

## HISTOFISIOLOGIA DEL EPITELIO DIGESTIVO DE PHERETIMA CALIFORNICA KINBERG

I. — *Material hidrocarbonado; mucopolisacáridos, mucoproteínas  
y glucoproteínas*

POR M. LEVIN, A. R. MORENO, Z. TOMSIC Y F. DULOUT

### SUMMARY

The authors studied the histophysiology of the digestive epithelium of *Pheretima ca. lifornica* Kinberg with reference to the secretion of hydrocarbonated material.

The functional stratification of the cytoplasm was analysed, and acid mucopolysaccharides and neutral glycoproteins were detected in the basal membranes and apical zones of the cells. The structural disposition of the epithelial covering cuticles, which are similarly disposed in all the segments are described. Their characteristics agree with the findings described in epithelium of vertebrates.

### INTRODUCCIÓN

Nuestro propósito es realizar un estudio histoquímico del género *Pheretima*, tomando como especie inicial a *Ph. californica* Kinberg. Radica nuestro interés en las descripciones que acerca de este género se han hecho en base a descripciones morfológicas e histológicas en su mayoría realizadas con métodos y técnicas clásicos. Existen estudios realizados en Lumbrícidos del género *Eisenia* con sistemas modernos de investigación, que datan de tiempos recientes, mereciendo ser citados los de Rudall, Roots, van Gansen, Herlant-Meewis, entre otros.

Hemos aplicado métodos y técnicas análogos en el estudio de los Oligoquetos megascolécidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares de *Pheretima californica* provenientes de terrenos de San Miguel de Tucumán fueron seleccionados de acuerdo a su grado de evidente madurez, clasificados por uno de nosotros y alimentados durante tres días en borra de café lavada repetidas veces, para permitir la ulterior sección de los segmentos por el micrótopo. Previa narcosis, los especímenes se fijaron en formol neutro al 10 %, y en fijador de Stieve. Algunos ejemplares fueron fijados en mezcla fijadora de Bouin-Allen.

Se realizaron cortes de inclusiones en parafina, longitudinal y transversalmente dispuestas, de 5 micrones de espesor, las que se montaron sobre cubreobjetos sin adhesivo alguno.

Las técnicas de tinción con las que el material fue sistemáticamente procesado fueron:

- A) Hemalum de Mayer-Eosina.
- B) Tricrómico de van Gieson.
- C) Reacción PAS, según Hotchkiss-Mac Manus.
- D) Azul de toluidina al 0.5 % en soluciones buffer de pH entre 3.6 y 5.6.
- E) Azul alcian, 0.1 %, en soluciones buffer de pH 0.5, 2.5 y 3.6.
- F) Reacción del hierro coloidal, según Pearse modificada por Gasie.
- G) Test de extinción del azul de metileno, en soluciones M/3000, entre pH 0.5 y pH 3.6.
- H) Pruebas de control con digestiones mediante hialuronidasa testicular (Unidasa MR) a una concentración de 250 U.I./100 ml de solución buffer. Los cortes se incubaron durante lapsos de una a doce horas a 37° C.

## RESULTADOS

*Boca; epitelios bucal y prefaríngeo*

El epitelio de revestimiento de estas regiones denota, respecto del sector externo, un incremento de la basofilia, con mayor contenido de material citoplásmico, al que van Gansen, en sus estudios del epitelio homólogo en aparato digestivo de *Eisenia foetida*. Sav., atribuye carácter mitocondrial. La cutícula de revestimiento supraepitelial aumenta ligeramente su espesor, conservando los caracteres arquitecturales de la membrana supraepitelial epidérmica; en secciones de extensión muy restringida se observan papilas sensoriales que resaltan por los contornos de sus células, que asumen contornos piriformes destacándose de los elementos columnares circundantes. La basofilia de estos elementos es mayor, y con tinciones de azul de toluidina y prue-

ba de extinción del azul de metileno denota su identidad con la de los ácidos nucleicos citoplasmáticos (RNA).

Las células mucoscretoras desaparecen en este sector. Las técnicas histoquímicas para detección de compuestos mucoproteicos revela los hechos siguientes:

- 1) Gamma-metacromasia a pH 5.6 en forma de estriaciones perinucleares muy finas que se disponen paralelamente al eje mayor de la célula.
- 2) Tenue condensación granular para-apical ortocromática al mismo pH.
- 3) Desaparición de la gamma-metacromasia a pH más bajos, con persistencia de la ortocromía nuclear.
- 4) Membrana basal PAS positiva que resalta igualmente con los restantes métodos en soluciones abufferadas a pH muy ácidos (pH 2.5).

