

# Ovogénesis de *Helobdella ampullariae* (Hirudinida, Glossiphoniidae)

## Oogenesis of *Helobdella ampullariae* (Hirudinida, Glossiphoniidae)

Bettina S. Gullo<sup>1</sup>  
bgullo@fcnym.unlp.edu.ar

Estela C. Lopretto<sup>1</sup>  
lopretto@fcnym.unlp.edu.ar

### Resumen

El conocimiento de la gametogénesis en Hirudinida es una herramienta importante que permite interpretar el ciclo reproductor. La ovogénesis de *Helobdella ampullariae* se describió en base a 30 hirudíneos recolectados en la cavidad paleal de *Pomacea canaliculata*. Durante el proceso de ovogénesis se reconocieron siete etapas que fueron definidas considerando las transiciones nucleares de la línea germinal, las variaciones del diámetro núcleo-citoplasmático, presencia y evolución de las reservas. Se determinó que la ovogénesis es un proceso sincrónico ya que todos los ovocitos se hallan en la misma etapa de desarrollo. Durante las fases de proliferación y meiosis el cordón ovárico incrementa su volumen y los ovocitos experimentan la profase de la primera división meiótica. Durante las etapas de previtelogénesis y vitelogénesis el ovocito I incrementa su talla. La primera fase de crecimiento ovocitario se relaciona con la incorporación de componentes celulares de las células nodrizas (vitelogénesis incipiente) y la segunda con la formación de placas de vitelo (vitelogénesis avanzada). El período de post-puesta se caracteriza por la retracción de las paredes del ovisaco y por los procesos de reabsorción que afectan al cordón ovárico. El examen microanatómico permitió confirmar que la madurez sexual ocurre en el interior del molusco hospedador.

**Palabras clave:** histología, ovario, sanguijuelas.

### Abstract

The knowledge of the gametogenesis in Hirudinida is an important tool that allows the understanding of the reproductive cycle. Ovogenesis of *Helobdella ampullariae* was described based on 30 leeches collected from mantle cavity and lung of *Pomacea canaliculata*. By means of histological analysis, seven stages were recognized during the oogenesis process, which were defined considering nuclear transitions of germ cells, cytoplasmic-nucleus diameter variations, presence and evolution of reserves. It was determined that oogenesis is a synchronous process, since all oocytes are in the same stage of development. During the phases of proliferation and meiosis, the ovarian cord increases its volume and the oocytes undergo the prophase of the first meiotic division. During the stages of previtellogenesis and vitellogenesis, the oocyte I increases its size within the framework of the vitellogenesis process. The first phase of oocyte growth is related to the incorporation of cellular components of the nurse cells (incipient vitellogenesis) and the second with the formation of yolk plates (advanced vitellogenesis). The post-laying period is characterized by the retraction of ovisaco walls, and by the reabsorption processes that affect the ovarian cord. The microanatomic examination allowed to confirm that sexual maturity occurs inside the host mollusk.

**Keywords:** histology, ovary, leeches.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Cátedra Zoología Invertebrados I. 122 y 60, (1900) La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

## Introducción

Varias especies de hirudíneos de la familia Glossiphoniidae establecen asociaciones simbióticas con moluscos gasterópodos (Ringuelet, 1985; Vega *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2007; De-Carli *et al.*, 2014). Por lo general, son simbioses facultativos y se asocian de manera temporal u oportunista con sus hospedadores (Damborenea *et al.*, 2017).

*Helobdella ampullariae* RINGUELET 1945 es el único hirudíneo que desarrolla todo su ciclo de vida como simbiote obligado de gasterópodos principalmente Ampullariidae, aunque su presencia también está documentada en *Chilina fluminea* (MATON 1811) (Ringuelet, 1985). Los estadios del ciclo de vida (adultos, adultos incubadores y juveniles) fueron hallados en el interior de la cavidad paleal y pulmón de *Pomacea canaliculata* (LAMARCK 1822) y esta asociación probablemente beneficia a los individuos que obtienen del hospedador alimento y protección (Damborenea y Gullo, 1996).

