

LA VITEL·LOGÈNESI A *ACANTHOCYCLOPS ROBUSTUS* G.O. SARS (Copepoda, Cyclopoida): PREVITEL·LOGÈNESI I VITEL·LOGÈNESI PRIMÀRIA

J. GARCIA VALERO

*Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.*

SUMMARY

Ultrastructural characteristics of the oocytes of *A. robustus* G.O. SARS in the early vitellogenic stages are studied. The different cellular compartments and their relationship with functions of synthesis and storage characteristic of this group are described. Blebbing processes of the outer lamina of the nuclear envelope related with the "endoplasmic pool" and that, apparently, transport material from the nucleus are shown. A part of the cisternae of the endoplasmic reticulum undergo infolding in the cytoplasm, fuse and evolve, morphologically, towards a particular type of yolk bodies. Some considerations are done about the possible mitochondrial origin of a part of the accumulation vesicles that appear scattered in the ooplasm of the same time that phenomena of degradation of the cristae of a part of the mitochondria are observed.

INTRODUCCIÓ

Actualment es disposa de una variada informació referent als esquemes generals del desenvolupament oocitari i la fecundació en els crustacis i d'altres grups zoològics (BRUSLÉ, 1972; EDDY, 1975; RAVEN, 1961). Respecte els aspectes citològics i estructurals, els estudis realitzats a partir de la excel·lent revisió de KESSEL (1968), han estat molt dispersos, quant als models objecte d'estudi, però tots han estat enriquidors quant al coneixement del paper

que desenvolupen els diferents compartiments cel·lulars en les tres fases vitel·logenètiques. Així, EDDY (1975), en la revisió de la citologia de les línies germinals fa esment dels "nematosomes", fenomen que s'inicia a la etapa previtel·logenètica; BEAMS i KESSEL (1962) van descriure el gran desenvolupament ergastoplasmàtic que té lloc a la vitel·logènesi primària; els processos de vesiculació de l'embolcall nuclear (BLADES-ECKELBARGER i YOUNBLOUTH, 1984; ARNAUD, 1982) o la intervenció del complex de Golgi en l'emma-

gatzematge i compactació dels productes de síntesi (DURFORT *et al.*, 1980) són d'altres contribucions integradores.

En aquesta línia, el present estudi té per objecte el coneixement de les dues primeres fases vitel-logènètiques en els seus aspectes morfològics i estructurals, fent èmfasi en les particularitats que presenta aquest ciclòpid en dos dels seus compartiments: l'ergastoplasmàtic i el mitocondrial.

MATERIAL I MÈTODES

Els exemplars estudiats han estat recollits a diferents llacunes litorals del Delta de l'Ebre (Tarragona). La fixació és realitzada per immersió (2 h.) dels animals sencers en paraformaldehid 2 %-glutaraldehid 2,5 % tamponat amb fosfat 0,2 M (pH 7,3), bé que en algunes ocasions s'ha afegit a aquesta solució, àcid tànic fins a una concentració final del 4 %. Posteriorment es realitza una postfixació amb OsO_4 al 1 % tamponat i en fred (4 °C), al llarg de 90 minuts. Van ser deshidratats en una sèrie cetònica ascendent, utilitzant com a intermediari l'òxid de propilè i incloent-los, finalment, en la resina Spurr (SPURR, 1969).

Els talls van ser obtinguts mitjançant un ultramicrotòtom Reichert. Els talls semifins, d'un gruix de 1 μ , varen ser tenyits amb blau de metilè-bòrax al 1 % i observats en un microscopi Dialux-Leitz. Els talls ultrafins van ser contrastats amb acetat d'urani, seguit de citrat de plom (REYNOLDS, 1963) i observats en un microscopi electrònic de transmissió Phillips 200 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Per a l'estudi amb el microscopi electrònic de rastreig, els exemplars van ser fixats i deshidratats de la mateixa manera, passats després per l'acetat d'amil i sotmesos a la tècnica del punt crític per ésser, poste-

riorment, metalitzats amb or i observats en aparells Cambridge S.4 i JEOL 840 de l'esmentat Servei.

RESULTATS

Anatòmicament, l'ovari és un òrgan senàr, situat dorsalment respecte l'intestí mitjà. Presenta, en direcció cefàlica, dues expansions, els oviductes que, en arribar a l'inici de l'intestí anterior, giren 180°, adreçant-se cap a la part posterior de l'animal, aconseguint, a la vegada, una posició més medial. Aquesta disposició morfològica té també un paral·lelisme funcional, en el sentit que fenòmens temporals, com són la maduració dels oòcits i la síntesi de nou material en les diferents fases de la vitel-logènesi, tenen una correspondència en la seva compartimentació espacial (fig. 7).

a) *Previtel-logènesi*

En arribar al leptotè, primer estadi profàsic, els oòcits han augmentat de volum, fins arribar a les 9-10 m de diàmetre. L'increment del volum nuclear és més espectacular que la resta del conjunt cel·lular, i medeix, en terme mitjà, 6 a 7 μ de diàmetre. Com a conseqüència, l'índex nucleocitoplasmàtic arriba a valors molt alts (més de 0,8). El nuclèol no és únic, i està constituït per masses disperses perifèricament, en contacte amb l'embolcall nuclear (fig. 8).

Els mitocondris són escassos i de matriu clara. Hi ha abundants ribosomes, dispersos en el reduït citoplasma, però no es detecta la presència de sistemes membranosos, com reticle endoplasmàtic, complex de Golgi i vacúols.

