

Possible relació de la presència d'esferocristalls intestinals amb la vitel.logènesi dels crustacis copèpodes.

M. DURFORT

Dpt. de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Abstract

Possible relationship between presence of intestinal spherocrystals and vitellogenesis in copepod crustaceans.

Since copepods lack a hepatopancreas and adipose tissue, the functions which these organs have in higher crustaceans are carried out by certain cells in the intestinal mucosa.

The species of freshwater copepods in this study, Eurytemora velox and Diaptomus conexus, have three types of cells in their midgut and hindgut. The majority are type A cells which are the enterocytes; the type B cells function as bioaccumulators and the type C cells are involved in the storage of lipids.

As in the other species of copepods which have been studied, the midgut B cells have cytoplasmic structures involved in the formation of large vesicles containing a fibrogranular organic matrix which inorganic salts. This process culminates in the formation of concretions or spherocrystals from one to two microns in diameter.

Due to the fact that the sexually mature specimens, with their oocytes full of vitelline platelets, have decomposed spherocrystals, we studied a possible connection between the concretions and the process of vitellogenesis. We have also found them to be involved with the process of ecdysis which has led us to believe that these spherocrystals have not an excretory function, such as they have in insects, but one of storage. They play an important role in the consolidation of the cuticle after ecdysis, and maybe in vitellogenesis.

The neurosecretive regulation of vitellogenine synthesis and ovulation in these copepods remains unknown.

Key words: Intestinal spherocrystals; Cation storage; Vitellogenesis; Copepod.

Introducció

La formació de les plaquetes vitel·lines depèn, en la major part de les espècies estudiades, de la vitel·logenina, proteïna que es forma en el fetge dels vertebrats, i en els invertebrats és sintetitzada en diversos òrgans, encara que en molts d'ells l'origen de la proteïna roman desconegut així com la seva neuroregulació.

En la major part dels crustacis superiors són els cossos grassos, molt desenvolupats en els insectes, els responsables de la formació de la vitellogenina i el procés és regulat per una hormona produïda pel mateix ovari, la VSOH (hormona ovàrica estimuladora de la síntesi de vitellogenina).

En els crustacis són els òrgans Y els que determinen la maduresa de les gònades femenines, ARVY et al (1954 i 1956) van demostra-ho en Carcinus maenas. Posteriorment en l'amfípode Orchestia gammarellus, el grup de treball del Laboratoire de Sexualité et Réproduction des Invertébrés de Paris ha publicat diversos estudis sobre la síntesi de la fracció proteica femenina, responsable de la vitellogenèsi, i la seva relació amb l'ecdisterona, amb les hormones de la muda en general i amb la Y-ectomia, BLANCHET et al (1975, 1980), MEUSY et al (1974, 1979). En l'isòpode Porcellio dilatatus, PICAUD et al (1980 a, b i c) demostraren que la síntesi de vitellogenina té lloc en el teixit adipós i en l'hepatopàncreas, al mateix resultat hi arriben GOHAR et al (1983) i SOUTY et al (1981), en el crustaci isòpode, Idotea balthica.

Cal tenir present però, que segons en quin moment es fa la Y ectomia els efectes són diferents. Si es practica abans de la pubertat, la vitellogenèsi queda bloquejada i si es fa després no hi té incidència, cal però remarcar que s'han descrit casos en què no se segueix aquest esquema. Així en Idotea balthica, REIDENBACH (1971) observa com l'ablació dels òrgans Y frena la vitellogenèsi, siqui quan sigui el moment en què s'ha practicat.

En Orchestia gammarellus la cauterització dels òrgans Y provoca una disminució de la producció de la vitellogenina i bloqueja totalment la vitellogenèsi si es fa en iniciar-se la intermuda, MEUSY et al (1977) i BLANCHET (1980 b).

En la síntesi de la vitellogenina i en la incorporació dins dels oòcits en ocasions sembla que hi intervinguin altres factors, entre els quals volem donar un especial ènfasi al paper que hom creu que juga el calci, MOREAU et al (1980), VILAIN et al (1980) ho demostren en oòcits d'amfibis, també BUMA et al (1983) troben una relació directa entre el calci i la hormona reguladora de l'ovulació de Lymnaea stagnalis.

Ja que en els copèpodes no hi ha teixit adipós, ni tampoc hepatopàncreas, l'origen de la vitellogenina roman enigmàtica, si bé caldria pensar en els òrgans sensorials de la regió cefàlica.

En el present treball intentem buscar una correlació entre la vitellogenèsi i la bioacumulació que té lloc en les cèl.lules de tipus B de l'intestí mitjà i posterior dels copèpodes estudiats.

Les cèl.lules intestinals de tipus B són un model d'estudi molt interessant

i en les espècies estudiades hem pogut constatar com les diverses estructures citoplasmàtiques intervenen en la formació dels litosomes (vesícules dins de les quals s'acumulen sals inorgàniques tot precipitant-se en una matriu orgànica, preferentment proteica). El complexe de Golgi, els lisosomes, el reticle endoplasmàtic rugós, així com el llis i fins i tot els mitocondris intervenen en la gènesi de les concrecions o esferocristalls (vegeu l'esquema 1).

Una revisió interessant dels processos de bioacumulació en general podem trobar-la en els treballs de MARTOJA (1980) i MARTOJA et al (1984).

Matèrial i mètodes

Els copèpodes estudiats han estat espècies d'aigua dolça, si bé de diferenta procedència: Eurytemora velox, de la família Temoridae, procedent dels Aiguamolls de l'Empurdà i Diaptomus conexus de la família Diaptomidae, procedent del Blaine Lakes i del Little Quill, llacs del Canadà.

Els exemplars han estat preparats seguint la metodologia habitualment emprada en els estudis ultraestructurals. Una doble fixació amb glutaraldehyd-paraformaldehyd al 3,5% tamponat amb Sørensen a pH 7,3 i a 4°C. Després d'un rentat prolongat amb la solució tampó s'ha fet una postfixació amb OsO₄ al 2% igualment tamponat amb Sørensen a pH 7,3 i a 4°C, durant dues hores. Una acurada deshidratació amb una sèrie ascendent d'alcohols o d'acetones ha precedit l'inclusió amb la resina Spurr o bé amb l'Araldita.