La ovogénesis en hirudíneos Glossiphoniidae se conoce en unas pocas especies de *Glossiphonia* (Aisenstadt, 1964; Aisenstadt *et al.*, 1964; Damas, 1964, 1977; Świątek, 2005, 2006) y de *Helobdella* (Martínez Alós y García Corrales, 1988; Gullo, 1994, 1999), así como en *Theromyzon rude* (BAIRD 1863) (Fernández *et al.*, 1992).

Dado que el conocimiento de la gametogénesis en hirudíneos es una herramienta importante para interpretar el ciclo reproductor en función de los estadios de madurez sexual, el objetivo de este trabajo fue describir la ovogénesis de *Helobdella ampullariae* teniendo en cuenta las transiciones nucleares de la línea germinal, las variaciones del diámetro núcleo-citoplasmático, presencia y evolución de las reservas.

## Materiales y métodos

Para estudiar la ovogénesis de *Helobdella ampullariae* se emplearon 30 hirudíneos en diferentes estadios de madurez sexual hallados en la cavidad paleal y pulmón de 19 ejemplares de *Pomacea canaliculata* que fueran recolectados en un canal artificial próximo a la desembocadura del Río de la Plata en el Balneario Bagliardi (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Los hirudíneos fueron fijados en Bouin y Zenker e incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones histológicas seriadas de 10  $\mu\text{m}$  que fueron teñidas con hematoxilina de Meyer y eosina. De cada ejemplar se obtuvo la talla nuclear y citoplasmática de los elementos germinales ( $n = 15$ ), teniendo en cuenta el diámetro menor y empleando ocular micrométrico.

## Resultados

El sistema reproductor femenino de *H. ampullariae* consta de un par de ovarios cuya forma y dimensiones

cambian a medida que progresa la ovogénesis. Cada ovario está rodeado por un saco celómico especializado (ovisaco) conformado por un epitelio externo y uno interno. Esta doble capa está constituida por células planas de tipo mesotelial separadas por tejido conjuntivo (Figura 1A). El ovisaco rodea una cavidad llena de fluido hemocelómico donde se halla contenido el cordón ovárico, conformado por células germinales y células nodrizas rodeadas de una capa de células foliculares. Cada célula nodriza está unida a una masa central denominada citóforo o raquis el cual conecta los ovocitos en crecimiento.

En *H. ampullariae* se reconocieron siete etapas durante el proceso de ovogénesis: I y II (proliferación y meiosis), III a VI (previtelogénesis y vitelogénesis) y VII (post-puesta).