Dès d'aquest primer període meiòtic, apareixen a l'entorn del nucli unes masses denses als electrons relacionades, topogràficament, amb els porus nuclears; la seva

estructura és granelluda i filamentosa, tot coexistent ambdues en proporció variable. Malgrat no haver-hi comprovació citoquímica (ribonucleoproteïnes), el seu examen ultrastructural les fa homòlogues a les extrusions nuclears anomenades "nuages" o nematosomes, descrites a diferents models cel·lulars (principalment en cèl·lules germinals i neurones) i que van ser revisades per EDDY (1975) (fig. 9).

Als estadis de zigotè i paquitè són visibles complexos sinaptinèmics; desapareixen les masses nucleolars i la cromatina és condensada en grumolls, que corresponen als cromosomes (fig. 8). Posteriorment, al diplotè, aquella s'homogenitza, donant al nucleoplasma un aspecte granellut i poc dens als electrons, on tornen a ser visibles les, ja esmentades, masses nucleolars perifèriques i els nematosomes.

b) *Vitel-logènesi primària*

L'inici d'aquesta etapa està marcat per un extraordinari desenvolupament mitocondrial i ergastoplasmàtic (fig. 11), mentre que d'altres estructures, com el reticle endoplasmàtic llis, complexe de Golgi i vacúols, no són detectats; el volum cel·lular total arriba a multiplicar-se per un factor de 5 a 7, encara que el nucli només ho fa per la meitat.

L'ergastoplasma és vesicular i tubuliforme i s'observen, a l'interior dels sàculs, uns grànuls densos als electrons, amb mesures bàsiques de 40-50 nm de diàmetre. Part del gran desenvolupament ergastoplasmàtic sembla que té el seu origen en un procés de vesiculació de l'embolcall nuclear, en concret de la seva membrana externa (figs. 1, 10, 11), fenomen descrit en un calanoid per BLADES-ECKELBARGER i YOUNGBLOUTH (1984).

Aquesta vesiculació és explosiva en els primers moments, però d'una durada molt curta. Les vesícules són polimorfes, de di-

ferents grandàries i, en general, contenen un material fibrós que es condensa en grànuls semblants als que contenen els sàculs ergastoplasmàtics. Aquests evolucionen amb nous productes de síntesi, que es disposen segons l'eix longitudinal, donant-se una primera fase de condensació entre ells. Quan el nombre arriba a 10-15 unitats, condensades o no, part dels sàculs s'incurven, tot prenent una forma semblant a la dels torus geomètric, i incorporen en el seu interior alguns elements lliures en el citoplasma, fonamentalment ribosomes, quan els dos extrems d'aquesta formació tòrica es fusionen per a donar una vesícula (figs. 2, 12). La resta dels sàculs sembla que només fan una condensació intramembranosa.

D'una manera o altra evolucionen cap a una agregació generalitzada, amb nova síntesi i la constitució final d'un grànul vitel·línic primordial, al qual se li van afeigint, dintre del sàcul d'ergastoplasma, d'altres de nova acumulació. El resultat final és una estructura envoltada per una doble membrana, on es poden distingir, a nivell morfològic tres components: a) un component basal i majoritari, que constitueix el producte de nova síntesi, de naturalesa granelluda i electrodensa; b) un component fibrós, extraordinàriament dens als electrons que al començament de l'elaboració és quantitativament molt important però que minva ràpidament en la maduració; c) dintre d'aquest segon hi ha una zona central clara, fibrosa i laxa. La membrana més externa que envolta el conjunt sembla ser la pròpia del sàcul ergastoplasmàtic, i porta fins al final del procés ribosomes adherits, mentre que l'interna aviat els perd i acaba per desaparèixer ella mateixa (fig. 14). Finalment tot el grànul evolucionaria, tal com hem esmentat anteriorment, presentant un aspecte homogeni, constituint el primer tipus plaquetari.

Respecte al complexe de Golgi ens trobem a la fi d'aquesta etapa amb l'observa-

ció de formacions membranoses, que no tenen la disposició característica d'aquesta estructura. Són constituïdes per un cúmul de vesícules relativament petites i un nombre reduït de sacs aplanats, no ben bé delimitat quant a la seva extensió -i, per això, podria ser més convenient de parlar de "zones golgianes" (fig. 13)-, i no es poden relacionar clarament amb cap altra estructura cel·lular, encara que sempre són envoltades per l'ergastoplasma i els mitocondris.

El conjunt mitocondrial, que a la previtel·logènesi es constituïa amb elements de gran mida, però en nombre reduït, inverteix pràcticament la situació, tot multiplicant-se extraordinàriament en un procés paral·lel a l'ergastoplasma. La seva grandària és mitjana, i s'observen molt aviat fenòmens de fusió entre ells i de regressió interna, fonamentalment a les crestes (figs. 11, 12) i, com a conseqüència, formen grans vacúols, que, cap al final d'aquesta etapa, es van omplint d'un material molt laxe al començament, més condensat després i tenint, a terme, un aspecte granel·lut i relativament electrodens, constituint el segon tipus fonamental de vitellus (figures 12, 15).

