

FORMA I ULTRASTRUCTURA DELS OÒCITS DE *TRACHYDERMON CINEREUS*, THIELE (MOLLUSCA, POLIPLACOPHORA) *

Comunicació presentada el dia 18 de maig de 1978

per

**MERCÈ DURFORT, ROBERT BARGALLÓ, MARIA GRÀCIA BOZZO,
JORDI LÓPEZ-CAMPS i RAMON FONTARNAU**

Departament de Morfologia i Microscòpia de la Facultat de Biologia
i Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona

SUMMARY

The Trachydermon cinereus oocyte is surrounded by to 18 to 20 follicle cells which are extremely flat in shape and are involved in an active process of synthesis during oocyte development forming the zona pellucida. This is suggested by the presence of concentric whorls of rough endoplasmic reticulum, large mitochondria and a very well developed Golgi complex. This zona pellucida emits some cylindrical projections which are flattened dorso-ventrally and which are supported on the hexagonal base, being responsible for the starshaped aspect of the oocyte. The said expansions are completely protected by the follicle cells, the nucleus being situated at its apical end.

In the cytoplasm oocytes in previtellogenesis and in vitellogenesis a very well developed and polymorphous rough endoplasmic reticulum is present; the annulate lamellae always appear during the phase in continuity with the vesicles of the rough endoplasmic reticulum.

The origin and evolution of yolk platelets have been demonstrated in Trachydermon cinereus oocytes. The transformation of the mitochondria has been seen by the accumulation of crystalline material and the later loss of cristae, until they become transformed into the yolk platelet. These process a dense electron core mainly composed of proteins the superficial layer being composed of a not very dense electron material.

* Aquest treball forma part del projecte d'estudis gametogenètics patrocinat per la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica» de la Presidència del Govern.

INTRODUCCIÓ

Normalment, la gònada femenina de tots els animals triploblàstics és formada per cèl·lules germinals en les seves diverses fases de maduració (des dels gonis primordials a les oogònies i oòcits) per cèl·lules vitel·lines així com per una xarxa més o menys complexa de fibres conjuntives que dona suport als altres elements cel·lulars i el seu desenvolupament depèn del grau de maduració de la glàndula sexual.

La presència de cèl·lules no germinals, de tipus nutritiu o bé vitel·lines és quasi universal, encara que manquen en el nemàtodes, en els molluscs lamelibranquis i en els equinoderms.

La principal diferència entre les cèl·lules vitel·lines i les nutritives, és que aquestes últimes acaben per ésser fagocitades i incorporades totalment a les cèl·lules germinals, mentre que les vitel·lines o fol·liculars no ho són mai de fagocitades. La funció primordial de les cèl·lules fol·liculars és habitualment la de secreció de productes que es disposaran al voltant de les cèl·lules de tipus germinal, formen una coberta més o menys desenvolupada segons els casos i que a la vegada facilitarà la incorporació per diversos mecanismes, de productes que posteriorment seran utilitzats en el procés de la vitel·logènesi. L'increment del poder reabsorbent de l'oolema ve donat per la naturalesa química de la zona pellúcida, de tipus glucoproteínic, sintetitzada per les cèl·lules fol·liculars, a la vegada que aquesta coberta deu jugar un paper important en el moment de la fertilització.

És justament en un estudi que GARNAULT⁸ portà a terme en 1888 sobre els oòcits dels quitònids i de les seves cèl·lules fol·liculars, on trobem una apassionada i fins i tot divertida discussió sobre l'origen d'aquestes cèl·lules. Alguns autors de l'època, com CADIAT³, FOL, NUSSBAUM, ROULE¹⁴, SABATIER¹⁵, entre altres, creien en un origen endogen, és a dir, consideraven fermament que les cèl·lules fol·liculars eren secretades del citoplasma dels oòcits tal com, en un moment donat, després de la fertilització, són expulsats els grànuls corticals per formar la membrana de fecundació. Altres autors com VAN BENEDEN², el mateix GARNAULT⁸, JULIN, LACAZE-DUTHIERS, treballaven en materials molt diversos, que van des de les ascídies als mamífers, creien —com realment és— que llur origen és totalment exogen.