La membrana cuticular es fuertemente PAS positiva, evidenciando la presencia de un alto contenido en material glucoproteico; mediante la combinación de tinciones (PAS-Azul Alcian, PAS-Hale y PAS-Azul de toluidina) se observa una estratificación de esta membrana supracelular en tres capas: la más interna, aplicada directamente sobre las células, como la externa, que contacta con la luz buco-faríngea, son positivas al azul de toluidina, comprendiendo entre ambas un estrato más grueso, de alta positividad al PAS. Tal tipo de membrana supraepitelial estratificada, descrita recientemente por Rambourg y colaboradores en estructuras análogas de vertebrados, es un hecho que merece ser señalado.

En algunas células epiteliales se halla material PAS positivo ordenado a modo de pequeños gránulos con disposición perinuclear.

*Epitelio faríngeo*

Ofrece el aspecto de un epitelio de compleja y abundante secreción. Existen dos regiones distintas, tanto desde un punto de vista anatómo-histológico como bajo un aspecto histoquímico.

La región dorsal aparece como un epitelio columnar, ciliado, formado por elementos muy altos con núcleos alargados y situados a distintas alturas, asemejando un epitelio pseudoestratificado. A grandes aumentos se ven, intercaladas con los elementos de revestimiento, delgadas fibrillas de tejido muscular que se introducen hasta el tercio basal de los límites intercelulares. Ello configura un complejo mio-epitelial de tejido que cumple simultáneamente funciones de cubierta y de secreción. Los estudios de van Gansen realizados en el género *Eisenia* (Lumbricido), demuestran la secreción cuantiosa de material mucoproteico de esta región. Nuestros hallazgos histoquímicos concuerdan y son reproducibles respecto de dichas investigaciones, en el género que nos preocupa. Es importante señalar, por otra parte, la basofilia de la mitad

apical de las células indicio de alto contenido proteico, lo cual es propio de elementos celulares de alta actividad metabólica.

La región faríngea ventral nos muestra un epitelio en el que ocurren transformaciones significativas. Surgen sectores de células con núcleos más tingibles por la hematoxilina, nucleólos mayores, y citoplasmas que se afinan hacia la región basal. En la zona apical de cada célula el material basófilo es abundante y se dispone a modo de estriaciones finas y paralelas que rematan en una condensación para-apical. Se observan escasas granulaciones gruesas de tipo cromoidal. La cutícula de cubierta sufre sobre dichas células un aumento de su espesor; las reacciones de detección de mucopolisacáridos ácidos son positivas.

El estrato externo, afin al azul de toluidina, muestra un debilitamiento de la positividad, y a grandes aumentos presenta una transformación a modo de superficie plegada en forma de numerosas y finas ondulaciones, a modo de digitaciones o microvellosidades.

Por debajo de la membrana basal del epitelio de cubierta se encuentran, entre los haces musculares de la túnica motora de la faringe, conglomerados glandulares que tanto por su morfología cuanto por sus afinidades tintoriales corresponden al tipo de elementos cromófilos de las glándulas faríngeas, estudiados y descritos por otros autores (Stephenson; Keilin). Estos cuerpos o células de secreción parecen verter el material elaborado a través de un sistema de transporte constituido por finísimos túbulos limitados por una membrana muy fina cuya reactividad es idéntica a la de las basales. Estos túbulos están dotados de sinuosas prolongaciones que por su extremo inferior contactan con los conglomerados de células cromófilas, mientras que hacia arriba contactan, confluyendo, con la membrana basal del epitelio, terminando por desembocar entre las células de revestimiento en un extremo afilado o bien en dilataciones caliciformes.

El contenido de excreción es positivo a la reacción PAS, como asimismo metaacromático a pH 3.6; el azul alcian lo tiñe a pH 2.5. La metaacromasia es del tipo de la beta-metaacromasia. Esto indicaría la existencia de un conglomerado de glucoproteínas y mucopolisacáridos ácidos no sulfatados.

### *Esófago*

En este género, el esófago es de paredes delgadas, no así en otros, en los que se ha descrito la existencia de formaciones secretoras especiales (glándulas calcíferas). Se compone de tractos conjuntivos y musculares finos dispuestos en dos estratos; periféricamente está revestido por elementos celulares dispuestos a modo de serosa, que en zonas aisladas comienzan a asumir el rol de células cloragógenas.

