

societat Catalana de Biologia

ESTRUCTURES DEL TIPUS DE LES ARRELS CILIARS EN OOCITS DE
MOL.LUSCS POLIPLACOFORS

M. DURFORT i J. GARCIA VALERO

Unitat de Biologia Cel.lular. Facultat de Biologia. Univer-
sitat de Barcelona. Avda.Diagonal,645.,08071 Barcelona.

A b s t r a c t

The ciliary rootlet like structures in the oocytes of the
Poliplacophora Mollusca

Serial ultrathin sections were used to study the formation of the striated rootlets like structures as other accessory components of the basal body in the mature oocytes of Acanthochitona fascicularis. Initially formed at or near the Golgi complex, very developed in this female gamete. At the time the cyclinders became conspicuous components of the cortical cytoplasm, groups of procentrioles.

This electron microscopic study of the mature oocytes with ciliated rootlets revealed striking mitochondrial abnormalities which comprised alterations in shape, increases in size and formations lamellar arrays within the mitochondrial matrix.

Key words: ciliary rootlets, Golgi complex, mitochondria, oocyte, ultrastructure, Poliplacophora Mollusca.

I n t r o d u c c i ó

L'estudi estructural i ultraestructural dels elements cinètics de la cél.lula en general ha estat sempre motiu de molta atenció per part dels citòlegs i fins i tot per part de molts sistemàtics del camp de la protozoologia, en que la determinació final de moltes espècies de ciliats, es resolte veient la disposició de les cinètides (infraciliatura) que de fet és un caràcter hereditari, o bè per la disposició del centríol o de les estructures equivalents respecte a l'embolcall nuclear en el cas dels esporozous (DE PYTORAC et al. 1987)(1).

(1) DE PUYTORAC,P.-GRAIN,J.-MIGNOT,J.P.(1987).-Précis de Protistologie.,Fondation Singer-Polignac.,ed.Boubée.Paris. 581 pàgs.

Hem assenyalat dos dels elements relacionats en els procés cinètics de les cèl.lules: els cilis que habitualment determinen la motilitat de determinats tipus de cèl.lules somàtiques i germinals masculines i el centríol, responsable en gran part dels casos de la dinàmica i divisió del cromosomes en les cèl.lules en divisió. De la mateixa manera que no totes les divisions cel.lulars segueixen l'ortomitosi i per tant poden fer-ho seguint altres mecanismes, encara que no hi hagin centríols o estructures equivalents, no sempre la presència d'un cili condiciona la motilitat de la cèl.lula que el té. Efectivament, hi han cèl.lules que tenen cilis complerts o incomplerts totalment o parcialment intracitoplasmàtics, amb una fórmula axonemàtica no habitual, com pot ésser el cas dels fotoreceptors retinians que tenen un cili en llur segment extern de tipus 9 + 0.

Els elements que habitualment conformen un cili són la part evaginada, extracel.lular o axonemàtica, el corpuscle basal o zona d'ancoratge (amb denominacions molts diverses en els ciliats) i les arrels ciliars, habitualment dues en disposició divergent.

Des de els primers treballs d'AFZELIUS (1959.,1961 i 1962) sobre el flagell dels espermatozoides fins el de 1988, molts han estat les publicacions fetes sobre l'ultraestructura axonemàtica de la cua dels gàmetes masculins, de la mateixa manera que molt nombrosos són els treballs fetes sobre les formacions axonemàtiques en cilis de cèl.lules somàtiques des de els bàsics d'ANDRE (1961), ANDRE i THIERY (1963). Són tanmateix molt importants, en quant a nombre i qualitat els treballs que fan referència a les alteracions normals i patològiques de la fórmula axonemàtica que habitualment comporten l'inmovilitat del cili atípic, tant a nivell dels espermatozoides(ESCALIER et al.1982.,ESCALIER i DAVID,1984., JUSTINE i MATTEI ,1988), com a nivell de cèl.lules somàtiques de vies genitals (CHAILLEY et al.1982) o de vies respiratòries PUIG MUSET,1966).

Ocasionalment s'han descrit cilis intracitoplasmàtics, complerts o fragmentats en cèl.lules somàtiques de funcions molt diferents i d'origen embrionari també diferent.

El teixit nerviós embrionari ha estat ampliament estudiat des de que RAMON i CAJAL recomanà el seu seguiment per poder entendre molt millor la textura dels centres nerviosos en els adults, pot ésser per aixó que hi han diverses cites sobre la presència de cilis intracitoplasmàtics en neuroblasts i neurones joves. Entre altres cal recordar els treballs al respecta de SOTELO i TRUJILLO-CENOZ (1958) sobre l'epiteli neural en embrions de pollastre, com a capdavanters en aquesta qüestió i entre els més recents el de COHEN (1988) en embrions de ratolí. LAFARGA et al.(1980) troba cilis en neurones del nucli supraóptic hipotalàmic en període neonatal., BARNES (1961) en cèl.lules hipofisaries de la pars distalis i GIROD et al.(1980) en cèl.lules de l'adenohipófisi., MARTINEZ CUADRADO i GONZALEZ SANTANDER (1989) en el mesènfal del gat.

En cèl.lules de tipus mesodèrmic no han estat trobats gaire sovint elements ciliars intracitoplasmàtics, recordem la seva localització en condrocits (SCHERFT i DAEMS,1967), caldria però fer un buidat bibliogràfic sobre aquest punt. En les cèl.lules germinals hi ha alguna trobada excepcional, SZOLLOZI (1972)., DOS SANTOS (1975) en micromamífers.

En la majoria dels casos però, el significat de la presència de cilis intracitoplasmàtics roman enigmàtica, si bé el seu origen ha estat seguit amb éxit en alguns casos, en aquest aspecta cal recordar el treball de DE ROBERTIS referenciat en la seva quarta edició de la CITOLOGIA GENERAL (1960) i que havia publicat any 1956 (1), i el d'ALLEN (1965).

MATERIAL I METODES

S'han estudiat al microscopi electrònic de transmissió les gónades femenines d'Acanthochitona fascicularis, mol.lusc poliplacófor, d'exemplars recollits en tres èpoques de l'any i procedents de Galicia (Santander). Els exemplars eren sexualment madurs.

