

APLICACIÓ CONJUNTA DE MÈTODES MORFOLÒGICS CITOQUÍMICS I D'ANÀLISI DE RAIGS X EN L'ESTUDI DE CONCRECIIONS MINERALS INTRACITOPLASMÀTIQUES

per

MERCÈ DURFORT

Dept. de Morfologia Microscòpica,
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, i
Societat Catalana de Biologia, filial de l'IEC

SUMMARY

General considerations about inorganic salts bioaccumulation within intracytoplasmic structures from various plant and animal cellular types (iodides, bromides, carbonates, phosphates, nitrates, oxalates, etc.).

Suitable technics such as polarization, staining, microanalysis and structural study provide data about the chemical structure of concretions or spherocrystals, and also allow us to follow their origin and later development.

We have studied hepatopancreas B cells of Mollusca Polyplacophora and intestinal cells of copepoda and we can report that, in these cells, various cytoplasmic structures are involved in the building of lythosomes, either simultaneously or separately.

It must be emphasised that the Golgi complex and the endoplasmic reticulum take part in this process, as a general rule. Likewise, in certain species such as *Eucyclops serrulatus*, micropits originated at the apical pole of intestinal cells take a large amount of exogenous material. In the same species, mitochondria are also involved in the formation of lythosomes.

There is a discussion about the storage function of these concretions as well as about their role in the growing and consolidation of the carapace and the integument in both invertebrate groups.

RESUM

Consideracions generals sobre la bioacumulació de sals inorgàniques en estructures intracitoplasmàtiques en determinats tipus cel·lulars de plantes i animals (iodurs, clorurs, bromurs, carbonats, fosfats, nitrats, oxalats, etc.).

Tècniques adients d'estudi com són la polarització, el tintatge, la microanàlisi i l'estudi ultrastructural aporten dades sobre la natura química de les concrecions o esferocristalls, alhora que permeten de conèixer-ne l'origen i el desenvolupament posterior.

En les cèl·lules animals estudiades, les cèl·lules B de l'hepatopàncrees de molluscs polioplacòfors i en cèl·lules intestinals de copèpodes, diverses estructures citoplasmàtiques estan implicades, simultàniament o per separat, en la formació de litosomes.

Cal destacar-hi la participació generalitzada del reticle endoplasmàtic i de l'aparell de Golgi. Així mateix, en determinades espècies, com ara en *Eucyclops serrulatus*, microcriptes

formades a nivell del pol apical de cèl·lules intestinals segresten una gran quantitat de material exogen. En aquesta mateixa espècie, els mitocondris també intervenen en la formació dels litosomes.

Hom discuteix el significat de reserva que tenen aquestes concrecions i el paper que tenen en el creixement i en la consolidació de la closca i del tegument d'ambdós grups d'invertebrats.

Introducció

Determinats tipus cel·lulars, tant vegetals com animals, en condicions normals, és a dir, no en estat patològic, tenen la propietat d'acumular diverses sals inorgàniques.

Entre les plantes que gaudeixen d'aquesta propietat, cal esmentar les algues marines, que en llurs vacúols gegantins acumulen clorurs, bromurs i també iodurs. Aquestes sals es troben dissoltes en el suc vacuolar i mitjançant l'aplicació de tints, com ara el blau de crèsil, queden tintades d'un magnífic color fosc.

Si les sals es troben en suficient concentració, precipiten espontàniament en forma de cristalls prismàtics o aciculars més o menys característics de cada gènere. Com més diluïda sigui la concentració del líquid vacuolar, més perfecta serà la cristallització. En provocar la plasmòlisi, els vacúols es deshidraten i les sals precipiten i s'esdevenen visibles.

Els clorurs poden posar-se de manifest amb la solució de Macallum (nitrat de plata a l'1/10 amb àcid nítric) que dona un precipitat insoluble de clorur d'argent. No solament les algues tenen clorurs; SCHIMPER (1883) en plantes de les famílies de les urticàcies, quenopodiàcies, tamaricàcies i malvàcies, així com en les compostes, en localitza de sòdics i de potàssics, i FITTING (1911) en troba en plantes de llocs desèrtics.

MOLISCH (1905) detectà clorurs cristallitzats en el làtex d'euforbiàcies, moràcies, apocinàcies, entre altres.

Nombroses espècies d'algues marines, principalment rodofícies, tenen en dissolució en el suc vacuolar iodurs, que *in vivo* amb el blau de crèsil precipiten donant cristalls vermells o violats (MANGENOT, 1928).

Els bromurs es troben en cèl·lules especials, pròpies d'algues vermelles, cèl·lules denominades bròmiques per SAUVAGEAU (1925 i 1926).

En deshidratar seccions d'euforbiàcies, cactàcies i maratiàcies, amb alcohol de 90-96°, HANSEN * obtingué esferocristalls poc refringents que donen reacció positiva al fosfat càlcic, i BELZUNG (1893) hi demostrà la presència de mala-fosfat càlcic, àdhuc de malat càlcic.

Els nitrats, en forma de nitrat càlcic i potàssic, es troben en totes les plantes, i és molt important llur presència en les nitròfiles. BELZUNG (1893) deshi-

* Aquest treball pertany al llibre de GUILLIERMONT et al. (1933) que és citat a la Bibliografia.

drata les seccions amb glicerina i fa aparèixer en els vacúols nombrosos cristalls prismàtics, incolores, que sota l'acció d'una solució sulfúrica de difenilamina esdevenen blaus.