### Etapas I

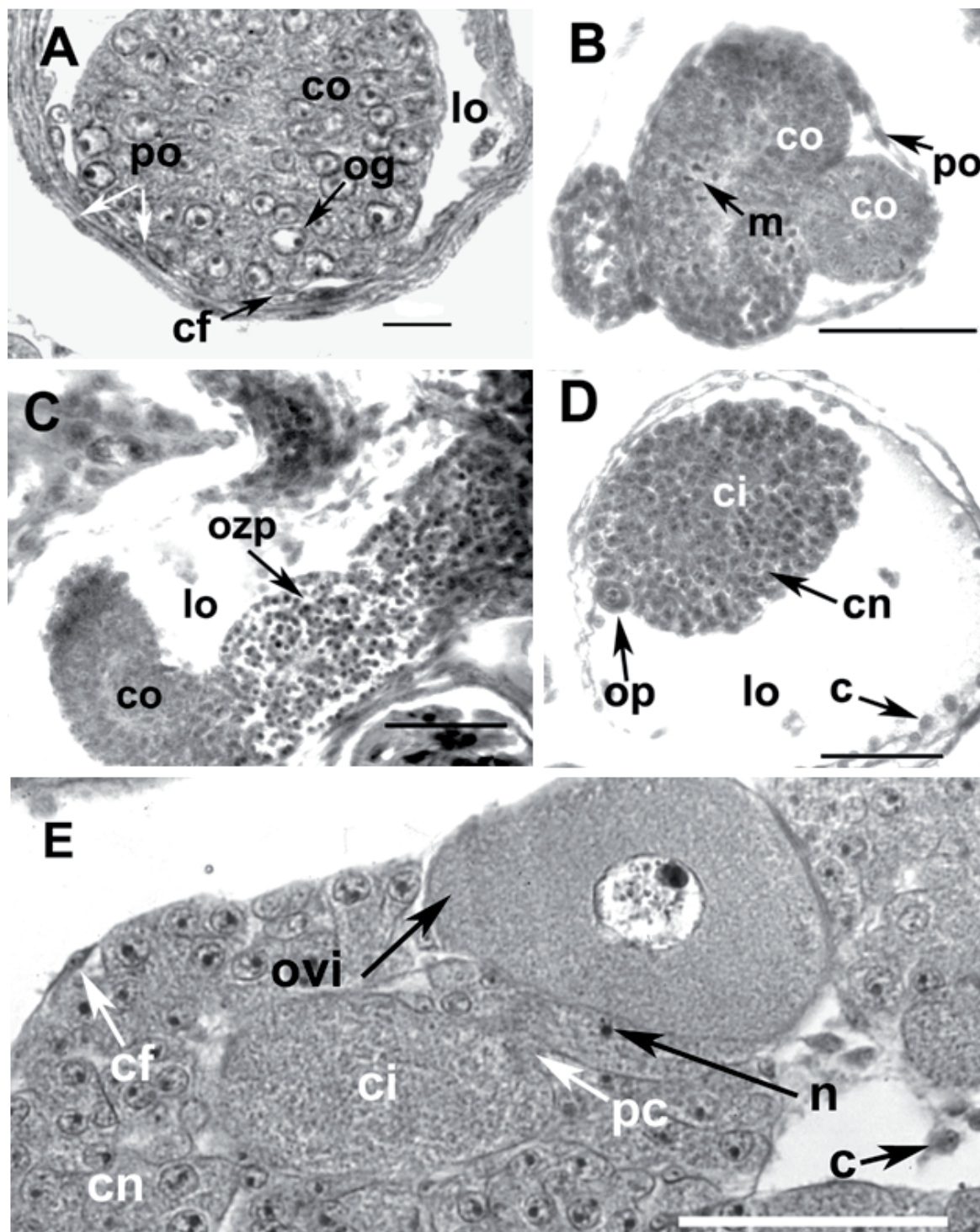
En el cordón ovárico se observan ovogonias rodeadas de una capa de células foliculares. Las ovogonias se multiplican activamente por mitosis sucesivas, las cuales incrementan en forma gradual el volumen del cordón ovárico. Estas células presentan núcleo esférico con la cromatina de disposición perinuclear. El nucléolo es subcentral. La talla nuclear promedio es de  $4,28 \mu\text{m} \pm 0,35$  ( $n = 15$ ) (Figuras 1A-B).

### Etapas II

Después de varias divisiones mitóticas, las células germinales experimentan la profase de la primera división meiótica. La etapa se caracteriza por un incremento de la talla nuclear media de  $5,4 \mu\text{m} \pm 0,31$  ( $n = 15$ ), una condensación de la cromatina – que se presenta muy basófila – y la desaparición del nucléolo (etapa zigotene o paquitene de la profase de la primera división meiótica). Los elementos germinales no se diferencian de aquellos que van a desempeñar una función trófica (Figura 1C).

