

DADES ULTRASTRUCTURALS DE LES MITOCÒNDRIES D'UN COPEÏPODE PARÀSIT DEL MUSCLO

Comunicació presentada el dia 16 de novembre de 1973
per la doctora

MERCÈ DURFORT i COLL

Servei de Microscòpia Electrònica. Departament de Morfologia Microscòpica.
Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona

S U M M A R Y

Ultrastructural data of the mitochondria of a mussel's parasitic copepod

The "normal" morphology of mitochondria is found in the chondriosomes of the cells which receive more oxygen, whilst the ones more distant from the cuticle and the digestive tract, present alterations, such as invaginations, swellings in the mitochondrial wall, etc., which leads us to believe that the absence of oxygen is the determining factor in these morphological anomalies of the mitochondria.

A description has also been done on the special distribution of the chondriosomes, surrounding totally or partially a microorganism which is found in 20% of the copepods studied. It is argued that this distribution is possibly an easier way of releasing energy as the Protozoa in question does not possess differentiated mitochondria.

INTRODUCCIÓ

La morfologia ultrastructural és gairebé sempre molt important i con- cloent per a poder diferenciar els diversos orgànuls citoplasmàtics, alhora que ens orienta sobre l'activitat fisiològica de la cèl·lula. Així, el desenvolupament i l'aspecte de l'ergastoplasma i de l'aparell de Golgi en una cèl·lula ens assenyalen l'activitat de síntesi i d'emmagatzematge que té.

La mitocòndria és una de les estructures citoplasmàtiques de morfo- logia més ben definida i ensembla més làbil que té la cèl·lula eucariota, i són nombrosos els treballs que fan referència al seu polimorfisme en els dife- rents tipus cel·lulars, i també a les alteracions morfològiques dels condrio- somes, a nivell estructural i ultrastructural, tant de cèl·lules animals pa-

tològiques com de cèl·lules d'animals sotmesos a dietes alimentàries especials, o bé a diferents tipus de drogues i fàrmacs^{2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 19}.

En cèl·lules vegetals també hom ha treballat molt i han estat descrites anomalies mitocondrials provocades per diverses substàncies químiques, hormones, per radiacions lumíniques, per anòxia¹⁰, etc.

Podem veure en dos treballs de VALLMITJANA^{15, 16} una revisió molt completa sobre les mitocondries en general (morfologia normal i patològica, fisiologia, relació amb d'altres estructures cel·lulars, etc.). Innombrables són els treballs publicats sobre aquesta qüestió, després d'aquesta revisió; en la bibliografia d'aquesta nota només en seran esmentats alguns.

Amb les dades que tenim, la morfologia mitocondrial pot ésser, i és de fet, un índex d'estats fisiològics cel·lulars normals o bé patològics.

Una vegada més ens crida l'atenció el fet de comprovar el gran do d'observació que tenien els citòlegs de la microscòpia òptica. Pensem en concret en COWDRY, quan l'any 1924 digué: «La morphologie des mitochondries est une propriété fondamentale de la cellule en rapport avec son organisation».

Mytilicola intestinalis Steuer és un crustaci copèpode que viu paràsit dins l'aparell digestiu de gairebé un 60 % dels musclos; pel color vermell fa que es distingeixi bé sobre el fons negre-verdós de l'hepatopàncreas, en fer la dissociació d'aquesta glàndula digestiva.

Presenta un dimorfisme sexual molt patent quant a dimensions. La femella té uns deu mil·límetres de llargada per uns dos d'amplada; pel que fa als mascles, més menuts, tenen uns quatre mil·límetres de llargada per mig d'amplada; a més, la femella, quan està en maduresa, presenta dos sacs ovígers que li pengen i que sobresurten molt de la furca caudal, que tenen en la part posterior del cos.

El nombre de paràsits que trobem per exemplar de musclo infestat és habitualment de dos a quatre, bé que en musclos de la ria de Pontvedra ANDREU¹ ha arribat a trobar-ne fins a quinze, i KORRINGA⁷, durant l'epidèmia de musclos que hi hagué a Holanda el 1950, en trobà fins a setanta per exemplar; en aquests casos el musclo apareix totalment atrofic, mentre que, en el nostre cas, els musclos apareixen ben desenvolupats i, si no fos per la dissociació de l'hepatopàncreas, podrien passar per sans.

Hom fa un estudi histològic i citològic d'aquest copèpode. Fins ara han estat fetes observacions sobre l'estructura i ultraestructura de les cèl·lules epitelials de l'intestí que ofereixen particularitats d'interès; podrien tenir una funció secretora, excretora i reabsorbent alhora; hom recopila dades sobre la cutícula, que és molt prima, comparada amb la dels copèpodes lliures, i sobre la musculatura estriada, que té nombroses mitocondries i quantitats elevades de diminutes agrupacions de partícules de glucogen.

