



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

BIOLOGIAKO GRADUA

GRADU AMAIERAKO LANA

***Arion ater* BAREAREN LISERI-
GURUINAREN KARAKTERIZAZIOA:
HURBILKETA HISTOLOGIKOA**

Joana Vitallé Andrade

Leioa, 2013ko uztaila

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

LABURPENA

Arion ater barea, ingurumeneko kutsaduraren organismo behale moduan erabiltzen da, horregatik, baldintza normaletan liseriketetan zehar liseri-guruina nola aldatzen den aztertzea interesgarria izan daiteke; izan ere, liseriketa dela eta ematen diren aldaketak eragina izan dezakete animaliotan neurtzen den hainbat parametrotan. Liseri-guruina, azino deituriko unitate funtzionalez osatua dago eta liseriketaz eta liseriketarako beharrezkoak diren sustantzien jariatzen arduratzen da. Liseri-epitelioan, hiru zelula mota bereizi dira: liseri-, eskrezio- eta kaltzio-zelulak. Hauen kopuruak, zein epitelioaren lodiera eta argiaren tamaina, liseriketa fasearen arabera aldatzen dira; aldaketa hauek, zelula mota bakoitzaren funtzioarekin erlazionatuak egonik. Honetaz gain, liseriketa aurrera doan heinean, mukopolisakaridoen garraioa dagoela ikusi da; ondorioz, liseri-traktuko, odol hodietako eta liseri-guruineko mukopolisakaridoen kopuruan desberdintasunak agertu dira.

The terrestrial slug *Arion ater* is used as sentinel organism in environmental pollution assessment. The investigation of the digestive gland in normal conditions during digestion can be interesting since changes in the digestion may affect measurements in other parameters. The digestive gland is formed by functional units that call acini and is responsible for the digestion and secretion of necessary substances. We have identified three types of cells in the digestive epithelium : digestive, secretory and calcium cells. The abundance of these cells, the thickness of the epithelium and the size of the light change depends on the digestive phase; these changes are related with the function of the cells. Furthermore, it have been observed that during digestion a relevant transport of mucopolysaccharides occurs; therefore, differences appear in the abundance of the mucopolysaccharides in the digestive tract, blood vessels and digestive gland.

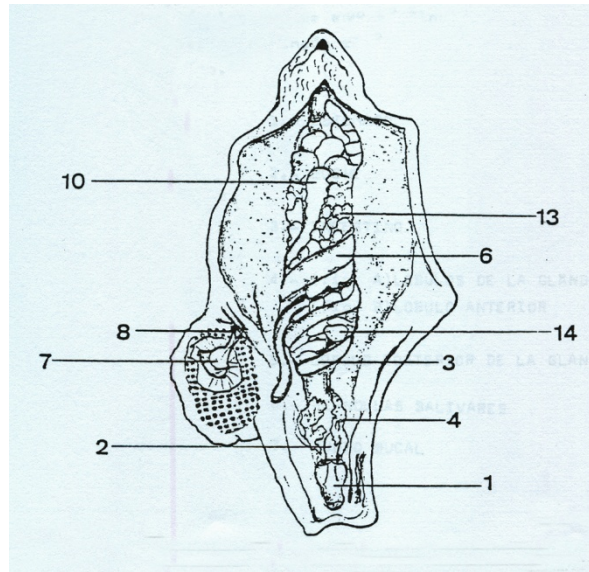
SARRERA

Arion ater (L), bareen artean arruntena dena, gastropodoen taldean sailkatzen den molusku pulmonatua da. 15-18 cm-ko luzera izatera heldu daiteke eta kolore desberdinetakoa izan daiteke, helduak direnean kolore ilunak nagusitzen dira, beltza batik bat. Toki heze eta freskoetan bizi da, batez ere basoetan eta animalia omniborua da. Bizimodu gautarra du eta sarraskiaz, gorotzez eta deskonposizioan dauden landarez elikatzen da batez ere. Nahiz eta animalia hermafrodita izan, bikotea aurkitzen dutenean ernalketa gurutzatua egiten dute (Menéndez Valderrey J. L., 2007).

Bareak egoera arruntean nolakoak diren aztertzea, interesgarria izan daiteke, oro har, kutsaduraren neurketan eta ebaluazioan organismo behale gisa funtzionatzen baitu. Izan ere, *Arion ater* batik bat, sarritan erabilia izan da ingurumeneko metalen maila neurtzeko (Berger B. & Dallinger R., 1993). Animalia hauek, bazkatu ostean, gordeleku berera bueltatzen dira eta metro karratu gutxiko azalera batean mantentzen dira, beraz, barearen barneko metalen mailak, potentzialki, ingurune horretako airean eta lurzoruetan dagoen metal astunen kutsadura maila islatzen du. Honetaz gain, *Arion ater* landa zein hirietako habitatetan bizi da, hau da, metalen maila altu zein baxuko inguruetan aurki daiteke. Ondorioz, espezie bereko indibiduoak ingurune desberdinetatik har daitezke eta honela, espezie desberdinak erabiltzeak ekartzen dituen arazoak ekiditen dira, izan ere, bare edo gastropodo espezie desberdinen artean, desberdintasunak egon daitezke metalen absortzioari dagokionez (Popham J. D. & D'Auria J. M., 1980).

Arion ater barearen anatomiarri dagokionez, liseri guruina atal interesgarria izan da, ingurumeneko kutsaduraren adierazle moduan erabili baita kasu askotan. Izan ere, liseri-guruinean burutzen da, besteak beste, kutsaduraren metaketa, metabolizazioa eta irazketa. Honetaz gain, kutsatzailea lehenbizi hartzen duen organoa da eta bertako zeluletan ematen da kutsatzailearekiko lehenbiziko erantzuna.

Animalia honen liseri hodiak eta honi erantsiak dauden guruinek, gorputzaren barrunbe gehiena betetzen dute eta indibiduo gazteetan, sexu organoak garatuak ez daudenez, "U" forma aurkezten du. Liseri hodiak, liseri guruina inguratzen du, zeinek bolumen handia hartzen duen (1.Irudia). Azken hau, ehun konjuntiboaren bitartez lotutako hodi adarkatuez osatua dago eta hodi bakoitza eskrezio unitate moduan jokatzen du, azino moduan izendatzen dena. Azinoak haien artean hodixka batzuen bitartez komunikatzen dira eta hauek elkarren artean lortzen dira hodi nagusi bat eratuz, zeina urdailari lotua dagoen. Azinoen argiaren tamaina, honen aktibitatearen arabera izaten da; aktibitatea handia denean argiaren tamaina txikiagoa da eta aktibitatearik ez dagoenean handiagoa. Liseri guruina, barearen hemozelean kokatua dago, masa bat eratuz eta mintz peritoneal mehe batez estalita dago. Bi lobuluetan bananduta dago, aurrekoa eta atzekoa, baina ezaugarri hau ez da gastropodo guztietan ikusten (1.Irudia). Guruin honen funtzio nagusia, urdaileko liseriketarako beharrezkoak diren sustantzien jariapena da, hala ere, ikerlari batzuek diotenez beste funtzio batzuk eduki ditzake (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981).



