

Comportamento dos nucléolos e mitocôndrios durante a ovogênese de peixes teleósteos de água doce (*)

Carminda da Cruz-Landim (**)
Maria Alice da Cruz-Höfling (***)

Resumo

Os ovócitos de peixes teleósteos em fase pré-vitelogênica apresentam numerosos nucléolos localizados perifericamente no núcleo. Existem evidências morfológicas da passagem do material destes nucléolos para o citoplasma onde se associa a mitocôndrios e se dispersa, mantendo sempre a associação. Este material pode ser detectado no ovócito mesmo após o início da deposição de vitelo possivelmente vindo a constituir o plasma germinativo.

INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido realizados sobre o comportamento e função dos nucléolos durante a ovogênese. A observação mais geral a respeito, indica papel proeminente deste orgânulo nuclear na armazenagem do RNA ribossômico necessário para atender à síntese de proteínas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Brown & Littna, 1964; Perry, 1966).

Gansen & Schram (1968) estudando a ultra-estrutura e citoquímica da vesícula germinal do ovócito de *Xenopus laevis* descreveram três tipos de nucléolos que correspondem a variações durante o ciclo ovogênico: 1) grandes nucléolos típicos, geralmente em número de um por célula; 2) alguns nucléolos com protuberâncias; 3) número variável de micronucléolos. Basicamente estes nucléolos não diferem nos seus componentes ultra-estruturais ou químicos e apresentam-se na célula em uma seqüência temporal. Todos os nucléolos são constituídos de fibrilas com 1 — 2 nm de diâmetro e grânulos de 20 nm de diâmetro e apresentam composição de RNA e proteínas, sendo a única diferença entre eles a distribuição espacial dos elementos estruturais e a

presença de DNA nos nucléolos grandes Müller (1966) por sua vez, relata a presença de centenas de nucléolos localizados perifericamente no núcleo de ovócitos de salamandra, destacados dos cromossomos, os quais correspondem aos micronucléolos mencionados acima. Segundo o autor, estes nucléolos apresentam um componente membranoso sob a forma de túbulos achatados que teria importância na transferência ou transformação intra-nuclear das moléculas precursoras do RNA ribossômico após sua transcrição do DNA. Já Dallai (1967) e Hinsh (1970), descrevem a presença de membranas intranucleares, associados aos nucléolos, cujo papel poderia ser no transporte do material nucleolar para o citoplasma.

Esta transferência de RNA ribossômico do núcleo para o citoplasma apesar de universalmente aceita, permanece obscura quanto ao modo da passagem, embora várias maneiras tenham sido sugeridas por diferentes autores (Hinsch, 1970).

No caso dos ovócitos é bastante comum encontrarem-se acúmulos de material semelhante ao dos nucléolos do lado citoplasmático do envelope nuclear (Lewis & McMillan, 1965; Droller & Roth, 1966; Eddy, 1975; Clérot, 1976). O aparecimento desse material no citoplasma próximo ao envelope nuclear é freqüentemente acompanhado por modificações nos nucléolos, como por exemplo vacuolização (Esper, 1965) e mais tarde por modificações citoplasmáticas que ocorrem associadas a mitocôndrios (Clérot, 1976).

O presente estudo refere-se à ultra-estrutura dos micronucléolos presentes em ovócitos de peixes e à análise das evidências

(*) — Pesquisa financiada pelo CNPq e NSF — Grant n.º BNS 75-10457A01

(**) — Instituto de Biociências — UNESP — Rio Claro, SP.

(***) — Instituto de Biologia — UNICAMP — Campinas, SP.

morfológicas da passagem de seu conteúdo para o citoplasma, bem como de sua evolução neste compartimento celular, durante a fase pré-vitelogênica do ovócito.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas sete espécies de peixes, quatro pertencem à superordem Ostariophysi (Cypriniformes) *Serrasalmus* sp; *Hemiodus gracilis*, *Hemiodus immaculatus* e *Semaprochilodus* sp e 3 pertencentes à superordem Acanthopterygii (Perciformes) *Crinicichla johanna* e *Plegioscion squamosissimus* e (Artherimiformes); *Pseudotylorus microps*. Os peixes foram capturados nos rios Solimões (lago Janauacá) e Negro (arquipélago Anavilhanas), Amazonas, durante o mês de janeiro, enquanto a bordo do R/V Alpha-Helix da Universidade de La Jolla, California.