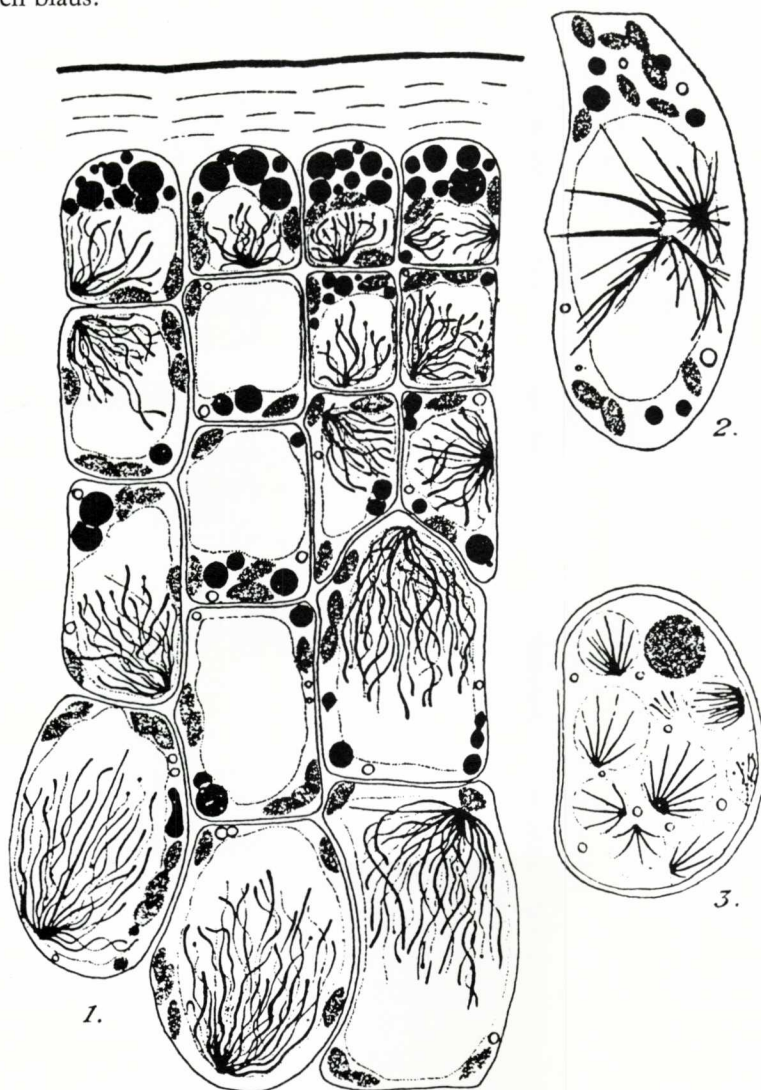
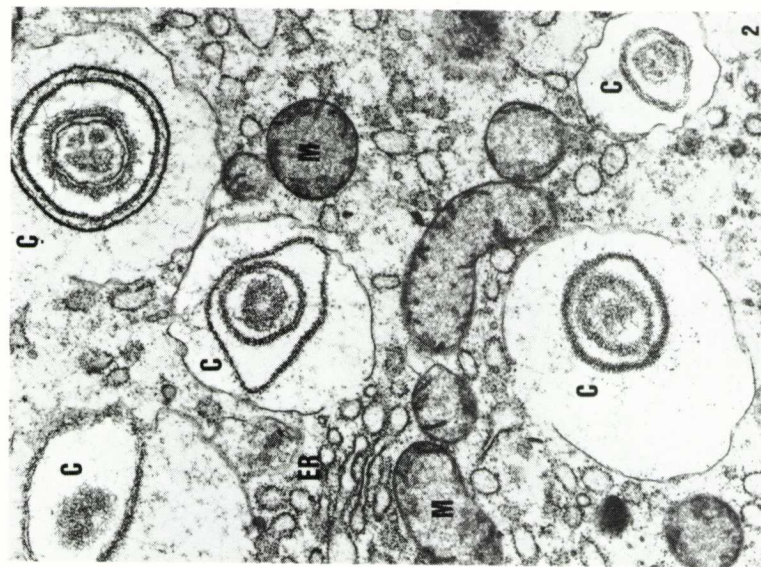


Fig. 1. - Esquema de MANGENOT (1927) procedent del «Traité de Cytologie végétale» de GUILLIERMONT (1933).

Freqüentment també tenen sulfats; així BELZUNG posà de manifest el sulfat potàssic en plàntules de *Lupinus*, i féu precipitar el sulfat de calci, en forma de cristalls aciculars, per deshidratació de les seccions amb glicerina.



Cèl·lula de tipus B de l'hepatopàncreas de *Chaetopteleura fulva* (poliplacófor). Hom hi observa cinc vacúols (litosomes) amb concrecions en vies de formació (C). Entre elles vegeu mitocondris (M) i reticle endoplasmàtic de tipus rugós (ER). (32.000 x).



