

**RELAÇÕES NÚCLEO-CITOPLASMÁTICAS DURANTE A GAMETOGENESE:
Ultraestrutura, Citoquímica e Aspectos Funcionais**

Carlos Azevedo

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade do Porto, 4000 Porto, Portugal

Abstract

NUCLEUS-CYTOPLASMATIC RELATIONSHIP DURING THE OOGENESIS

To a large extent, the morphological organization of nucleoli, reflects the degree of ribosomal RNA (rRNA) synthesis taking place in different cells. Oocytes are cells in which ribosome formation is extremely active principally at specific stages of oogenesis before the beginning of the vitellogenesis.

Correlations of nucleolar structure and function during the oogenesis can be made on the basis of new formations, intense growth and numerous morphological and biochemical transformations. Among fibrillar and granular components, the nucleoli generally present the fibrillar centers which contain the transcribing rDNA molecules located in the Nucleolar Organizer Region (NOR) of the nucleolar chromosomes. Synthesis of the successive ribosomal particles (45S rRNA \rightarrow 32S and 20S) (32S \rightarrow 28S and 5.8S) (20S \rightarrow 18S) studied by autoradiographic techniques indicate that the activity represents a continuous transport of the nucleolar material that condense in the perinuclear zone and thus becomes ultrastructurally an organelle named "nuage". This structure formed by ribonucleoproteins, contains the precursors of the ribosomes, and may be associated with some mitochondria, forming the mitochondrial rosettes. Generally the "nuages" migrate in the cytoplasm before the beginning of the vitellogenesis at dictyate stage of meiotic prophase.

Key Words: rRNA, Nucleolus, "Nuages", Nucleus-Cytoplasmic Relationship.

A gametogênese é um complexo fenómeno biológico que, nos diferentes grupos de animais, engloba a espermatogênese e a ovogênese originando a formação dos gâmetas, células especializadas na transmissão da informação genética dos caracteres hereditários.

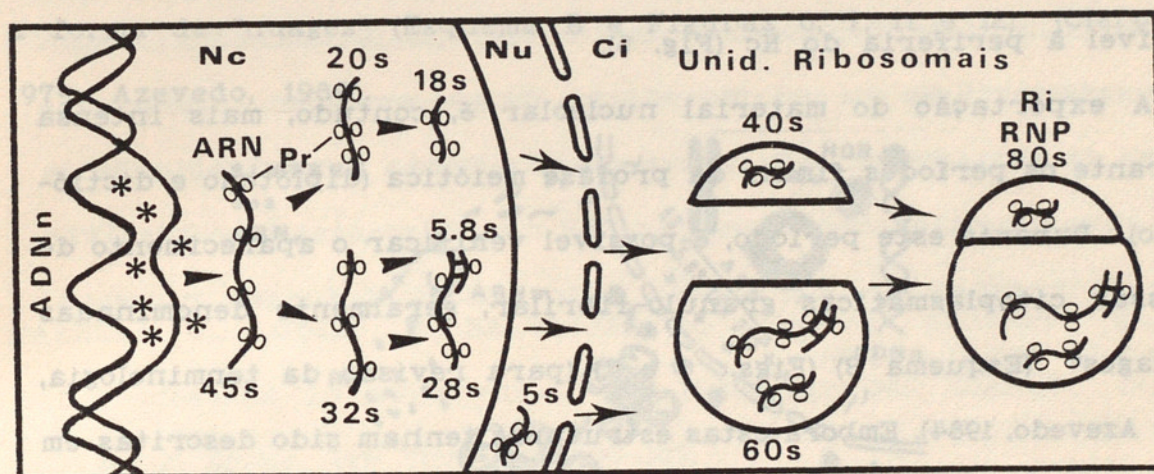
A informação genética contida no ADN é transmitida sucessivamente a várias entidades biológicas que a utilizam em diferentes etapas da gametogênese, através da replicação, amplificação e transcrição.

Na ovogênese, a transcrição é um fenómeno de grande evidência, nomeadamente no período profásico da meiose em que o ovócito tem necessidade de grande quantidade de precursores para a síntese vitelina. Este fenómeno está intimamente associado à formação dos genes ribosomais, ao desenvolvimento do nucléolo (Nc) e, à consequente, exportação de material nucleolar para o citoplasma (Clérot, 1979; Azevedo, 1984; Azevedo et al., 1984; Coimbra e Azevedo, 1984; Goessens, 1984).