1.Irudia. Barearen anatomia. 13: liseri guruinaren atzeko lobulua, 14: aurreko lobulua eta 6: urdaila (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981).

Liseri guruinaren histologiari erreparatuz, liseri epitelioan, zelula mota desberdinak bereizten dira. Zenbait autoreen artean eztabaida egon da zelula moten kopuruaren inguruan, Walker G.-ren (1970) arabera esaterako, lau mota daude, baina beste batzuen arabera gehiago edo gutxiago. Ikerketa honetan, hiru zelula mota aztertu ziren: liseri-zelulak, eskrezio-zelulak eta kaltzio-zelulak (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981).

Liseri-zelulak, haien funtzio eta ugartasuna dela eta, azinoaren parte nagusia osatzen dute. Aktibitatearen arabera, epitelioaren egitura kubikoa edo prismatikoa osatzen dute eta nukleo basalak dituzte, nahiko txikiak direnak. (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981). Zelula hauen funtzioa, liseriketan beharrezkoak diren entzimen jariatzea da eta ondorioz, zonalde apikalean eskrezio-pikor ugari agertzen dira, lisosomekin erlazionatuak izan direnak (Dimitriadis V.K. & Konstantinidou V., 2002).

Kaltzio-zelulak, tamaina handiko nukleo bakarra duten zelulak dira, gainerako zelulengandik desberdintzen duen ezaugarri nagusia izanik eta liseri-zelulak baino zabalagoak dira, borobilduagoak. Beste ezaugarri bereizgarri bat, zitoplasma osotik dituen besikulak dira eta kasu gehienetan, azinoaren atal irregularretan agertzen dira, erpinak agertzen diren tokietan ... (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981). Zelula hauen funtzioa ez da ezaguna, hala ere, hainbat hipotesi proposatu izan dira honen inguruan, batik bat, oreka osmotikoarekin edo mukiaren eraketarekin erlazionatuak daudenak (Zubiaga A.M., 1982).

Eskrezio-zelulak, lipofuszinaren agerpenagatik bereizten dira batez ere eta liseri-zelulen berdina den nukleo txiki bat dute. Zelula hauen barnean, lipofuszinak dituen bakuola handi bat

agertzen da eta kasu honetan ere, zelula borobilduak dira. Nahiz eta zutabe-egitura edo egitura kubikoa mantendu, taldekatzeko joera txikiagoa dute beste bi zelula motekin alderatuz (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981).

Esperimentuan zehar ematen diren aldaketak ikusteko, teknika histologikoak aplikatu dira. Teknika hauen bitartez, ehun eta zelula mailan ematen diren aldaketak azter daitezke eta maila honetan emandako erantzunak, organismo edo populazio mailan ematen direnak aurrerako balio dute (McCarthy, J.F. & Shugart, L.R., 1990). Honetaz gain, mikroskopia erabiltzean, esperimentuan zehar ematen diren aldaketak ikusi egin daitezke eta hau, gainerako metodoekiko abantaila bat da.

Ikerketa honen helburua, baldintza arruntan pean dagoen *Arion ater* barearen liseri-guruinaren zelulak eta ehunak aztertzea da, liseriketa aurrera doan heinean, prozesu honetan zehar ematen diren aldaketak behatuz.

MATERIAL ETA METODOAK

Esperimentu hau aurrera eramateko, *Arion ater* espezieko 8 bare harrapatu ziren Gorlizan. Laginketa apirilean egin zen, gauean hain zuzen, bareak aurkitzeko probabilitatea handiagoa baita. Ondoren, bareak laborategira eramane eta baraualdian mantendu ziren 24 orduz, 18°C-tan.

Behin bareak lortuta, janariaren prestaketa egin zen. Horretarako, alde batetik, sagarra, azenarioa eta letxuga nahastu ziren proportzio berean, 66 g bakoitzeko hain zuzen, eta dena nahastuz pure bat lortu zen. Beste alde batetik, 7.5 g agar 150 ml ur bidestilatuan disolbatu ziren. Azken honi, poliestirenozko esferatxoak gehitu ziren, 10 µm-ko diametroa zutenak. Amaitzeko, aurreko guztia nahastu, mikrouhinean berotu eta Petri kutxetan sartu zen, hozten utziz. Bazka solidotzean, prest zegoen bareei jaten emateko.

Bareak bazkatzen hasi ziren eta denbora tarte desberdinetan fixatzaile baten bitartez hil ziren. Fixatzailearen prestaketarako, Fosfato monosodikoa (2,56 g), Fosfato disodikoa 12H₂O (28,92 g) eta ur destilatua (1000 ml) nahastu ziren lehenbizi. Ondoren, disoluzioa pH 7,4-ra doitu eta NaCl (7,5 g) bota zen. Azkenik, 100 ml Formaldehido (%40) gehitu zitzaion. Bareak hiltzeko, fixatzailea xiringa baten bitartez injektatu zen bareen barrunbe zelomikoan, jaten hasi zirenetik 0,1,2,4,8 eta 24 orduetara. 1 eta 2 orduetan bi bare hil egin ziren, gainerakoetan berriz

bakarra. Amaitzeko, bare hilak 4°C-tan fixatzen utzi ziren 24 orduz eta ondoren alkoholaren sartu ziren mantentzeko.

Behin laginak fixatuak, mikroskopia laginen prestaketa egin zen. Honetarako lehenbizi, disezioa egin zen liseri traktua erauzteko. Ondoren, laginak deshidratatu eta parafina likidoan sartu ziren ohiko histologiako protokoloa jarraituz. Parafinazko blokeak eratzeko, lagina eta parafina likidoa molde batzuetara bota ziren eta giro tenperaturan utzi ziren solidotzen. Jarraian, laginen mozketa egin zen, bakoitzeko bi erreplika moztu ziren eta plaketan jarri ziren. Amaitzeko, bi tindaketa desberdin egin ziren: alde batetik, Hematoxilina-eosia tindaketa topografikoa eta beste alde batetik, Alcian urdina, mukopolisakaridoak ikustarazteko tindaketa histokimikoa (1 eta 2.Taulak). Bi kasuetan, laginen estalkiak DPX erabiliz jarri ziren.

Esperimentuari amaiera emateko, lagin desberdinen azterketa egin zen mikroskopia optikoan. 100, 200 eta 500 µm-tako eskalan behaketak egin eta argazkiak atera ziren.

1 eta 2.Taula. Hematoxilina-eosina eta Alcian urdina tindaketa.

