

Estructura y evolución del nucléolo durante la oogénesis de Hemidiapto-
mus roubaui (Copepoda, Calanoida).

E. Ribes

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

Avda. Diagonal, 637-647. 08020 Barcelona, Spain.

Abstract

Structure and evolution of the nucleolus during oogenesis of Hemidiapto-
mus roubaui (Copepoda, Calanoida).

In *H. roubaui* a wide variety of nucleoli can be observed according to the phases of oocyte differentiation. The nucleolar alterations produced during oogenesis affect the number, size and structure of same.

The oocytes in vitelogenesis usually have one or more nucleoli 5.5 to 6 μm in diameter arranged at the periphery near the nuclear envelope. The nucleoli of the oocytes during primary vitelogenesis become oval due to segregation of the nucleolar components initiated during the previous phase of previtelogenesis. As a consequence of nucleolar segregation, a series of electron-dense materials ("nucleolar masses") spread from the nucleolus. During this phase, multiple nucleolar vacuoles can be observed in the fibrillar as well as the granular component. The size of these vacuoles increases with time, and their number diminishes so that when the oocyte begins secondary vitelogenesis only one large vacuole appears which occupies a central position within the nucleolus.

During primary vitelogenesis nucleolar segregation is accompanied by a marked increase in the nucleolus-like-bodies.

Introducción

En los trabajos de PERRY, GALL, PENMAN y otros se precisó que es en el nucléolo donde tiene lugar la transcripción y maduración de los precursores ribosómicos. Aunque el nucléolo con su morfología típica no existe en los procariotas, sí se halla en la casi totalidad de organismos superiores, presentando una gran plasticidad morfológica y siendo su forma básica la misma para todos ellos.

Se observa una gran diversidad nucleolar entre los oocitos de especies distintas e incluso dentro de los de la misma especie (BRUSLÉ, 1972). El nucléolo es un orgánulo dinámico que va cambiando durante el proceso de la oogénesis. Los cambios nucleolares afectan al número, tamaño y a la estructura del mismo.

MULNARD (1949) estudiando los nucléolos de las glándulas salivales de los dípteros encuentra en ellos gránulos Feulgen positivos. La utilización de la espectrofotometría de absorción con luz ultravioleta por CASPERSSON

y sus colaboradores muestra la existencia en el nucléolo de macromoléculas similares a la cromatina.

A nivel de microscopía electrónica los estudios realizados en los erizos de mar (AFZELIUS, 1955, 1957), en los peces teleósteos (ZAHND & PORTE, 1966; ANDERSON, 1968a, b; ULRICH, 1969; AZEVEDO & COIMBRA, 1980), en los anfibios (WARTENBERG, 1962; MILLER, 1962, 1965, 1966, 1967), en los reptiles (HUBERT, 1972, 1973a, b), en el conejo (ZAMBONI & MASTROIANI, 1966), y en otras especies (NORREVANG, 1968) indican que el nucléolo está constituido por una parte fibrilar central y por una parte granular periférica.

MARINOZZI (1964) estudiando los nucléolos de diferentes tipos de células somáticas (células hepáticas, células exocrinas del páncreas, neuronas ganglionares, etc.), describe en todos ellos dos componentes: unos gránulos de 15 a 20 nm de diámetro (zona granular) y unas fibras de 5 nm de grosor (zona fibrilar) inmersas en un substrato proteico (matriz), un cuarto componente nucleolar constituido también por agregados de fibras de aproximadamente 10 nm de diámetro, sensiblemente menos denso al paso de electrones que la zona fibrilar del nucléolo, ha sido identificado como parte de la cromatina que se extiende hacia el interior del nucléolo (cromatina nucleolar).

Material y métodos

Hemidiaptomus roubau es un copépodo calanoide planctónico de agua dulce, que vive en aguas temporales, generalmente limpias y poco mineralizadas. Los ejemplares utilizados para este estudio proceden de los Estanys de Capmany (Girona), que se encuentran sobre pizarras y esquistos.

Para el estudio al microscopio electrónico se fijaron animales fragmentados o se hizo la disección del aparato reproductor de los mismos; operación que se realizó en el mismo líquido de fijación.