Nos diferentes tipos de ovócitos, o Nc apresenta-se como uma estrutura de particular importância na síntese dos ARN ribosomais (ARNr). É uma estrutura nuclear altamente dinâmica que, nos ovócitos, atinge grande volume (Mirre e Sthal, 1976; Azevedo e Coimbra, 1980; Azevedo et al., 1984; Goessens, 1984), devido à amplificação dos genes ribosomais (Gall, 1968; Denis e Wegnez, 1977) ou por actividade transcricional a partir dos cromosomas nucleolares que contêm o ADN nucleolar (ADNn) ou ADN ribosomal (ADNr), como também é designado (Mirre e Sthal; 1978, Azevedo et al., 1984). A partir de sequências nucleotídicas contidas em unidades transcricionais (UT) em zonas dos cromosomas nucleolares, chamadas Região do Organizador Nucleolar ("NOR") (Hernandez-Verdun, 1983; Fakan e Hernandez-Verdun, 1986) e, por interferência do ARN-polimerase I, é transcrita a primeira unidade nucleotídica (UNT) com 13.000 nucleótidos (Nt) correspondente ao ARNr de 45S (RNP 80S). Este primeiro ARNr de 45S

contêm os Nt correspondentes aos ARNr de 18S, ARNr de 28 e 5,8S que são as UNT dos ribosomas (Esquemas A e B) (Azevedo e Lobo-da-Cunha, 1984; Goessens, 1984; Darnell *et al.*, 1986; Newport e Forbes, 1987).

De origem nuclear, não nucleolar, moléculas de ARNr de 5S são sintetizadas e migram para o citoplasma acompanhando alguns ARNr de origem nucleolar. Mais tarde são incorporadas no agregado RNP que constitui o ribossoma (Esquema A e B) (Darnell *et al.*, 1986).



Esquema A- Transcrição e maturação ribossomal

Esta actividade bioquímica, esquematizada neste trabalho (Esquemas A e B), traduz a actividade metabólica do Nc, mais evidente nos períodos de diplóteno e dictióteno da profase meiótica.

O Nc torna-se precocemente uma unidade estrutural bem visível ao ML e ME nos estadios de ovogónias, contudo, o seu volume aumenta substancialmente durante as fases finais da Profase I (Fig. 1). Neste período, os componentes fibrilar e granular, bem como, os centros fibrilares, tornam-se mais evidentes (Figs. 2 e 3).

Embora nem sempre visível ao ME, o centro fibrilar é uma organização estrutural dos nucléolos que contém o ADNn (ou ADNr) dos

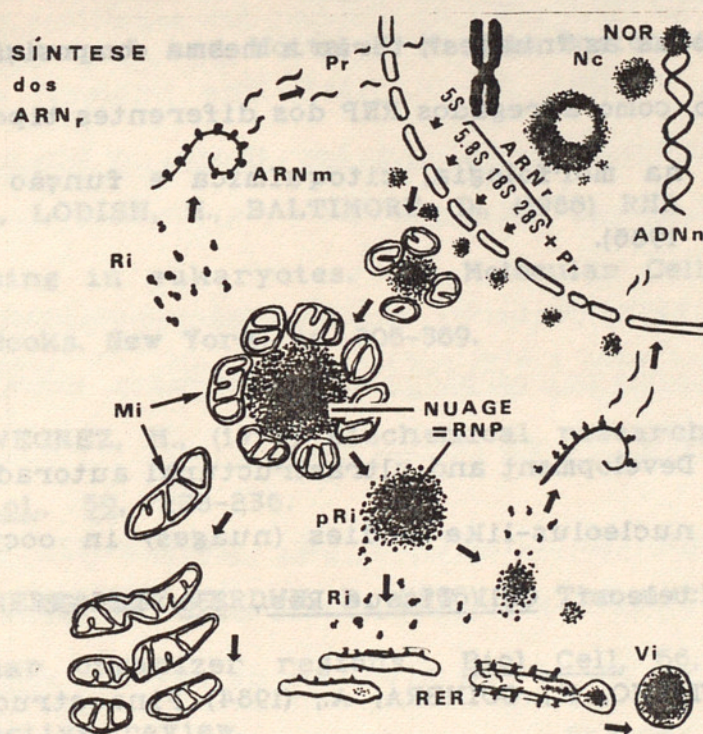
cromosomas nucleolares que transcrevem para os ARNr de 45S.

Análises citoquímicas por meio das técnicas do EDTA, da amina de ósmio e do nitrato de prata (Fig. 4), permitem a identificação dos componentes específicos do Nc, ou sejam o ADN, ARN e proteínas argirofílicas (Azevedo *et al.*, 1984; Goessens, 1984; Fakan e Hernandez-Verdun, 1986). Neste períodos iniciais da profase o Nc apresenta uma pequena exportação de material nucleolar, por vezes visível à periferia do Nc (Fig. 5).