El epitelio de revestimiento del esófago descansa sobre una muy fina y neta membrana basal. Las células son columnares y se disponen en un único estrato. Su núcleo es oval, el contenido cromatínico es finamente granular, y en el citoplasma se distinguen dos regiones bien marcadas: la basal, cargada de gránulos cromófilos que se conglomeran junto al núcleo y se disponen hacia la profundidad en forma de estriaciones; y la apical, levemente acidófila, de aspecto granuloso, que mediante tinciones argénticas según la técnica de Lascano demuestra ser sede de un complejo de Golgi.

El ápice de las células es finamente sinuoso, presentando finísimas microvellosidades; su determinación con los medios ópticos disponibles es dificultosa y solamente nos limitamos a señalarla. Las reacciones histoquímicas de la membrana de cubierta supracelular son en este segmento apreciables y se disponen de forma análoga a las de los epitelios bucal y faríngeo-ventral.

Las granulaciones basófilas del citoplasma ofrecen evidencia de material mucopolisacárido ácido, especialmente en las zonas perinuclear y subapical del citoplasma. La reacción es notable con el azul alcian en la gama de pH 2.5, es decir, en el rango de detección de mucopolisacáridos ácidos fosfatados.

Adosados a la membrana basal se observan elementos de reemplazo o reserva de la túnica epitelial, con núcleo más tingible y citoplasma escaso.

### *Molleja*

Es un segmento de tracto digestivo adaptado tanto a funciones de tránsito de los alimentos como a la actividad de malaxación. Asume características anátomo-funcionales especiales.

El epitelio se apoya en una basal fuerte que le une a un complejo muscular de gran potencia. Las células epiteliales columnares poseen núcleos fusiformes situados en la parte media del cuerpo celular. Hacia la basal existen numerosos elementos de reserva, en forma de células de pequeñas dimensiones y forma redondeada.

Sobre los núcleos de las células de revestimiento se encuentran acúmulos de material basófilo y finamente pulverulento; hacia la zona mesoapical, en un sector de citoplasma acidófilo, existe otro conglomerado, verdadera banda o condensación de material proteico granular. La zona infranuclear se halla repleta de estriaciones de tipo mitocondrial.

La disposición y arquitectura celulares son muy uniformes. Las tinciones con azul de toluidina a pH 3.6 y pH 5.6 no revelan metaacromasia. Las restantes coloraciones y métodos histoquímicos destinados a la detección de material hidrocarbonado intracelular no han sido positivas.

Este epitelio está recubierto por una formación cuticular muy gruesa, verdadera coraza de trituración de los elementos ingeridos. Con el hemalum-cosina es totalmente negativa; el método de van Gieson la hace resaltar como

una estructura altamente fuesinófila, que se insinúa entre cada célula a modo de cortas dentelladuras. Es fuertemente PAS positiva, y ante los otros métodos de ensayo histoquímico utilizados solamente reveló metacromasia con el azul de toluidina a pH 5.6 en la superficie intraluminal. Ello indica la persistencia de la estratificación de la membrana supracelular antes sugerida, y la presencia de un material glucoproteico especial. Van Gansen, en sus estudios efectuados, lo califica como un material del tipo de la elastina, integrante principal del tejido conjuntivo de los invertebrados.

Del mismo modo, asigna a la molleja una función secretora de un producto histoquímicamente emparentado con el mucus, que rezumaría a través de la cutícula hacia la luz de la molleja.

Las concepciones clásicas del funcionamiento de los epitelios, y aún las actuales, no condicionan fácilmente con la existencia de una verdadera coraza de cubierta de un epitelio secretor, y más ante la afirmación de que tal coraza pudiese estar compuesta de un verdadero tejido o estructura elastinoide.

Estamos en total acuerdo con dicha autora en su afirmación de la necesidad de estudios más profundos acerca de este problema.

El tracto de salida de la molleja muestra una paulatina disminución del espesor de la túnica muscular, hasta retomar su densidad de túnica esofágica. Un hecho notable es la presencia, en este sector, de un verdadero collar de células cromófilas subepiteliales intermusculares cuya reactividad histoquímica coincide con la de los elementos homólogos descritos en el epitelio ventral de la región faríngea. Están asimismo asociados con formaciones tubulares de transporte que se abren entre las células epiteliales en el lumen esofágico. Los ensayos con PAS y con azul alcian y azul de toluidina, en soluciones reguladas, denotan un contenido del tipo de las mucoproteínas neutras, y de los mucopolisacáridos ácidos de tipo sulfatado y no sulfatado.