El material ha estat doblement fixat amb glutaraldehyd-pa-raformaldehyd al 3,5 tamponat amb cacodilat sódic durant 2 hores a 4°C i post fixat amb OsO₄ al 2% igualment tamponat i durant unes altres 2 hores.

(1): De Robertis, E.(1956)., Biophys.Biochem.Cytol.,2.,503

Alguns fragments de gónada han estat solsament fixats amb glutaraldehyd-paraformaldehyd per evitar l'ennegrimient produït pel tetròxid d'osmi i així aplicar determinades reaccions químiques (GARCIA VALERO i DURFORT, 1988), cap de les quals és positiva per a dur l'estudi de les estructures tipus arrel ciliar, motiu de la present comunicació.

L'inclusió ha estat habitualment feta amb Spurr i els talls ultrafins contrastats amb acetat d'uranil i citrat de plom. Els talls semifins han estat rutinariament tenyits amb blau de metilè i amb Giemsa, però en cap cas ens han permès visualitzar les estructures en estudi.

RESULTATS I DISCUSSIO

L'observació d'estructures de caire fibrilar amb una típica estriació motivada per la presència de bandes i interbandes de diferenta electrodensitat (Figs.6.,7 i 8), amb tot l'aspecte d'arrels ciliars, en els oòcits d'Acanthochitona fascicularis ha estat accidental i molt escadussera, possiblement pel fet de no haver estudiat un nombre suficient de seccions seriades i pel fet de que l'orientació dels talls obtinguts no ha estat sempre la més escaient per a l'interpretació d'una estructura periòdica com la que ens ocupa.

Fins el moment solsament el 7% dels oòcits d'A. fascicularis estudiats presenten aquestes formacions del tipus d'arrels ciliars. en tots els casos han estat trobats en oòcits madurs, en oòcits post.vitellogenètics i en disposició preferentment perpendicular o tangencial al oolemma de la cèl.lula germinal femenina (Figs.1.,2 i 3). La considerable riquesa i heterogeneïtat d'estructures vesículo-membranoses presents en la zona cortical dels oòcits d'aquesta espècie (Figs.1 i 2) (DURFORT,1988; DURFORT i GARCIA VALERO,1989), junt amb la problemàtica de l'orientació del tall, suara esmentada, determina que aquestes arrels ciliars siguin molt difícils d'observar. Casualment o per que és així, solsament hem observat una de les dues branques que habitualment surten o arrenquen del corpuscle basal ciliar.

La llargada de les arrels estudiades, pels motius abans esmentats és força variable, de 0,3 micres a 6 micres, i quasi

bè sempre estàn molt propers al oolemma i als dictiosomes que en aquesta espècie estàn molt desenvolupats (Figs.1 i 2).

El feix de microfilaments que forma l'arrel és del ordre dels 0,3 a 0,6 micres de diàmetre i els microfilaments tenen per terme mitg uns 200 Å, encara que amb les imatges dels talls obtinguts es fa molt difícil de precisar llur diàmetre (Figs. 6,7 i 8).

En els mateixos oòcits en els que hem trobat aquestes estructures fibrilars periòdiques, tipus arrel ciliar, s'han observat unes formacions de caire cilíndric que tenen un aspecte ultraestructural que pot recordar al del procentriols (Figs. 4 i 5). L'localització és molt variable, prop de l'embolcall nuclear (Fig.4) o en el bell mitj de la zona cortical i alhora en zones properes al oolemma (Figs.4 i 5).

Ens interessa molt relacionar ambdues tipus de formacions, ja que la ciliogènesi ha estat sempre relacionada amb les formacions de tipus centriolar (COHEN et al.1988).

No delimitats per cap estructura membranosa, aquests cilindres tenen un diàmetre extern de 0,8 micres i un diàmetre intern del ordre de les 0,4 micres. Algunes imatges fan pensar que el material electrodens que forma la paret del cilindra està estructurat, caldria fer però el test de rotació fotogràfic de MARKHAM (1).

En aquests mateixos oòcits però amb una freqüència molt petita hem trobat mitocondris allargats que la part central de llur matriu està ocupada per una gegantina estructura disposada paral·lelament al eix llarg del mitocondri, que sembla una cresta gegant, però que a grans auments veiem que és una estructura de caire fibrilar (Fig.4). Caldria estudiar un nombre més gran d'aquestes formacions per a constatar si són totalment accidentals o bé són estadis del procés de formació d'estructures paracrístalines o de les estructures fibrilars que posteriorment donarien lloc a les arrels ciliars.

Una revisió exhaustiva del tema no permet dir res al respecte. Les imatges trobades per BARASTEGUI et al (1983 i 1984),

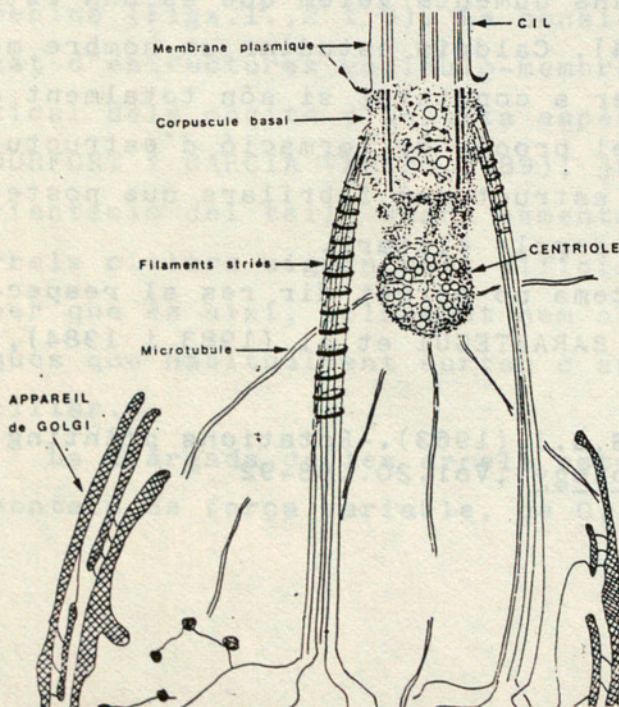
(1): MARKHAM, R.-FREY, S.-HILLS, G.J. (1963).-Rotations printing intensification. Virology, Vol.20., 88-92

en mitocondris de cèl.lules del uroteli d'exemplars tractats experimentalment, recorden en els seus estadis inicials a la formació membranosa-fibrilar localitzada en els mitocondris dels oòcits d'A.fascicularis. El seu signicat romà totalment enigmàtic, en gran part degut al migrat estudi dels pocs mitocondris que presenten aquest tipus d'estructura. Caldrà obtenir-ne imatges de talls ultrafins depositats en la platina goniomètrica.