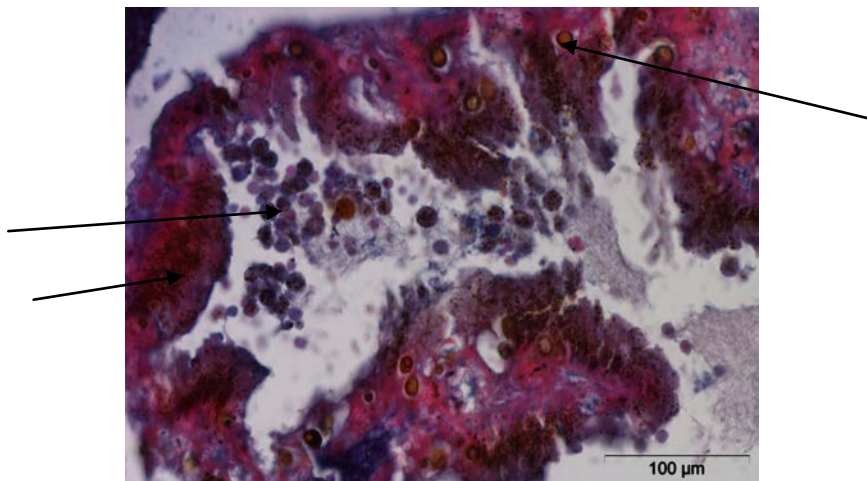
Xilol	10 min
Xilol	10 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol %96	2 min
Etanol %70	2 min
Txorrotako ura	5 min
Hematoxilina	4 min
Txorrotako ura	4 min
Alkohol azidoa	10 seg
Ur destilatua	3 min
Litio karbonatoa	10 seg
Txorrotako ura	2 min
Eosina	2 min
Txorrotako ura	2 min
Etanol %70	2 min
Etanol %80	2 min
Etanol %96	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Xilol	5 min
Xilol	5 min

Xilol	10 min
Xilol	10 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol %96	2 min
Etanol %70	2 min
Txorrotako ura	5 min
Alcian urdina	30 min
Ur destilatua	30 seg
Ur destilatua	30 seg
Ur destilatua	3 min
Etanol %70	2 min
Etanol %80	2 min
Etanol %96	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Xilol	5 min
Xilol	5 min

EMAITZAK

Hematoxilina-eosina-z tindaturiko laginak, mikroskopia optikoan behatu eta aztertu ziren. Honela, zelula desberdinak aztertu ziren; liseri-zelulak, eskrezio-zelulak eta kaltzio-zelulak hain zuzen. Liseriketan zehar, zelula mota bakoitzaren kopuruan emandako aldaketak aztertu ziren eta hiru zelula motak kontuan harturik, hauen kopuru erlatiboak ere. Orokorrean, erlatiboki portzentaje altuena liseri-zelulek aurkezten zuten eta baxuena berriz kaltzio-zelulek, hala ere, kopuru erlatiboetan desberdintasunak agertu ziren ordu desberdinetako laginetan. Honetaz gain, epitelioaren altuera eta argiaren tamaina desberdinak agertu ziren liseriketan zehar. Laginetan ere, odol hodiei erreparatu zitzairen. Amaitzeko, aipatu beharra dago, laginetan ez zirela mikroesferarik behatu.

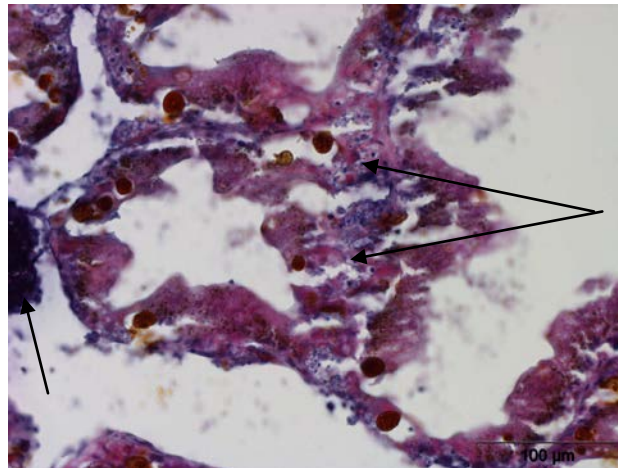
Esperimentuaren hasieran (0 denbora) epitelioaren altuera ertaina eta argiaren tamaina handia behatzen ziren. Epitelioan zehar, liseri-zelulak kopuru ertainean ikusten ziren eta haien bereizgarri diren pikorrak ere. Eskrezio-zelula gutxi batzuk agertzen ziren, kaltzio-zelulak berriz, oso urriak ziren. Lagin honen ezaugarri bereziena, argian kokatutako jariakin ugariak ziren, ez baitziren gainerako laginetan agertu (2. Irudia).



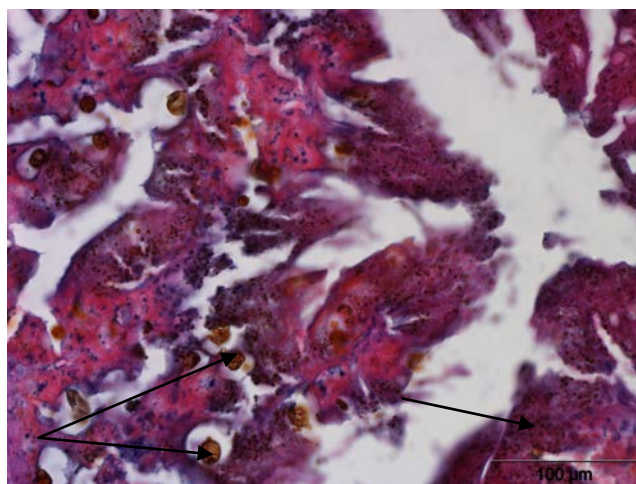
2.Irudia. Baraualdian mantendutako barearen lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero (0h). Bi zelula mota seinatuak agertzen dira: eskrezio zelulak, zelula marroi eta borobilak direnak, eta liseri zelulak, epitelioan zeharreko pikordun zelulak. Gainera, argian dauden jariapen besikulak adierazita daude.

Ordu bat beranduago, eskrezio-zelulen kopuruaren emendioa ikusi zen eta kaltzio-zelulen kasuan joera berdina behatu zen. Epitelioaren altuerari eta argiaren tamainari

dagokionez, ordu honetan lortutako bi bareen laginetan desberdintasunak agertu ziren; izan ere, baraualdian mantendutako barearen laginarekin alderatuz, 1h-tako lehenengo bareak epitelio baxuagoa eta argiaren tamaina handiagoa aurkezten zuen eta bigarrenak berriz kontrakoa. Liseri-zelulen kopuruari dagokionez ere, desberdintasunak agertu ziren, lehenengoan liseri-zelulen kopurua baxuagoa zen eta bigarreanean aldiz altuagoa (3 eta 4. Irudiak).

