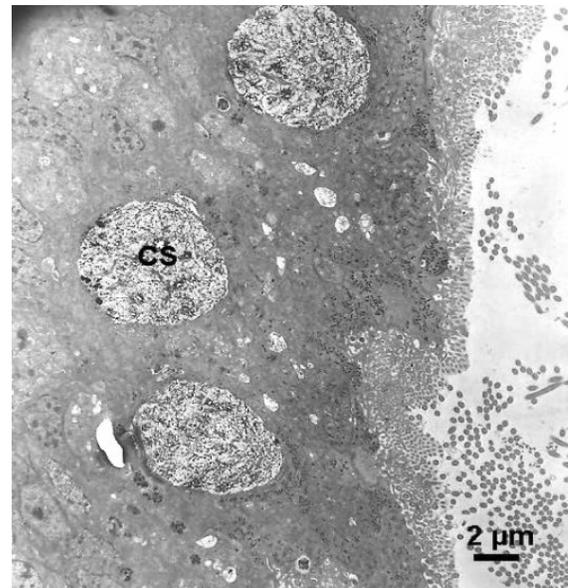


Fig. 9. Ultraestructura del epitelio del osfradio. Células secretantes. (CS). Visto en Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión, revela que los cilios poseen una estructura interna específica con una membrana plasmática que rodea el axonema ciliar el cual está constituido por nueve dupletes de microtubulos periféricos alrededor de un par central, organización 9x2 +2. Hallazgo similar al descrito por Haszprunar (1992) que describe la ultraestructura ciliar del epitelio de revestimiento del osfradio en la especie *Campanile symbolicum*, Cada duplete está constituido por un microtúbulo completo que tiene un diámetro aproximado de 20 nm, (túbulo A) el cual comparte la pared con un segundo microtúbulo (túbulo B), desde el túbulo A se proyectan los brazos de dineina y se extienden los espolones radiales hacia la vaina interna que rodea el par central de microtubulos. El diámetro de los cilios fluctúa en entre 250 y 270 nm (Figura 10).

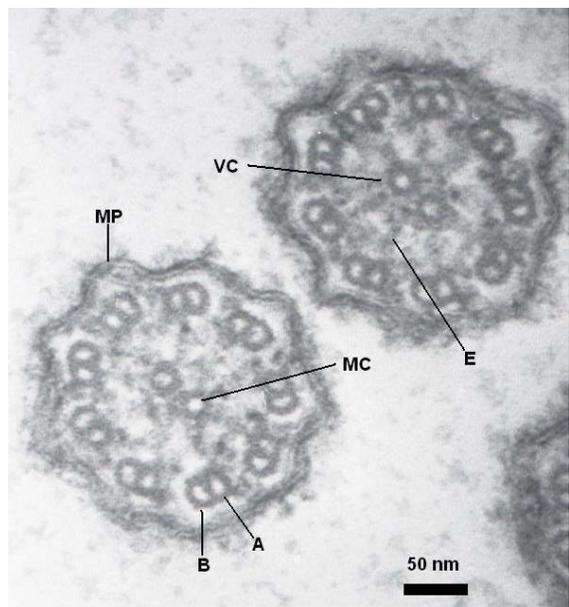


Fig. 10. Corte transversal que pone de manifiesto la distribución microtubular de los cilios (axonema) en el cual se observa arreglo 9x2+2. Membrana Plasmática (MP), Microtubulo Central (MC), Túbulo A (A), Túbulo B (B), Vaina Ventral (VC), Espolón radial (E). Visto en Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al realizar el análisis morfométrico (Tabla 1) se encontró una diferencia notoria entre el epitelio de revestimiento del osfradio y el epitelio lamelar. El epitelio lamelar

presenta un mayor espesor a expensas de las prolongaciones apicales, lo que podría explicar la necesidad de aumentar el área de contacto al comportarse éste como una estructura quimiosensora [7, 15- 17] De acuerdo a la revisión bibliográfica no se reporta diferencia entre estos dos tipos de epitelio, razón por la cual se hace necesario plantear un patrón morfométrico que permita evidenciarlo como el índice epitelial, que probablemente variaría ante la presencia de eventos patológicos que afecten la pomácea (como la presencia de algunos contaminantes).

Se encontró un número promedio de 48 lamelas (Figura 5), con un espesor promedio de 120.3 µm. Al establecerse las mediciones de los espacios interlamelares y del espesor del epitelio lamelar, se determina un índice entre estos dos, que para el presente trabajo fue de 0.607 interpretándose que en este sitio se presenta una alta tasa de intercambio y de flujo acuoso (Figura 6).

Tabla 1. Parámetros morfométricos del osfradio de *Pomacea sp*

Parámetros morfométricos	Unidades (µm)
Área	3438807 µm ²
Perímetro	12387,99
Eje transversal	1429,16
Eje longitudinal	3003,47
Espesor promedio del epitelio de revestimiento	42,11
Espesor promedio de las lamelas	120,3
Espesor del epitelio del sistema lamelar	49,15
Espesor promedio de los espacios interlamelares	29,86
Profundidad promedio de los espacios interlamelares	331,49
Índice de ejes trasversal/longitudinal	0,476
Índice epitelial	0,856

CONCLUSIONES

En la actualidad los temas ecológicos son de importancia significativa para la sociedad, lo que motiva a estudios de la flora y fauna presentes en los diversos hábitat.