De moment, l'esquema adjunt de GIROD et al (1980) que correspon al que descriu en les cèl.lules glandulars de l'adenohipòfisi d'eriçó terrestre no coincideix amb les nostres trobades en l'oòcit de l'espècie de mol.lusc polioplacófor estudiat en el present treball. Manca el cili propiament dit, falta el corpuscle basal, no hem trobat cap estructura centriolar, encara que sí hem vist estructures que podriem considerar com a precentriols. L'únic punt en comú és la presència de les arrels ciliars i lluir relació topogràfica amb els dictiosomes.

Queden per trobar més imatges i alhora poder relacionar el trobat amb probables fenòmens d'inducció de l'embolcall nuclear, del complex de Golgi i fins i tot del oolemma oocitari amb la formació de les estructures tipus arrels ciliars descrites i finalment intentar comprendre llur funció, encara que aquesta pot ser relacionada amb els futurs esdeveniments que li esperen a la cèl.lula germinal femenina.

Alhora que no cal descartar possibles processos de partenogènesi en els quals ocasionalment s'hi han relacionat fenòmens d'activació centriolar amb aparents induccions d'origen divers.



Relacions entre cili, corpuscle basal, arrels ciliars i dictiosomes golgians, en cèl.lula glandular de hipòfisi d'eriçó terrestre. Segons GIROD., LHERITIER i GUI-CHARD (1980).

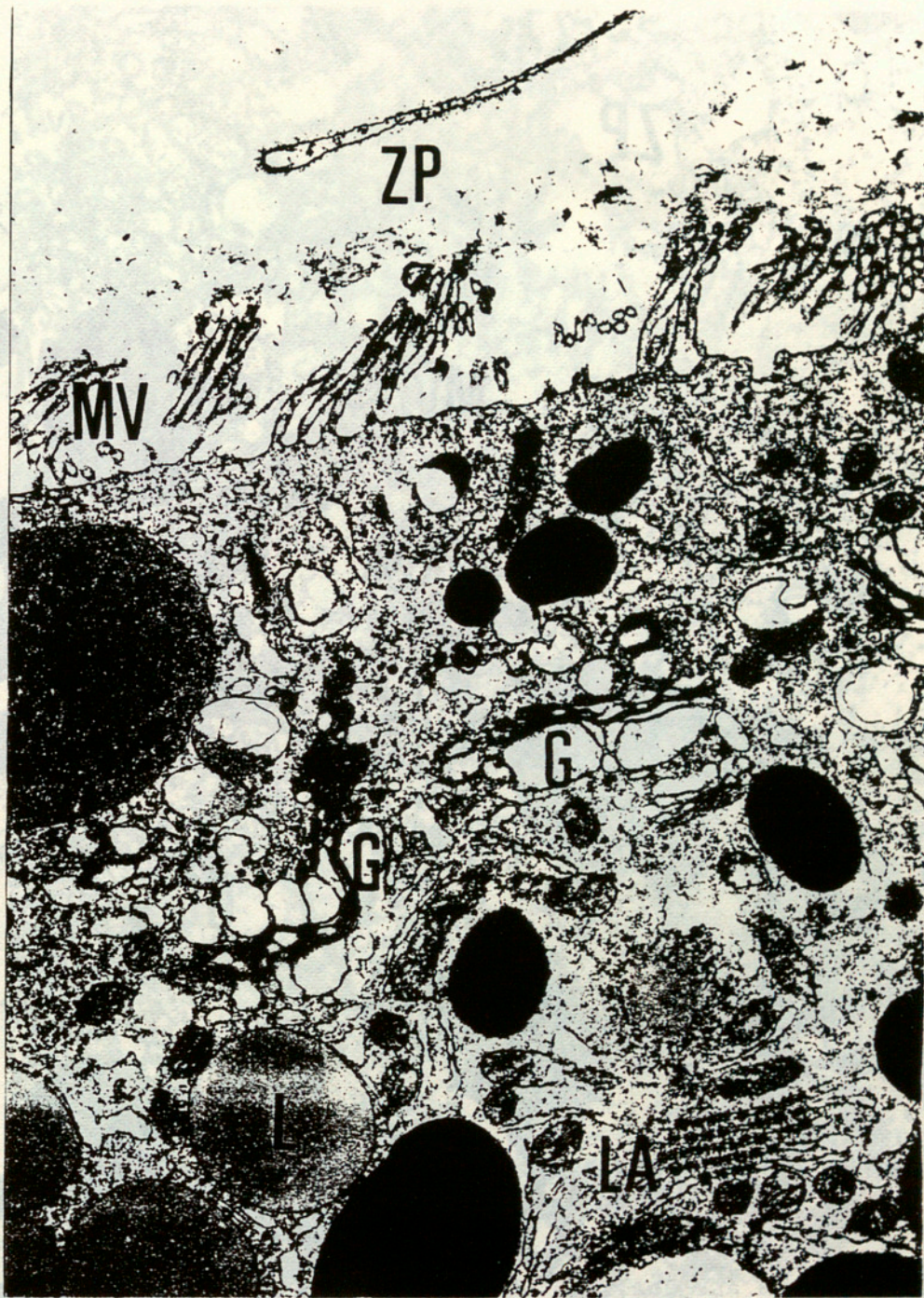


Fig.1.- Zona cortical d'òocit d'Acanthochitona fascicularis, en fase de postvitel.logènesi. Observis la heterogenitat dels orgànuls presents, alhora que llur desenvolupament.