Zona de contacte entre els dos tipus cel·lulars que es troben en l'intestí mitjà de *Cyclops strenuus* (Copepode). A: enteròcit, observeu la llargada dels microvillis (mv). B: cèl·lula bioacumuladora, vegeu com els microvillis són més curts, i també la riquesa de formacions d'endocitosi. La fletxa gruixuda assenyalava una unió septada que ve tot seguit després d'una zona ocludens. (22.000 x).

Una revisió molt interessant, i referència obligada per bé que antiga, la trobem en el text de GUILLIERMONT *et al.* (1933).

Els cristalls poden tenir formes molt diferents: prismàtiques, aciculars que formen rafidis, constituint druses, o bé adopten la forma sorrenca, com és el cas de les plantes de la família de les solanàcies.

Plantes terrestres, tan diferents com poden ésser el julivert (*Petrozelinum sativum*) i el vesc (*Viscum album*) entre altres, acumulen oxalats i carbonats càlcics que cristal·litzen i donen lloc a unes magnífiques druses que fins i tot arriben a deformar les cèl·lules parenquimàtiques que les contenen a causa de llur grandària.

Cal esmentar, en aquesta breu revisió, una formació molt especial, el cistòlit, formació descrita el 1827 per MEYEN en el *Ficus elastica*. Una determinada cèl·lula epidèrmica, denominada idioblast, creix molt més que les seves veïnes. La seva paret apical creix puntualment cap a l'interior i forma un peduncle silicificat, en l'extrem del qual es van dipositant sals calcàries recordant un xic el creixement d'una estalactita. Les plantes de les famílies de les urticàcies, moràcies, acantàcies i ficàcies, acostumen a presentar-ne.

Alguns autors, com ara DORMER (1961-62), han demostrat que els cristalls poden tenir un valor sistemàtic, i així troba diferències significatives en cèl·lules de la paret de l'ovari d'unes 10 espècies de compostes.

En les cèl·lules vegetals, l'acumulació de les sals pot tenir dos significats: 1.^{ra}) regulació de la pressió osmòtica, i 2.^{na}) funció excretora.

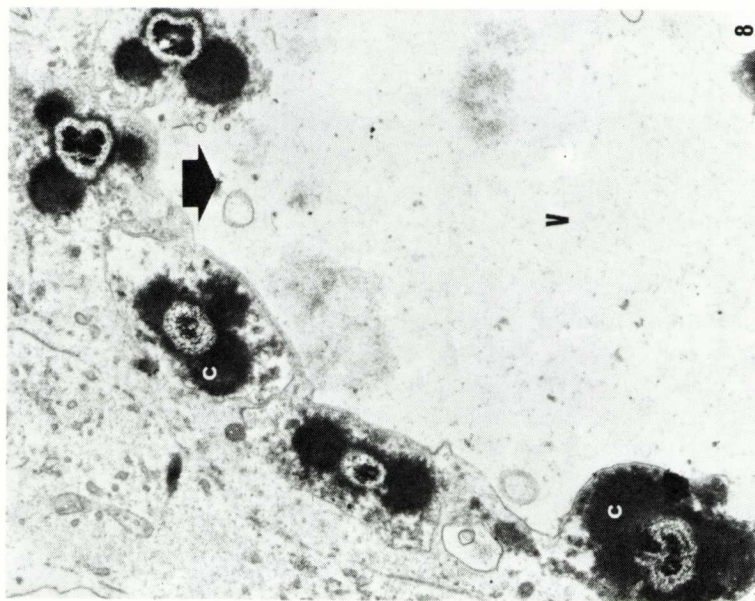
L'excreció en les plantes, a part de la formació de cristalls, pot tenir lloc mitjançant l'elaboració d'essències, de gomes, de mucíl·lags o de làtex. L'adopció d'un sistema o l'altre depèn de la filogènia de la planta, així com del seu hàbitat.

La presència de sals inorgàniques cristal·litzades dins les cèl·lules pot esdevenir alhora motiu que les plantes en qüestió no siguin menjades per qualsevol herbívor, ja que normalment són abrasives. Però alhora poden tenir un efecte perjudicial per al creixement. Una revisió molt acurada d'aquest tema es troba en el treball de CHETELAT (1978).

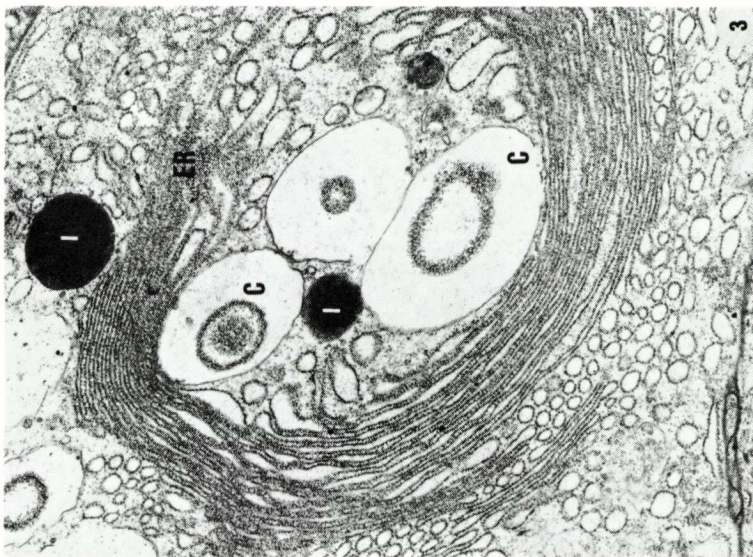
Fent una breu revisió de les cèl·lules animals, cal pensar que hi trobem, en condicions normals, formacions esferoidals, denominades també concrecions, que poden tenir dues funcions: 1.^{ra}) reserva de sals, i 2.^{na}) caràcter excretor.