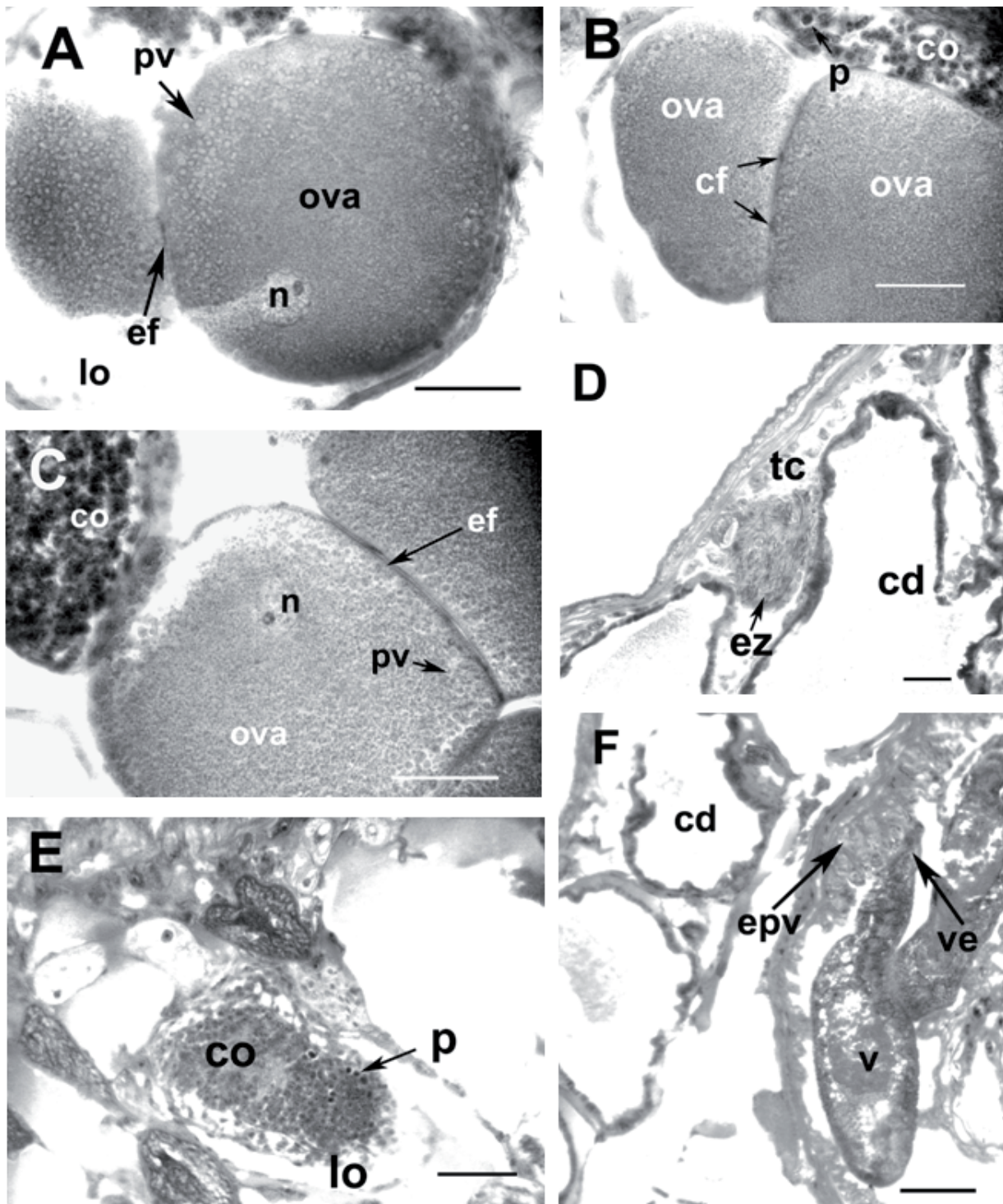
### Etapas III

En la periferia del cordón ovárico comienzan a diferenciarse los elementos germinales (ovocitos) de aquellos que cumplirán un rol nutricional (células nodrizas). El ovocito incrementa gradualmente su talla núcleo-citoplasmática (talla nuclear promedio:  $7,6 \mu\text{m} \pm 1,33$ ; talla citoplasmática promedio:  $16,3 \mu\text{m} \pm 2,22$ ;  $n = 15$ ). Los ovocitos se hallan en previtelogénesis. Aún no son evidentes los gránulos de vitelo si bien se observa basofilia en el citoplasma (autosíntesis). Las células nodrizas presentan una talla nuclear de  $5,4 \pm 0,31$ ;  $n = 15$ . Se observan algunos celomocitos en el interior del ovisaco (talla nuclear media es  $3,31 \mu\text{m} \pm 0,38$ ; talla citoplasmática promedio:  $6,16 \pm 0,31$ ;  $n = 15$ ) (Figura 1D).



**Figura 1.** *Helobdella ampullariae*. A-E: Sección transversal del ovisaco y etapas de la ovogénesis: A-B: Etapa I (Proliferación), C: Etapa II (meiosis), D: Etapa III (previtelogénesis), E: Etapa IV (vitelogénesis incipiente). Celomocitos (c), célula folicular (cf), citóforo (ci), células nodrizas (cn), cordón ovárico (co), luz del ovisaco (lo), mitosis (m), nucléolo (nu), ovogonia (og), ovocito en previtelogénesis (op), ovocito en vitelogénesis incipiente (ovi), ovocitos en zigotene/paquitene (ozp), puente intercelular (pc), pared del ovisaco (po). Escalas: 10  $\mu$ m (A), 50  $\mu$ m (B-E).

**Figure 1.