Como método de fijación se utilizó el de la "fijación doble", o sea, una previa fijación con una mezcla de paraformaldehído-glutaraldehído (KARNOVSKY, 1965) tamponada con fosfato 0.2 M (pH 7.4) a 4 ° C durante 3 h. Después de un lavado con tampón fosfato 0.2 M se procedió a una post-fijación de 1 h con tetraóxido de osmio al 2 % en el mismo tampón y a temperatura ambiente. Tras una deshidratación progresiva con etanol y utilizando el óxido de propileno como líquido intermediario, se procedió a la inclusión en resina Spurr (1969). Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963), siendo obser-

vados en un microscopio electrónico PHILIPS CM-200 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Observaciones

En H. roubaui, se observa una gran diversidad nucleolar en función de las fases de diferenciación oocitaria. Las alteraciones nucleolares que se producen durante la oogénesis afectan al número, al tamaño y a la estructura, aumentando el volumen del nucléolo a medida que se incrementa el tamaño del oocito. El contenido en ARN varía notablemente presentando un máximo en las fases de previtelogénesis y vitelogénesis primaria, y un mínimo al final de la vitelogénesis secundaria. Esto indica que ha tenido lugar una emisión de ARN hacia el citoplasma, acumulándose en forma de masas electrodensas (nucleolus-like-body o nuage) junto a la envoltura nuclear.

En las oogonias los nucléolos en número de dos o tres son voluminosos y no se distinguen muy bien de los componentes fibrilar y granular, por estar ambos muy entremezclados. En cambio, se observan unos pequeños acúmulos de cromatina asociada.

Los oocitos en vitelogénesis tienen habitualmente en el núcleo uno o más nucléolos de 5.5-6 μm de diámetro, fuertemente eosinófilos, que adoptan en su mayoría una posición periférica junto a la envoltura nuclear. (Lám. I, fig. 1).

En cortes semifinos, teñidos con azul de metileno o azul de toluidina, el nucléolo aparece como un gránulo denso y ligeramente heterogéneo, si se observa con el microscopio de contraste de fase se confirma este aspecto heterogéneo.

El estudio al microscopio electrónico del nucléolo pone de manifiesto sus constituyentes macromoleculares (fibrillas y gránulos de ARN) su disposición y organización dentro del nucléolo y su relación con el ADN asociado, en forma de cromatina nuclear (Lám. II, figs. 1, 2).

Los nucléolos de los oocitos en vitelogénesis primaria se vuelven ovales debido a la segregación de los componentes nucleolares iniciada en la fase anterior de previtelogénesis, de esta manera el componente fibrilar adopta una posición subcéntrica en el nucléolo, mostrando una progresiva lobulación. Como consecuencia de la segregación nucleolar, del nucléolo parecen desprenderse una serie de acúmulos electrodensos a los que se denomina "masas nucleolares" semejantes a los "nucleolar satellites" observados en Labidocera sestiva (BLADES & YOUNGBLUTH, 1984), (Lám. I, fig. 1; Lám. II, figs. 1, 2).

En esta fase se observan múltiples vacuolas nucleolares, tanto en el componente fibrilar como en el granular. El tamaño de estas vacuolas se incrementa con el tiempo, y su número disminuye de manera que cuando el oocito entra en vitelogénesis secundaria sólo aparece una gran vacuola que ocupa una posición central dentro del nucléolo. La parte fibrilar y la granular se disponen alrededor de la gran vacuola central, formando una corona circular periférica. Los nucléolos, en forma de corona circular o anular, miden aproximadamente 12 μm de diámetro. (Lám. III, figs. 1, 3).

En la fase de vitelogénesis primaria, la segregación nucleolar viene acompañada de un notable incremento de las masas electrodenensas en disposición perinuclear, a modo de "nuage". Estas masas alcanzan su máximo tamaño al inicio de la vitelogénesis, y se asocian con otros orgánulos citoplasmáticos, preferentemente con las mitocondrias. (Lám. I, fig. 1; Lám. II, fig. 1).

La vacuolización nucleolar coincide con una marcada hiperplasia de los orgánulos citoplasmáticos, concretamente de las mitocondrias y del retículo endoplasmático rugoso. (Lám. III, fig. 1). El tamaño del oocito y el diámetro de su núcleo continúan incrementándose de forma progresiva.