DISCUSSIÓ

La representació en forma d'histograma dels índex nucleocitoplasmàtics obtinguts en sèries independents de dades ($n=64$) preses d'una col·lecció de talls parasagitals de diferents exemplars, denota la possible distribució bimodal del paràmetre (fig. 3), amb una vall situada entre 0,6 i 0,7, la qual cosa podria interpretar-se com a reflex de la existència de dues poblacions, corresponents a un índex mig molt alt (0,85-0,90) i a un altre relativament baix (0,4), que corresponen a les poblacions d'oòcits en previtel·logènesi i vitell·logènesi primària. Si alhora fem una representació

dels parells diàmetre nucli-diàmetre citoplasma, el núvol de punts es descomposa en dues agrupacions clares i definides (fig. 4), que podrien estar en la mateixa línia de les ja esmentades en tractar el paràmetre anterior.

Encara que aquestes dues mesures les podem correlacionar mitjançant una corba exponencial, amb un bon índex (0,94) (fig. 5), l'equació resultant és de difícil interpretació i el seu valor seria en principi, restringit a aquesta espècie en particular.

Però de la representació histogràmica i dels paràmetres es pot extreure com a conclusió evident l'extraordinària rapidesa de pas de la primera fase a la segona, en base a la pràctica inexistència de valors intermedis entre una i l'altra. Si això és correcte, hem de suposar una maquinària sintètica molt potent i sincronitzada per tal de produir, si més no, membranes, o bé l'existència d'un reservori previ. La conseqüència, a part del lògic increment de l'embolcall nuclear i l'oolemma, és la presència de dos sistemes membranosos molt desenvolupats: el mitocondrial i l'ergastoplasmàtic.

La vesiculació de l'embolcall nuclear descrita en diferents models cel·lulars, entre ells els oòcits, pot estar en la mateixa línia que el fenomen dels nematosomes, pel que fa referència al pas d'informació organitzada, però en aquest cas es comprova, morfològicament, que són la base de part de les formacions ergastoplasmàtiques.

Mentre que el model general de síntesi proteica als crustacis sembla ser el de la fusió intracisternal dels grànuls (KESSEL, 1968a, b), en el cas de *A. robustus*, hi ha un material originari nuclear (almenys en una proporció important dels sàculs) que es va organitzant ja abans de la segregació de la vesícula per part de l'embolcall nuclear (fig. 10), mitjançant una compactació del material filamentós, al qual posteriorment s'afegeixen productes de nova síntesi, un

cop lliure al citoplasma. El que és característic de l'espècie en estudi és l'evolució d'almenys, part dels sàculs ergastoplasmàtics. La fusió parcial dels grànuls seria una situació intermèdia entre l'oogènesi del calanoid *Labidocera aestiva* (BLADES-ECKELBARGER i YOUNGBLOUTH, 1984), en la qual fonamentalment no hi ha fusió, i l'expressada pel model general, en el qual predomina, des del primer moment de síntesi, la fusió total dels grans. El fet que aquesta fusió parcial sigui continuada per una incurvació sacular i possible segrestament de material citoplasmàtic (ribosomes?) evidència: 1) la heterogeneïtat del material contingut a la vesícula, comprovable a nivell morfològic; 2) la síntesi i l'emmagatzematge fraccionats del primer tipus fonamental de vitel·lus, inclús amb la presència temporal de compartiments intrasaculars; 3) la complexa reorganització morfològica de tots aquests components fins a donar una vesícula homogènia (figs. 12, 14).

Les vesícules que contenen el segon tipus fonamental de vitel·lus (fig. 12), creiem, per les imatges obtingudes, que provenen de la reestructuració d'un gran nombre de mitocondris, en degenerar les crestes i, encara que l'origen del contingut romani desconegut, s'han observat restes de doble membrana a la vesícula madura (fig. 15), la qual cosa vindria a confirmar l'idea exposada i completaria parcialment els treballs fets pels autors esmentats abans, quan exposen la presència de "vesícules buides que s'omplen de material mitjanament dens", tot afirmant la seva desconexió (BLADES-ECKELBARGER i YOUNGBLOUTH, 1984) i els treballs de ARNAUD *et al.* (1982) que observa formes de transició entre l'ergastoplasma i les vesícules buides.

Pel que fa referència a les anomenades "zones golgianes" (fig. 13), no sembla que tinguin una relació directa amb cap orgànel, encara que sempre estiguin envoltades pels mitocondris i l'ergastoplasma, i aques-

ta proximitat s'interpreti com a funcional (ANDERSON, 1974), ja que s'ha d'observar que aquesta també és obligada pel gran desenvolupament d'aquells dos sistemes membranosos; respecte a això és obligat també d'assenyalar que en un altre ciclòpid, *Cyclops strenuus*, DURFORT *et al.* (1980) han observat un complex de Golgi actiu i en relació amb l'ergastoplasma al llarg de la vitel·logènesi.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, E. (1974) Comparative aspects of the female gamete. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 4:1-61.
- ARNAUD, J., BRUNET, M. i MAZZA, J. (1982) Etude de l'ovogenèse chez *Centropages typicus* (Copepoda, Calanoida). *Reprod. Nutr. Dévelop.* 22(3):537-555.
- BEAMS, H.W. i KESSEL, R.G. (1962) Intracisternal granules of the endoplasmic reticulum in the crayfish oocyte. *J. Cell Biol.* 13(1):158.
- BLADES-ECKELBARGER, P.I. i YOUNGBLOUTH, M.J. (1984) The ultrastructure of oogenesis and yolk formation in *Labidocera aestiva* (Copepoda, Calanoida). *J. Morphol.* 179:33-46.
- BRUSLE, J. (1972) Les infrastructures germinales femelles précoces (Gónocytes, ovogonies et ovocytes I). *Ann. Biol. T.II* (11-12):505-571.
- DURFORT, M., BARGALLO, R., BOZZO, M.G., FONTARNAU, R. i LOPEZ CAMPS, J. (1980) La vitellogènesi en *Cyclops strenuus* FISCHER (Crustacea, Copepoda). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.* 78:437-447.
- EDDY, E.M. (1975) Germ plasm and the differentiation of the germ line. *Int. Rev. Cytol.* 43:229-280.
- FRANKE, W. (1974) Structure and biochemistry of the nuclear envelope. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 4:72-211.
- KESSEL, R.G. (1968a) Mechanisms of protein synthesis and deposition in Crustacean oocytes. *Z. Zellforsch.* 71:525-544.
- KESSEL, R.G. (1968b) The permeability of the crayfish oocyte-follicle complex as studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* 38:169-170.
- RAVEN, CH. P. (1961) *Ovogenesis: the storage of developmental information.* Pergamon Press. London.
- REYNOLDS, E.S. (1963) The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- SPURR, A.R. (1969) A low-viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26:31-43.