La tinció dels talls semifins ha estat feta rutinàriament amb el blau de metilè-borax i també amb roig d'alitzarina al 0,5%. Els talls ultrafins obtinguts amb un Ultracut i amb ganiveta de diamant, han estat contrastats rutinàriament amb acetat d'uranil i amb citrat de plom. Les observacions ultraestructurals han estat fetes amb un microscopi electrònic de transmissió Phillips 200 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Per fer la microanàlisi dels esferocristalls per difracció de raigs X s'han obtingut talls de 1 a 3 micres de gruix i han estat recollits amb reixetes d'or i aquestes han estat muntades sobre un suport de grafit. La metalització ha estat feta amb un Polaron model E.5000 i la pel·lícula de carbó o d'or té un gruix de l'ordre dels 300 Å. L'observació ha estat feta amb un microscopi electrònic de rastreig Phillips amb sistema d'anàlisi per difracció d'energia dispersiva de raigs X (EDAX) de l'Escola d'Enginyers de Barcelona (Fot.13).

Observacions

Eurytemora velox

L'intestí mitjà i posterior està format per tres tipus cel·lulars i com a Diaptomus conexus, el segon model quant a nombre, correspon a les cèl·lules de tipus B que també tenen aquí una funció bioacumuladora.

El polus apical de les cèl·lules B es diferencia molt bé de les cèl·lules de tipus A, ja que els microvillis són molt més menuts, de 0,5 a 1,5 micres de llargada i entre ells trobem nombroses formacions d'endocitosi.

Contactes del tipus de les unions septades són freqüents en els polus apicals d'aquestes cèl·lules intestinals. A nivell de la membrana apical però, no hem observat mai la formació de criptes com les trobades a Eucyclops serrulatus, una altre de les espècies d'aigua dolça estudiada (DURFORT, 1983).

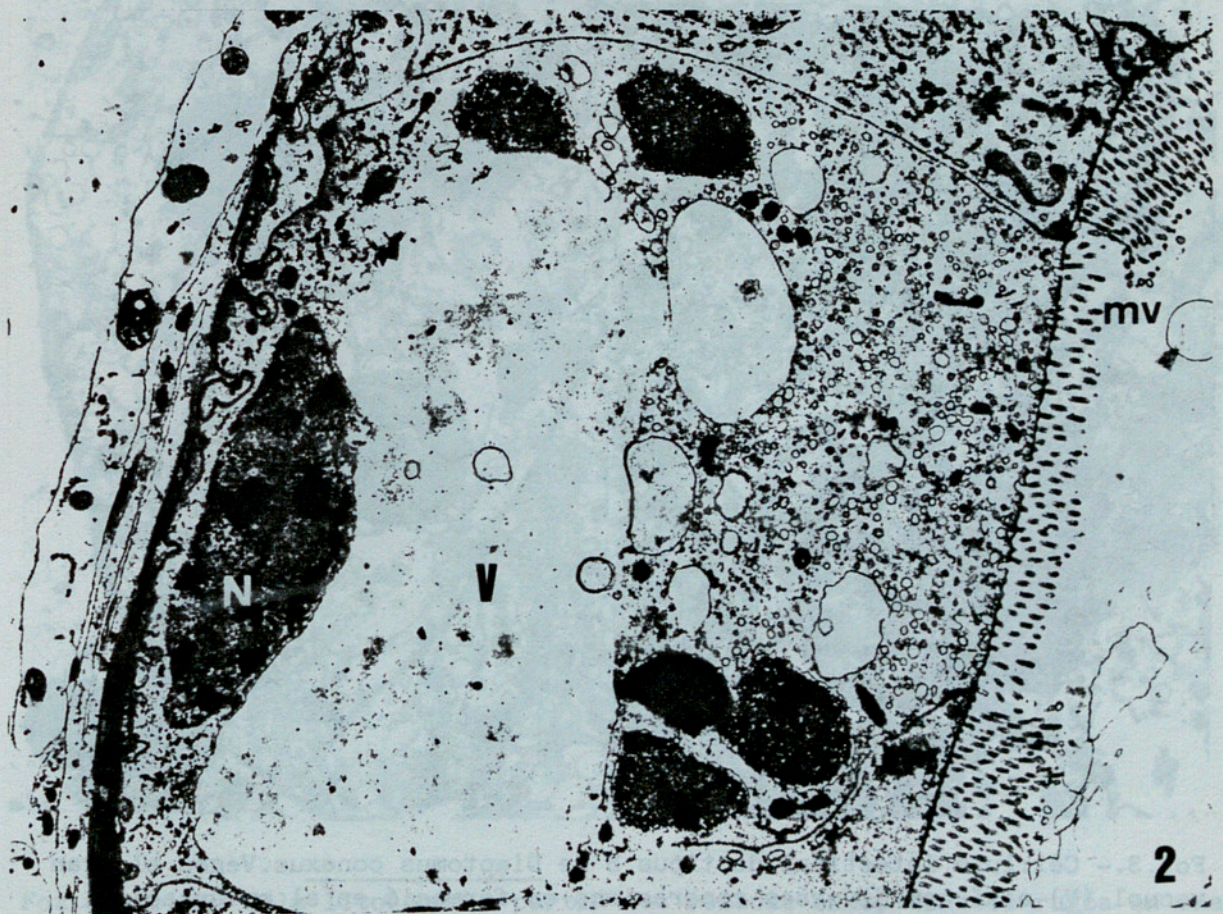
El condrioma és molt més desenvolupat que en D.conexus i en la matriu hi hem trobat habitualment partícules de glicogen, però mai hi hem observat calci. Hi han dues poblacions mitocondrials, les normals i els megamitocondris, són aquests els que presenten, ocasionalment, formacions laminars en el seu interior, molt semblants a les trobades en els mitocondris de les cèl·lules bioacumuladores de l'hepatopàncreas de Trachydermon cinereus, mol·lusc marí, DURFORT (1983).

El reticle endoplasmàtic rugós és molt desenvolupat i abraça el 80% del volum cel·lular. Es a nivell de les seves vesícules que trobem grans dilatacions que posteriorment perdran els ribosomes i donaran lloc als litosomes (Fot.6).