(G): dictiosoma., (LA): làmines anellades., (L): inclusió lipídica., (V): vitel glucolipoproteic., (CM): cos multivesiculós., (MV): membrana vitel.lina., (ZP): zona pel.lucida.

Contrastat rutinari amb acetat d'uranil i citrat de plom.

14.000 x.

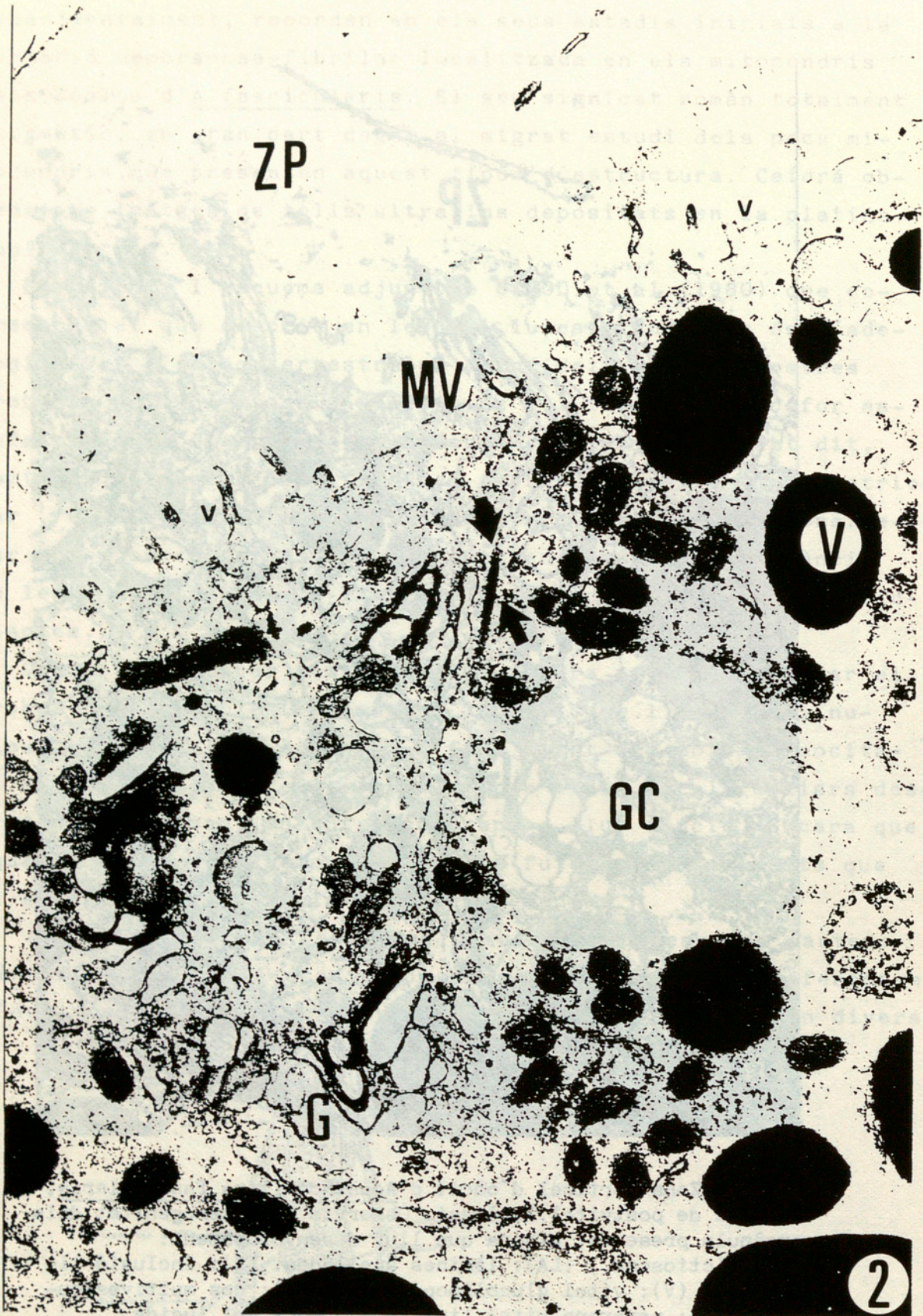


Fig.2.- En aquesta imatge de la zona cortical d'un oòcit madur d'*Acanthochitona fascicularis* s'observa, a part de les estructures habituals: (G): dictiosoma., (V): vitel., (GC): grànul cortical., (m): mitocondris., (MV): membrana vitel.lina., (ZP): zona pel.lucida., una estructura que recorda una arrel cilíar per la seva estriació periòdica (→). 15.000 x.

hipo-
del d'origen terrestre. Se-
sons GIROD, LHERITIER i GUI-
CHARD (1980).