En ambdós casos, les sals són incorporades a l'organisme per l'absorció intestinal o gastro-intestinal. En determinades ocasions i amb la intervenció d'una estructura citoplasmàtica o més, aquestes sals queden atrapades dins una matriu orgànica i s'inicia un procés de microcristal·lització que dóna lloc a unes magnífiques formacions concèntriques: els esferocristalls. Aquest és el cas que descriurem en els dels copèpodes. És obligat de consultar els treballs de GRAF (1968, 1971 i 1978, entre d'altres) pel que fa als sistemes d'emmagatzemament de calci en crustacis amfípodes.

Pot ésser també que, un cop les sals són dins la cèl·lula intestinal, passin a l'hemolimfa, i aquesta les distribueixi per tot l'organisme. En arribar a l'hepato-



Particular disposició de les concrecions de l'intestí mitjà de *Diaptomus conexus* al voltant d'un gran vacúol central V. (18.000 x).



Cèl·lules de tipus B de la glàndula digestiva de *Trachydermon cinereus* (poliplacòfor). Observeu el gran desenvolupament del reticle endoplasmàtic rugós (ER), i la presència d'algunes incusions lipídiques (I) al voltant d'esteroglicis-talls en formació (C). (20.000 x).

pàncrees (en el cas d'alguns molluscs i crustacis superiors) seran captades per un dels seus tipus cel·lulars i, amb la participació d'una o de diverses estructures citoplasmàtiques, s'hi formaran igualment unes concrecions o esferocristalls (DURFORT, 1982a).

En alguns grups d'insectes, principalment ortòpters i hemípters, les sals s'insolubilitzen en els tubs de Malpighi en ésser-hi filtrada l'hemolimfa, i donen lloc a formacions esferoïdals, d'aspecte ultraestructural similar a les descrites anteriorment.

En aquest darrer cas, en el dels insectes, el significat d'aquestes formacions és sens dubte excretor. En el «Mundo Científico» del mes de setembre de 1984 apareix una nota de SIMKISS sobre els invertebrats que neutralitzen els metalls pesants, resumint els diversos mecanismes d'entrada dels ions metàl·lics.

En els vertebrats, formacions d'aquest tipus i en condicions normals han estat descrites en peixos (BERNER, 1980).

Una revisió molt interessant dels mecanismes de la biomineralització en animals i plantes, és la d'OMORI *et al.* (1980).

A nivell d'acumulació de contaminants, cal, entre d'altres, esmentar la revisió feta sobre el cadmi per GOTTOFREY (1984) així com la de MARTOJA *et al.* (1984).

L'estudi de les concrecions minerals intracitoplasmàtiques ha estat duta a terme mitjançant l'observació de seccions semiprimes amb el microscopi òptic i amb el microscopi electrònic de rastreig, així com l'estudi de seccions ultrafines amb la microscòpia electrònica de transmissió.

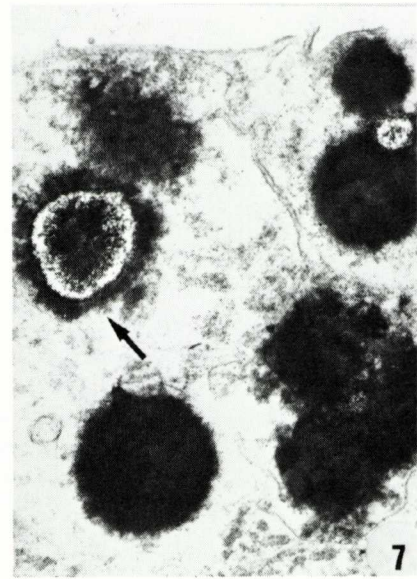
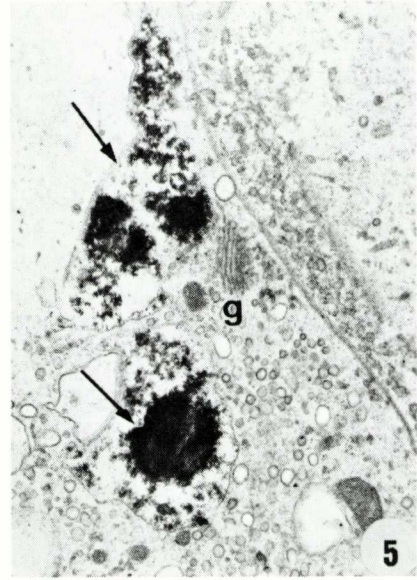
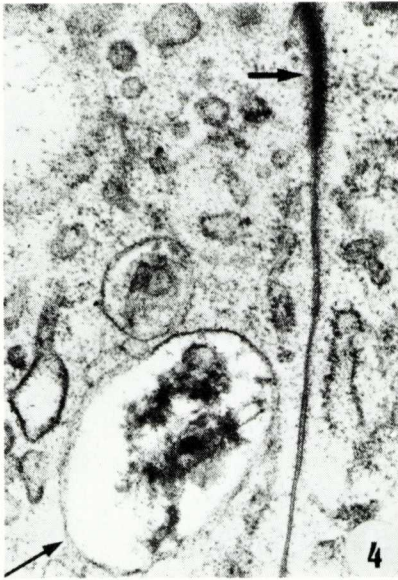
Material i mètodes

Hom ha treballat amb hepatopàncrees de molluscs polioplacòfors de les espècies: *Trachydermon cinereus* i *Chaetopleura fulva*, per a la qual cosa ha estat aïllada i dissociada la glàndula digestiva.