Centrant-nos en els estudis duts a terme sobre l'oogènesi dels molluscs polioplacòfors, cal recordar els clàssics treballs de la microscòpia fotònica de LOVEN¹⁰, GARNAULT⁸, GABE i PRENANT⁷, LYNGNES¹¹, entre altres i admirar-nos una vegada més del gran poder d'observació dels microscopistes clàssics; entre els de tipus ultraestructural figuren els d'ANDERSON¹, DURFORT⁴, RICHTER^{12, 13} i SELWOOD¹⁶.

MATERIAL I MÈTODES

Les gònades femenines d'exemplars de *Trachydermon cinereus* recollits a Cubelles (Barcelona) han estat doblement fixades per als seus posteriors estudis als microscopis electrònics de transmissió i d'exploració. Així, després d'una prefixació amb glutaraldèhid tamponat amb Sorensen o bé en cacodilat sòdic a pH 7,3 o bé fixades en glutaraldèhid-paraformaldèhid també tamponat a pH 7,3, durant dues hores a 4 °C, es postfixaren en tetraòxid d'osmi al 2 % igualment tamponat durant dues hores a 4 °C.

Després d'una deshidratació curosa, les peces es van incloure amb araldita, araldita-epon o bé en Spurr, a fi de poder-ne obtenir seccions ultrafines amb un ultramicròtom OmU₂ i una vegada contrastades amb acetat d'uranil i amb citrat de plom s'observaren amb microscopis electrònics de transmissió EM 200 i EM 301 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Altres mostres van ésser tractades, després d'una acurada deshidratació, per l'acetat d'amil i posteriorment passaren al punt crític i van ésser metallitzades per R. FONTARNAU *, l'observació es va fer amb un microscopi d'exploració Stereoscan S-4 (Cambridge Scientific Instruments, Ltd.) del Servei anteriorment esmentat i treballant amb un potencial d'acceleració entre 10 i 30 kV.

OBSERVACIONS

Els oòcits de *Trachydermon cinereus* tenen unes 250 μ de diàmetre, són totalment esfèrics i estan envoltats per un nombre determinat de cèl·lules fol·liculars de forma pediculada que donen a l'oòcit un aspecte estrellat molt exòtic que el microscopi electrònic d'exploració evidencia de manera prodigiosa. Cal esmentar, que si bé són moltes les imatges d'ous, principalment d'insectes, obtingudes amb aquest tipus de microscopi, que sapiguem, aquestes són les primeres obtingudes dels oòcits de quitònids.

El nombre de cèl·lules fol·liculars és constant en aquesta espècie —de 18 a 20 per cada oòcit—. La cèl·lula és aplanada, sembla de tipus endotelial i la seva base té forma polièdrica, com un hexàgon regular de 31 μ de costat i per tant abraça una superfície de l'ordre dels 2,3 micròmetres quadrats.

* La tècnica seguida per R. FONTARNAU en la preparació de mostres biològiques delicades i molt menudes, del tipus de les cèl·lules sanguínies, espermatozoides, oòcits, etc., és descrita amb tota precisió en la tesi de J. LÓPEZ CAMPS (Universitat de Barcelona, 1978).

Contactes del tipus de desmosomes i unions íntimes (tight junction) es troben entre les membranes basals de les cèl·lules foliculars, a la vegada que l'emissió de microvillis per part de l'oolema de l'oòcit i per part de la membrana plasmàtica de la cèl·lula folicular constitueix un sistema d'ancoratge molt interessant.