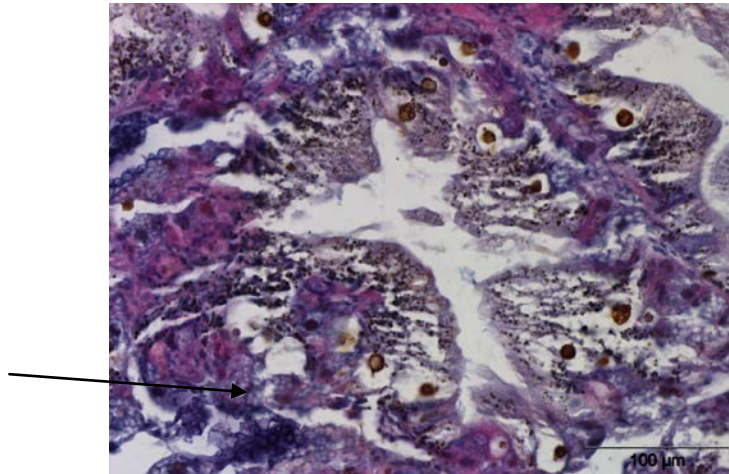


3.Irudia. Jaten hasi zenetik ordu batera lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero, lehenengo barea (1h¹). Geziek alde batetik, odol hodi bat seinalatzen dute, ezkerrean agertzen den orban iluna. Beste alde batetik, kaltzio zelulak adierazita daude, besikula antzeakoak direnak eta nukleo nabaria dutenak.

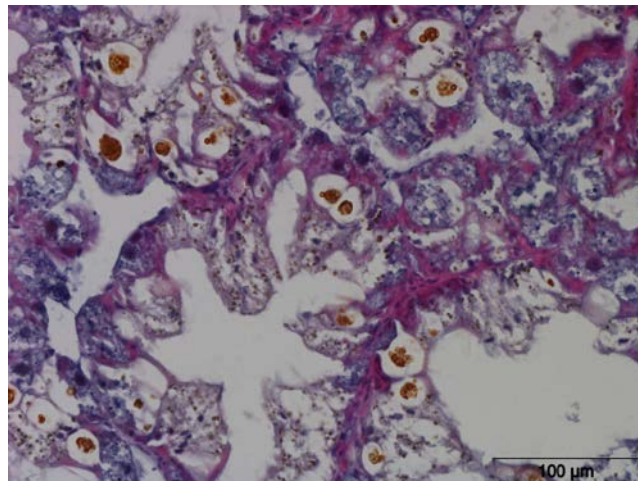


4.Irudia. Jaten hasi zenetik ordu batera lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero, bigarren barea (1h²). Eskrezio-zelulak eta liseri-zelulak adierazita daude.

Jaten hasi zenetik bi ordu igarotzean, epitelioa loditu eta argiaren tamaina txikitu zen. Liseri-zelulen eta eskrezio-zelulen kasuan, kopurua altuagoa zen aurrekoarekin alderatuz eta kaltzio-zelulen kasuan, nabarmenki altuagoa (5 eta 6. Irudiak).



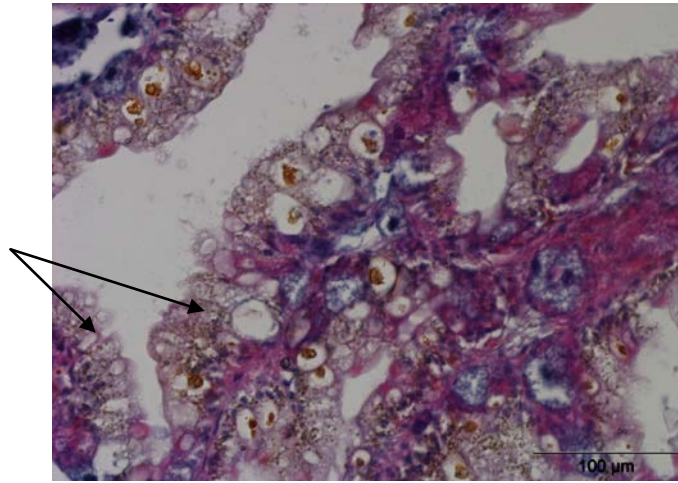
5.Irudia. Jaten hasi zenetik bi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero, lehenengo barea ($2h^1$). Kaltzio zelulak seinaltatuak daude.



6.Irudia. Jaten hasi zenetik bi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero, bigarren barea ($2h^2$).

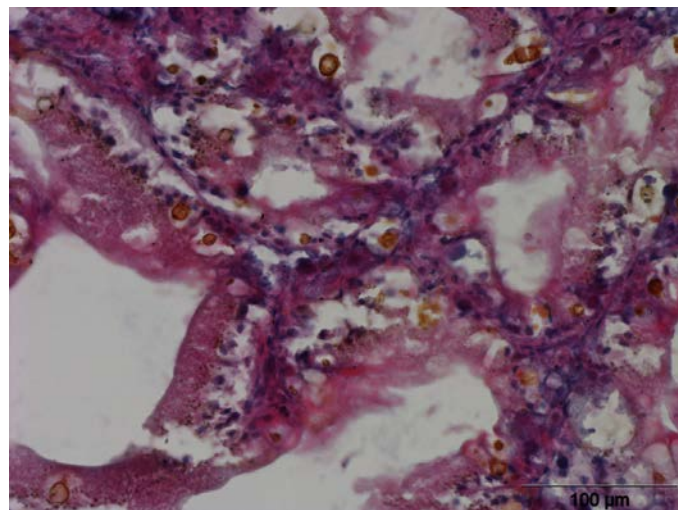
Lau ordu beranduago, barearen liseri-guruinak, aurrekoaren oso egitura antzekoa erakutsi zuen, izan ere, epitelio nahiko altua eta argiaren tamaina nahiko txikia zen eta liseri- eta eskrezio-zelulen kopurua altua. Hala ere, honetan kaltzio zelula gehiago ikusten ziren, baina

ezberdintasuna ez zen oso nabaria. Bestalde, exozitosi-besikula gehiago agertzen zirela azpimarratu beharra dago, batez ere, liseri-zelulen eta eskrezio-zelulen inguruan (7.Irudia).



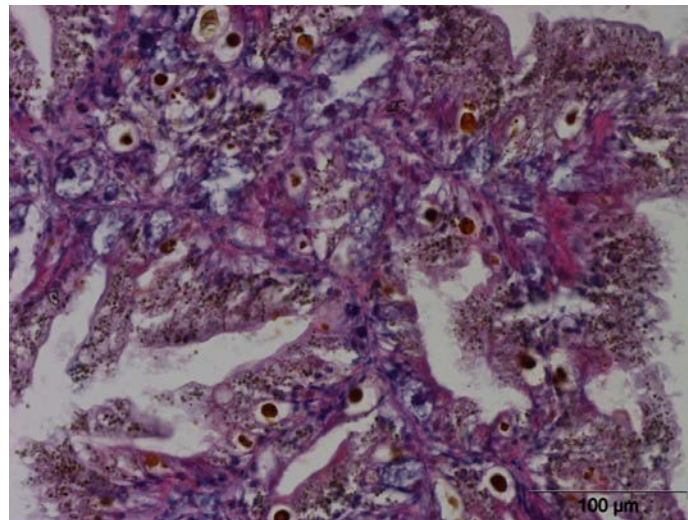
7.Irudia. Jaten hasi zenetik lau ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero (4h). Exozitosi-besikulak seinatuak daude.