** *Helobdella ampullariae*. A-E: Cross section of the ovisacs and oogenesis stages: A-B: Stage I (Proliferation), C: Stage II (meiosis), D: Stage III (previtellogenesis), E: Stage IV (incipient vitellogenesis). Celomocytes (c), follicular cells (cf), cytophore (ci), nurse cells (cn), ovary cord (co), ovisac cavity (lo), mitosis (m), nucleolus (nu), oogonium (og), previtellogenic oocyte (op), incipient vitellogenesis oocyte (ovi), oocytes zigotene/ pachytene oocytes (ozp), intercellular bridge (pc), ovisac wall (po). Scale bars: 10  $\mu$ m (A), 50  $\mu$ m (B-E).



**Figura 2.** *Helobdella ampullariae*. Sección transversal del ovisaco y etapas de la ovogénesis: A-F: Etapas V a VII de la ovogénesis: A-D: Etapas V y VI (vitelogénesis avanzada e impregnación hipodérmica). E-F: Etapa VII (post-puesta). Ciego digestivo (cd), célula folicular (cf), cordón ovárico (co), envoltura folicular (ef), epidermis ventral (epv), espermatozoides (ez), luz del ovisaco (lo), núcleo (n), ovocito en vitelogénesis avanzada (ova), piconosis (p), placas de vitelo (pv), tejido conectivo (tc), ventosa (ve), vitelo (v). Escalas: 100 µm (A-C y F), 50 µm (D-E).

**Figure 2.** *Helobdella ampullariae*. Cross section of the ovisacs and oogenesis stages: A-F: Stages V a VII of the ovogénesis: A-D: Stages V and VI (advanced vitellogenesis and hypodermic injection). E-F: Stage VII (post-laying). Digestive caeca (cd), follicular cells (cf), ovary cord (co), follicular envelope (ef), ventral epidermis (epv), spermatozoa (ez), ovisac cavity (lo), nucleus (n), advanced vitellogenesis oocyte (ova), pyknosis (p), yolk plates (pv), connective tissue (tc), suck (ve), yolk (v). Scale bars: 100 µm (A-C y F), 50 µm (D-E).