Aquestes cèl·lules foliculars són altament secretores de glucoproteïnes, com ho demostra el fet de tenir un aparell de Golgi i un ergastoplasma extraordinàriament desenvolupat, i el producte elaborat és eliminat per la part de la membrana basal. D'aquesta manera es va formant un eix granulós-fibrós, força consistent, altament PAS positiu i que per la microscòpia electrònica es contrasta molt bé amb el roig de ruteni al 0,05 % en solució aquosa. Aquest material és el que dona la forma pediculada a la cèl·lula folicular, de manera que aquest material està entre els dos tipus de cèl·lules, la germinal i la folicular.

L'eix que constitueix el pedícul té unes 90 μ de llargada i unes 60 μ de diàmetre. És més o menys cilíndric, però aplanat a la regió ventral i acabat de forma roma. És justament en aquest extrem on els talls ultrafins estudiats amb el microscopi electrònic de transmissió demostren que hi ha el nucli de la cèl·lula folicular.

El microscopi electrònic d'exploració ens permet comprendre la forma estrellada dels oòcits i la microscòpia electrònica de transmissió ho confirma.

Quant a la ultraestructura dels oòcits de *T. cinereus*, cal esmentar que té els elements habituals en tots els tipus de cèl·lules germinals: un oolema que dona unes prolongacions digitiformes del tipus de microvillis, molt poc desenvolupats, d'1 a 2 μ de llargada i poc nombrosos, exteriorment al qual hi ha una membrana vitel·lina molt prima i laxa, secretada per l'oòcit i protegida a la vegada per la ben desenvolupada zona pel·lúcida, de tipus pediculat, que es troba entre l'oòcit i les cèl·lules foliculars. Els dos constituents extraovocitaris es diferencien bé ultraestructuralment per llur textura.

Dintre les estructures citoplasmàtiques, cal remarcar el gran polimorfisme de les estructures membrano-vesiculososes del tipus de l'ergastoplasma i de les làmines anellades. Cal destacar el fet que la relació entre aquestes estructures es fa sense transició, és a dir, l'ergastoplasma perd els seus ribosomes, es fragmenta i dona la típica imatge de les làmines anellades o periòdiques. El diàmetre de les interrupcions que presenten aqueixes làmines és de l'ordre de la grandària dels porus de l'embolcall nuclear, és a dir d'uns 450 a 500 Å de diàmetre. L'ergastoplasma, molt desenvolupat en la previtel·logènesi, adopta diverses disposicions. És altament polimòrfic i, en les primeres fases, es troba pre-

FIG. 1.— Ovari de *Trachydermon cinereus*. Imatge obtinguda amb un microscopi de Scanning en què es poden observar els oòcits envoltats per nombroses cèl·lules fol·liculars pediculades i radialment disposades (160 x).

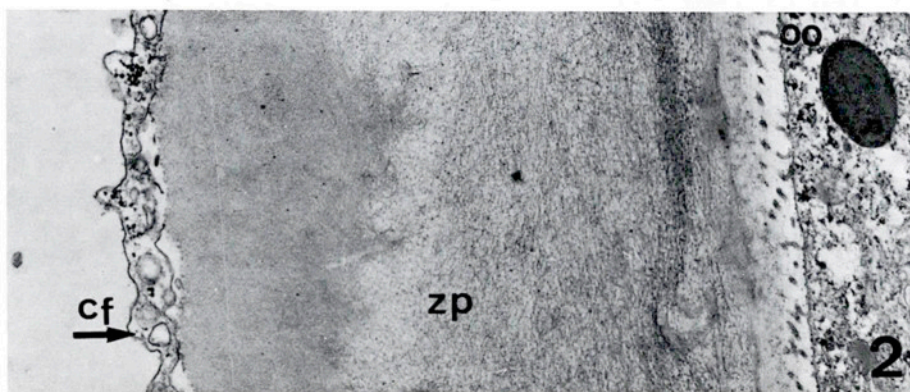


FIG. 2.— Detall de la coberta de la cèl·lula germinal femenina. L'oòcit és envoltat per la zona pellúcida (zp) i a la vegada recobert per la cèl·lula fol·licular (cf) extraordinàriament prima en aquesta zona (13.500 x).