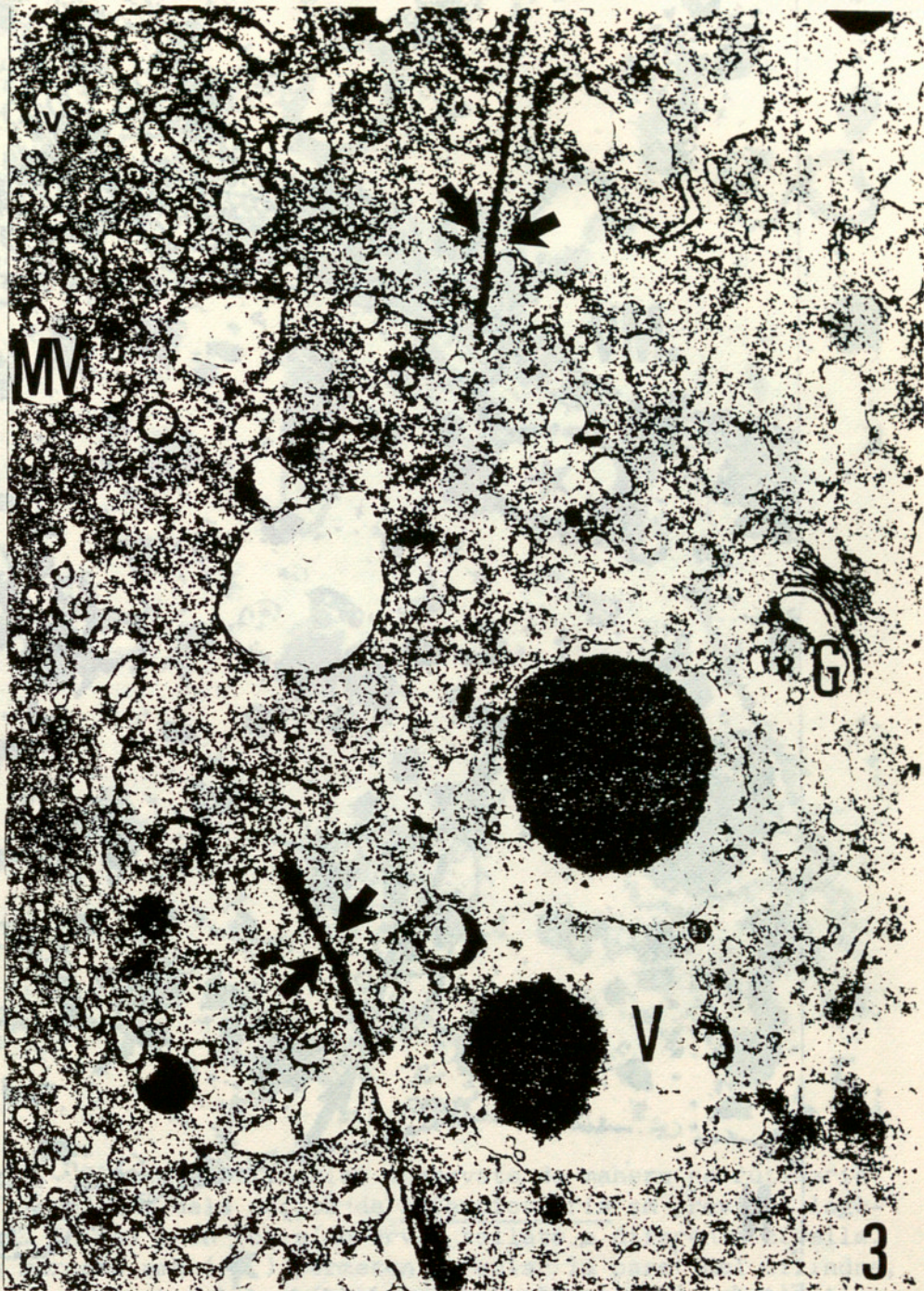


Fig.3.- A l'esquerra de l'imatge veiem els microvillis que emet l'óolemma (v) per la qual cosa constatem que tenim una imatge de la zona cortical del oòcit de *A.fascicularis*. Plaquetes vitel.lines (V) i dictiosoma (G) són les estructures que destaquen, a part de les estructures estriades (→) que veiem en una situació molt cortical i en general disposades be sigui perpendicularment o tangencialment a la membrana vitel.lina (MV). 15.000 x.