A medida que avanza la vitelogénesis secundaria, la vacuola nucleolar central del nucléolo va desapareciendo, los componentes fibrilar y granular se mezclan yuxtaponiéndose de nuevo, y el nucléolo se hace cada vez más pequeño, terminando por desaparecer al final de esta fase.

Discusión

La evolución que sigue el nucléolo en la oogénesis de H. roubaui es similar a la descrita por otros autores en oocitos de diferentes especies de organismos: Nereis pelagica (DHAINAUT, 1972), Lacerta vivipara (HUBERT, 1972, 1974), Xiphohorus helleri (AZEVEDO & COIMBRA, 1980), Terebratula vitrea (BOZZO, 1982).

DHAINAUT (1972), al describir los cambios morfológicos del nucléolo durante la oogénesis de Nereis pelagica señala que el nucléolo es compacto antes de empezar la fase de vitelogénesis, y se va dissociando en pequeñas masas granulares a medida que avanza la vitelogénesis.

HUBERT (1972 y 1974), estudiando el nucléolo y su evolución en

oocitos de diferentes especies de lagartijas, observa como en los oocitos jóvenes la parte granular del nucléolo está yuxtapuesta a la parte fibrilar, originando un nucléolo compacto, y a medida que los oocitos crecen y se llenan de vitelo, la parte granular se disgrega, formando unas masas granulares que se reparten por todo el nucleoplasma. El mismo autor relaciona la formación de masas granulares con la actividad sintetizadora del oocito, y llega a la conclusión de que las variaciones morfológicas del nucléolo son un reflejo de la síntesis más o menos activa del ARN-ribosomal.

AZEVEDO & COIMBRA (1980), al estudiar la evolución del nucléolo durante la oogénesis del pez teleósteo Xiphophorus helleri, observan que durante las primeras fases de la oogénesis el nucléolo es compacto, y presenta una zona central fibrosa y una zona cortical granular densa. Al final de la profase meiótica empieza la segregación de los componentes nucleolares y la aparición de vacuolas. Estos autores sugieren que la vacuolización del nucléolo puede ser consecuencia de un incremento en la síntesis y emisión de materiales nucleolares. El estudio autorradiográfico de los nucléolos, después de haber sido marcados con uridina-H3, demostró que los nucléolos en forma de anillo tienen una mayor densidad de granos de plata por unidad de masa nucleolar que los nucléolos compactos de diploteno.

La aparición de vacuolas en la masa nucleolar no parece ser un fenómeno exclusivo de la oogénesis de invertebrados y vertebrados inferiores, puesto que se ha descrito también en vertebrados superiores, como la codorniz y la rana entre otros (MIRRE & STAHL, 1976; PALOMBI & VIRON, 1977).

Los cambios morfológicos del nucléolo descritos en los oocitos de H. roubaui siguen las mismas pautas dadas por HUBERT (1972 y 1874) y por AZEVEDO & COIMBRA (1980). Cuando la actividad sintetizadora aún no se ha iniciado (oogonias y oocitos diploténicos) el nucléolo es denso, siendo difícil distinguir sus componentes fibrilar y granular. Con la entrada de los oocitos en previtelogénesis se produce el fenómeno de la segregación nucleolar y la aparición de masas nucleolares compactas, semejantes a los "nucleolares satellites" observados en Labidocera aestiva (BLADES & YOUNGBLUTH, 1984), que se dirigen hacia la envoltura nuclear. En la fase de vitelogénesis primaria, cuando a nivel del citoplasma se elaboran las primeras plaquetas vitelinas, apa-

recen el el nucléolo unos espacios de baja electrodensidad, que corresponden a las vacuolas nucleolares. A medida que avanza el proceso de vitelogénesis las vacuolas nucleolares incrementan su volumen a la vez que disminuyen en número, de forma tal que cuando el oocito entra en vitelogénesis secundaria su núcleo sólo presenta una gran vacuola central (núcleolo anular). Por otra parte, durante las fases de previtelogénesis y vitelogénesis primaria, cuando tiene lugar la segregación nucleolar y la aparición de vacuolas nucleolares, la presencia de masas densas como los nucléolos a ambos lados de la envoltura nucleolar sugiere el tránsito de material nucleolar hacia el citoplasma.