## Etapas IV

La vitelogénesis tiene lugar en dos etapas. La primera fase de crecimiento ovocitario (vitelogénesis incipiente) se relaciona con la incorporación de componentes celulares de las células nodrizas registrándose granulaciones basófilas en la periferia del ovocito. En el interior del citóforo se observan algunos componentes de las células nodrizas (núcleolos) que son incorporados al ovocito en crecimiento a través de puentes citoplasmáticos. En el interior del ovisaco se reconocen celomocitos que en la siguiente etapa formarán la envoltura folicular (Figura 1E).

## Etapas V

Durante la segunda fase de crecimiento (vitelogénesis avanzada) el ovocito es rodeado por celomocitos que conforman la envoltura folicular (foliculogénesis). A medida que progresa la vitelogénesis en la periferia se observan granulaciones de vitelo acidófilas que formarán placas de vitelo, las que aumentan su tamaño en dirección al núcleo. Los ovocitos incrementan su talla núcleo-citoplasmática (talla nuclear promedio:  $19 \mu\text{m} \pm 1,79$ ;  $n = 15$ ; talla citoplasmática promedio:  $116 \mu\text{m} \pm 30,11$ ;  $n = 15$ ). Los celomocitos se aplanan distendiéndose por el crecimiento de los ovocitos (Figuras 2A-B).

## Etapas VI

Durante esta etapa progresa y culmina la vitelogénesis, el ovocito alcanza una talla máxima de  $300 \mu\text{m}$  y se libera a la luz del ovisaco. En el cordón ovárico se observan núcleos en hipercromatosis y picnosis, lo cual indica que las células nodrizas son reabsorbidas (absorción directa, autólisis). Durante esta etapa se constató la presencia de espermatozoides en el tejido conectivo como resultado de impregnación hipodérmica (Figuras 2C-D).

## Etapas VII

Corresponde al período post-puesta que se caracteriza por la retracción general de las paredes del ovisaco – que evidencian mayor espesor – y por los procesos de reabsorción que afectan al cordón ovárico. Durante esta etapa no se constató la formación de nuevos elementos germinales. Fue posible observar crías adheridas por la ventosa posterior a la superficie ventral del progenitor (Figuras 2E-F).

## Discusión

La estructura del ovario y ovogénesis de *Helobdella ampullariae* presenta similitudes a las observadas en otros hirudíneos Glossiphoniidae (Aisenstadt, 1964; Aisenstadt *et al.*, 1964; Damas, 1964, 1977; Martínez Alós y García

Corrales, 1988; Fernández *et al.*, 1992; Gullo, 1994, 1999; Świątek, 2005, 2006).

En la ovogénesis se han reconocido procesos de proliferación y meiosis de células germinales, diferenciación del ovocito (previtelogénesis y vitelogénesis) y de reabsorción de elementos germinales (post-puesta). Los dos primeros fueron observados en otras especies de Glossiphoniidae por Fernández *et al.* (1992) y Świątek (2005, 2006), en tanto el de reabsorción que afecta al ovario post-puesta lo fue por Gullo (1994, 1999). En *Helobdella ampullariae*, se observó actividad mitótica de las ovogonias en el interior del cordón ovárico durante la etapa de proliferación tal como lo hiciera Gullo en *H. triserialis* (1994) y en *H. hyalina* (1999).

En *H. ampullariae* la ovogénesis es un proceso sincrónico, ya que todos los elementos germinales del cordón ovárico experimentan la profase de la primera división meiótica. Sólo unos pocos manifiestan su potencial germinal, en tanto los restantes desempeñan un rol nutricional. El proceso también es sincrónico en otras especies de Glossiphoniidae (Gullo, 1994, 1999; Świątek, 2005, 2006).

El crecimiento del ovocito en *H. ampullariae* se produce por incorporación de componentes celulares de las células nodrizas (vitelogénesis incipiente) y por el aporte de sustancias durante el proceso de foliculogénesis (vitelogénesis avanzada).