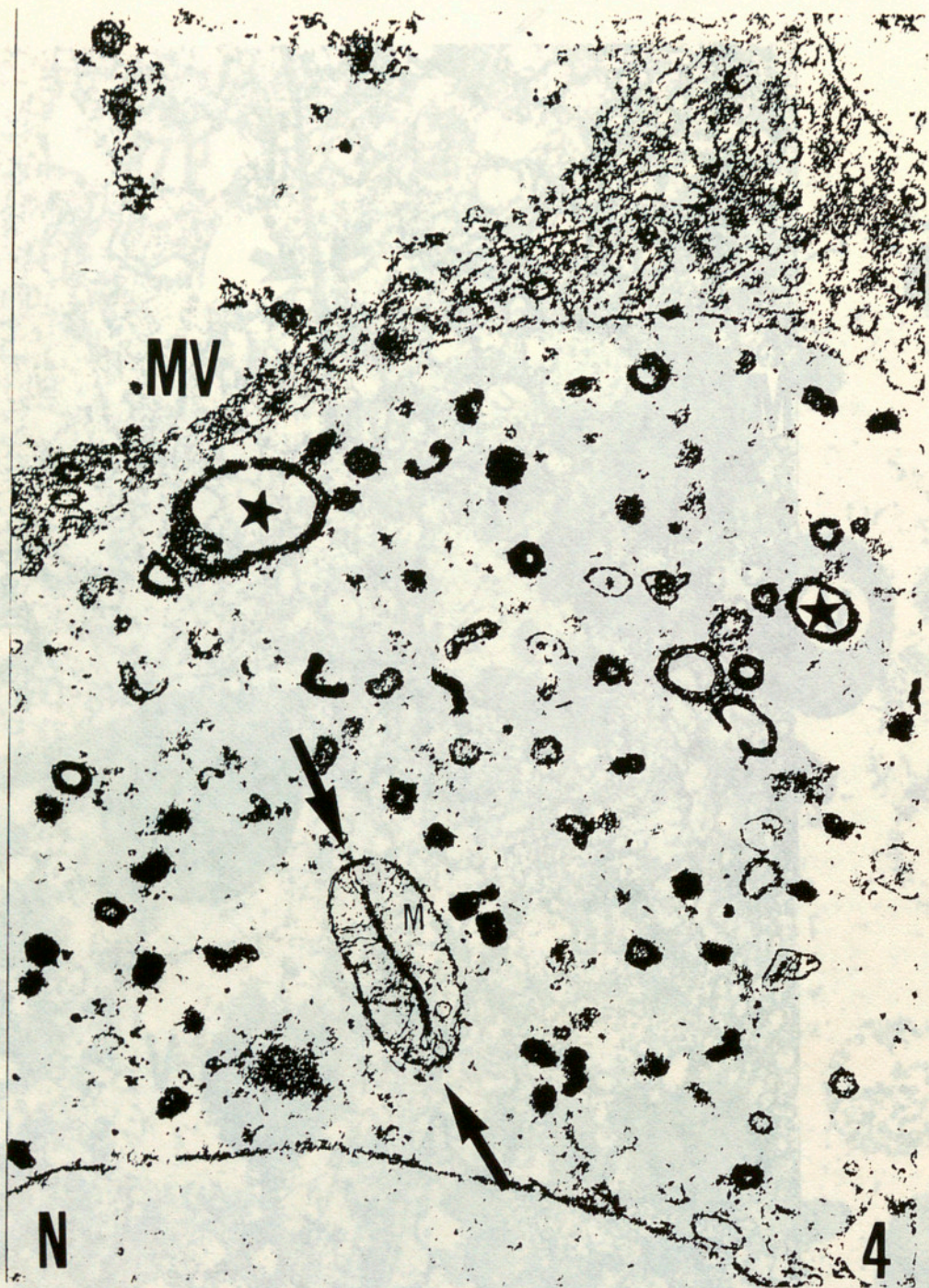


Fig.4.- Zona cortical d'un oòcit de *A.fascicularis*, en una fase de previtel·logènesi. En aquesta etapa, i no sempre, hem observat la presència de cossos densos que quant són tallats ben transversalment revelen una estructura cilíndrica. L'ur diàmetre és variable, així com l'ultraestructura de llur coberta. En aquesta imatge, prop del nucli (N) s'observa un mitocondri (M) que presenta una estructura fibril·lar no habitual en la seva matriu. La electrodensitat de les estructures cilíndriques així com del element allargat intramitocondrial dificulta en gran mesura llur correcta visualització. 18.000 x.

Fig.2.- Zona cortical d'un oòcit de *A.fascicularis*, en una fase de previtel·logènesi. (G): dictiorama. (V): vitel··lna. (ZP): zona pel·lucida. (M): mitocondri. (MV): membrana vitel··lina. (ZP): zona pel·lucida, una estructura que recorda una arrel cilíar per la seva estructures cilíndriques. 15.000 x.

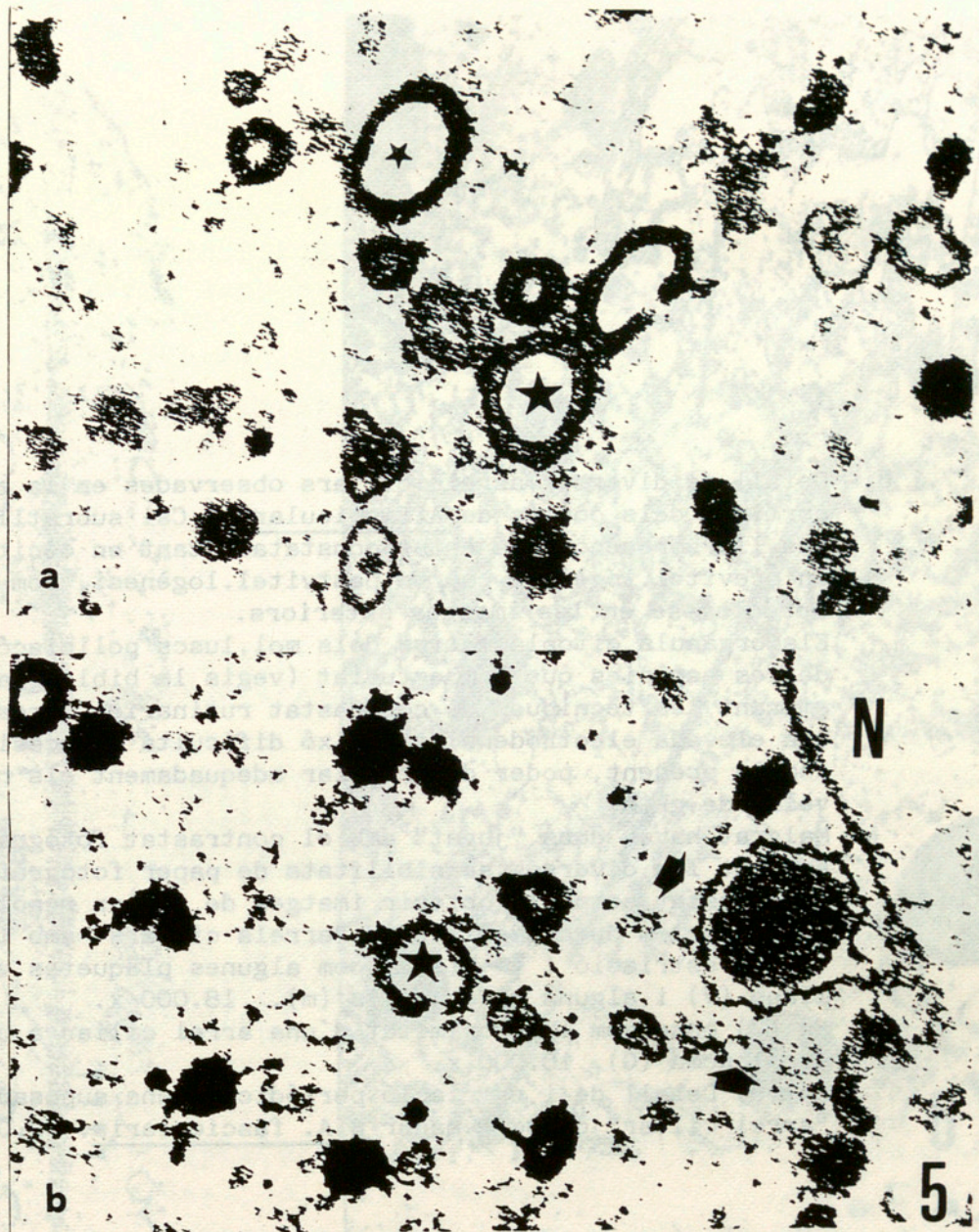


Fig.5.- Elements cilíndrics observats de manera no rutinària en l'ooplasma dels oòcits de *A.fascicularis* en previtel·logènesi. En (a) i en (b) s'observen tallats a diferents nivells. Els marcats amb (★) permeten apreciar la paret del cilindre, encara que en cap cas s'ha pogut observar una membrana delimitant. En (b) sembla com si hi hagués un nematosoma en la vesícula derivada d'un inflament de l'embolcall nuclear. Els oòcits dels mol·luscs polioplacòfors presenten habitualment cossos nucleolars, de textura però molt diferent a la presentada en aquesta imatge (◈). 20.000 x