A exportação do material nucleolar é, contudo, mais intensa durante os períodos finais da profase meiótica (diplóteno e dictióteno). Durante este período, é possível verificar o aparecimento de massas citoplasmáticas granulo-fibrilar, geralmente denominadas "nuages" (Esquema B) (Figs. 6 e 7) (para revisão da terminologia, ver Azevedo, 1984). Embora estas estruturas tenham sido descritas em vários tipos de células, nomeadamente em espermatócitos (Clérot, 1979), é nos ovócitos que elas atingem grandes dimensões (Azevedo, 1984; Smiley, 1988). Livres ou associadas a mitocôndrias, as "nuages" contêm os precursores RNP dos ribosomas (Clérot, 1979; Azevedo, 1984).

As "nuages" como agregados granulo-fibrilares de substâncias RNP migram no citoplasma, transportando em bloco os precursores ribossomais que vão originar os ribosomas estruturas indispensáveis para a intensa síntese proteica (vitelogénese) que se efectua durante o dictióteno (Azevedo, 1984). A redução gradual do volume das "nuages" (Figs. 8 e 9), presupõe que a sua dissipação está relacionada com o aparecimento dos ribosomas. Por outro lado, o facto de se associarem às "nuages" numerosas pequenas mitocôndrias (Figs. 6-8) antes do

processo de divisão mitocondrial que ocorre antes da hiperplasia, faz supor que as "nuages" têm interferência directa neste fenómeno de hiperplasia citoplasmática. Durante igual período, o Nc apresenta uma grande actividade de síntese do ARNr, detectada por estudos autorradiográficos, usando-se como precursor a uridina tritiada (U-3H) (Fig.10). O material intensamente sintetizado migra no nucleoplasma, atravessa os poros nucleares (Newport e Forbes, 1987) e, geralmente, condensa-se no citoplasma junto aos poros nucleares sob a forma de "nuages" (Esquema B e Figuras 6, 7, 11 e 12) (Clérot, 1979; Azevedo, 1984).



Esquema B - Relações núcleo-citoplasmáticas com a formação de "nuages"

A exportação dos produtos metabolizados no Nc apresentam uma migração rápida, da ordem dos 15 minutos para o ARNr de 18S e 40 minutos para o ARNr de 28S e 5,8S (Figs. 11-13) (Darnell *et al.*, 1986).

Em resumo e concluindo, pode ser afirmado que as RNP detectadas nas "nuages" de alguns ovócitos estudados constituem os precursores ribosomais sintetizados no Nc e, que, gradualmente, são exportados para o citoplasma sob a forma particulada (Newport e Forbes, 1987).

A falta de estudos autorradiográficos, citoquímicos e bioquímicos nas "nuages" observadas em diferentes tipos de ovócitos, não permite uma generalização dos componentes químicos existentes nas citadas estruturas. Contudo, a semelhança da morfologia ultraestrutural, a sua diferenciação e o estado meiótico da sua evolução, sugerem que todas, ou quase todas as "nuages", terão a mesma composição química e a mesma função, como agregados RNP dos diferentes tipos de ARNr que interferem na morfologia, citoquímica e função ribossomal (Darnell *et al.*, 1986).

Bibliografia

- AZEVEDO, C., (1984) Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuages) in oocytes of a viviparous teleost. Cell Tissue Res., 238, 121-128.
- AZEVEDO, C., CASTILHO, F., COIMBRA, A., (1984) Fine structure and cytochemistry of the oocytes nucleolus in the mollusk Helcion pellucidus (Prosobranchia). J. Ultrastruct. Res., 89, 1-11.
- AZEVEDO, C., COIMBRA, A., (1980) Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous teleost (Xiphophorus helleri). Biol. Cell, 38, 43-48.

- AZEVEDO, C., LOBO-DA-CUNHA, A., (1984) Centro fibrilar: morfologia, citoquímica e aspectos funcionais. Ciênc. Biol., (Portugal), 9, 157-184.
- CLEROT, J.-C., (1979) Les groupements mitochondriaux des cellules germinales téléostéen cyprinidés. II. Etude autoradiographique à haute résolution de l'incorporation de phenylalanine 3H et d'uridine 3H. Exp. Cell Res., 120, 237-244.
- COIMBRA, A., AZEVEDO, C., (1984). Structure and evolution of the nucleolus during oogenesis. In: Ultrastructure of Reproduction. van Blerkom, J. and Motta, P. M. (Ed.) Boston, Chapter 11, pp. 129-139.
- DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D., (1986) RNA synthesis and processing in eukaryotes. In: Molecular Cell Biology. Sci. Amer. Books. New York, pp. 305-369.
- DENIS, H., WEGNEZ, M., (1977) Biochemical research on oogenesis. Dev. Biol., 59, 228-236.
- FAKAN, S., HERNANDEZ-VERDUN, D., (1986) (*) The nucleolus and the nucleolar organizer regions. Biol. Cell, 56, 187-206.
- (*) Collective review.
- GALL, J.G. (1968) Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphilian oogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 60, 558-560.
- GOESSENS, G., (1984) Nucleolar structure. Int. Rev. Cytol., 87, 107-158.