Les espècies de copèpodes d'aigua dolça estudiats han estat: *Cyclops strenuus*, *Eucyclops serrulatus*, *Diaptomus connexus* i *Eurytemora velox*. Els exemplars han estat processats sencers, per raó de llurs reduïdes dimensions: de 2 a 5 mm de llargada.

La metodologia emprada ha estat la mateixa per a totes les espècies. En tots els casos el material ha estat fixat amb glutaraldehid i paraformaldehid tamponat amb Sørensen o bé en cacodilat sòdic, a pH 7,3 i a 4 °C de temperatura durant 2 hores. Postfixació amb OsO_4 al 2 % igualment tamponat, al mateix pH, a 4 °C i durant 2 hores.

Després d'una acurada deshidratació amb una sèrie ascendent d'acetones o d'alcohol, cal procedir a la inclusió amb Araldite, Epon 812 o bé amb SPURR (1969); aquesta darrera resina és la que ha donat més bons resultats a causa de la seva baixa viscositat.



4, 5, 6 i 7. - Diverses etapes de la formació de concrecions en cèl·lules del tipus B de l'intestí de *Diaptomus connexus* (18.000 x).

Amb un ultramicrotòtom Reichert OMU han estat obtingudes les seccions semiprimes (d'uns 2 μm de gruix) i les ultrafines (300 Å de gruix).

Seccions semiprimes

1) Observació directa amb el microscopi òptic de llum polaritzada. Les concrecions estudiades són generalment birefringents.

2) Tintatge amb blau de metilè-bòrax (mètode rutinari). Les concrecions apareixen tenyides intensament i uniformement.

3) Tintatge amb vermell d'alitzarina en solució aquosa al 0,5 %. Queden tenyides de color vermell intens.

4) Doble tintatge amb nitrat d'argent i blau de metilè. Les concrecions presenten una regió perifèrica nitrat d'argent-positiva i una interna blau de metilè-positiva.

5) Doble tintatge amb la reacció de l'àcid periòdic de Schiff i el blau de crèsil. Les concrecions apareixen amb una zona central intensament vermella, PAS-positiva, una regió intermèdia, lleugerament PAS-positiva i una regió cortical intensament blava.

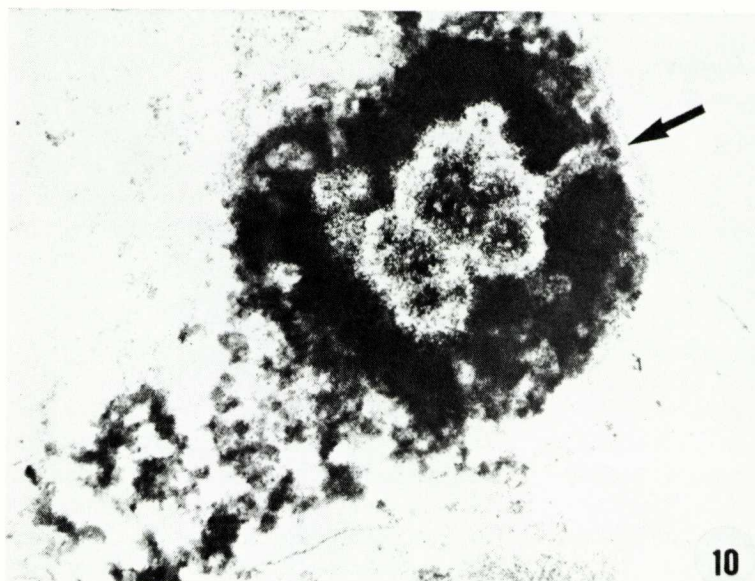
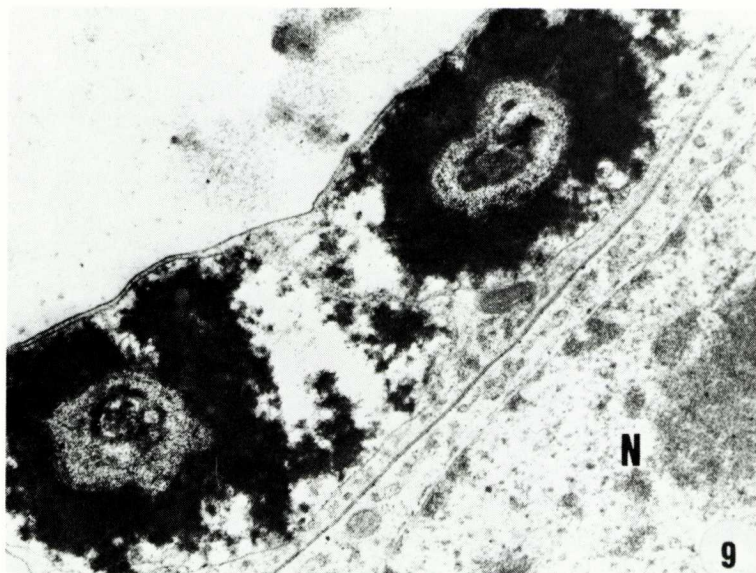
6) Seccions semiprimes recollides en reixetes d'or i ombrejades mitjançant la tècnica del «sputtering» amb un Polaron model E.5000, queden recobertes per una capa d'or o de carbó de 300 a 500 Å de gruix. L'observació ha estat feta amb un microscopi electrònic de rastreig Philips amb un sistema d'anàlisi per difracció d'energia dispersiva de raigs X (EDAX) de l'Escola d'Enginyers de Barcelona.