La vitelogénesis incipiente tal como se ha descrito antes, ha sido observada también en otras especies de *Helobdella* (Fernández *et al.*, 1992; Gullo, 1994, 1999) donde los componentes celulares son incorporados al ovocito a través de puentes citoplasmáticos que lo vinculan con el raquis. En *Glossiphonia heteroclita* Świątek (2005, 2006) constata que existen conexiones citoplasmáticas que vinculan al ovocito y a las células nodrizas con el raquis. También describe células foliculares intercaladas entre las células nodrizas que intervienen en el crecimiento del ovocito, células que no fueron observadas en *H. ampullariae*.

La vitelogénesis avanzada fue registrada en otros géneros de Glossiphoniidae (Fernández *et al.*, 1992; Gullo, 1994, 1999; Świątek, 2005, 2006). En *H. ampullariae* se inicia con la formación de la envoltura folicular y a diferencia de otros Glossiphoniidae participan celomocitos. En *H. ampullariae*, la presencia de gránulos de vitelo acidófilos en la periferia del ooplasma y el sentido centrípeto de desplazamiento de las placas de vitelo sugieren que los celomocitos aportan nutrientes al ovocito en crecimiento. La naturaleza exógena del vitelo se constató en otras especies de *Helobdella* (Gullo, 1994, 1999) y también ha sido documentada en crustáceos (Charniaux-Cotton, 1985; Lopretto y Gullo, 2017). En *H. ampullariae* la basofilia observada en el ooplasma durante la previtelogénesis sugiere autosíntesis. Con respecto al origen del vitelo, Aisenstadt (1964), Fernández *et al.* (1992) y Świątek (2005, 2006) proponen un mecanismo mixto para su formación: auto-

síntesis y heterosíntesis. La vitelogenesis mixta es típica de anélidos y otros invertebrados (Olive, 1983; Eckelbarger, 1994).

En *H. ampullariae* fueron observados procesos de reabsorción directa en el cordón ovárico como ocurre en *H. triserialis* y *H. hyalina* (Gullo, 1994, 1999); durante esta etapa se observan células con núcleos heterocromáticos y picnóticos. En *H. triserialis* y *H. hyalina* Gullo (1994, 1999) detectó procesos de reabsorción reaccional, durante los cuales intervienen los fagocitos eliminando los remanentes celulares, que no se constataron en *H. ampullariae*.

La presencia de ovocitos en madurez avanzada en el interior del ovisaco y de espermatozoides en el tejido conectivo indica la existencia de individuos sexualmente maduros en el interior del molusco hospedador.

## Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los dos revisores por sus valiosas sugerencias. Este trabajo fue subsidiado por el Proyecto 11/N802-2016-2019 acreditado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, Argentina).