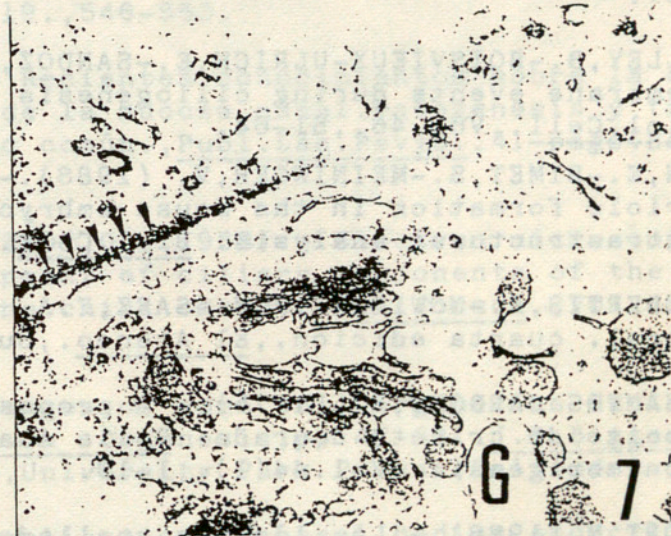
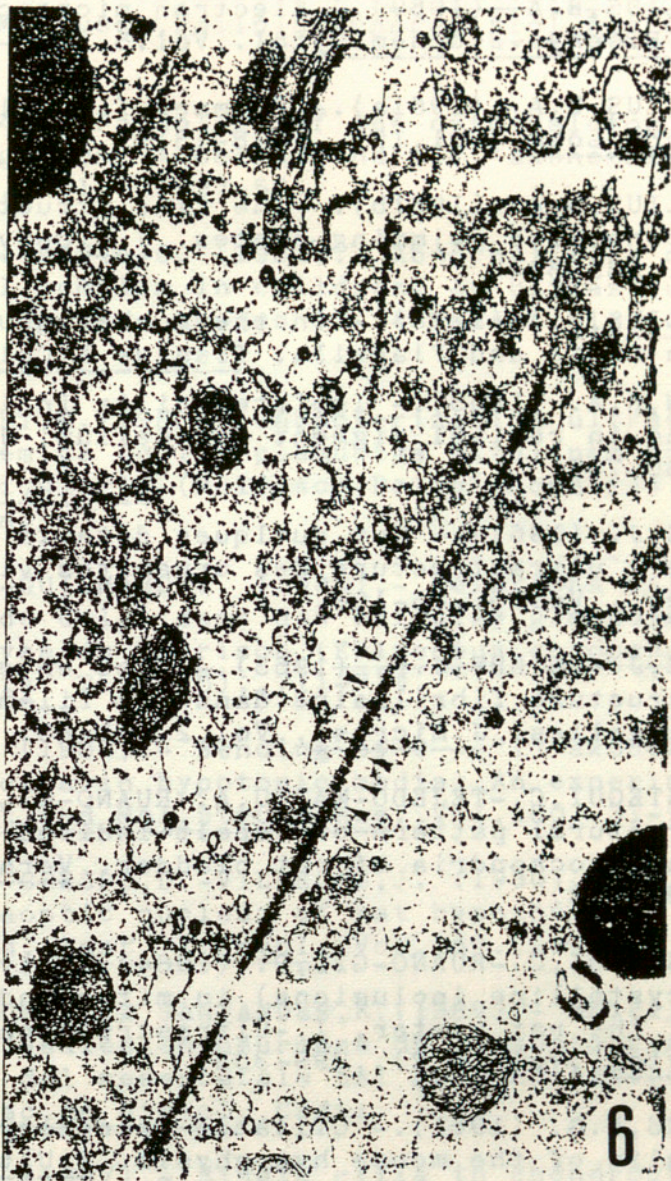
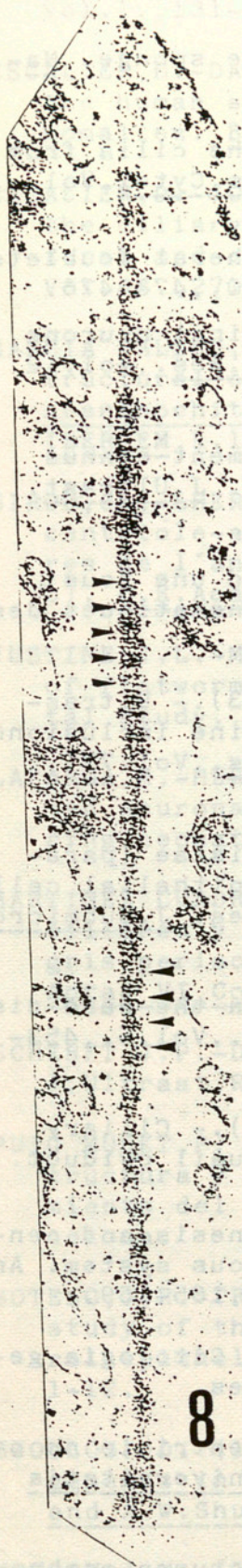
Fig.6.,7.i 8.- Detall de diverses arrels ciliars observades en la zona cortical dels oòcits de A.fascicularis. Cal subratllar que llur presència ha estat constatada tant en oòcits en previtel.logènesi com en postvitel.logènesi, com pot apreciar-se en les imatges anteriors.

Els orgànuls citoplasmàtics dels mol.luscs polioplacófors de les espècies que hem estudiat (vegis la bibliografia), emprant les tècniques de contrastat rutinaries, presenten una elevada electrodensitat, aixó dificulta en ocasions, com la present, poder diferenciar adequadament els nivells de gris.

Malgrat haver dons "jugat" amb el contrastat fotogràfic, emprant les diverses sensibilitats de paper fotogràfic, no ha estat possible obtenir imatges de millor resolució. En (6) veiem dues magnífiques "arrels ciliars" amb llur típica estriació (►) així com algunes plaquetes vitel. lines (V) i alguns mitocondris (m). 18.000 x.