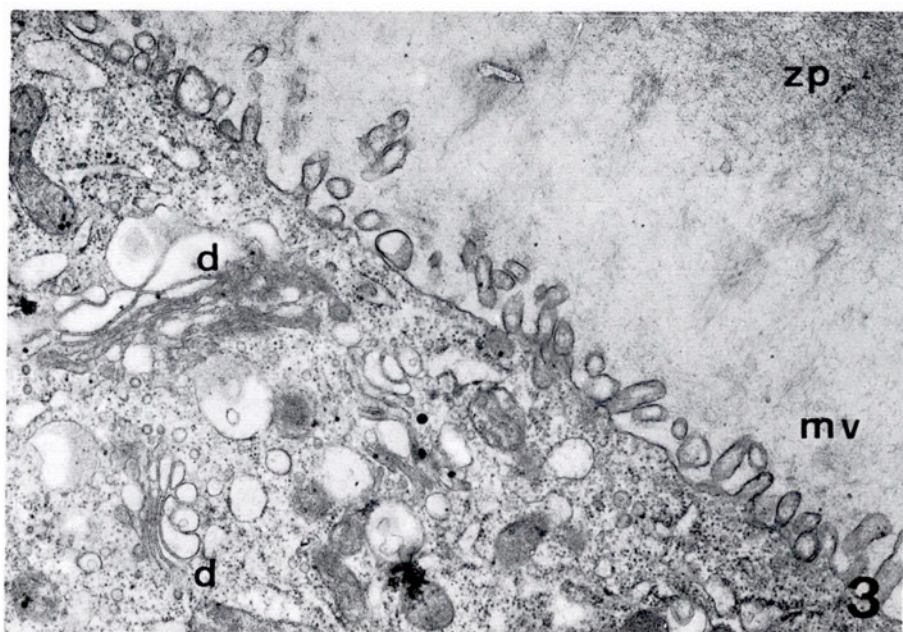


FIG. 3.—L'olema (oo) dona una sèrie d'evaginacions digitiformes o microvillis que s'introdueixen en la membrana vitel·lina (mv). En l'ooplasme poden observar-se dos dictiosomes (d) responsables de l'elaboració de les glucoproteïnes que formen la membrana vitel·lina (40.000 x).

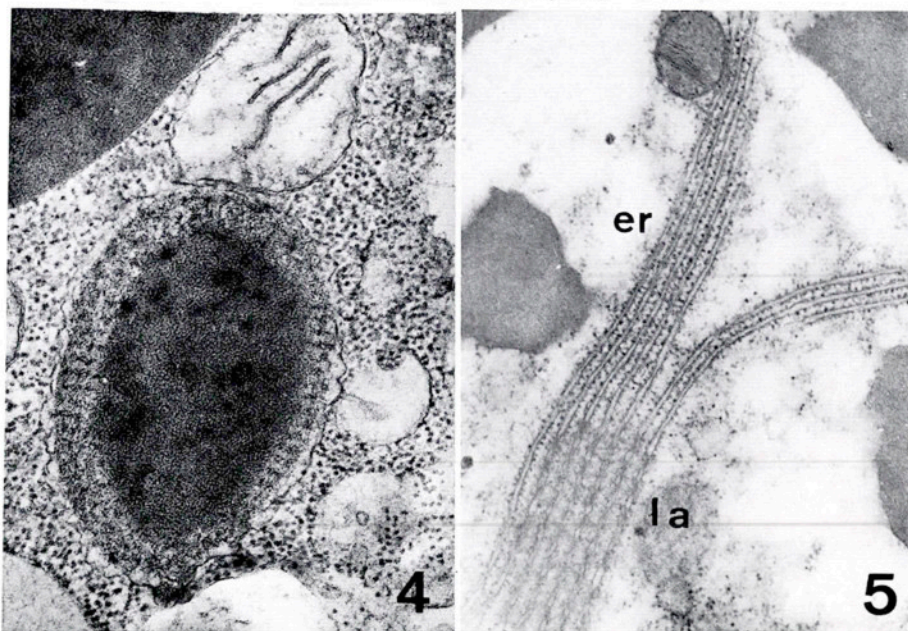


FIG. 4.—Detall d'una plaqueta vitel·lina en formació, a la perifèria podem veure restes de crestes mitocondrials (40.000 x).