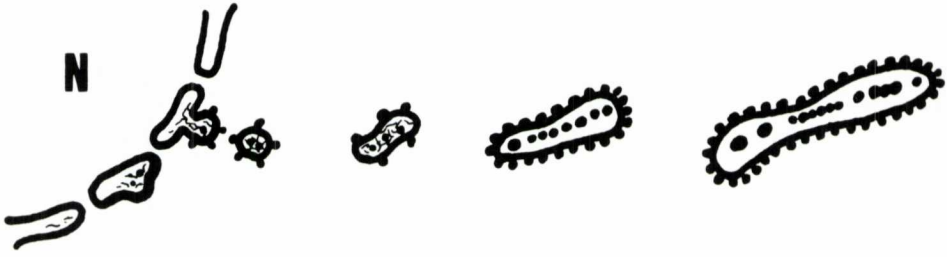


Fig. 1. Esquema del procés de vesiculació de l'embolcall nuclear.

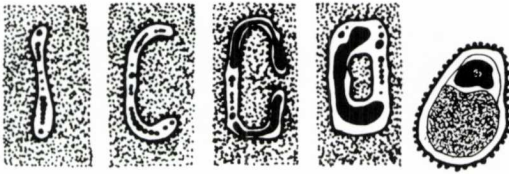


Fig. 2. Esquema de la estructuració d'una part dels sàculs ergastoplasmàtics.

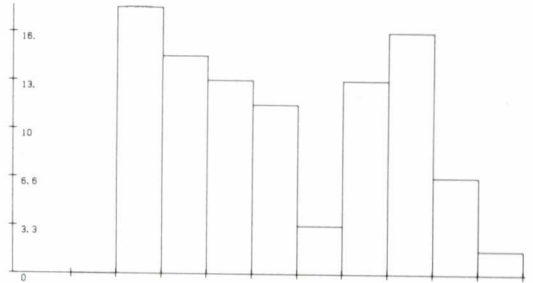


Fig. 3. Histograma de la distribució de la relació núclei/citoplasmàtica.

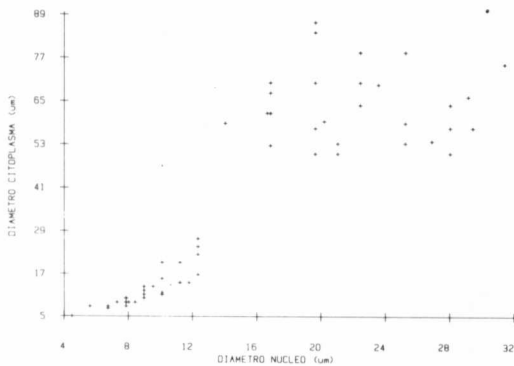


Fig. 4. Representació de la població de punts corresponents als parells diàmetre nucli-diàmetre citoplasmàtic.

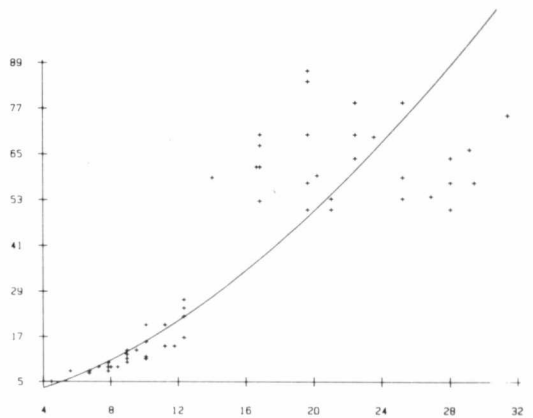


Fig. 5. Corba de regressió dels paràmetres representats a la fig. 4.