- HERNANDEZ-VERDUN, D., (1983) The nucleolar organizer regions.
Biol. Cell, 49, 191-202.
- MIRRE, C., STHAL, A., (1976) Ultrastructural study of nucleolar organizer in the quail oocyte during meiotic prophase I.
J. Ultrastruct. Res., 56, 186-201.
- MIRRE, C., STHAL, A., (1978) Peripheral RNA synthesis of fibrillar center in nucleoli of japonese quail oocytes and somatic cells.
J. Ultrastruct. Res., 64, 377-387.
- NEWPORT, J. W., FORBES, D. J., (1987) The nucleus: structure, function, and dynamics. In: Ann. Rev. Bioch., by Annual Reviews Inc., New York, pp. 535-565.
- SMILEY, S., (1988) The dynamics of oogenesis and the annual ovarian cycle of Stichopus californicus (Echinodermata, Holothuroidea).
Biol. Bull., 175, 79-93.
- STHAL, A., MIRRE, C., HARTUNG, M., KNIBIELER, B., (1980) Localization, structure et activité des gènes ribosomiques dans le nucléole de l'ovocyte en prophase de méiose. Reprod. Nutr. Dévelop., 20, 469-483.

Legendas

Figura 1. Corte semifino dum ovário mostrando ovócitos com diversos graus de maturação com nucléolos (Nc). x 400.

Figura 2. Corte ultrafino dum nucléolo (Nc) mostrando os componentes fibrilar (F), granular (G) e centro fibrilar (CF). x 18.000.

Figura 3. Porção dum nucléolo (Nc) mostrando centros fibrilares (CF).
x 18.500.

Figura 4. Porção de um nucléolo (Nc) em anel mostrando os grãos de prata sobre o componente fibrilar. x 20.000.

Figura 5. Zona periférica dum nucléolo (Nc) mostrando material em fase de migração (setas). x 60.000.

Figura 6. Região citoplasmática (Ci) mostrando vários tipos de "nuages" (*), algumas das quais rodeadas por mitocôndrias (Mi). x 18.000.

Figura 7. Pormenor do invólucro nuclear com os seus poros nucleares (setas) e algumas "nuages" (*), uma das quais associada a mitocôndrias. x 77.500.

Figura 8. "Nuage" (*) completamente rodeada por mitocôndrias (Mi). x 30.000.

Figura 9. "Nuage" (*) em fase de dissipação, mostrando à sua periferia ou em zona próxima polirribosomas (setas). x 43.000.

Figuras 10-13. Aspectos de estudo autorradiográfico com uridina tritiada que foi incorporada no nucléolo (Nc) e transferida para as "nuages" (*).
x 11.200; x 29.000; x 24.000; x 39.000 respectivamente.

Figura 1. Corte semitransversal mostrando o núcleo (N) e o citoplasma (C) da célula. x 400.

Figura 2. Corte semitransversal mostrando o núcleo (N) e o citoplasma (C) da célula. x 18.000.

Figura 3. Porção do núcleo (N) mostrando o nucléolo (Nu) e o citoplasma (C). x 18.500.

Figura 4. Porção do núcleo (N) mostrando o nucléolo (Nu) e o citoplasma (C). x 20.000.

Figura 5. Zona periférica do núcleo (N) mostrando o nucléolo (Nu) e o citoplasma (C). x 60.000.

Figura 6. Corte semitransversal mostrando o núcleo (N) e o citoplasma (C). x 18.000.

Figura 7. Corte semitransversal mostrando o núcleo (N) e o citoplasma (C). x 17.500.

Figura 8. "Nucléolo" (?) completamente rodeado por citoplasma (C). x 20.000.

Figura 9. "Nucléolo" (?) em fase de dissolução, mostrando o núcleo (N) e o citoplasma (C). x 20.000.

Figura 10-11. Aspecto do estado autoradiográfico com grânulos (G) que foi incorporada no núcleo (N) e translocada para as mitocôndrias (M). x 11.200; x 19.000; x 24.000; x 39.000 respectivamente.