Jaten hasi zenetik zortzi ordutara, epitelioaren altuera pixka bat emendatu eta argiaren tamaina pixka bat murriztu zen aurrekoarekin alderatuz. Liseri-zelulen kopurua altua izaten jarraitzen zuen eta eskrezio-zelulena oraindik gehiago emendatu zen. Kaltzio-zelulen kasuan berriz, kopurua, bi eta lau orduetakoan baino baxuagoa izan zen (8.Irudia).



8.Irudia. Jaten hasi zenetik zortzi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero (8h).

Esperimentua hasi eta hogeita lau ordu beranduago, aldaketa nabarmena ikusten zen aurrekoekin alderatuz. Epitelioa oso altua eta argiaren tamaina oso txikia aurkezten zuen. Horretaz gain, epitelioa altua zenez, liseri-zelulek bolumen handia hartzen zuten, zelulak handiagoak eta pikorrak ugariak izanik, hala ere, zelulen kopurua erlatiboki baxuagoa zen aurrekoarekin alderatuz. Eskrezio-zelulen kasuan berriz, kontrakoa behatu zen; hauen kopuru erlatiboa nabarmenki emendatu zen. Kaltzio zelulak, nahiz eta hiru zelula moten artean urriena izan, gainerako laginetan baino kopuru altuagoan agertzen ziren (9.Irudia). Honetaz gain, odol hodi baten barnean, parasitoak aurkitu ziren (10.Irudia).



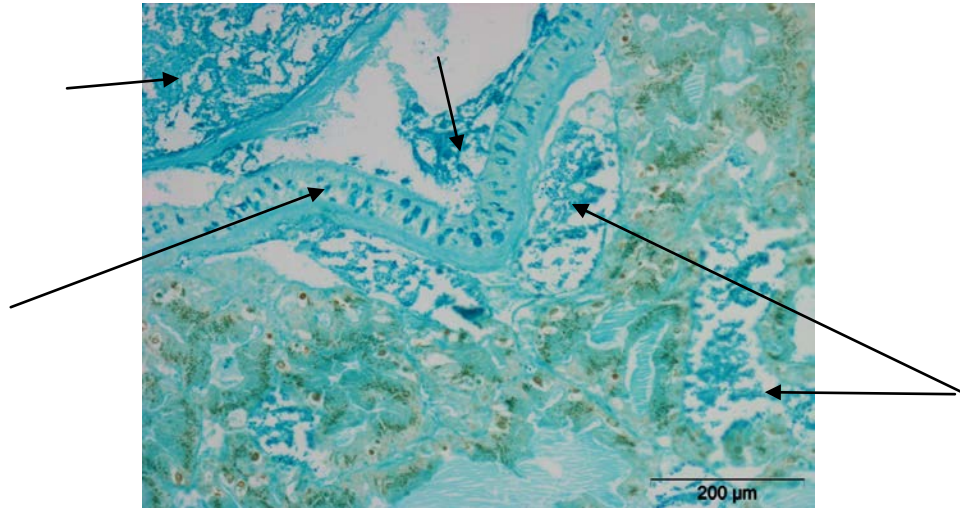
9.Irudia. Jaten hasi zenetik hogeita lau ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero (24h).



10.Irudia. Jaten hasi zenetik hogeita lau ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, hematoxilina-eosinaz tindatu eta gero. Gezien bitartez, odol hodi bat (more iluna) eta bere barneko parasitoak (arrosa) seinalatuak agertzen dira.

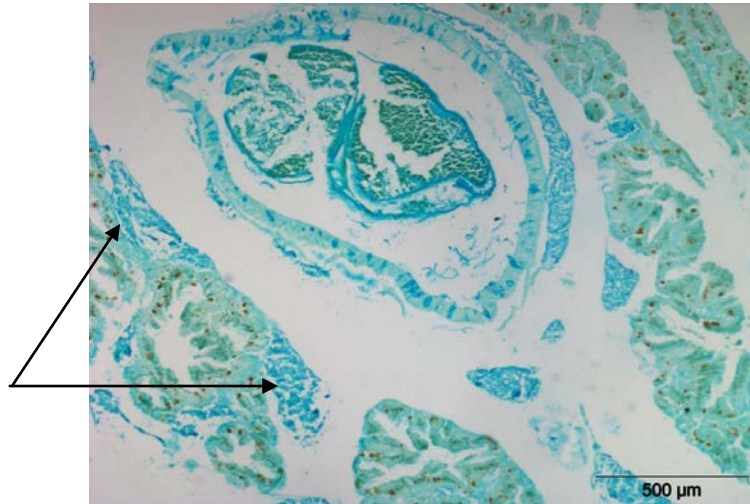
Alcian urdinez tindaturiko laginen argazkietan ere, taldeen arteko desberdintasunak behatu ziren. Honen bitartez, mukopolisakaridoei buruzko informazioa lortu zen, azken hauek urdinez tindatuak agertzen baitziren.

Baraualdian mantendutako barearen kasuan, mukopolisakaridoak laginaren gune desberdinetan agertzen ziren. Hasteko, urdailaren epitelioari erreparatuz, ikus zitekeen mukopolisakaridoak agertzen zirela. Honetan, seinalerik altuena, urdaileko epitelioan zehar dauden zelula jariatzaileen inguruan behatu zen. Odol hodiekin ere mukopolisakaridoak erakutsi zituzten, baina kasu honetan kopuru txiki batean. Lagin honetako kantitate handiena, liseri-traktuan behatutako materialean agertzen zen, janariaren arrastoez edo jariatutako hondakinez osatua egon zitekeena. Liseri-guruinaren epitelioan berriz, mukopolisakaridoak oso urriak dira (11.Irudia).

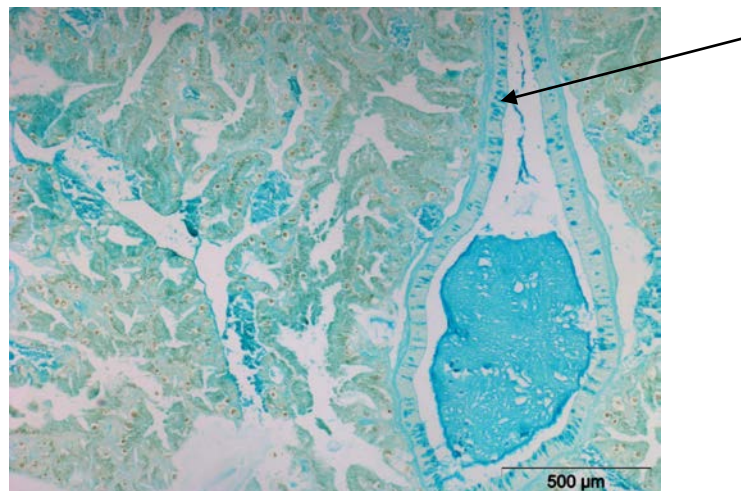


11.Irudia. Baraualdian mantendutako barearen lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero (0h). Elementu desberdinak seinlatuak daude: ezker eta goiko aldean janariaren arrastoak, erdialdean urdailaren epitelioa eta honen gaineko mukopolisakaridoak eta eskuineko aldean odol hodiak.