Conclusiones

- Se observa una gran diversidad nucleolar en los oocitos de H. roubaui en función de las fases de diferenciación oocitaria. Las alteraciones nucleolares que se producen durante la oogénesis afectan al número, tamaño y a la estructura; el nucléolo aumenta en volumen a medida que se incrementa el tamaño del oocito. También el contenido en ARN varía notablemente, presentando un máximo en las fases de previtelogénesis y vitelogénesis primaria, y un mínimo al final de la vitelogénesis secundaria.
- Los componentes del nucléolo son los característicos de todas las células: una zona fibrilar, una zona granular, una matriz y la cromatina nucleolar.
- Durante las fases de menor actividad sintetizadora, el nucléolo es denso, siendo difícil distinguir sus componentes fibrilar y granular. Con la entrada de los oocitos en previtelogénesis se activa el fenómeno de la segregación nucleolar, la aparición de masas nucleolares compactas ("nucleolar satellites") y de vacuolas nucleolares.
- A medida que avanza la vitelogénesis, las vacuolas nucleolares incrementan su volumen y se fusionan, dando lugar a una gran vacuola que ocupa el centro del nucléolo (núcleolo anular) de los oocitos en vitelogénesis secundaria.

Bibliografía

- AFZELIUS B.A. (1955). The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope. Exp. Cell Res., 8, 147-158.

- AFZELIUS B.A. (1957). Electron microscopy of the basophilic structures of the sea urchin egg. Z. Zellf. 45, 660-675.
- ANDERSON E. (1968a). Oocyte differentiation in the sea urchin, Arbacia punctulata, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. J. Cell Biol., 37, 514-539.
- ANDERSON E. (1968b). Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the Pipefish, Syngnathus fuscus and the Killifish, Fundulus heteroclitus. J. Morph., 125, 23-60.
- AZEVEDO C. & COIMBRA A. (1980). Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous teleost (Xiphophorus helleri). Biol. Cell 38, 43-48.
- BLADES-ECKELBARGER P.I. & YOUNGBLUTH M.J. (1984). The ultrastructure of oogenesis and yolk formation in Labidocera aestiva (Copepoda; Calanoida). J. Morph., 179, 33-46.
- BOZZO M.G. (1982). Estudi ultrastructural dels processos oogenètic i espermatoogenètic de Terebratulula vitrea (Gmelin). Braquiòpodes Testicardins. Tesi Doctoral. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- DHAINAUT A. (1972). Evolution nucléolaire au cours de l'ovogènese de N. pelagica (Annélide, Polychète). I. Etude morphologique. J. Microscopie, 13, 67-84.
- HUBERT J. (1972). Ultrastructure du nucléole au cours du stade diplotène dans les ovocytes du Lézard Lacerta vivipara Jacquin. Archives d'Anatomie Microsc., 61 (4), 325-338.
- HUBERT J. (1973a). Quelques données cytochimiques sur le nucléole des cellules de la granulosa chez de Lézard vivipare (Lacerta vivipara Jacquin). C.R. Acad. Sc. Paris, 276, 1467-1469.
- HUBERT J. (1973b). Etude autoradiographique en microscopie électronique sur les sites de synthèse d'ARN dans les cellules de la granulosa. C.R. Acad. Sc. Paris, 277, 429-432.
- HUBERT J. (1974). Ultrastructure des gonocytes primordiaux du lézard des murailles (Lacerta muralis L. aur.) et du lézard vert (Lacerta viridis L. aur.). Comparaison avec le lézard vivipare (Lacerta vivipara J.). Arch. Anat. Hist. Embr. norm. et exp. 57, 259-268.
- KARNOVSKY M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137-138.
- MARINOZZI V. (1964). Cytochimie ultrastructurale du nucléole RNA et protéines intranucléolaires. J. Ultrastruct. Res., 10, 433-456.
- MILLER O.L. (1962). Studies on the ultrastructure and metabolism of nucleoli in Amphibian oocytes. 5th Int. Congr. Electr. Micr. Philadelphia, 2, NN 8.
- MILLER O.L. (1965). A membranous component in Amphibian oocyte nucleoli. J. Cell Biol., 27, 66A.
- MILLER O.L. (1966). Structure and composition of peripheral nucleoli of Salamander oocytes. Nat. Canc. Inst. Monogr., 23, 53-66.
- MILLER O.L. (1967). Observations on isolated components of Amphibian oo-