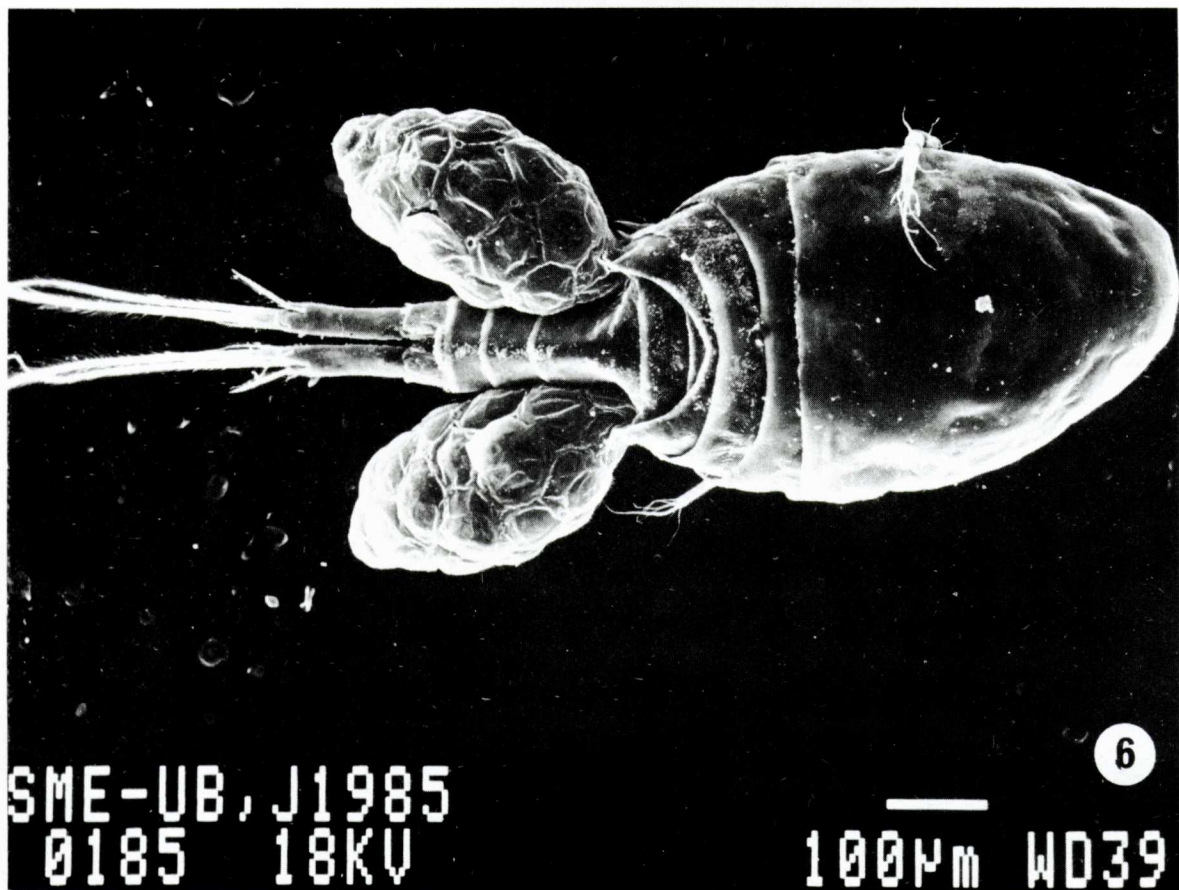


Fig. 6. *A. a. robustus* (visió dorsal). Es tracta d'un exemplar femella, en el qual destaca la presència dels dos sacs ovígers.

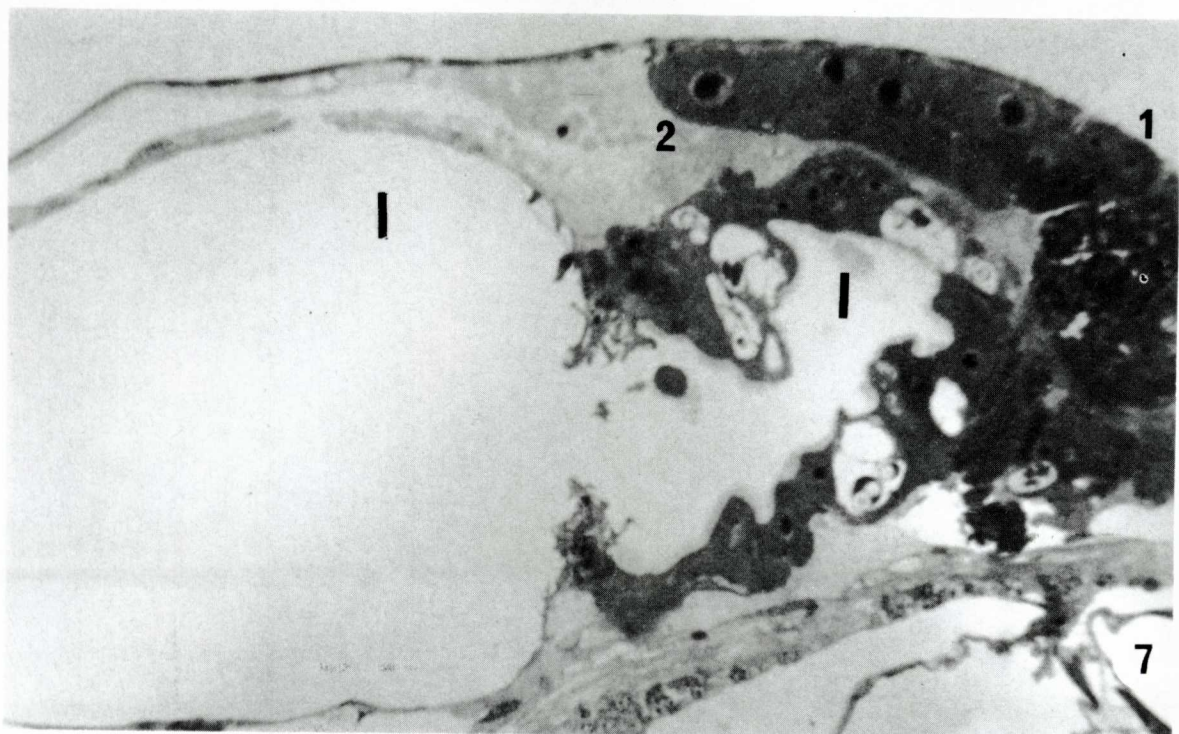


Fig. 7. Tall parasagital d'un oviducte. Es pot observar la gradació espacial en la maduració oocitària (1 → 2) i la seva proximitat al tub digestiu (I).