Ordu bat igarotzean, baraualdian mantendutako barearekin alderatuz, urdailean mukopolisakarido gutxiago behatu ziren, odol hodietan aldiz, gehiago. Lagin honetan ere, urdailaren barnean mukopolisakarido ugariko materiala agertzen zen, baina kasu honetan, argi zegoen janaria zela. Liseri-guruinean, mukopolisakaridoen kopurua oso baxua mantentzen zen (12 eta 13. Irudiak).

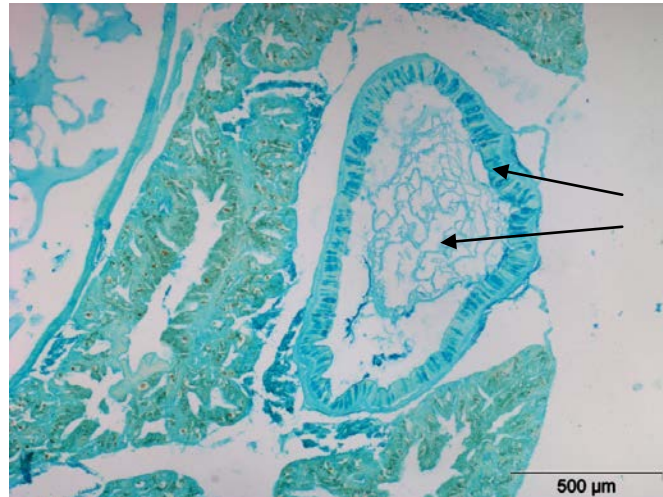


12.Irudia. Jaten hasi zenetik ordu batera lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero, lehenengo barea (1h¹). Odol hodiak adierazita daude.

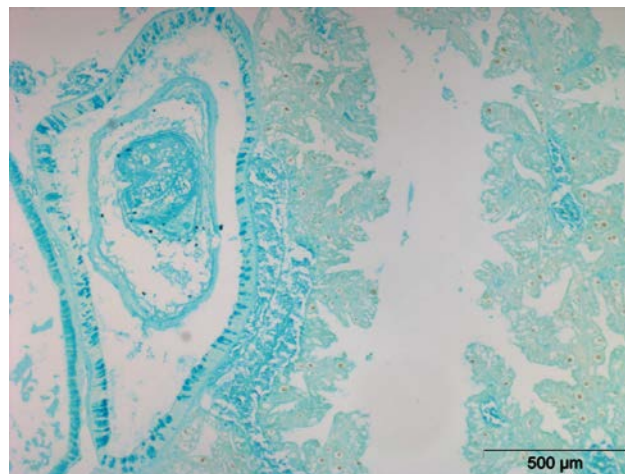


13.Irudia. Jaten hasi zenetik ordu batera lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero, bigarren barea (1h²). Urdaileko epitelioan dauden zelula jariatzaileak adierazita agertzen dira.

Jaten hasi zenetik bi ordu beranduago, urdaileko epitelioko zelula jariatzaileen kopuruaren emendio nabarmena ikusten zen eta beraz, urdailaren barneko mukopolisakaridoen kantitatea ere altua zen. Odol hodiak berriz, aurreko laginaren antzekoa zen. Liseri-guruinaren kasuan, nahiz eta mukopolisakaridoen kopurua oraindik ere baxua mantendu, emendio txiki bat ikusi zen (14 eta 15. Irudiak).

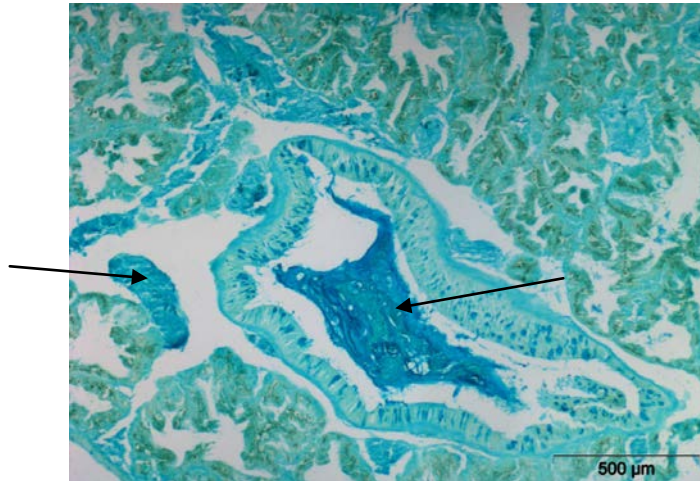


14.Irudia. Jaten hasi zenetik bi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero, lehenengo barea (2h¹). Urdaileko epitelioko zelula jariatzaileak eta hauek sortzen duten mukopolisakaridoa seinalatua dago.



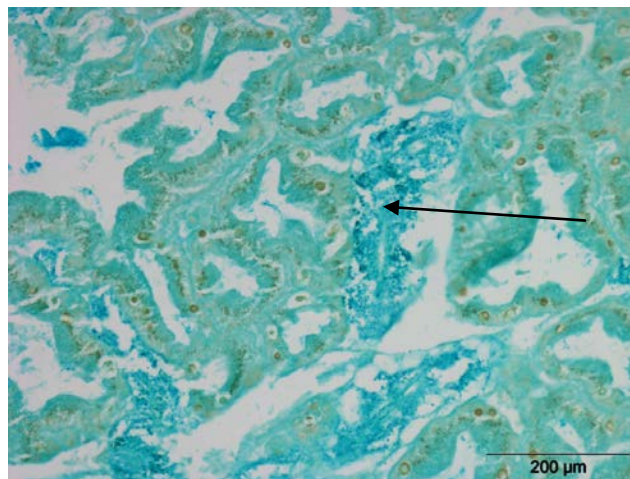
15.Irudia. Jaten hasi zenetik bi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero, bigarren barea (2h²).

Esperimentua hasi zenetik lau ordutara, mukopolisakarido ugari zituzten odol hodiak behatzen ziren eta urdailaren barneko janariak ere kopuru handia zuen. Zelula jariatzaileen kopuru altua mantendu egiten zen, hala ere, 2h-ko laginekin alderatuz, gutxiago agertzen ziren. Liseri-guruinari dagokionez, mukopolisakaridoen kopurua pixka bat emendatu zen (16.Irudia).