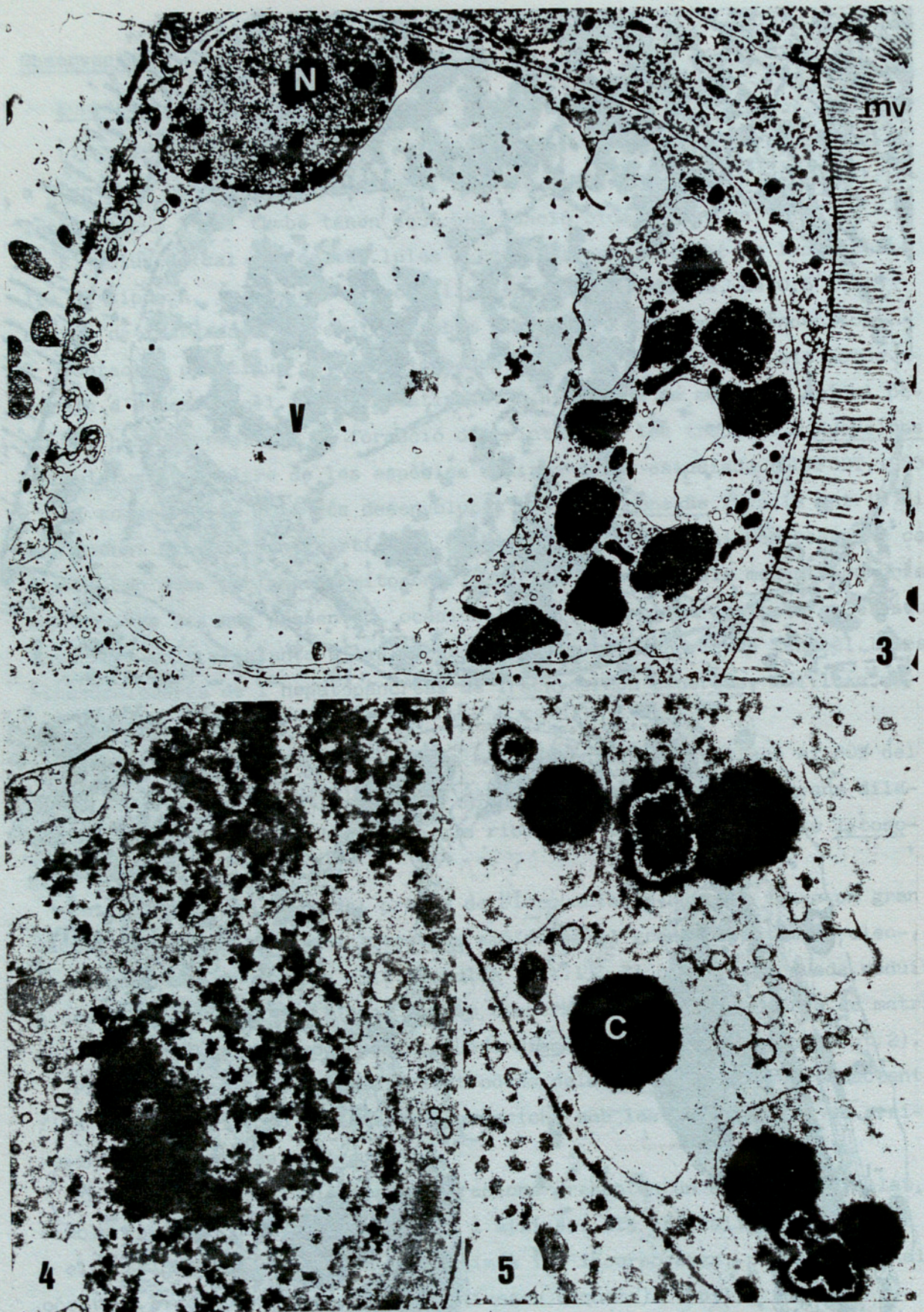
En les fases inicials del procés de bioacumulació hom pot veure un gran vacuol que aplega diversos litosomes amb material granulós altament electrodens i amb un aspecte molt floculós (Fot.1). El citoplasma queda reduït a una petita franja en la qual trobem dispersos alguns mitocondris de matriu molt densa. El nucli, molt petit, queda disposat en posició basal (Fot.2).

Progressivament el material electrodens dels litosomes es va compactant fins assolir un típic aspecte de concrecions amb les seves línies de creixement concèntriques (fot.4 i 5).