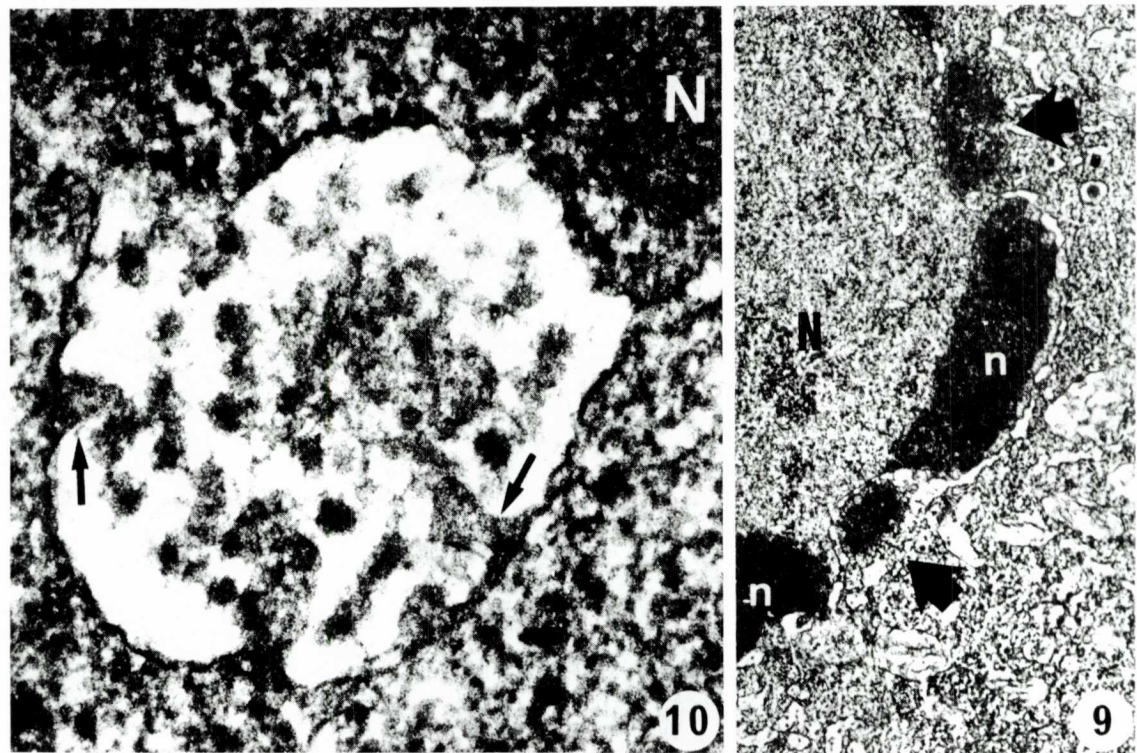
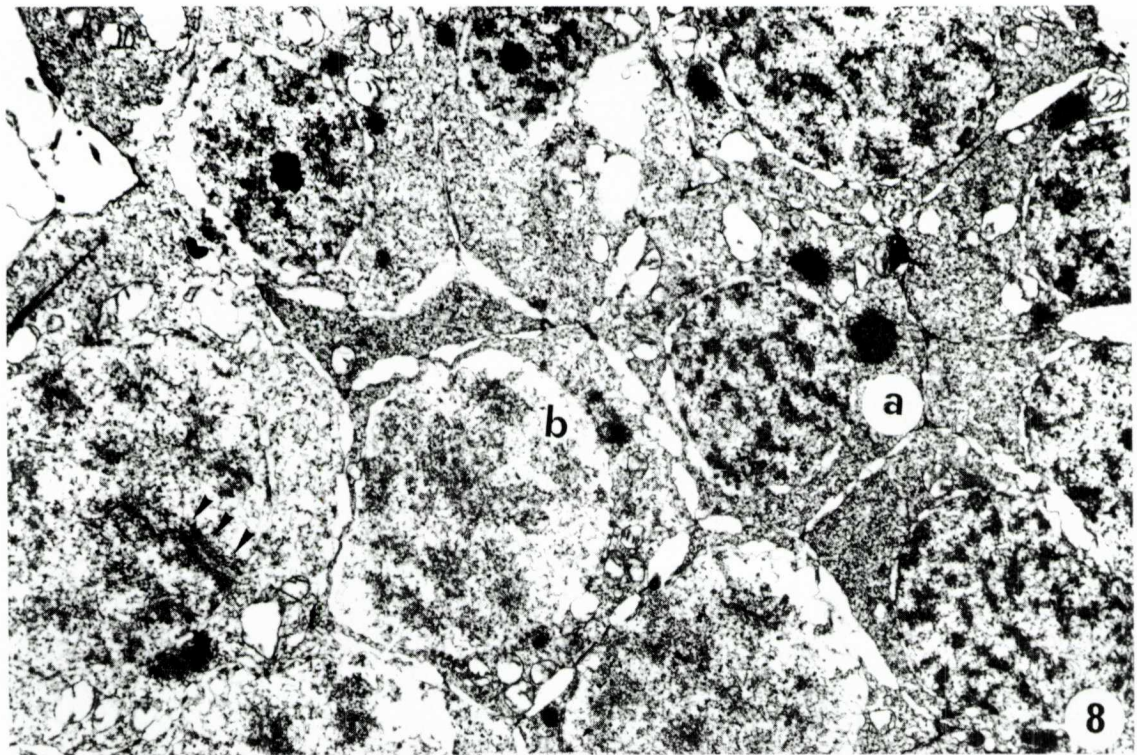


Fig. 8. Grup d'òocits en diferents estadis de la profase I: leptotè (a) i paquíte-zigotè (b). Es reconeixen complexos sinapteinèmics (↓↓↓) ($\times 7800$).