### *Intestino*

Hemos considerado una porción anterior, desde el segmento XXV; una región media, desde el segmento XXXV hasta el L, y otra posterior o terminal que comprende los últimos 20 segmentos.

La disposición orgánica del intestino obedece al plan arquitectural del resto del tubo digestivo (epitelio de cubierta - membrana basal - vaso sanguíneo marginal - tónicas musculares y revestimiento mesodermo-cloragógeno).

El epitelio se dispone en forma de túnica celular monoestratificada, integrada por elementos columnares que pueden ser divididos en dos clases fundamentales: secretores y absortores. No existe una formación de verdaderas glándulas, y como estructura que a modo de vellosidad aumenta la superficie del lumen intestinal se observa el tiflosol, que en esta especie es poco desarrollado. Las vertientes del tiflosol están tapizadas principalmente por células de

absorción. Lo mismo se observa sobre las láminas constituídas por los brotes capilares que hacen proteusión hacia la luz entérica.

En los lados y cara ventral de la porción anterior y gran parte de la porción media del intestino, las células son de tipo secretor.

### *Células secretoras*

Resaltan por su aspecto globuloso, asemejando odres cuya apertura estrecha se encuentra entre los elementos vecinos. Existen dos tipos principales; uno es altamente basófilo con las tinciones comunes de hematoxilina. El material celular se dispone a modo de barras o conglomerados que se adaptan al contorno celular, llegando a ocultar el núcleo por su alta basofilia. En algunos elementos el material basófilo está desplazado hacia uno de los extremos del cuerpo celular, generalmente el basal. En algunas células la carga del citoplasma se muestra vacuolada; las tinciones revelan el alto contenido en material nucleoproteico (ortocromasia entre pH 4 y pH 6); la tinción PAS es negativa. En caso de las vacuolas, éstas son metacromáticas a pH 5.6 y ligeramente PAS-positivas. El material nuclear es abundante; el núcleo vesiculoso, dotado de una neta membrana limitante, contiene un gran nucléolo en su centro.

Otro tipo de células secretoras lo constituyen elementos altos, columnares y ligeramente globulosos que contienen material ligeramente basófilo, espumoso y PAS positivo; la intensidad de esta reacción es notable en el sector apical del citoplasma, existiendo en el resto una positividad menor. A menudo se observan gúttulas de secreción PAS positivas en el momento de ser vertidas hacia la luz intestinal. El azul de toluidina es ligeramente positivo (metacromasia alcohol-resistente) y la reacción del hierro coloidal es escasa. Algunos elementos demuestran haberse deplecionado de su contenido; su núcleo ocupa una altura media y demuestra una forma oval, con un nucléolo pequeño y compacto. El citoplasma ha perdido la basofilia y la reacción al PAS es leve.

Las tinciones con azul alcian son ligeramente positivas a pH 2.5, resaltando con este ensayo los contornos celulares y algunas vacuolas del citoplasma. A pH 0.5 la afinidad tintorial y reactiva se localiza notablemente en la zona basal inmediatamente anexa a los capilares. La membrana basal y la región apical de ambos tipos de células son débilmente positivas.

### *Células de absorción*

En estos elementos el citoplasma está regionalmente diferenciado y pueden ser señalados una serie de segmentos o sectores celulares que desde el ápice hacia la basal son:

a) *Zona de microvellosidades*: compuesta por microdigitaciones del citoplasma que brotan de una zónula lineal dotada de alta refringencia, verdadero borde estriado. Estas vellosidades constituyen una zona compacta y homogénea. La positividad a la reacción PAS es franca. Las tinciones con azul de toluidina a pH 3.6 y 5.6 revelan metaacromasia que no resiste al alcohol. Las tinciones con azul alcian a pH 0.5 y 2.5 son escasamente positivas. La reacción de Hale del hierro coloidal es positiva. En algunos cortes de intestino de especímenes mantenidos durante tres días en un medio constituido por agar gelificado, la positividad al PAS en la región de las microvellosidades fue muy alta, observándose igualmente un incremento de la afinidad por el hierro coloidal. En animales mantenidos en completo ayuno sobre esponja de plástico humedecida durante 24 horas, la positividad a estas reacciones no se agotó, si bien fue atenuada.