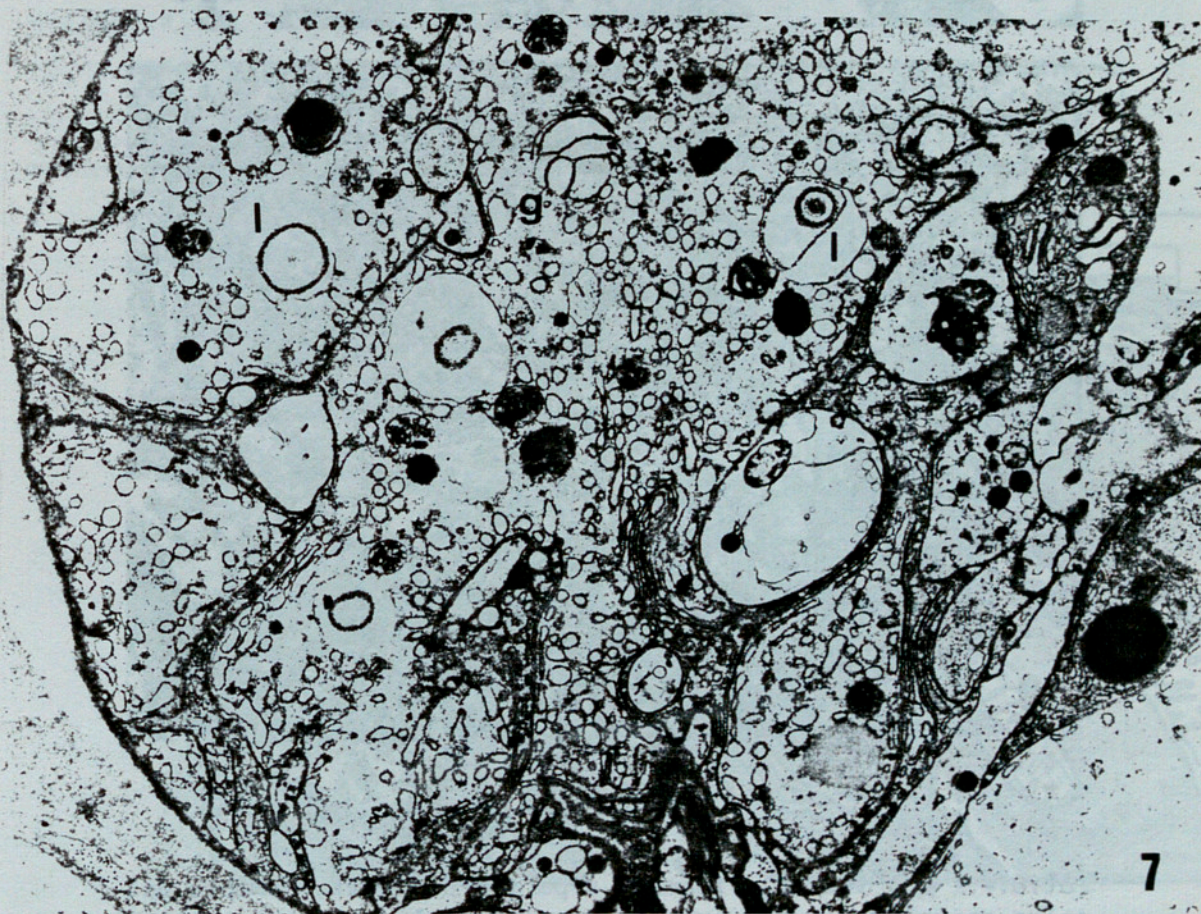
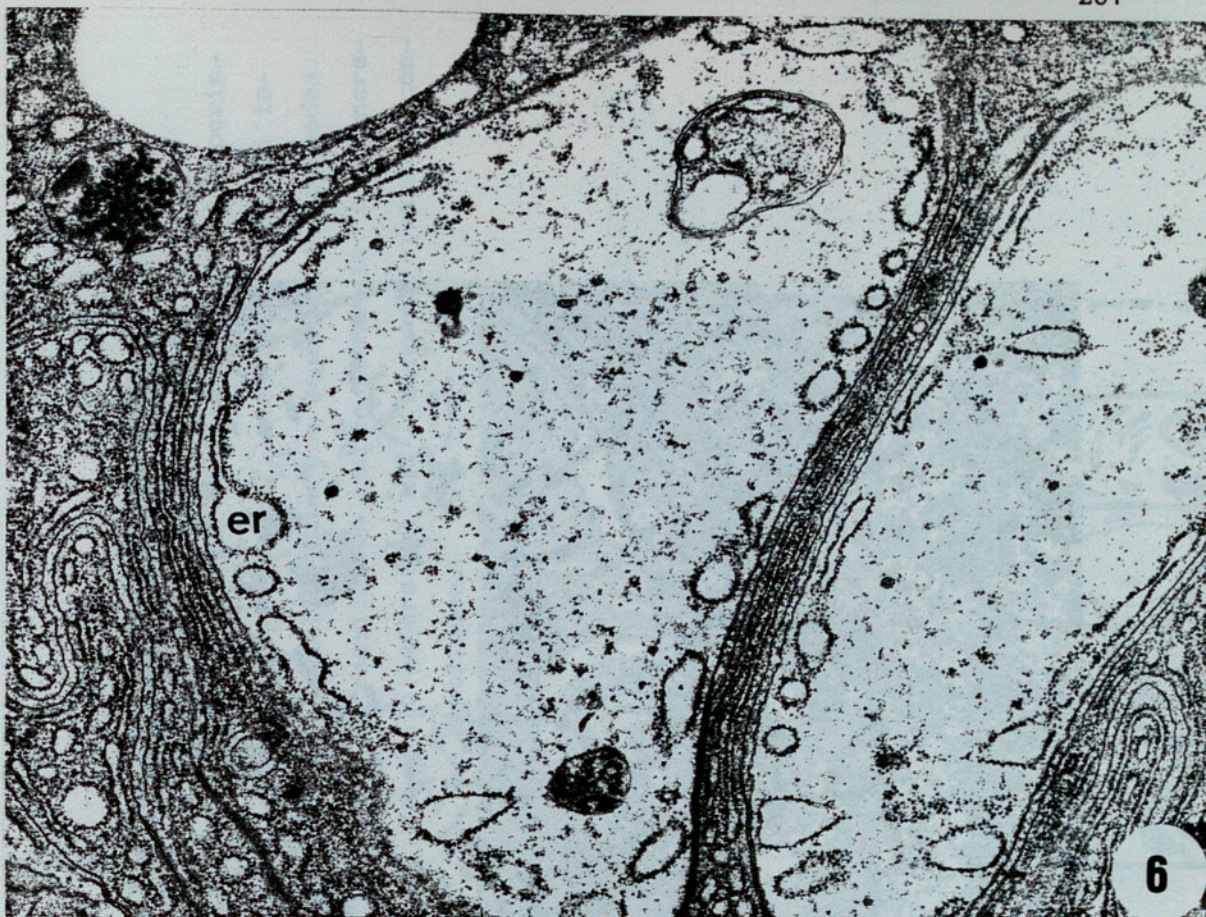
En determinats estadis, les concrecions presenten un aspecte estrellat, sembla com si s'haguessin erosionat i així és. Els cristalls es redisolten i els cations són lliurats a l'hemolimfa i s'incorporaran, possiblement als oòcits i evidentment a la cutícula (vegeu esquema). (Fot.10 i 11).



Fot. 1 i 2.- Dues fases de la formació dels esferocristalls en una cèl.lula de tipus B d'Eurytemora velox . 20.000 x i 12.500 x.