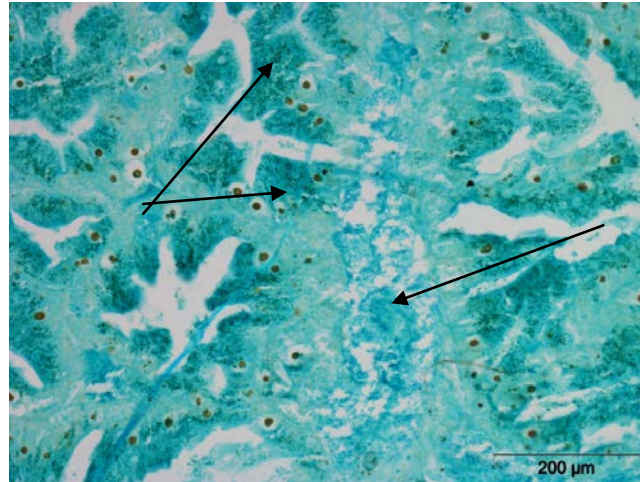
16.Irudia. Jaten hasi zenetik lau ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero (4h).

Jaten hasi zenetik zortzi ordutara, lagina, lau ordukoaren oso antzekoa zen, desberdintasun bakarra, odol hodiien mukopolisakarido kopurua baxuagoa zela da, hala ere, aldea ez zen oso handia. Liseri-guruinean ere, kopurua aurrekoaren antzekoa zen (17.Irudia).



17.Irudia. Jaten hasi zenetik zortzi ordutara lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero (8h). Odol hodi bat seinalatua dago.

Jaten hasi zenetik hogeita lau ordutara lortutako lagina, gainerakoetatik oso desberdina zen. Izan ere, odol hodiekin oso mukopolisakarido gutxi zuten eta liseri-guruinak berriz asko, batez ere, liseri-zelulen inguruan (18.Irudia). Urdailean, mukopolisakarido gutxi behatu ziren.



18.Irudia. Jaten hasi zenetik hogeita lau orduz lortutako lagin mikroskopikoa, Alcian urdina tindaketa burutu eta gero (24h). Gezien bitartez, liseri guruinaren liseri-zelulak (ezkerraldean) eta odol hodi bat (eskuinaldean) seinaltatuak daude.

EZTABAIDA

Lan honetan, urdaila, odol hodiak eta liseri guruinaren zelulak eta epitelioa aztertzean lortutako emaitzetatik abiatuta, desberdintasun esangarriak behatu dira talde desberdinen artean.

Hasteko, laginetan ez ziren mikroesferarik agertu eta bareen janaria aztertuz hauen eza ere ikusi zen, beraz, metodologian akatsen bat egon zela pentsatzera eramaten gaitu; seguruenik, esperimentuan zehar erabilitako konposatu baten eraginez edo beroaren eraginez desegin ziren. Honela, mikroesferen ibilbidearen inguruan ezin izan dira ondorioz lortu.

Liseri-guruinaren epitelioaren lodierari eta argiaren tamainari dagokionez, desberdintasunak ikusi ziren ordu desberdinetako laginetan. Orokorrean joera berdina da kasu guztietan; zenbat eta denbora gehiago eraman bazkatzen, epitelioa lodiagoa eta argiaren tamaina txikiagoa dira, 2 eta 9. Irudiak alderatuz joera hau ondo desberdindu daiteke. Aldaketa hau, azinoaren aktibitatearekin erlazionatua dago. Izan ere, azinoak aktibitatearekin ez duenean, guruinaren epitelioa kubikoa da eta ondorioz argi handia uzten du bere barnean, azinoa aktibo dagoenean berriz, epitelioaren egitura prismatikoa izatera pasatzen da eta argiaren tamaina txikitzen da (Isasi I. & Marigomez J.A., 1981). Gainera, aurretik aipatu den moduan, azinoaren

funtzioa urdaileko liseriketarako beharrezkoak diren sustantziak jariatzea da eta beraz, barea denbora gehiago bazkatzen usten bada, janari gehiago barneratuko du eta sustantzien jariatzea, hau da, azinoen aktibitatea, handiagoa da, epitelioaren altuera emendatuz.

Zelula mota desberdinen azterketatik lortutako emaitzek, ondorio desberdinetara bideratzen gaituzte.

Liseri-zelulen kopurua, gero eta altuagoa izan zen; izan ere, 0h eta 1h¹ laginetan, kopurua baxua zen (2 eta 3. Irudiak) eta azkeneko laginetan berriz, 4h eta 8h-etan batez ere, kopurua askoz altuagoa zen (7 eta 8. Irudiak). 24h-ko laginean ordea, zelula hauen kopuru erlatiboa txikiagoa zen (9. Irudia). Honetaz gain, zelulen ugartasunaren emendioarekin batera, zelula honen bereizgarriak diren pikorren kopuruaren emendioa ere ikusten zen; 24h-ko laginean berriz, nahiz eta zelulen kopuru erlatiboa baxuagoa izan, pikorrek oso ugariak ziren (9. Irudia). Honen arrazoa, liseri-zelulen funtzioarekin zerikusia du. Zelula mota honek, liseriketarako beharrezko sustantziak jariatzen ditu, beraz, bareak janari gehiago barneratzean hauen aktibitatea emendatu behar da, honetarako, hauen kopurua emendatzen da eta barneko jariatzen pikorrena ere. Liseriketaren fase berantiarrean aldiz, liseri-zelulen kopurua baxuagoa da, jada janari gehiena liserituta baitago eta hauetako asko, eskrezio-zelulak bilakatzen baitira.

Eskrezio-zelulei erreparatuz, orokorrean liseri-zelulen joera berdina ikusi zen, hau da, zenbat eta denbora gehiago bazkatzen egon, orduan eta ugariagoak ziren, 24h-tako laginean batez ere (9. Irudia). Honen azalpena, liseri-zeluletan dutela jatorria izan daiteke, hau da, liseri-zelulak, eskrezio-zelulak bilakatzen dira, gehienbat, liseriketaren azken faseetan. Ondorioz, liseri-zelulen kopurua emendatzen denean, pixka bat beranduago, eskrezio-zelulena ere. 24h-ko laginaren kasuan, lehen esan bezala, liseri-zelula gutxiago eta eskrezio-zelula gehiago zeuden, liseriketaren azkeneko faseetan, liseri-zelula asko eskrezio-zelulak bilatzen baitira (Zaldibar B. *et al.*, 2007)

Kaltzio-zelulen kasuan, nahiz eta erlatiboki zelula motarik urriena izan, denbora aurrera joan ahala ugariagoak ziren. Hala ere, aipatu beharra dago, beste ikerketa batzuetan kaltzio-zelulek kopuru erlatibo altuagoa aurkezten zutela (Zubiaga A.M., 1982). Zelula hauen kopuruaren emendioa, hasierako laginetan ere ikusten zen; izan ere, jan gabeko barearen laginean ez ziren ia kaltzio zelularik agertu eta jaten ordu bat egon eta gero berriz, kopuru ertainean agertzen ziren (2 eta 3. Irudiak). Zelula mota honen funtzioa ezezaguna izanik, ezin dira ondorio zuzenak atera, hala ere, kaltzioaren funtzioak ezagunak dira eta hauek erlazionatuak egon daitezke liseriketarekin. Kaltzioa oreka osmotikoan eta mukiaren eraketan parte hartzen du, beraz, kontuan hartuta kaltzio zelulen kopurua emendatu dela, pentsa dezakegu nolabaiteko abantaila edo laguntza ematen dutela liseriketa prozesuan zehar, esaterako, erreserba moduan edo babeserako erabiliz.