## Referencias

- AISENSTADT, T.B. 1964. Cytological studies of oogenesis. I. Morphology of the gonad of *Glossiphonia complanata* L. examined by light and electron microscopy. *Citologiya*, **6**:19-24.
- AISENSTADT, T.B.; BRODSKY, V.Y.; IVANOVA, S.N. 1964. Cytological studies of oogenesis. II. A cytochemical examination of the oocyte growth in *Glossiphonia complanata* L. by UV cytophotometry and interference microscopy. *Citologiya*, **6**:77-81.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoologist*, **25**(1):197-206. <https://doi.org/10.1093/icb/25.1.197>
- DAMAS, D. 1964. Structure et rôle du racchis ovarien chez *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle). Origine, evolution et structure. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, **89**(2-3):147-155.
- DAMAS, D. 1977. Anatomie et evolution de l'appareil genital femelle de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle), au cours du cycle annuel. Étude histologique et ultrastructurale. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **118**:29-42.
- DAMBORENEA, M.C.; BRUSA, F.; NEGRETE, L. 2017. Symbionts and diseases associated with invasive apple snails. In: R.C. JOSHI; R.H. COWIE; L.S. SEBASTIAN (eds.), *Biology and management of invasive apple snails*. Nueva Ecija, Science City of Muñoz, Philippine Rice Research Institute (PhilRice), p. 73-97.
- DAMBORENEA, M.C.; GULLO, B.S. 1996. Hirudíneos asociados a la cavidad paleal de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Gasteropoda: Ampullariidae) del Balneario Bagliardi, Río de la Plata, Argentina. *Neotrópica*, **42**(107-108):97-101.
- DE-CARLI, B.P.; ROTUNDO, M.M.; PASCHOAL, L.R.P.; ANDRADE, D.P.; CAVALLARIS, D.C.; OCEGUERA-FIGUEROA, A.; ALONSO, D.D. 2014. First record of the association between the leech *Helobdella triserialis* (Hirudinea, Glossiphoniidae) and two species of *Pomacea* (Gastropoda, Ampullariidae) in Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, **9**(2):136-140.
- ECKELBARGER, K.J. 1994. Diversity of metazoan ovaries and vitellogenic mechanisms: implications for life history theory. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **107**:193-218.
- FERNÁNDEZ, J.; TELLEZ, V.; OLEA, N. 1992. Hirudinea. In: F.W. HARRISON; S.L. GARDINER (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 7. Annelida*. New York, Wiley-Liss, p. 323-394.
- GULLO, B.S. 1994. Microanatomía de la gónada femenina de *Helobdella triserialis* (Hirudinea, Glossiphoniidae). *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, **224**(2):43-45.
- GULLO, B.S. 1999. Ovogenesis y estructura ovárica de *Helobdella hyalina* Ringuet, 1942 (Hirudinea: Glossiphoniidae) en Los Talas (Pdo. de Berisso), Buenos Aires, *Neotrópica*, **45**(113-114):31-36.
- LOPRETTO, E.C.; GULLO, B.S. 2017. Microanatomía del ovario y ovogenesis del anfípodo *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942. *Neotropical Biology and Conservation*, **12**(2):131-134. <https://doi.org/10.4013/nbc.2017.122.05>
- MARTÍNEZ-ALÓS, S.; GARCÍA-CORRALES, P. 1988. Anatomía e histología del aparato reproductor de *Helobdella stagnalis* L. (Annelida, Hirudinea, Rhynchobdellida, Glossiphoniidae). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. (Biología)*, **84**(1-2):15-31.
- NEGRETE, L.H.; GULLO, B.S.; MARTÍN, S.M. 2007. First record of *Helobdella hyalina* (Hirudinea; Glossiphoniidae) in the mantle cavity of Planorbidae from lentic environments in a Buenos Aires province, Argentina. *Brazilian Journal of Biology*, **67**(2):377-378. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000200027>
- OLIVE, P.J.W. 1983. Annelida Polychaeta. In: K.G. ADIYODI; R.G. ADIYODI (eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. I. Oogenesis, oviposition, and oosorption*. Chichester, John Wiley & Sons, p. 357-422.
- RINGUELET, R.A. 1985. Annelida. Hirudinea. In: Z. AGEITOS de CASTELLANOS (ed.), *Fauna de agua dulce de la República Argentina*, **27**(1):1-321.
- ŚWIĄTEK, P. 2005. Oogenesis in the leech *Glossiphonia heteroclita* (Annelida, Hirudinea, Glossiphoniidae). I. Ovary structure and previtellogenic growth of oocytes. *Journal of Morphology*, **266**(3):309-318. <https://doi.org/10.1002/jmor.10379>
- ŚWIĄTEK, P. 2006. Oogenesis in the leech *Glossiphonia heteroclita* (Annelida, Hirudinea, Glossiphoniidae). II. Vitellogenesis, follicle cell structure and egg shell formation. *Tissue and Cell*, **38**(4):263-270. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2006.06.005>
- VEGA, I.A.; DAMBORENEA, M.C.; GAMARRA-LUQUES, C.; KOCH, E.; CUETO, J.A.; CASTRO-VÁSQUEZ, A. 2005. Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell*, **30**(2):367-375.

Submitted on November 9, 2017

Accepted on March 30, 2018