Hi ha també en estudi un protozou que hem trobat envaint tota mena

de teixits del copèpode; les seves particularitats citològiques no permeten de classificar-lo, almenys de moment.

En aquesta nota serà esmentat el polimorfisme de les mitocòndries en els diferents teixits del copèpode *Mytilicola*, així com la disposició que adopten entorn del protozou paràsit.

MATERIAL I MÈTODES

El copèpode *M. intestinalis* ha estat tret de l'hepatopàncreas del músculo i fixat amb glutaraldehyd al 3 % tamponat amb Sørensen, durant dues hores, a 4° C; i, després d'un rentat amb tampó, ha estat feta una postfixació amb OsO₄ a l'1 %, també tamponat amb Sørensen, durant 1 o 2 hores, a 4° C. Passos successius per alcohols de graduacions ascendents i per òxid de propilè, ens permeten de fer la inclusió en plàstic. Habitualment hem utilitzat l'araldita. Les seccions ultrafines han estat contrastades amb acetat d'uranil i citrat de plom, procediment molt habitual de contrastat en microscòpia electrònica. L'observació de les seccions ha estat feta amb un microscopi electrònic Philips 200, del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

OBSERVACIONS I DISCUSSIÓ

En *Mytilicola*, trobem un polimorfisme molt patent, i també una variabilitat, quant a grandària, entre les mitocòndries dels diferents teixits.

Mentre que les cèl·lules de l'epiteli tegumentari tenen mitocòndries grans, d'unes 4 μ de diàmetre i quasi esfèriques, amb crestes llargues que arriben a dividir totalment la matriu, a les fibres musculars de la paret del cos en trobem unes de 0,5 μ de diàmetre, rodones o lleugerament el·líptiques, amb la matriu no gaire densa i quasi totalment dividida per les crestes; i amb abundants partícules de glucogen a llur proximitat (fig. 2).

Les cèl·lules de tipus A de l'epiteli intestinal són diferents de les cèl·lules del tipus B, principalment per llur riquesa en condriosomes; en aquest cas les mitocòndries mesuren unes 2 μ de llargada per 0,5 μ de diàmetre i tenen preferència per disposar-se perpendicularment a l'extrem apical de la cèl·lula i paral·lelament a les parets laterals; continuen, però, tenint crestes llargues i força abundants. Normalment no presenten anomalies (fig. 1).

Les mitocòndries del teixit conjuntiu, que hom troba entre la musculatura de la paret del cos i del tub digestiu, acostumen a ésser el·líptiques,

bé que llur forma sol ésser força irregular, lleugerament piriforme en alguns casos, en d'altres en forma de sabatilla (amb una suau constricció, més o menys cap al mig de l'òrganul). No tenen tantes crestes, s'arquegen en els extrems i a vegades es bifurquen; hom hi veu sovint petites dilatacions entre les dues membranes de la paret mitocondrial, simptomàtiques d'una alteració, que ens podria fer pensar en un procés de fixació deficient; però el fet d'observar-les així, quan les dels altres teixits són «normals», ens fa pensar més aviat en condicions especials del metabolisme d'aquestes cèl·lules (fig. 3).

Hem observat imatges molt interessants, donades per grans invaginacions de la paret mitocondrial, que adopten un aspecte que ens recorda el procés de la pinocitosi (alguns autors han observat processos de captació d'agregats de partícules virals, per part de la paret mitocondrial), i també ens recorda molt l'estructura del tipus mesosoma bacterià observada per YOTSUYANAGI¹⁵ en mitocòndries.

En tots els casos, la matriu mitocondrial té un aspecte poc dens als electrons i acostuma a estar totalment dividida per les crestes.

En un 20 % dels exemplars estudiats hem trobat un organisme unicel·lular esfèric, no identificat encara, que mesura unes 4 μ de diàmetre; no presenta cap coberta especial externament a la membrana citoplasmàtica; té un nucli bastant gran amb nuclèol i material cromatínic distribuït més o menys uniformement. Quant a les estructures citoplasmàtiques, és un fet molt interessant que no hi hàgim trobat mitocòndries diferenciades, bé que hi ha estructures vesiculososes, delimitades per una doble membrana, que podríem considerar com a formes mitocondrials degradades o no diferenciades. Consideracions sobre les ultraestructures cel·lulars d'aquest microorganisme han estat donades en un treball recent¹⁷.