b) *Zona apical*: inmediatamente por debajo de las microvellosidades. Aparece como un estrato basófilo finamente granular. Tanto su reactividad con el hemalum como los ensayos con el azul de toluidina denotan la presencia de material proteico. Las reacciones histoquímicas restantes son negativas.

c) *Zona subapical*: ocupa un espesor que por lo general no es mayor que 1/5 de la altura de la célula. Es ligeramente acidófila, ortocromática con el azul de toluidina, ligeramente positiva con el Hale y negativa ante el azul alcian. En los animales que fueran sometidos a mantenimiento con gel de agar, esta región presenta granulaciones basófilas que se disponen como finísimas estriaciones de material ergastoplásmico. Su exacta naturaleza aún no ha sido determinada.

d) *Zona mesoapical*: clara, ligeramente acidófila. Las tinciones con azul de toluidina ofrecen metaacromasia violácea de poca intensidad, que es resistente al tratamiento con alcohol, en todos los cortes analizados. La reacción PAS es positiva, como lo es débilmente el ensayo con hierro coloidal. Las tinciones de azul alcian a pH 2.5 son escasamente positivas.

e) *Zona granulosa supranuclear*: inmediatamente adyacente al núcleo. Está repleta de finísimo material granular basófilo; tinciones argénticas para detección del aparato de Golgi nos permiten asimilar esta región del citoplasma a tal organoide celular. En algunos elementos se perciben los núcleos rodeados por un halo de material basófilo y ortocromático, de caracteres nucleoproteicos. Las reacciones para identificación de carbohidratos o mucinas son negativas.

f) *Zona infranuclear*: serie de estriaciones y vacuolas de distinto tamaño en la que se detecta material PAS positivo dispuesto a manera de finas líneas; al igual que las vacuolas es débilmente metaacrómico con el azul de toluidina. La reacción de Hale es muy débil y el azul alcian a pH 0.5 es así mismo débil.

Esta disposición zonal del citoplasma de los elementos de absorción es sensiblemente igual en todos los sectores de los tramos intestinales anterior y medio. Las reactividades para el hierro coloidal, como para el azul alcian, nos colocan en presencia de mucopolisacáridos ácidos, observándose el mayor acúmulo de éstos en la zona de las microvellosidades y en las vecindades de la membrana basal, puntos extremos de los sistemas de transporte celular. Ensayos realizados en cortes sometidos a competición iónica con cloruro de magnesio nos permiten afirmar la presencia de mucopolisacáridos ácidos sulfatados y no sulfatados en todo el sistema de absorción intestinal. La determinación de estos últimos no ha sido precisa por carecer de enzimas del tipo de la neuraminidasa, pero los ensayos mediante soluciones abufferadas indican la posible presencia de material fosfatado.

Hacia el intestino posterior se observa la reaparición de algunos elementos mucíparos PAS positivos. El resto de las células presenta una morfología y disposición que no difiere de las células de absorción ya descritas. La cutícula de cubierta supraepitelial reaparece en los últimos segmentos con idénticas características de arquitectura y reactividad.

#### *Ciegos intestinales*

Estas dos formaciones del intestino anterior están tapizadas por un epitelio columnar simple. Su aspecto difiere sensiblemente de las que se encuentran en el tubo intestinal principal. Las microvellosidades apicales son PAS positivas y débilmente metaacrómicas. El citoplasma supranuclear es claro, con algunas vacuolas y gúttulas compuestas por material PAS positivo. En esta zona se observan gruesos y escasos gránulos basófilos. La positividad hacia la reacción de Schiff en la región infranuclear es igualmente notable. El núcleo es claro, con cromatina laxa y se observan uno o dos nucléolos pequeños y bien tingibles.

#### CONSIDERACIONES FINALES

1º) El tracto digestivo de *Pheretima californica* está sometido en todos sus segmentos a procesos de secreción en cuyo material se detectan mucopolisacáridos ácidos sulfatados y no sulfatados. Estos últimos, por su comportamiento frente a sales de magnesio y en el rango de acidez a que fueron investigados, serían compuestos fosfatados. A nivel de la región faríngea y del cono de salida de la molleja se encuentran sistemas de secreción y transporte en forma de complejos presumiblemente mio-epiteliales en los que se detectan mucopolisacáridos y material hidrocarbonadoanueuro PAS positivo, del tipo de las glucoproteínas y mucinas epiteliales.