FIG. 5.—Zona de transició entre l'ergastoplasma (er) i les làmines anellades (la).

ferentment en les proximitats de la membrana nuclear i, posteriorment, al voltant d'inclusions lipídiques i de plaquetes vitel·lines.

Els mitocondris són molt abundants en la zona més interna de l'ooplasma i tenen un paper decisiu en la formació de les plaquetes vitel·lines. Aquestes tenen unes 2 μ de diàmetre i presenten una forma particular: un centre molt dens als electrons envoltat d'una zona de poca densitat als electrons i altament fibro-granulosa. Hem observat imatges en les quals dins de la matriu mitocondrial es van acumulant materials densos que es van compactant. Els mitocondris perden llur morfologia habitual, les crestes mitocondrials queden desdibuixades i finalment obtenim una plaqueta vitel·lina envoltada per una doble membrana de tipus unitari. Aqueixes plaquetes vitel·lines al llarg de la vitel·logènesi es diseminen uniformement per tot l'ooplasma.

El nucli o vesícula germinativa és molt gros i poc dens als electrons. Ocupa tota la zona central de la cèl·lula germinal i presenta una membrana molt porosa. Els seus porus són de tipus senzill i d'un diàmetre de l'ordre dels 450 als 550 Å.

DISCUSSIÓ

Les característiques més remarcables dels oòcits de *Trachydermon cinereus* són sens dubte els que acabem de descriure: la presència d'un nombre constant de cèl·lules fol·liculars altament secretores al seu entorn i la fermesa dels ancoratges trobats en les seves parts basals amb el microscopi d'exploració. Serà interessant veure quina és l'evolució que experimentaran aquestes cèl·lules quan els oòcits arribin a la seva maduresa total i es produeixi la fertilització. Hi ha dues alternatives possibles: o bé es desenganxen i l'oòcit queda lliure, o bé les cèl·lules fol·liculars es transformen per processos de lisi i queda un material granulós molt lax que permetrà l'entrada de l'espermatozoide. En qualsevol dels casos podria aparèixer una formació de tipus micropílic. Caldrà, doncs, fer observacions en oòcits més madurs.

A nivell de l'oòcit cal remarcar el polimorfisme que presenta l'ergastoplasma que adopta disposicions en paral·lel i concèntriques, aquestes molt desenvolupades durant la fase de vitel·logènesi; per pèrdua dels ribosomes i posterior fragmentació, l'ergastoplasma evoluciona donant lloc a les làmines anellades. Aquest fet fou exposat en la publicació de DURFORT⁴, el 1976, i aquesta interpretació concorda amb unes de les possibilitats donades per KESSEL⁹ en alguns tipus d'oòcits.

En aquest model cel·lular es demostra una vegada més la gran relació que hi ha entre totes les estructures membranoses de les cèl·lules, siguin del tipus que siguin.

En la vitel·logènesi dels oòcits de *Trachydermon cinereus*, juga un paper decisiu el condrioma, ja que és a partir dels mitocondris que es formen les plaquetes vitel·lines, com ja en *Planorbis*, FAVARD i CARASSO ⁶, en 1958 van veure i descriure en un dels primers treballs ultraestructurals duts a terme sobre aquest fet, i com posteriorment ha estat descrit per diversos autors en molluscs, insectes, peixos, etc. Una revisió sobre els possibles orígens de les plaquetes vitel·lines en els molluscs la trobem en la nota de DURFORT ⁵ de 1977.