Aquest microorganisme ha estat trobat a tota mena de teixits de *Mytilicola*, tant a les cèl·lules de l'epiteli intestinal, com prop de la musculatura de la paret del cos, a les cèl·lules de l'epiteli tegumentari, etc.

Freqüentment hem observat una distribució molt particular de les mitocòndries de les cèl·lules infectades, en el sentit que són aplicades sobre la membrana citoplasmàtica del microorganisme, bé que no hi ha estat trobat cap tipus de contacte especial com els descrits per NOIROT-TIMOTHÉE i collab.¹¹ i per PERISSEL i collab.¹² També hi ha un marcat canvi en la disposició de les crestes mitocondrials, de manera que totes estan orientades paral·lelament al microorganisme, el qual arriba a estar totalment envoltat per una anella de condriosomes. A més, hem observat que aquesta disposició no l'hem trobada al voltant dels microorganismes presents en les cèl·lules de l'epiteli intestinal; això podria contribuir a formular la hipòtesi per la qual la infestació de *Mytilicola* seria per via digestiva, com passa amb tants d'altres casos de parasitisme o de simbiosi, i

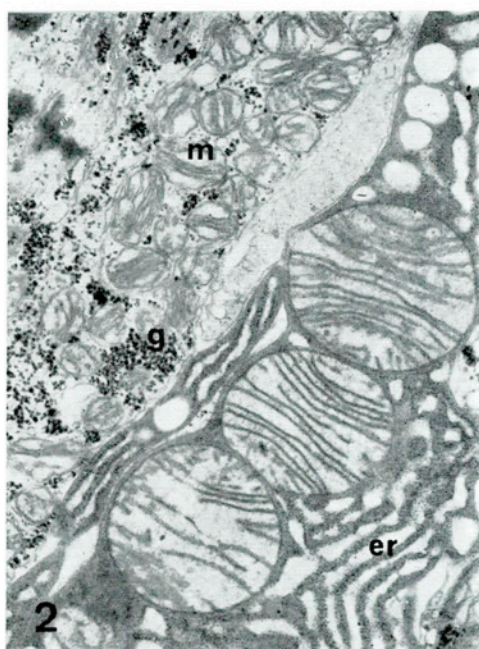


FIG. 1. — Imatge de dues mitocòndries disposades paral·lelament a cada costat de les membranes citoplasmàtiques de dues cèl·lules de l'epiteli intestinal (20.000 ×)

FIG. 2. — Mitocòndries d'una cèl·lula de l'epiteli tegumentari. Compareu llur grandària amb la de les mitocòndries que es troben a l'esquerra de la imatge, properes a la musculatura estriada de la paret del cos (17.000 ×)

FIG. 3. — Seccions de diferents mitocòndries, que ens permeten de veure una morfologia un xic diferent: dilatacions de la paret mitocondrial, inflaments i invaginacions (20.000 ×)

FIG. 4. — Disposició molt particular de les mitocòndries (ací amb crestes disposades paral·lelament a l'eix més llarg del condriosoma), envoltant el protozou (20.000 ×)

d'aquí passarien als altres òrgans. Com que la cèl·lula intestinal és el lloc d'entrada i de pas, no hi hauria, per dir-ho així, temps de provocar una organització d'aquest tipus, envoltant el protozou.

El fet que les mitocondries més pròximes a la cutícula de *Mytilicola* siguin les que presenten un aspecte ultraestructural més «normal» (o sigui que no presenten inflaments de la paret mitocondrial ni invaginacions atípiques, així com abundància de crestes, mentre que les de cèl·lules més internes presenten, habitualment, les anomalies abans esmentades) ens fa pensar que això pot estar en relació amb l'oxigen de què disposen aquestes cèl·lules.

La respiració en els Copèpodes és principalment cutània, i també la motilitat dels músculs dilatadors del recte permet un intercanvi d'aigua relacionat amb els processos respiratoris. Com que *Mytilicola* viu dins la glàndula digestiva del músclo, això fa que estigui en condicions pobres d'oxigen, si bé cal recordar que l'entrada d'aigua a la cavitat paleal del músclo és constant i, per tant, l'oxigenació pot ésser considerable.

L'oxigen entrarà per difusió i, per tant, les cèl·lules pròximes a la cutícula tindran un règim aeròbic; per això llur condrioma tindrà una morfologia típica, mentre que en les cèl·lules més internes la disposició d'oxigen serà molt inferior, per la qual cosa aquesta certa anòxia podria ésser la causant de les modificacions morfològiques de l'ultraestructura mitocondrial.