El intestino está revestido de un epitelio glandular muy activo en el cual la función tanto secretoria de principios digestivos como la absorción del material digerido por éstos está a cargo de células especializadas para cada función. Los elementos celulares de absorción coexisten con los secretores; no se aprecia formación de estructuras organoides con aspecto de verdaderas glándulas; el citoplasma de las células de absorción está altamente especializado para esta actividad, como lo muestra la sistematización de su citoplasma. La estratificación funcional de este citoplasma es aquí analizada histoquímicamente, con vistas a la detección de material hidrocarbonado. Detectanse materiales ácidos y neutros, del tipo de los mucopolisacáridos y proteínas hidrocarbonadas, respectivamente.

2º) La disposición estructural de las cutículas es la de un sistema de cubierta supraepitelial con disposición ordenada de sus componentes a manera de estratos, cada uno de los cuales observa determinadas características reactivas. Esto concuerda con lo descrito en cubiertas epiteliales de estructuras glandulares y de revestimiento de vertebrados, y como en éstos, concurrir a complementar las funciones de transporte a través de membranas y de secreción de los epitelios.

3º) Las técnicas para la detección de sustancias hidrocarbonadas complejas son para nosotros un primer jalón para la investigación histofisiológica de los mecanismos y estructuras celulares de esta especie y del género que la involucra.

## BIBLIOGRAFIA

- AVEL, M. 1959. *Traité de Zoologie*, de P. P. Grassé 5 (fase. 1) Masson éd., Paris.
- BERGERON, J. A. AND SINGER, M. 1958. Metachromasy: An Experimental and Theoretical Revaluation. — *J. biophys. biochem. Cytol.* 4: 433-437.
- CHEN, Y. AND CHIUNG PUH, Y. 1941. A histological study of the stomach and caecum in the genus *Pheretima*. — *J. Morph.* 68: 507-514.
- HAM, W. *Tratado de histología*, 4ª ed. Ed. Interamericana, México.
- HERLAN-MEEWIS, H. 1965. Les Neurosécrétion chez les Oligoquetes. — *Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci.*, 5e. série 41: 500-506.
- HERLANT-MEEWIS, H. ET GALLARDO, S. 1965. Phénomènes neurosécrétoires au cours de la régénération postérieure d'*Eisenia foetida* Sav. — *Gen. Comp. Endocrinol.* 5 (6). Acad. Press ed. (Abstract).
- HERLANT-MEEWIS, H. 1966. Les cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse d'*Eisenia foetida* Sav. — *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 69: 319-325.
- KEILIN, D. 1920. On the pharyngeal or salivary gland of the earthworm. — *Quart. J. micr. Sci.* 65: 33-63.
- PEARSE, A. G. E. 1960. *Histochemistry, theoretical and Applied*. Churchill, London.

- RAMBOURG, A. NEUTRA, M. AND LEBLOND C. P. 1966. Presence of a Cell "Coat" rich in carbohydrates at the surface of cells in the rat. — *Anat. Rec.* 164: 41-72.
- SPANNHOFF, L. 1966. *Histoquímica práctica*. Acribia ed.
- STEPHENSON, J. 1930. *The Oligochaeta*. Oxford, 978 págs.
- VAN-GANSEN, P. 1956. Les cellules chloragogènes des Lombriciens. — *Bull. biol. Fr. Belg.* 90: 335-353.
- VAN-GANSEN, P. 1957. Le lipopigment des chloragosomes des Lombriciens. — *Annls. Histo. chim.* 2: 41-55.
- VAN GANSEN, P. 1957. Structures et Fonctions du Lombricien *Eisenia foetida* Sav. Région buccale, pharynx et glandes pharyngiennes. — *Bull. biol. Fr. Belg.* 91: 225-238.
- VAN-GANSEN, P. 1958-59. Structure du jabot et du gésier d'*Eisenia foetida* Sav. *Ann. Soc. zool. Belg.* 89 (2).
- VAN GANSEN-SEMAL, P. 1960. Occurrence of non-fibrillar elastin in the earthworm. — *Nature*, 186 (4275): 654-655.
- VAN-GANSEN, P. 1962. Plexus sanguin d'*Eisenia foetida* Sav.: étude a microscope électronique de ses constituants conjonctif et musculaire. — *J. Microscop.* 1: 363-376.
- VAN-GANSEN, P. 1963. Le lombricien *Eisenia foetida* Savigny. *Dissertation de grade*, F. N. R. S., Bruxelles.