7) Les seccions ultrafines han estat contrastades amb acetat d'uranil i citrat de plom, mètode rutinari. Hom ha pogut seguir la gènesi dels litosomes a partir de diverses estructures citoplasmàtiques. Les observacions han estat fetes amb un microscopi electrònic de transmissió Philips 200 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Observacions

En les cèl·lules B o bioacumuladores de l'hepatopàncrees dels molluscs poliplacòfors *Trachydermon cinereus* i *Chaetopleura fulva*, s'acumulen concrecions de 2 a 4 μm de diàmetre que s'originen en l'interior de grans vacúols: els litosomes.

L'origen dels litosomes en aquestes espècies és a partir del complex de Golgi, així com del reticle endoplasmàtic rugós. Ensenes es formen citolisosomes gegants, amb profusió de figures mielíniques en llur interior. Els resultats ja han estat parcialment publicats (DURFORT, 1982) (fot. 2 i 3). La microanàlisi pel sistema EDAX ha permès de conèixer la composició dels esferocristalls, lleugerament diferent en les dues espècies, però bàsicament similar: Na, Mg, Si, K, Ca, Fe i Cu (fot. 12 i 13).



9 i 10. - Imatge de dues concrecions que permeten d'observar un nucli central menys dens (matriu orgànica) envoltat d'un material electrodens en què hi ha una microcristal·litització (18.000 x).

En el cas dels copèpodes, per tal com no tenen hepatopàncrees, és l'intestí qui fa alhora les funcions bioacumuladores descrites en el cas de les cèl·lules B de l'hepatopàncrees dels molluscs (DURFORT, 1981, 1982a, 1982b). Efectivament, juntament amb els enteròcits, cèl·lules tipus A fàcilment identificables per llur riquesa en microvil·lis molt esvelts (fot. 1), trobem unes cèl·lules menys nombroses amb microvil·lis molt més curts i amb més quantitat de formacions d'endocitosi: són les cèl·lules de tipus B. En determinats estadis fisiològics aquestes cèl·lules presenten uns magnífics lisosomes. En la seva formació intervenen: 1) complex de Golgi, 2) reticle endoplasmàtic rugós, 3) mitocondris, 4) grans invaginacions del plasmalema apical de la cèl·lula.

Allò més freqüent i que hem trobat en tots els casos estudiats és l'origen dels lisosomes a partir del reticle endoplasmàtic rugós. Aquesta estructura vesículo-membranosa dona lloc a grans vacúols: els lisosomes, i en diversos punts apareixen fenòmens de mielinització que aportaran el substrat orgànic, en el qual es dipositaran les sals incorporades pel pol apical de la cèl·lula.

El menys freqüent, únicament observat en *Eucyclops serrulatus*, és la formació de concrecions a partir de mitocondris i de grans criptes formades per invaginacions de la membrana cel·lular apical (DURFORT, 1983).

De l'espècie *Diaptomus conexus*, procedent dels llacs del Canadà, aportem imatges inèdites (fot. 4-9) que assenyalen el paral·lisme de la seva formació amb allò que s'esdevé en les altres espècies: *Cyclops strenuus* i *Eucyclops serrulatus*.