Fragmentos dos ovários foram fixados em gluta raldeído a 2.5% em tampão fosfato, pH 7.2, a 4°C durante 3 — 12 horas. Após lavagem em tampão, foi feita a post-fixação com ácido ósmico a 1% no mesmo tampão durante 2 horas. A desidratação foi feita em série crescente de etanóis após o que se procedeu a inclusão em araldite. Os cortes foram efetuados em ultramicrotomo Porter-Blum MT 2B com navalhas de vidros e examinados em microscópio eletrônico Zeiss EM 9-S2. Cortes grossos foram corados com mistura em partes iguais de azul de metileno e azul II.

RESULTADOS

As gônadas se encontravam em estágios diferentes de desenvolvimento, mas todas apresentaram ninhos de células com ovócitos em fase pré-vitelogênica (designamos fase pré-vitelogênica à fase que precede o aparecimento dos primeiros grânulos de vitelo no citoplasma). Nesta fase os ovócitos apresentam núcleos relativamente grandes (10 μ m de diâmetro) e citoplasma altamente basofílico (Fig. 1a). Em cortes o núcleo se apresenta preenchido por nucleoplasma de baixa densidade eletrônica, contendo alguns grânulos esparsos de cromatina e numerosos nucléolos localizados periféricamente (Fig. 1b), os quais correspondem aos micronúcléolos de Gansen

e Schram. O número e tamanho dos nucléolos é variável, sendo sua forma a princípio predominantemente esférica mas tendendo para irregular à medida que os ovócitos se apresentam mais desenvolvidos.

Inicialmente os nucléolos se apresentam altamente compactos e constituídos de material fibro-granular. Com o desenvolvimento dos ovócitos torna-se distinta uma medula compacta com menor eletrondensidade e uma córtex granular mais eletrondensa e mais difusa, cujos prenúncios já podem ser observados na figura 1b e também na 2a.

O processo de difusão ou dissolução do nucléolo se intensifica podendo atingir a região medular, deixando uma massa compacta em forma de anel ao seu redor (Fig. 2b). Ao microscópio óptico nucléolos desse tipo apresentam-se como se contivessem um vacúolo central. (Fig. 2c). A característica granular do material em dispersão é bem evidente, medindo os grânulos 30nm de diâmetro (Fig. 3a).

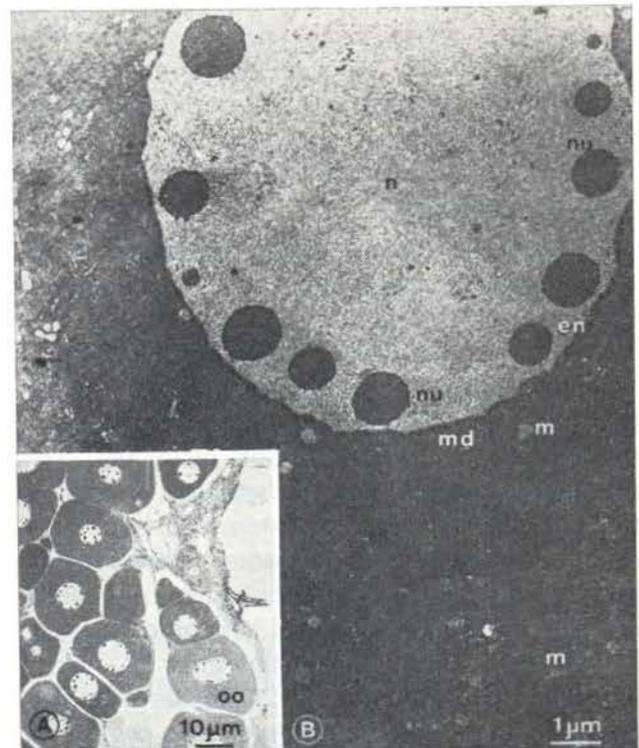


Fig. 1 — Ovócitos em fase pré-vitelogênica: A) — Micrografia de corte grosso ao microscópio de luz; B) — Micrografia eletrônica de pequeno aumento n=núcleo; nu=nucléolo; md=materiais denso de origem nuclear; m=mitocôndrios; oo=ovócito. (*Serrasalmus* sp.)