Fig. 9. Etapes inicials de la vítel·logènesi primària, on es poden distingir: (†), nematosomes; (n), masses nucleolars perifèriques; (N), nucli. Són remarcables les dilatacions de l'embolcall nuclear i els complexos dels porus ($\times 11400$).

Fig. 10. Vesícula o dilatació de l'embolcall nuclear, l'interior de la qual conté un material d'estructura filamentososa en procés de compactació. (→), restes dels complexos de porus; (N), nucli ($\times 119500$).

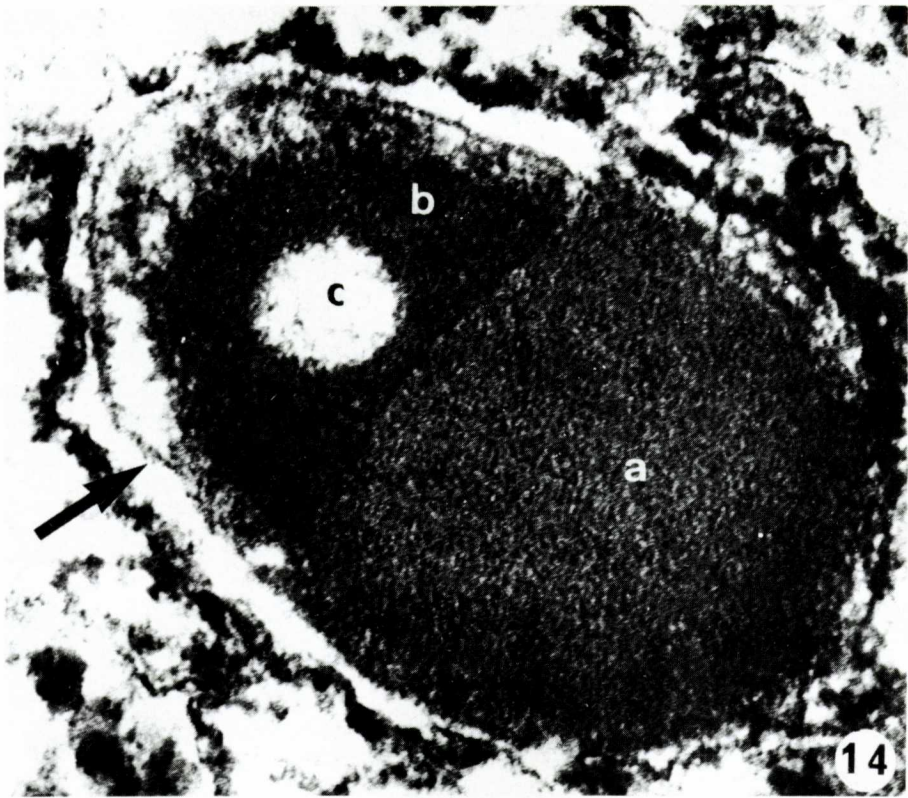


Fig. 14. Plaqueta vitel·lina del tipus 1 en fase síntesi i estructuració. (a, b, c) senyalen els tres components esmentats en el text; (→), membrana interna en re-

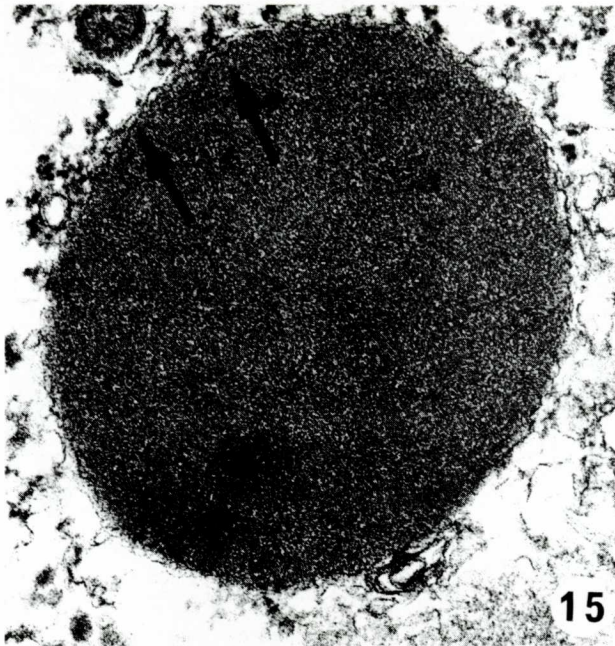


Fig. 15. Estat final de compactació del tipus vitel·línic 2, envoltat per restes de doble membrana (→) (×78600).