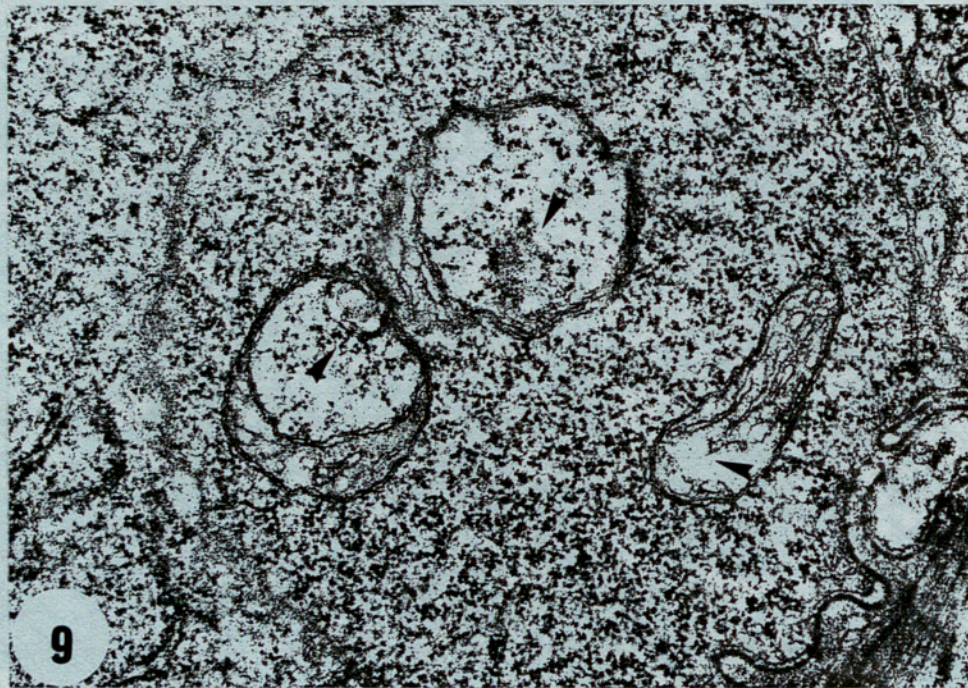
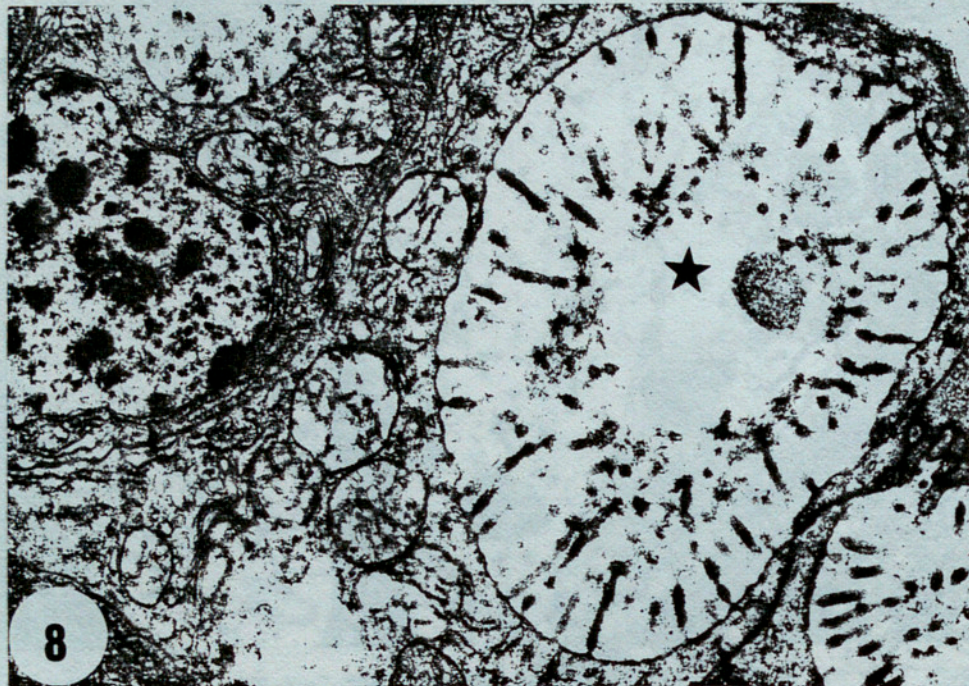


Fot.3.- Cèl.lula intestinal de tipus B de Diaptomus conexus. Vegeu el gran vacuol (V) així com diverses concrecions en formació en el polus apical. El nucli (N) està comprimit entre el vacuol i el plasmalemma. 12.500 x.
 Fot.4 i 5.- Esferocristalls de les cèl.lules bioacumuladores d'Eurytemora velox. Diverses etapes de formació. 20.000 x.



Fot.6.-Origen dels litosomes a partir del reticle endoplasmàtic rugós en una cèl.lula de tipus B de l'epiteli intestinal de D.conexus. 18.500x.

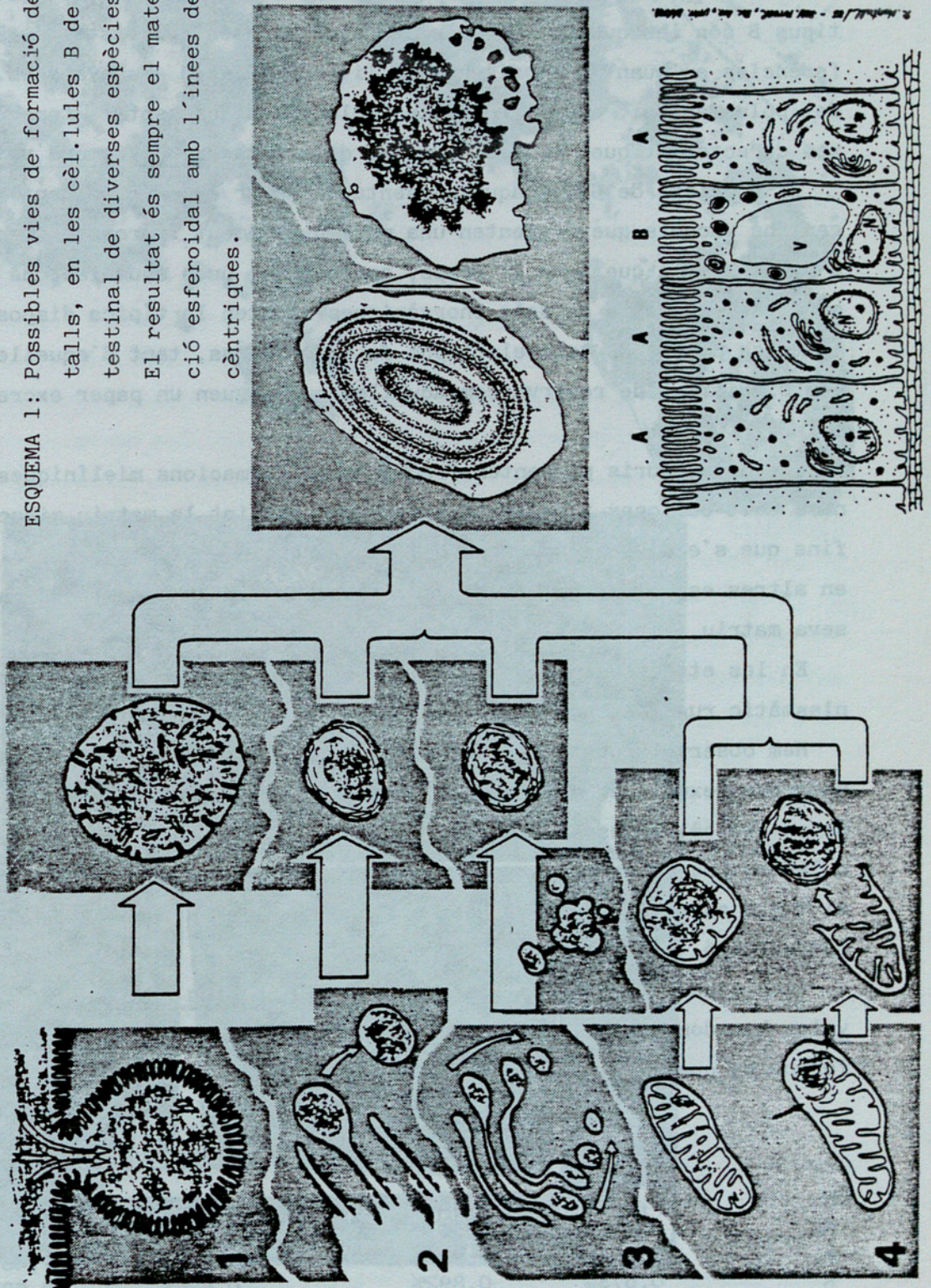
Fot.7.- Aspecte hiperdilatat dels dictiosomes (G) d'una cèl.lula del hepatopàncreas de Trachydermon cinereus. (L:litosomes).10.000x.