Nesta fase pode observar-se material com o mesmo aspecto morfológico colocado junto ao envelope nuclear, do lado citoplasmático, em pequenos agrupamentos (Figs 1b, 2a e b, 3b e 4a) dando idéia de que o material dos micronúcleolos deve ter sido transferido para o citoplasma.

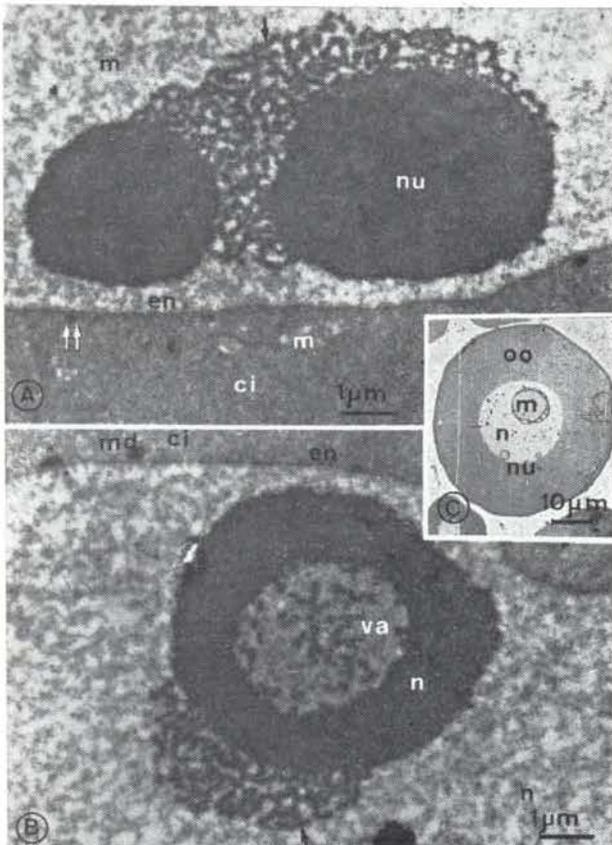


Fig. 2 — A) — Nucléolo (nu) em fase de descompactação dando origem a fitas anastomosadas de material granular (flechas); B) — Nucléolo (nu) em fase de descompactação dando origem à vacúolo (va) intranuclear; C) — Micrografia de corte grosso ao microscópio de luz mostrando nucléolos vacualizados. oo=ovócitos; en=envelope nuclear; md=materia! denso. (*Hemiodus immaculatus*)

O envelope nuclear dos ovócitos apresenta grande quantidade de poros e em alguns casos foi possível observar comunicação entre o material do nucléolo e esses poros (Fig. 3a). É também muito freqüente em cortes transversais dos poros, observar-se material granular na sua luz.

Comportamento dos...

Estruturas membranosas, formando vesículas ou enovelados irregulares (figuras mielínicas) intranucleares foram também observados nesta fase de transferência do material do núcleo para o citoplasma (Figs. 3a e b e 4b).

No citoplasma o material eletrondenso perinuclear se associa a mitocôndrios (Figs. 3b, 4a e b, 5a e b e 6). Inicialmente os mitocôndrios se colocam ao redor da massa de material, enquanto esta ainda está justaposta ao envelope nuclear (Fig. 3b). A massa a princípio compacta (Fig. 4a) passa por um processo de difusão semelhante ao que ocorre no nucléolo formando-se um retículo de fitas constituídas por material granular (Fig. 4b). A medida que isto acontece o material se dispersa pelo citoplasma afastando-se do núcleo (Figs.