- cyte nucleoli. J. Cell Biol., 35, 94A.
- MIRRE C. & STAHL A. (1976). Ultrastructural study of nucleolar organizers in the quail oocyte during meiotic prophase. I. J. Ultrastruct. Res., 56, 186-201.
- MULNARD J. (1949). Structure des nucléoles des noyaux géants chez les Diptères. C.R. Assoc. Anat., 36ème Réunion.
- NØRREVANG A. (1968). Electron microscopic morphology of oogenesis. Int. Rev. Cytol., 23, 113-186.
- PALOMBI F. & VIRON A. (1977). Nuclear Cytochemistry of Mouse Oogenesis. I. Changes in extranucleolar ribonucleoprotein components through meiotic prophase. J. Ultrastruct. Res., 61, 10-20.
- REYNOLDS E.S. (1963). The use of 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 epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26, 31-43.
- ULRICH E. (1969). Etude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un poisson Téléostéen, le Danio, Branchydanio rerio (Hamilton-Buchanan). J. Microsc., 8, 447-478.
- WARTENBERG H. (1962). Elektronenmikroskopische und histochemische Studien über die Oogenese der Amphibienzelle. Z. Zellf., 58, 427-486.
- ZAHND J.P. & PORTE A. (1966). Signes morphologiques de transfert de matériel nucléaire dans le cytoplasme des ovocytes de certaines espèces de Poissons. C.R. Acad. Sci., 262, 1977-1978.
- ZAMBONI L. & MASTROIANNI L. (1966). Electron microscopic studies on Rabbit ova. I.- The follicular oocyte. J. Ultrastruct. Res., 14, 95-117.

Explicación de las figuras

Lámina I.

Fig. 1. Detalle del núcleo de un oocito al inicio de la fase de vitelogenénesis primaria. La envoltura nuclear (En) presenta pliegues e invaginaciones; en el nucleoplasma finamente granuloso hay acúmulos de gránulos pericromatínicos (gp) y dos grandes nucléolos (NU) con sus constituyentes en fase de segregación (componente fibrilar, F; componente granular, G). Se observan también "masas nucleolares" (Nu*) junto a la envoltura nuclear y en el citoplasma en posición perinuclear, una gran concentración de masas electrodensas o "nuage" (ng). LB: Lámina basal; M: mitocondria. (x 10.440).

Lámina II.

Fig. 1. Aspecto ultraestructural de un oocito en la fase inicial de la vitelogenénesis primaria. En el núcleo, se observa un gran nucléolo en posición periférica, con sus componentes: fibrilar (F) y granular (G), bien diferenciados. En el citoplasma, se aprecian masas electrodensas de "nuage" (ng) que recubren la totalidad de la envoltura nuclear, y acúmulos de mitocondrias

(M) en posición perinuclear. (x 13.340).

- Fig. 2. Detalle ultraestructural del nucléolo de un oocito en vitelogenénesis primaria. F: Componente fibrilar; G: Componente granular; (*): Masa nucleolar. (x 31.320).

Lámina III.

- Fig. 1. Aspecto de un oocito en la fase final de la vitelogenénesis primaria. En el núcleo (N) se observa un nucléolo anular (Nu) y en el citoplasma destacan las vacuolas densas (Vc). (x 2.805).

- Fig. 2-3. Secciones transversales del nucléolo anular. Fig. 2. Corte a nivel de la zona periférica (x 8.510). Fig. 3. Corte a nivel de la zona central del nucléolo. Obsérvese que la parte fibrilar (F) y la granular (G) están dispuestas en bandas alternativas alrededor de la gran vacuola central (Vnu) formando una corona circular periférica. (x 8.510).

- Fig. 4. Detalle de la corona circular periférica (1). (x 54.390).

- Fig. 5. Detalle de la vacuola central (2). (x 54.390).