Fot.8.- (★) Vesícula formada a partir d'una microcripta del polus apical de la cèl.lula de tipus B de l'epiteli intestinal d'Eucyclops serrulatus. Vegeu els microvillis en la llum de la vesícula. 25.000x.

Fot.9.- Origen mitocondrial dels lisosomes d'una cèl.lula B del epiteli intestinal de D.conexus. Vegeu els acúmuls de calci. 20.000x.

ESQUEMA 1: Possibles vies de formació dels esferocristalls, en les cèl.lules B de l'epiteli intestinal de diverses espècies de copèpodes. El resultat és sempre el mateix: una concreció esferoidal amb l'inees de crexement concèntriques.



Diaptomus conexus

Troben igualment tres tipus cel.lulars i les cèl.lules intestinals de tipus B són les que presentaran concrecions o esferocristalls. Petites diferències en quant a l'origen dels litosomes seran assenyalades. A nivell del polus apical, els microvillis i els contactes septats tenen les mateixes característiques (Fot.3) que les descrites en Eurytemora velox.

El complex de Golgi aquí presenta un major desenvolupament i dona gegantins vacuols que presenten una matriu altament fibrosa i electrodensa, a nivell de la qual, en el temps, apareixeran unes acumulacions inorgàniques. Els dipòsits de sals inorgàniques adopten la típica disposició concèntrica propia de tots els tipus de concrecions, tant d'aquelles que tenen significat de reserva com aquelles que juguen un paper excretor (Fot. 4 i 5).

Els mitocondris presenten freqüentment formacions mielíniques i làminars molt curioses i progressivament van omplint la matriu mitocondrial fins que s'esdevenen concrecions, a diferència dels mitocondris estudiats en altres espècies, en Diaptomus conexus presenten acúmuls de calci en la seva matriu (Fot.9).

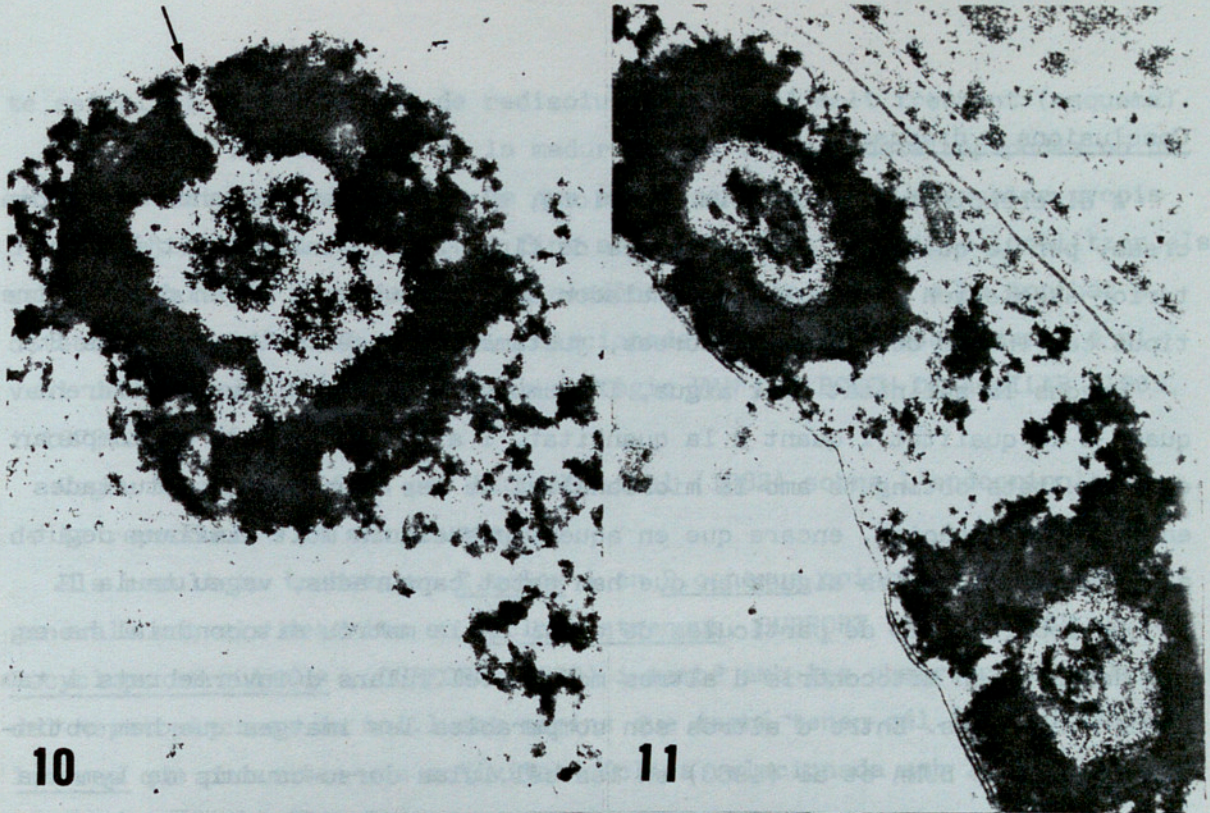
En les etapes estudiades d'aquest tipus cel.lular B, el reticle endoplasmàtic rugós adopta un desenvolupament mitjà (Fot.6).

Hem observat repetides vegades com els exemplars que estan en fase de maduresa sexual, és a dir amb els oòcits plens de plaquetes vitel·lines és on les cèl.lules de tipus B, és a dir les cèl.lules de funció bioacumuladora presenten menys esferocristalls i els pocs que tenen presenten el típic aspecte estrellat dels esferocristalls en fase de degradació o redissolució.

La microanàlisi de les concrecions de Diaptomus conexus i d'Eurytemora velox han donat resultats molt semblants qualitativament i amb petites diferències quantitatives:

	<u>Eurytemora velox</u>		<u>Diaptomus conexus</u>	
Na	0,325%	0,256%	0,250%	0,329
Mg	4,020%	4,001%	4,124%	4,280%
Si	20,130%	19,224%	18,020%	17,485%
K	0,673%	0,892%	0,826%	0,936%
Ca	0,654%	0,738%	0,792%	0,899%
Cu	51,224%	48,124%	36,428%	35,468%

Resultat de la microanàlisi puntual de quatre concrecions amb una exposició de 100 segons i treballant a 25 Kv.