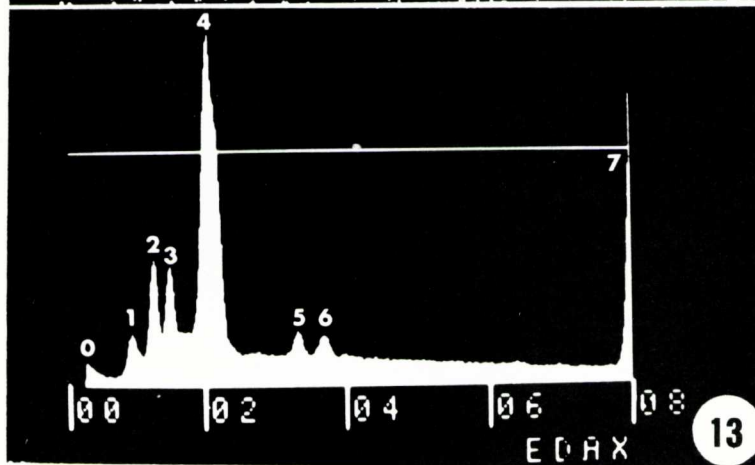
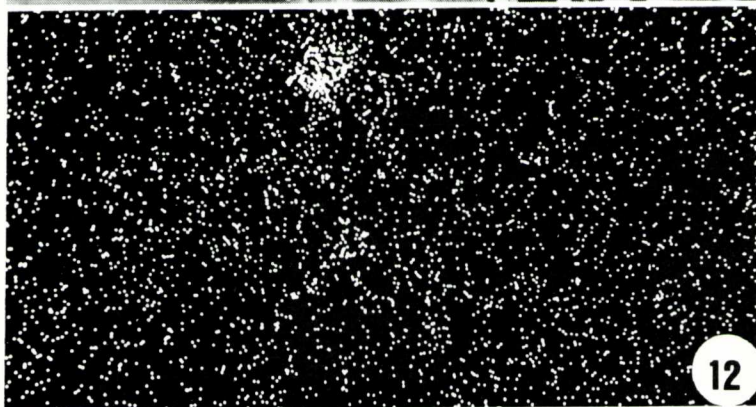
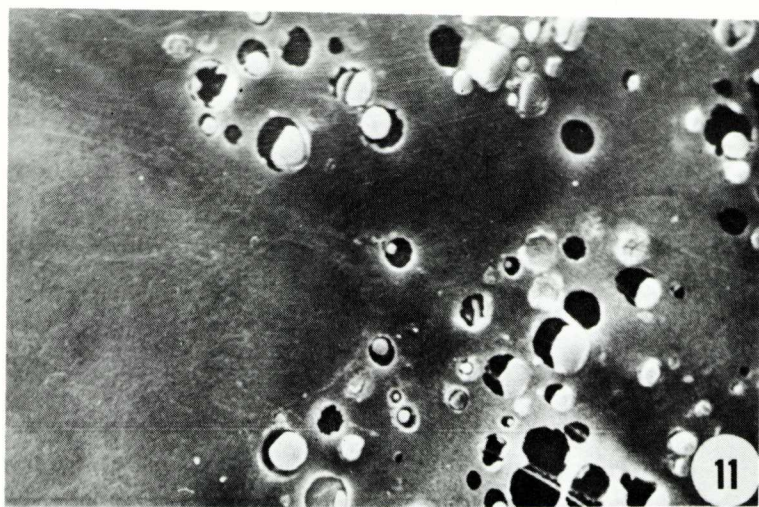
La microanàlisi dona resultats sensiblement diferents que són justificats pel tipus d'aigua en què es troba aquesta espècie, que procedeix dels llacs canadencs.

Conclusions

A diferència de les concrecions minerals presents en les cèl·lules dels tubs de Malpighi dels insectes, que tenen un caràcter eminentment excretor, en bloquejar les sals inorgàniques per aquest sistema, les concrecions descrites en les espècies de copèpodes estudiades tenen un sentit de reserva, així com les que hem localitzat en la glàndula digestiva dels molluscs poliplacòfors (DURFORT, 1982a).

Efectivament, les concrecions inorgàniques trobades en les cèl·lules B de l'hepatopàncrees serveixen de reserva de sals, i en el moment del creixement de les plaques i llur consolidació, sota influència hormonal, hi ha una redissolució d'aquestes concrecions i, per via hemolimfàtica, les sals assoleixen la capa epidermàtica.

En el cas dels copèpodes, el significat és el mateix. A manca d'hepatopàncrees, són les cèl·lules B del tub digestiu mitjà i posterior que fan aquesta funció. Quan s'esdevé l'ècdisi o muda, és el moment en el qual les concrecions es dissolen i les sals, per via hemolimfàtica, van a consolidar la cutícula quitinosa dels exemplars.



11. - Imatge al microscopi de rastreig de les concrecions de l'hepatopàncrees de *Chaetopleura fulva*. En fer la secció semiprima, la ganiveta ha arrencat algunes concrecions, i hi veiem litosomes buits (10.000 x). - 12. - Mapping del calci present en una de les concrecions estudiades. - 13. - Gràfica de la microanàlisi, obtinguda després de 100 segons d'exposició i treballant amb 20 electrovolts. 1: Na, 2: Mg, 3: Si, 4: Au, 5: K, 6: Ca, 7: Fe, 8: Cu.

Els resultats obtinguts sobre l'origen dels litosomes concorden amb els trobats per GRAF (1983) en *Orchestia gammarellus*, i amb els de POQUET (1984) trobats en les cèl·lules de tipus B del tub digestiu d'una espècie de copèpode ectoparàsit de peixos: *Lhernantropus kroyerii*, en què els esferocristalls s'originen principalment a partir del reticle endoplasmàtic rugós, bé que també n'ha estat observat l'origen a partir de mitocondris. Cal subratllar, però, que en una altra espècie estudiada, en aquest cas endoparàsita del musclo, *Mytilicola intestinalis* (DURFORT, 1977), mai no hem trobat esferocristalls en les formes adultes, per bé que les fases larvàries lliures d'aquest paràsit presenten esferocristalls en les cèl·lules B de llur incipient tub digestiu (MERCADÉ, 1984); per la qual cosa considerem que les espècies endoparàsites no necessiten reserva de sals minerals per a la consolidació de llur tegument, que és summament tou. També cal tenir present el règim alimentari que condiciona llur parasitisme, tan diferent del de les espècies lliures i fins i tot del de les ectoparàsites.