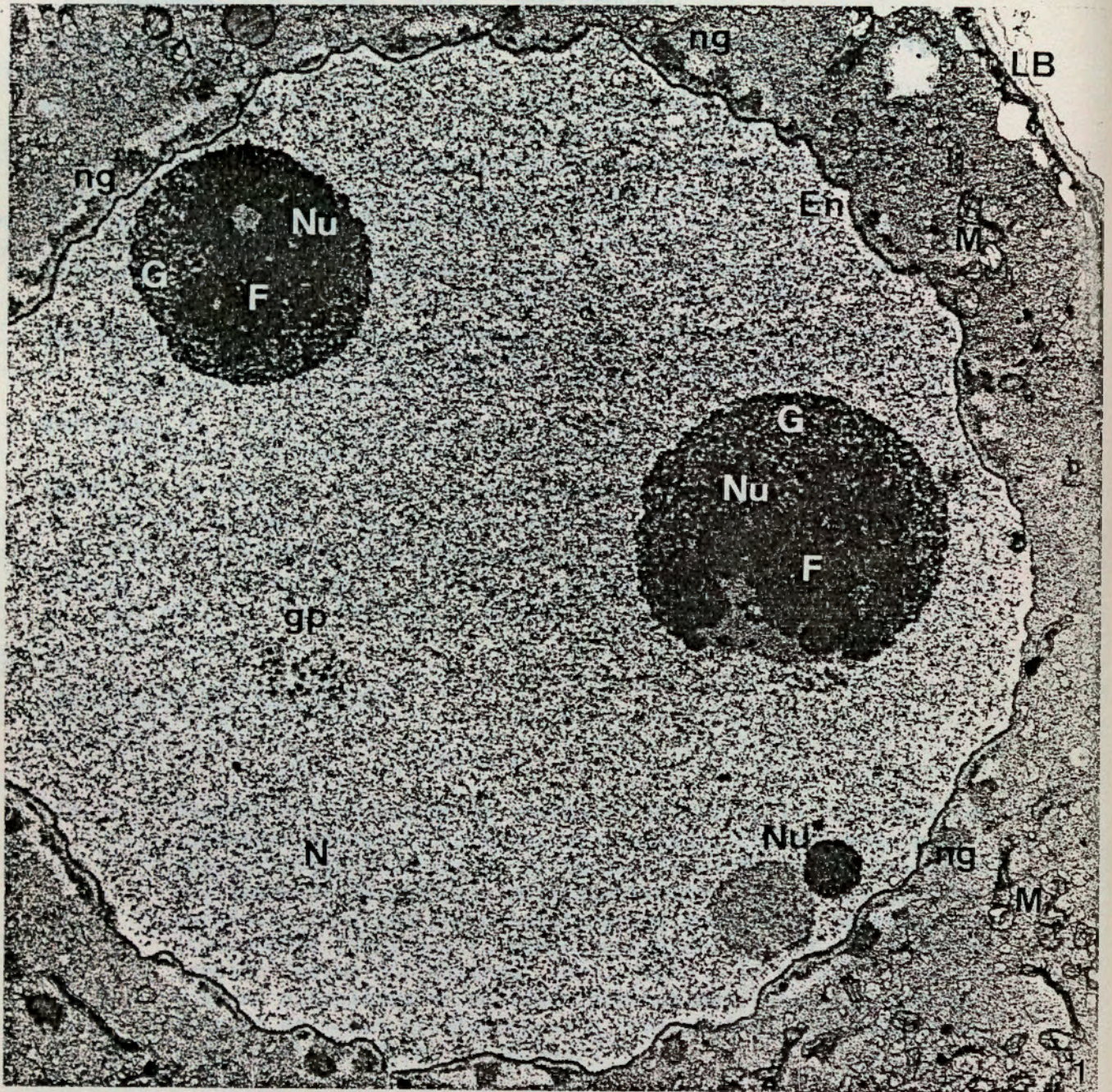


Fig. 1. Aspecto ultraestructural de un ovocito en la fase inicial de la vitelogenesis primaria. En el nucleo, se observa un gran nucleolo en posición periférica, con sus componentes fibrillar (F) y granular (G), bien diferenciados. En el citoplasma, se aprecian masas granulosas de "ng" que recubren la totalidad de la envoltura nuclear, y acúmulos de mitocondrias