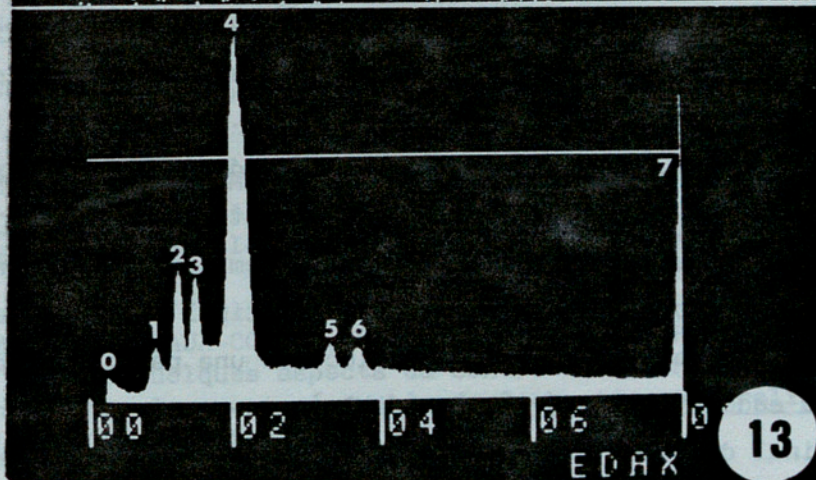


10

11



12



13

Fot.10 i 11.- Aspecte ultraestructural dels esferocristalls d'Eurytemora velox en fase de redissolució. 20.000 x.

Fot.12.- "Mapping" d'un esferocristall d'Eurytemora velox assenyalant la disposició del calci.

Fot.13.- Microanàlisi d'un esferocristall d'Eurytemora velox.1:sodi., 2:magnesi.,3:silici.,4:or.,5:potasi.,6:calci.,7:coure.

Conclusions i discussió

A diferència dels crustacis superiors, els copèpodes no tenen hepatopàncreas, per la qual cosa les cèl.lules de tipus B de l'intestí mitjà i posterior assoleixen el paper bioacumulador que habitualment té un dels quatre tipus cel.lulars de l'hepatopàncreas, justament les cèl.lules de tipus B.

Segons la salinitat de l'aigua, l'acumulació dels cations és diferent quant a la qualitat i quant a la quantitat, i aixó es fa palès en comparar els resultats obtinguts amb la microanàlisi de les concrecions estudiades en les dues espècies, encara que en aquest cas siguin molt similars degut a la salinitat de les aigües en que han estat capturades, vegeu taula 1.

La localització de partícules de calci en la matriu mitocondrial ha estat descrita en mitocondris d'altres models cel.lulars d'invertebrats i també de vertebrats. Entre d'altres són comparables les imatges que hem obtingut amb les de BUMA et al (1983) en les cèl.lules dorso-caudals de Lymnaea stagnalis i després d'haver aplicat el piroantimonià (WEAKLEY, 1979). També han estat descrites en la matriu mitocondrial d'osteoblasts, així com en la dels mitocondris d'hepatòcits (GREENAWALT et al 1964).

És a dir, que l'acumulació de calci en la matriu mitocondrial no ha d'ésser considerada com un cas aïllat, és més freqüent del que creiem, encara que la seva visualització no sigui excessivament fàcil.

La manca de l'hepatopàncreas en els copèpodes planteja també el problema de l'origen de la vitellogenina, per altra banda, a diferència del que succeix en altres espècies, ni Eurytemora velox ni Diaptomus conexus tenen teixit adipós.

La identificació de la vitellogenina en aquestes espècies de copèpodes està pendent d'ésser resolta.

Hem observat que l'ècdisi dels exemplars estudiats coincideix amb la presència dels sacs ovígers, plens d'ous embrionats.

Després de l'ècdisi i de la posta ja no trobem concrecions en l'intestí. Les tornarem a trobar quan els oòcits presentin l'inici de la vitellogenèsi secundària, procés cíclic que té lloc amb una participació massiva de processos d'endocitosi a nivell de l'oolemma.

serà al final d'aquest procés de vitellogenèsi que les concrecions que tenen les cèl.lules de tipus B de l'intestí presentin formes de degradació que es tipifiquen per llur morfologia estrellada (Fot.9 i 10).

En l'escala zoològica les concrecions tenen un aspecte ultraestructural molt similar, les bandes de creixement concèntriques són generals i l'aspecte

te estrellat de les formes de redisolució és també molt freqüent (esquema).

El control neuroendocri de la maduració de l'ovari dels copèpodes no ha estat tractat fins al moment, ja que els òrgans cefàlics endocrins propis dels crustacis aquí no hi són i fins ara no ha estat possible localitzar els seus equivalents, únicament en el cladòcer Daphnia pulex, s'ha arribat a detectar una activitat cíclica, relacionada amb la maduresa sexual, a nivell del cervell i del gangli sub-esofàgic VAN DEN BOSCH DE AGUILAR (1969, i 1972).

Vegeu la revisió feta per LEGRAND et al (1982) sobre l'endocrinologia de la reproducció en els crustacis.

Els resultats trobats en E.velox i en D.conexus coincideixen en línies generals amb els descrits en Cyclops strenuus, DURFORT (1981 i 1982 a), en Eucyclops serrulatus, DURFORT (1983) i també amb les observacions fetes del hepatopàncreas de mol.luscs marins que també tenen cèl.lules bioacumuladores que presenten una activitat cíclica relacionada amb l'oogènesi, DURFORT (1982b). (Fot.7).

Creiem que les concrecions localitzades en les cèl.lules de tipus B d'ambdues espècies estudiades són formacions de reserva i no d'excreció com les trobades a nivell dels tubs de Malpighi dels insectes per diversos autors o les descrites en l'intestí i els diverticles d'escorpins, GOYFFON et al (1983).

Bibliografía

ARVY, L., ECHALIER, G., GABE, M. (1954). Modifications de la gonade de Carcinides maenas, L. (Crustacé, Décapode) après ablation bilaterale de l'organe Y. C.R.Acad.Sc.Paris., 239., 1853-1855.

ARVY, L., ECHALEIR, G., GABE, M. (1956). Organe Y et gonade chez Carcinides (Carcinus) maenas, L. Ann.Sci.Nat.Zool., 18., 263-267.

BLANCHET, M.F., JUNERA, H., MEUSY, J.J. (1975). Mue et vitellogenèse chez Orchestia gammarella (Pallas) (Crustacé Amphipode): étude de la synthèse de la fraction protéique femelle après introduction d'ecdystérone. Experientia, 37, 865-867.