Hoy día, la tecnología de punta como la microscopia óptica y electrónica, permite realizar variados estudios biológicos, tanto descriptivos como comparativos de diversas especies.

La *Pomácea sp.*, es sensible a contaminantes ambientales, y ha sido postulada como un indicador biológico, por consiguiente, es de gran importancia aportar información básica sobre estas especies.

Se encontró similitud morfológica del epitelio de revestimiento de la *Pomácea sp.*, con el presente en otras especies.

La ultraestructura de los cilios presentes en el epitelio de revestimiento del osfradio de la *pomácea sp.*, es similar al encontrado en la especie *Campanile symbolicum*.

Es posible determinar patrones morfométricos, que ayudan en un futuro a la descripción y al análisis morfológico del osfradio de la *Pomácea sp.*, los cuales pueden realizarse utilizando software de distribución libre o licenciado.

Se sugiere la realización de futuros estudios donde se utilicen poblaciones de caracoles procedentes de áreas y condiciones ambientales distintas, con el fin de comparar y establecer parámetros, que permitan establecer diferencias morfofuncionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren dar las gracias a:

Liliana Salazar M. Profesora de Histología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Valle. Por sus apreciaciones durante el análisis histológico

Manuel Castrillón Fernández. Instituto Balseiro, por sus sugerencias para el análisis morfométrico.

Escuela de Materiales Universidad del Valle.

REFERENCIAS

- [1] A. Bachmann.(1960). “Apuntes para una hidrobiología argentina. II. *Ampullaria insularum* Orb. y *A. canaliculata* Lam. (Moll. Prosobr, Ampullariidae). Observaciones biológicas y ecológicas”. *I Congr Sudamer Zool* (Actas): 19-26.
- [2] N. Cazzaniga et al. (1990). “A sinistral *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae)”. *Malacological Review*, 13(1/2): 123-143.
- [3] I. Kenji (2003). “Expansion of the Golden Apple Snail, *Pomacea Canaliculata*, and Features of Its Habitat” National Agricultural Research Center”. Department of Entomology and Nematology. National Agricultural Research Center Kannondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8666.
- [4] A. Estebenet. et al. (2002). Minireview: *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): Life-history Traits and their Plasticity. *BIOCELL*. 26:83-89.
- [5] P. R. Martín. Et al. (2006). “Fossil record of *Pomacea* (Caenogastropoda: Ampullariidae) in Argentina and its paleoenvironmental implications” *Biocell* (Mendoza), vol.30, no.2, p.337-343.
- [6] F. Cobo. (2000). “Ecología fluvial y caudales ecológicos”. Universidad Santiago de Compostela. España.
- [7] G. Haszprunar, (1992). “Ultrastructure of the osphradium of the Tertiary relict snail, *Campanile symbolicum* Iredale (Mollusca, Streptoneura)”. *The Royal Society* 337: 457-469.

- [8] CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL VALLE DEL CAUCA, Humedales del Municipio de Santiago de Cali. "Experiencia de trabajo", 2002.
- [9] COBO, F. 2000. Ecología fluvial y caudales ecológicos. Universidad Santiago de Compostela. España.
- [10] L. P. Nezlin., R. Elofsson., and D. A. Sakharov. (1994). "Transmitter-specific subsets of sensory elements in the prosobranch osphradium". *Biol. Bull.* 187: 174-184.
- [11] D. W. Garton., R. A. Roller., and J. Caprio. (1984). "Fine structure and vital staining of osphradium of the southern oyster drill, *Thais Haemastoma Canaliculata* (Gray) (PROSOBRANCHIA: MURICIDAE)". *Biol. Bull.* 167: 310-321
- [12] F. Bernard. (1890). "Recherches sur les organes palléaux des gastéropodes prosobranches". *Ann. Sci. nat Zool.* 9 (7), 89- 404
- [13] V. Fretter and Graham. (1962). "British prosobranch moluscs their functional anatomy and ecology" (xiv+755 pages) London: Ray Society.
- [14] T. Maeda . (1990). " Further studies on the structure of osphradium in three subfamilies of Naticidae with reference to morphology and ecology. *Venus* (Jap. J. Malac.) 49, 45-53.
- [15] H. Lacaze-Duthiers. (1872). Du systeme nerveux des mollusques gastéropodes pulmonés aquatiques et d'un nouvel organe d'innervation. *Arch. Zool. Exp. gen.* 1, 97-168.
- [16] R. Croll. (1983). Gastropod chemoreception. *Biol. Rev.* 58: 293-319.
- [17] N. Kamardin, V. Zaitseva and P. Tsurulis. (1980). Osphradial sensory system of gastropod molluscs. Pp. 159- 176 *Sensory Systems.* Nauka , Leningrad.