NOTA:

Essent que en aquest treball es presenten les primeres imatges d'ous de quitònid obtingudes amb el microscopi de «scanning», cal puntualitzar que l'any 1979 apareix l'obra de GIESE i PEARSE, «Reproduction of Marine Invertebrates» (Academic Press), on s'hi pot veure imatges inèdites de dues espècies: *Cyanoplax hartwegii* i *Mopalia muscosa*, cedides, respectivament, per CARPENTER i GOULD. Tal com els oòcits del quitònid motiu del nostre treball, els gàmetes de les dues espècies esmentades es troben envoltats per cèl·lules fol·liculars d'una morfologia diferent, però sempre molt espectacular, que permet d'assenyalar que els oòcits són prou particulars com per a determinar l'espècie a la que pertanyen. (DURFORT i col., maig de 1981.)

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, E. — *Oocyte-follicle cell differentiation in two species of Amphineurans (Mollusca)*, *Mopalia muscosa* and *Chaetopleura apiculata*. «J. Morphol.», vol. 129, 89-126 (1969).
2. VAN BENEDEN, E. i JULIN, A. — *Morphologie des Tuniciers*. «Arch. de Biologie», T. VI (1886).
3. CADIAT, M. — *Traité d'anatomie générale*. (1881). Ref.: GARNULT: «Arch. Zool. Gén. et exp.». T. 6, 82-116 (1888).
4. DURFORT, M. — *Relation entre les lamelles annelées et le réticulum endoplasmique granulaire dans les ovocytes de Trachydermon cinereus, Thiele (Mollusque, Polyplacophore)*. «Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim.», T. 18, fasc. 4, 449-457 (1976).
5. DURFORT, M. — *Ultraestructura de las plaquetas vitelinas en tres especies de moluscos*. «Miscelánea Zoológica», Vol. IV, fasc. 1., 33-40 (1977).
6. FAVARD, P. i CARASSO, N. — *Origine et ultrastructure de plaquettes vitellines de la planorbe*. «Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.», T. 47, 211 (1964).
7. GABE, M. i PRENANT, M. — *Contribution à l'histologie de l'ovogenèse chez les Polyplacophores*. «La Cellule», T. 53, 99-117 (1949).
8. GARNULT, P. — *Recherches sur la structure et le développement de l'oeuf et son follicule chez les Chitonides*. «Arch. Zool. Gén. Exp.», T. 6, 82-116 (1888).
9. KESSEL, R. G. — *Annulate lamellae*. «J. Ultrast. Res.», supl. 10 (1968).
10. LOVEN, S. — *Über die Entwicklung von Chitoniden*. «Ann. Mg. nat. Hist.», Vol. 17, 413-416 (1856).
11. LYNGNES, R. — *Zur kenntnis der Eihüllen der Chitoniden*. «Skr. Vidensk. Selk. Kristiana», Vol. 20, 1-19 (1924).
12. RICHTER, H. P. — *Feinstrukturelle Untersuchungen zur Oogenese der Kaferschnecke Lepidochitona cinereus (Mollusca, Polyplacophora)*. «Helgolander wiss. Meeresunters.», Vol. 28, 250-303 (1976).
13. RICHTER, H. P. i GOTTING, K. J. — *Oogenese und Sexualität der Kaferschnecke Lepidochitona cinereus, L. (Mollusca, Polyplacophora)*. «Helgolander wiss. Meeresunters.», Vol. 26, 42-62 (1974).
14. ROULE, M. — *Monographie de la Ciona intestinalis*. «Annales du Musée de Marseille», T. II, 167 (1887).
15. SABATIER, M. — *Sur les cellules du follicule de l'oeuf et sur la nature de la sexualité*. «Comp. Rend. de l'Institut» (1883).
16. SELWOOD, L. — *Interrelationships between developing oocytes and ovarian tissues in the chiton Sypharochiton septentriones Ashby (Mollusca, Polyplacophora)*. «J. Morphol.», T. 125, 71-104 (1968).