BLANCHET, M.F., CHARNIAUX-COTTON, CROISILLE, Y., JUNERA, H., MARTIN, M., MEUSY, J.J., ZERBIB, C. (1980). Quelques aspects du contrôle hormonal de la synthèse de la vitellogénina chez le crustacé amphipode Orchestia gammarella (Pallas). Reprod. Nutr.Dévelop., 20 (2), 539-544.

BLANCHET, M.F., MEUSY, J.J., JUNERA, H. (1980). Mue et vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode Orchestia gammarella (Pallas). Etude des effets de la destruction de la région antéro-médiane du protocérébron sur la synthèse de la vitellogénine. C.R.Acad.Sc.Paris, 291., 829-832.

BUMA, P., ROUBOS, E.W. (1983). Calcium dynamics, exocytosis, and membrane turno-

ver in the ovulation hormone-releasing caudo-dorsal cells of Lymnaea stagnalis. Cell Tissue Res., 233., 143-159.

CROISILLE, Y., JUNERA, H. (1980). Recherche du lieu de synthèse de la vitellogénine chez le Crustacé Amphipode Orchestia gammarella (Pallas). Démonstration, à l'aide d'anticorps spécifiques, de la présence de vitellogénine dans le tissu adipeux sous épidermique des femelles en vitellogenèse secondaire. C.R.Acad.Sc.Paris : 290., 1487-1490.

DURFORT, M. (1981). Mineral concretions on the intestinal epithelium of Cyclops strenuus, Fish (Crustacea, Copepoda). Ultrastructural study. Butll.Inst.Cat. Hist.Nat. ., 47., 93-103.

DURFORT, M. (1982 a). Microanálisis de las concreciones intestinales de Cyclops strenuus, Fish (Crustacea, Copepoda). Estudio preliminar. Miscelánea Zoológica Vol. 6., 27-32.

DURFORT, M. (1982 b). Las concreciones minerales del hepatopáncreas de Trachydermon cinereus, Thiele (Mollusca, Poliplacophora). Estudio ultraestructural. Iberus., 2., 1-17

DURFORT, M. (1983). Origen, formación y posible significado de los esferocristales intestinales de Eucyclops serrulatus (Fischer, 1851), (Crustacea, Copepoda). Acta I. Congreso Esp. Limnol.., 253-264.

GOHAR, M., SOUTY, C. (1983). Mise en évidence in vitro d'une synthèse et d'une libération de vitellogénine dans le tissu adipeux mâle de Porcellio dilatatus Brandt. (Crustacé Isopode terrestre). C.R.Acad.Sc.Paris., 297., 145-148

GOMFFON, M., MARTOJA, R (1983). Cytophysiological aspects of digestion and storage in the liver of a scorpion, Androctonus australis (Arachnida). Cell Tissue Res., 228., 661-675.

GREENAWALT, J.W., ROSSI, C.S., LEHNINGER, A.L. (1964). Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. J.Cell Biol.., 23., 21-38.

JUNERA, H., CROISILLE, Y. (1980). Recherche du lieu de synthèse de la vitellogénine chez le Crustacé Amphipode Orchestia gammarella (Pallas). Mise en évidence d'une activation de la synthèse protéique dans le tissu adipeux sous-épidermique en liaison avec la production de vitellogénine. C.R.Acad.sc.Paris., 290., 703-706.

MEUSY, J.J., JUNERA, H., CROISILLE, Y. (1974). Données sur la synthèse de la fraction protéique femelle chez Orchestia gammarella Pallas (Crustacé Amphipode) au cours de l'intermue et chez les femelles en repos sexuel. C.R.Acad.Sc.Paris 279., 587-590.

LEGRAND, J.J., MARTIN, J., JUCHAULT, P. (1982). Contrôle neuroendocrine de la reproduction chez les Crustacés. J.Physiol., Paris 78., 543-552

MARTOJA, R. (1980). Organes excréteurs et excrétion. Méthodes actuelles d'identification in situ des produits d'excrétion. Soc.Zool.de France., 1980

MARTOJA, M., MARTOJA, R. (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. Le Courrier du CNRS, 54., 32-37

MEUSY, J.J., BLANCHET, M.F., JUNERA, H. (1977). Mue et vitellogenèse chez le Crus-

tacé Amphipode *Orchestia gammarella*, Pallas. II.-Etude de la synthèse de la vitellogénine (fraction protéique femelle de l'hémolymphe) après destruction des Organes Y. Gral.comp.edocrinol. 33.,35-40

MEUSY, J.J. (1980). Vitellogenin: the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea. A review. Reprod.Nutr.Dévelop. 2\$,1-21.

MOREAU, M., VILAIN, J.P., GUERRIER, P. (1980). free calcium changes associated with hormone action in Amphibian oocytes. Develop.Biol., 78.,201-214

PICAUD, J.L. (1980). Vitellogenin, synthesis by the fat body of *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda). Intern.J.Invert.Reprod., 2.,341-349.

PICAUD, J.L., SOUTY, C. (1980). Démonstration immunohistochimique de la présence de vitellogénine dans le tissu adipeux et l'hépatopancréas du Crustacé Isopode Oniscoïde *Porcellio dilatatus* (Brandt). C.R.Acad.sc.Paris., 290, 123-125.

PICAUD, J.L., SOUTY, C. (1980). Démonstration par immunoautoradiographie de la synthèse de la vitellogénine par le tissu adipeux de *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacé, Isopode). C.R.Acad.Sc.Paris., 290.,1019-1021.

SOUTY, C., PICAUD, J.L. (1981). Vitellogenin synthesis in the fat body of the marine crustacean Isopoda, *Idotea balthica basteri*, during vitellogenesis. Reprod.Nutr.Develop., 21(1).,95-101.

VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. (1969). Nouvelles données morphologiques et hypothèse sur le rôle du système neurosécréteur chez *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Ann.Soc.R.Zool Belg., 99.,1-2.,27-44.

VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. (1972). Les caractéristiques tinctoriales des cellules neurosécrétrices chez *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Gen.Comp.Endocrinol., U.S.A., 18.,1.,140-145.

VILAIN, J.P., MOREAU, M., GUERRIER, P. (1980). Propionate and cycloheximide reversibly block progesterone induced calcium surge in *Ambystoma mexicanum* Oocytes. Develop.Growth and Differ., 22 (1).,25-31.

WEAKLEY, B.S. (1979). A variant of the pyroantimoniate technique suitable for localization of calcium in ovarian tissue. J.Histochem.Cytochem., 27. 1017-1028.