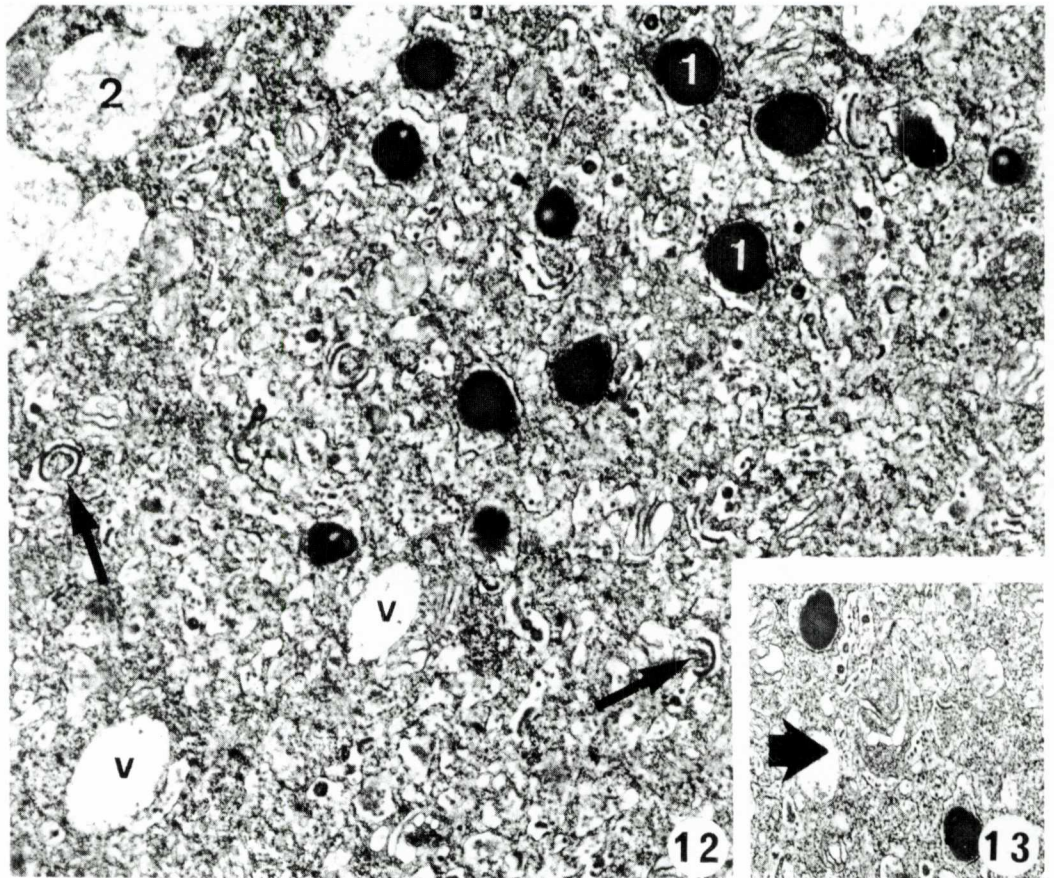
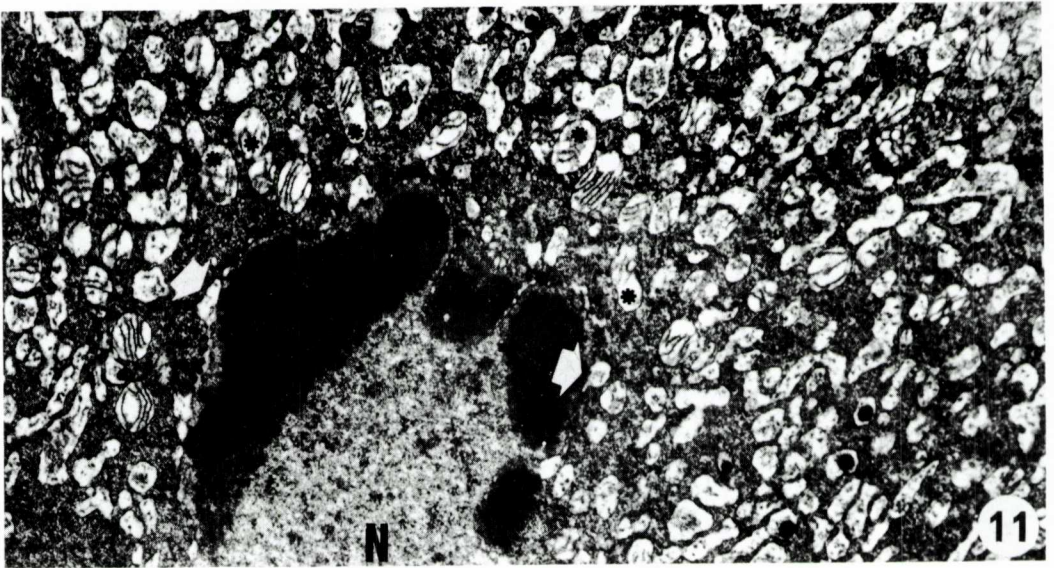


Fig. 11. Vitel·logènesi primària. Gran desenvolupament mitocondrial i ergastoplasmàtic. (*), mitocondris en diferents estadis de regressió de les crestes; (†), vesiculació de l'embolcall nuclear; (N), nuclis ($\times 8000$).

Fig. 12. Vitel·logènesi primària. (1), primer tipus fonamental de vitel·lus; (2) segon tipus fonamental; (v), vesícules buides, de possible procedència mitocondrial; (\rightarrow), diferents estadis de la formació de la plaqueta vitel·lina 1, amb figures del fenomen d'incurvació ($\times 15100$).

Fig. 13. Detall de les "zones gòlgies" (†) ($\times 18000$).