El fet que les mitocondries de les cèl·lules de l'epiteli intestinal, sobretot les de les cèl·lules del tracte final del digestiu, siguin de tipus normal la majoria de les vegades, corrobora la possibilitat de la difusió d'oxigen per la paret digestiva.

Ens és difícil de donar una explicació possible sobre la particular distribució de les mitocondries envoltant el protozou. Com que no hem trobat condriosomes amb crestes en el microorganisme, la seva respiració podria ésser anaeròbica o bé hom podria suposar que les mitocondries que l'envolten li forneixen una part de l'energia que produeixen. Possiblement l'observació de més seccions i algunes proves citoquímiques ens donaran noves dades, que faran possible de treure'n conclusions més precises. En el cas de poder demostrar aquest fet, hauríem d'admetre que el protozou seria un simbiote de *Mytilicola*.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDREU, B. — *Un parásito del mejillón. Propagación del copépodo parásito Mytilicola intestinalis en el mejillón de las rías bajas.* «Rev. Economía de Galicia», 17-18, 12-18, Vigo (1961).
2. BERNHARD, W. TOURNIER, P. i LORANS, G. — *Anomalies mitochondriales persistentes dans les cellules tumorales de Hamster induites par l'adénovirus 12.* «Comp. Rend. Acad. Sc. Paris», 261, 2137-2140 (1965).
3. FAIN-MAUREL, M. A. — *Variabilité de la structure mitochondriale dans les mucocytes des glandes digestives de Limmaea stagnalis L. (Gastéropode, Pulmoné).* «Comp. Rend. Acad. Sc. Paris», 267, 1614-1616 (1968).
4. GORDON, E. E. i BERNSTEIN, J. — *Effect of valinomycin on mitochondrial ultrastructure and function of intact Ehrlich ascites tumor cells.* «Biochem. Biophys. Acta», 205, 464-472 (1970).
5. HACKENBROCK, C. R. i REHN, T. G. — *Rapid ultrastructural transformation of mitochondria in the Ehrlich ascites tumor cell related to energy state.* «VII Congrès Intern. Grenoble», 3, 143-144 (1970).
6. KIESSLING, K. H. — *Ethanol and the human liver. Structural and metabolic changes in liver mitochondria.* «Cytobiologie», 2, 339-348 (1971).
7. KORRINGA, P. — *De aanval van de parasiet Mytilicola intestinalis op de zeeuwse Mosselcultuur.* «Supl. de Viserij-Nieuws», 7, 7 (1950).
8. LIPETZ, J. — *Ultrastructural comparison of transformed human cells and their normal counter parts at various passage levels.* «J. Ultrast. Res.», 44, 1-10 (1973).
9. MARX, R. — *Morphological changes in fat body mitochondria during larval development of the blowfly Calliphora erythrocephala Meigen.* «Cytobiologie», 3 (3), 417-420 (1971).
10. MORISSET, CH. — *Comportement des racines isolées de Lycopersicum esculentum Solanacées, cultivées in vitro et soumises à l'anoxie.* «Comp. Rend. Acad. Sc. Paris», 276, 311-314 (1973).
11. NOIROT-TIMOTHEE, C. i NOIROT, C. — *Liaison des mitochondries avec des zones d'adhésion intercellulaires.* «J. Microscopie», 6, 87-90 (1967).
12. PERISSEL, B., MALET, P. i GENEIX, A. — *Associations jonctions-organites cellulaires dans le foie néo-natal de souris.* «Z. Zellforsch.», 140, 77-89 (1973).
13. ROULLER, CH. i GANSLER, H. — *Contribution a la pathologie des mitochondries.* «Bull. Micr. Appl.», 5 (1-2), 17-20 (1955).
14. SMITH, V., SMITH, D. S. i YUNIS, A. — *Chloramphenicol related changes in mitochondrial ultrastructure.* «J. Cell Science», 7, 501-521 (1970).
15. VALLMITJANA, L. — *Consideraciones sobre la fisiología del condrioma.* «Acta Médica Hispánica», 4, 365 (1948).
16. VALLMITJANA, L. — *Contribución al estudio del condriosoma y otras formaciones protoplasmáticas.* «Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.», 55, 5-89 (1957).
17. VALLMITJANA, L. i DURFORT, M. — *Sobre unos parásitos del copépodo Mytilicola intestinalis Steuer.* «I Bienal Soc. Española Hist. Nat., Santander 1973» (en premsa).
18. YOTSUYANAGI, Y. — *Un mode de différenciation de la membrane mitochondriale évoquant le mésosome bactérien.* «Comp. Rend. Acad. Sc. Paris», 262, 1348-1351 (1966).