Bestalde, jaten hasi zenetik hogeita lau ordutara lortutako laginean, odol hodi batean parasitoak ikusi ziren (10.Irudia). Seguruenik, Rhabditida ordenako nematodo baten aurrean gaude. Oraingoz, ez da inolako erlaziorik aurkeztu parasito hauen eta liseriketa prozesuaren artean, hala ere, esperimentu honetan ez da baztertu nolabaiteko eragina izan dezakeela.

Alcian urdinez tindaturiko laginetan lortutako emaitzek, liseriketa aurrera joan heinean mukopolisakaridoen banaketa desberdina dela adierazten zuten. Oro har, lagin guztien kasuan, mukopolisakaridoen kopuru handiena janarian agertzen zen; janaria lagin gehienetan agertu zen liseri-traktuan, 0h laginean barne (11.Irudia). Berez, azken honetan, ez litzateke janaririk agertu behar, baina agian arrastoak geratu ziren nahiz eta 24 orduz jan gabe egon. Hala ere, azken hau, ez dago argi; seguruenik, laginean agertzen den materiala ez zen janaria izango, baizik eta jariaturiko hondakinak. Honetaz aparte, mukopolisakaridoaren banaketan aldaketak behatu ziren urdailari eta odol hodieie dagokienez. Izan ere, hasierako orduetan, mukopolisakaridoak ugarituz joaten ziren urdailaren barnean, urdaileko epitelioko zelulen kopurua ere emendatuz, eta odol hodietan berriz kontrakoa ikusi zen (11, 12, 13, 14 eta 15. Irudiak). Denbora aurrera joan heinean, gero eta mukopolisakarido gutxiago agertzen ziren urdailean eta gehiago odol hodietan (16 eta 17.Irudiak). Honekin ondoriozta daiteke, liseriketaren hasieran, urdailaren barnean mukopolisakarido gehiago daudela. Izan ere, janaria barneratzean urdaileko epitelioko zelula jariatzaileek mukopolisakaridoak jariatzen dituzte. Liseriketaren fase berantiarraioan berriz, urdaileko epitelioko zelula jariatzaileak hustuz doaz eta beraz, urdailean seinale txikiagoa ikusten da. Gero, elikagaietatik eskuratzen diren mukopolisakaridoak, odolera pasatzen dira xurgapenaren edo antzeko mekanismo baten bitartez. Gainera, jaten hasi zenetik hogeita lau ordutara lortutako lagina, gainerakoekiko oso desberdina izan zen; odol hodietan mukopolisakarido gutxi agertzen ziren eta liseri guruinean berriz ugari (18.Irudia). Bi hipotesi proposatu dira honen inguruan: lehenengoa, bareen liseriketan zehar, mukopolisakaridoen ibilbidea modu horretan ematen dela, hau da, urdailetik odol hodietara eta beranduago odol hodietatik liseri guruineko epiteliara, eta bigarrena, bare horretan aurkitutako parasitoek nolabaiteko eragina izan zutela, mukopolisakaridoetan mugimendu hau eraginez.

Amaitzeko, 2.Irudian ikus daitekeen moduan, jan gabeko barearen laginean, liseri-traktuaren argian jariakinak agertu ziren. Hauek, ez ziren gainerako laginetan agertu eta beraz, ezaugarri bereizgarria da. Honen azalpen bat, autofagositozi prozesu baten aurrean gaudela izan daiteke, hau da, janariaren falta dela eta, bareak bere zelulak aprobetxatzen ditu bertatik mantenugaiak lortzeko (Alberts B. *et al.*, 2002)

Oro har, esperimentu honen bitartez, liseriketan zehar ematen diren hainbat aldaketa argi geratu dira. Bazkatzen utzitako denbora emendatuz doan heinean, epitelioa lodituz eta argiaren tamaina txikituz joaten da, batez ere, liseri-zelulen tamaina eta pikorren kopurua handituz. Lan honetan desberdindutako hiru zelula motei dagokienez, liseriketaren fase goiztiarrean, janaria liseritu gabe dagoenean, liseri-zelulen kopurua emendatuz doa, baita eskrezio zelulena ere; fase berantiarrean aldiz, janari gehiena liserituta dago eta liseri-zelula asko eskrezio-zelulak bilakatzen dira, ondorioz, lehenengoak gutxitzen dira eta bigarrenak ordea ugartu. Kaltzio-zelulen kasuan, nahiz eta erlatiboki urrienak izan, denbora aurrera doan heinean ugartuz doaz, liseriketan nolabaiteko laguntza ematen dutelako. Amaitzeko, mukopolisakaridoen kasuan, liseriketaren hasieran, urdailean kopurua altuagoa dago eta liseriketa prozesua aurrera doan heinean, mukopolisakaridoak odol hodietara mugitzen dira, azkenean liseri-guruinaren epiteliora helduz.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Garland Science . New York. (2002).
- Berger B. & Dallinger R. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. Environmental Monitoring and Assessment, Volume 25, Issue 1, pp 65-84 (1993).
- Dimitriadis V.K. & Konstantinidou V. Origin of the excretory cells in the digestive gland of the land snail *Helix lucorum*. Malacologia. Volume 44, Issue 1, pp 145-151. (2002).
- Isasi I. & Marigomez J.A. Citología e histología de la glándula digestiva de *Arion ater* (1981).
- Menéndez Valderrey J. L. “ *Arion ater* (Linnaeus 1758)” *Asturnatura.com*. Num. 114. (2007).
- Popham J. D. & D'Auria J. M. *Arion ater* (mollusca: pulmonata) as an indicator of terrestrial environmental pollution. Water, Air and Soil Pollution, Volume 14, Issue 1, pp 115-124 (1980).
- Walker G. The cytology, histochemistry, and ultrastructure of the cell types found in the digestive gland of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller). Protoplasma, Volume 71, Issue 1-2, pp 91-109 (1970).
- Zubiaga A.M. Jaki naturalaz elikaturiko *Arion ater* L. barearen liseri-guruinaren aldaketa histologikoak eta histokimikoak sasoi desberdinetan (1982).

- McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. Biological markers of environmental contamination. *Biomarkers of Environmental Contamination*, pp. 3-14. Boca Raton, FL: Lewis Publishers (1990).
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M. & Marigómez, I. Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere*, Vol 70, pp 144-154. (2007).