En (7) observem la proximitat d'una arrel ciliar a un dictiosoma (G). 18.000 x.

En (8) Detall de l'estriació periódica d una suposada "arrel ciliar" d'oòcit madur d'A. fascicularis. 32.000 x.



Bibliografia

- AFZELIUS, B.A. (1959).- Electron microscopy of the sperm tail. J. Biophys. Biochem. Cytol., Vol. 5., 269-278.
- AFZELIUS, B.A. (1961a).- Flimmer-flagellum of the sponge. Nature Lond., Vol. 191., 1318-1319
- AFZELIUS, B.A. (1961b).- The fine structure of the cilia from ctenophore swimming-plates. J. Biophys. biochem. Cytol. Vol. 9., 383-394.
- AFZELIUS, B.A. (1988).- On the numbering of peripheral doublets in Cilia and Flagella. Tissue & Cell., Vol. 20., 473-476.
- ALLEN, R.A. (1965).- Isolated cilia in inner retinal neurons and in retinal pigment epithelium. J. Ultrast. Res., Vol. 12 730-747.
- ANDRE, J. (1961).- Sur quelques détails nouvellement connus de l'ultrastructure des organites vibratiles. J. Ultrast. Res., Vol. 5., 86-108.
- ANDRE, J.-THIERY, J.P. (1963).- Mise en evidence d'une sous structure fibrillaire dans les filaments axonematiques des flagelles. J. Microsc., Vol. 2., 71-80.
- BARASTEGUI, C.-TEJEDO-MATEU, A.-RUANO-GIL, D. (1983).- Ultrastructural pattern of cobalt-indiced crystalline inclusions in mitochondria of rat bladder. Verh. Anat. Ges., Vol. 77., 591-593.
- BARASTEGUI, C.-RUANO-GIL, D. (1984).- Atypical cristae (paracrystalline inclusions) in mitochondria of epithelial cells of the rat ureter. I.-Ultrastructural features. J. Submicrosc. Cytol., Vol. 16(2)., 299-305.
- BARNES, B.G. (1961).- Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. J. Ultrast. Res., Vol. 5., 453-467.
- CHAILLEY, B.-BOISVIEUX-ULRICH, E.-SANDOZ, D. (1982).- Ciliary membrane events during ciliogenesis of the quail oviduct. Biol. Cell., Vol. 46., 51-64.
- COHEN, E.-BIMET, S.-MEININGER, V. (1988).- Ciliogenesis and centriole formation in the mouse embryonic nervous system. An ultrastructural analysis. Biol. Cell., Vol. 62., 165-169.
- DE ROBERTIS, E.-NOWINSKI, W.W.-SAEZ, F.A. (1960).- Citologia general. cuarta edición., El Ateneo., Buenos Aires.
- DOS SANTOS CARDOSO, R. (1975).- A proposito do centriolo no ovocito do criceto dourado. Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis. Vol. 44(1)., 1-19.
- DURFORT, M. (1988).- Les làmines anellades, estructures membranoses que cerquen llur funció. Biol. Desenv., Vol. 6:143-157

- DURFORT, M.-GARCIA VALERO, J. (1989).- El complejo de Golgi i els grànuls corticals en els oòcits d'Achantochoitona fascicularis, L. (1767) (Mollusca, Poliplacophora). Biol.Reprod. Vol.1., 131-144.
- ESCALIER, D.-DAVID. (1984).- Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: Axonemal and peri-axonemal anomalies. Biol.Cell., Vol.50., 37-52.
- ESCALIER, D.-JOUANNET, P.-DAVID, G. (1982).- Abnormalities of the ciliary axonemal complex in children: An ultrastructural and cinetic study in a series of 34 cases. Biol.Cell. Vol.44., 271-282.
- GARCIA VALERO, J.-DURFORT, M. (1988).- Caracterización ultraestructural e histoquímica de las plaquetas vitelinas de Acanthochoitona fascicularis (Mollusca, Poliplacophora). IBER EM, L.19., Lisboa.
- GIROD, Ch., -LHERITIER, M.-GUICHARD, Y. (1980).- Relations cil-centriole-appareil de Golgi dans des cellules glandulaires de l'antéhypophyse du Hérisson (Erinaceus europaeus, L). C.R.Acad.Sc.Paris. T.290(D), 711-714.
- JUSTINE, J.L.-MATTEI, X. (1988).- Bending of 9 - "1" axonemes of flatworm spermatozoa in hypotonic media: An experimental study. J.Ultrast.and Mol.Struct.Res., Vol.100., 31-98.
- LAFARGA, M.-HERVAS, J.P.-CRESPO, D.-VILLEGAS, J. (1980).- Ciliated neurons in supraoptic nucleus of rat hypothalamus during neonatal period. Anat. Embryol., Vol.160., 29-38.
- MARTINEZ CUADRADO, C.-GONZALEZ SANTANDER, R. (1989).- Raicillas ciliares y cuerpos basales en neuronas de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo del gato doméstico. Actas VI Congreso Nac.de Histol., Cádiz.
- SCHERFT, J.P.-DAEMS, W.T. (1967).- Single cilia in chondrocytes. J.Ultrast.Res., Vol.19., 546-553.
- PUIG MUSET, P. (1966).- Recientes conocimientos sobre la estructura y función de la mucosa nasal. Patogénesis y tratamiento del resfriado común. Publ.Lab.Pevya., 41 pàgs. Barcelona.
- SOTELO, J.R.-TRUJILLO-CENOZ, O. (1958).- Electron microscope study of the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. Zellforsch., Vol.49., 1-12.
- SZOLLOSI, D. (1972).- Changes of some cell organelles during oogenesis in mammals. In : Oogenesis, pp 47-64. J.D.Biggers and A.W.Shuets Eds., University Park Press., Baltimore.
- YOUSON, J.H. (1982).- replication of basal bodies and ciliogenesis in a ciliated epithelium of the lamprey. Cell Tissue Res., Vol.223., 255-266.

=====