BIBLIOGRAFIA

- BELZUNG, E. (1893). Nature des sphérocristaux des Euphorbes cactiformes. *J. Bot.*, 7: 221-229 i 261-267.
- BERNER, C. (1980). Recherche du mercure et des autres métaux lourds dans la faune piscicole. Rapport sur les études et les recherches entreprises dans le bassin lémanique. *Commission internationale pour la protection des eaux du Léman contre la pollution*. Lausana, 251-254.
- CHETELAT, A. A. (1978). Impact des éléments tracés sur la croissance des plantes cultivées. *Rech Agron. Sci*, 17: 211-227.
- DORMER, K. J. (1961). The crystals in the ovaries of certain compositae. *Ann Bot. N. S.*, 25: 241-254.
- DORMER, K. J. (1962). The taxonomic significance of crystal forms in *Centaurea*. *New Phytol.*, 61: 32-35.
- DURFORT, M. (1977). Noves dades de la ultrastructura de l'epiteli intestinal de *Mytilicola intestinalis*, Steuer. *But. Soc. Cat. Biol.*, II (1-2): 27-31.
- DURFORT, M. (1981). Mineral concretions on the intestinal epithelium of *Cyclops strenuus*, Fish. (Crustacea, Copepoda). Ultrastructural study. *Butll. Ins. Cat. Hist. Nat.*, 47: 93-103.
- DURFORT, M. (1982a). Las concreciones minerales del hepatopáncreas de *Trachydermon cynerus*. Thiele (Mollusca, Polyplacophora). Estudio ultraestructural. *Iberus*, 2: 1-17.
- DURFORT, M. (1982b). Microanálisis de las concreciones intestinales de *Cyclops strenuus* Fish. (Crustacea, Copepoda). Estudio preliminar. *Miscelánea Zoológica*, 6: 27-32.
- DURFORT, M. (1983). Origen, formación y posible significado de los esferocristales intestinales de *Eucyclops serrulatus* (Fisher, 1851) (Crustacea, Copepoda). *Actas I Congreso Español de Limnología*, Barcelona, 253-264.
- FITTING, H. (1911). Die Wasserversorgung und die osmotischen Druckverhältnisse der Wüstenpflanzen. *Zeitschr., J. Bot.*, 3: 209.

- GOTTOFREY, J. (1984). Problèmes du cadmium. *Ann. Biol.*, 23(1): 1-30.
- GRAF, F. (1968). *Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodes Orchestia (Talitridé) et Niphargus (Gammaridé Hypogé)*. Thèse Fac. Sciences de Dijon, 1-216.
- GRAF, F. (1971). Dynamique du calcium dans l'épithélium des caecums postérieurs d'*Orchestia cavimana* Heller (Crustacé, Amphipode). Rôle de l'espace intercellulaire. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 273: 1828-1831.
- GRAF, F. (1978). Les sources de calcium pour les Crustacés venant de muer. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 119(1): 143-161.
- GRAF, F. & MEYRAN, J.-C. (1983). Premolt calcium secretion in midgut posterior caeca of the crustacean *Orchestia*: ultrastructure of the epithelium. *J. Morphol.*, 177: 1-23.
- GUILLIERMONT, A.; MANGENOT, G. & PLANTEFOL, L. (1933). *Traité de Cytologie végétale*. Le François ed., Paris.
- MANGENOT, G. (1928). Sur la localisation des iodures dans les cellules des algues. *Bull. Soc. Bot. de Fr.*, 75: 519-540.
- MARTOJA, M. & MARTOJA, R. (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Le courrier du CNRS*, 54: 32-37.
- MENABBE, J.D. & SANDBORN, E. (1964). Filaments in the microvillous border of intestinal cells. *J. Cell Biol.*, 22: 701-704.
- MERCADÉ, N. (1984). *Ultraestructura de las larvas libres de Mytilicola intestinalis*, *Steuer. Tesi Doctoral*. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- MOLISCH, H. (1905). Ueber amorphen und kristallisierten Anthocyan. *Bot. Ztg.*
- MUKHERJEE, T. M. & STAEHELIN, L. A. (1971). The fine structural organization of the intestinal epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 8: 573-599.
- OMORI, M. & WATABE, N. (1980). *The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Tokai University Press, Tokyo.
- POQUET, M. (1984). *Ultraestructura del tracto digestivo de copépodos parásitos de peces: Lernanthropus kroyeri van Beneden y Caligus minimus, Otto.*, Tesi Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- SAUVAGEAU, C. (1925). Sur quelques algues Floridées renfermant de l'iode à l'état libre. *Bull. Stat. Biol. Arcachon*, 22: 43 pp.
- SAUVAGEAU, C. (1926). Sur quelques algues Floridées renfermant du brome à l'état libre. *Bull. Stat. Biol. Arcachon*, 23: 21 pp.
- SCHIMPER, W. (1883). Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.* Dins: Guilliermont et al. *Traité de Cytologie Végétale*. Le François, 1933.
- SIMKISS, K. (1984). Invertebrados que neutralizan metales tóxicos. *Mundo Científico*, 4(39): 864-866.
- SPURR, A. R. (1969). A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43.
- TRIER, J. S. & RUBIN, C. E. (1965). Electron Microscopy of the small intestine. *A Review Gastroenterology*, 49: 547.