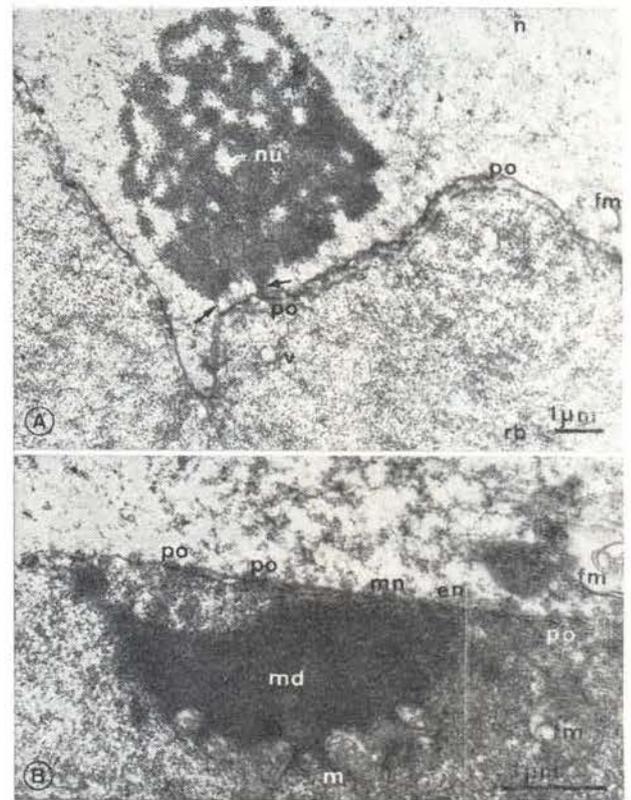


Fig. 3 — A) — Nucléolo (nu) em corte tangencial mostrando a natureza granular dos componentes e projeções (flechas) deste material para os poros (po) do envelope nuclear (en); B) — Associação do material (md) denso a mitocôndrios (m) do lado citoplasmático. ve=vesículas, rb=ribossomos, fm=figuras mielínicas. (*Plagioscion squamosissimus*)

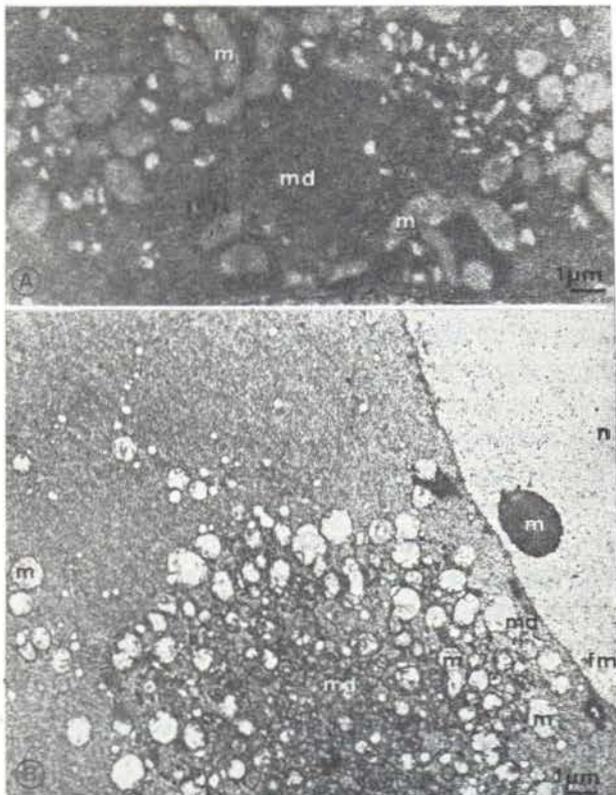


Fig. 4 — A) — Material denso (md) envolvido por mitocôndrios (m); B) — Dispersão do material denso ao se afastar do núcleo (n). fm=figuras mielínicas). (*Serrasalmus* sp)

4b e 5a e b). A dispersão vai se tornando cada vez maior, desfazendo-se o retículo (Fig. 5a), mas conservando-se o material denso, de provável origem nucleolar, associado aos mitocôndrios (Fig. 5b).

Em alguns ovócitos foram também observadas lamelas anuladas (Figs. 5b e c) associadas aos mitocôndrios e ao material eletrondenso. As lamelas anuladas têm estrutura semelhante à do envelope nuclear, apresentando poros. O aparecimento destas lamelas não foi muito freqüente nas espécies estudadas e a sua origem não pôde ser determinada. Em alguns pontos as lamelas anuladas apresentam dilatações nas extremidades (Fig. 5c) dando origem a membranas a que ficam aderidos ribossomos, originando assim, os poucos perfis de retículo endoplasmático granular presentes no ovócito. Como já foi dito, o citoplasma dos ovócitos nesta fase inicial do desenvolvimento, antes da deposição de vitelo

é muito basofílico e concordantemente muito rico em ribossomos. Cisternas de retículo endoplasmático são no entanto, muito raras e os ribossomos geralmente apresentam-se livres ou sob a forma de polissomos.

Em fase posterior, quando a deposição de vitelo já se acha em processamento ainda podem ser observadas as fitas de material denso granular, no citoplasma intersticial ao vitelo, sempre nas proximidades de mitocôndrios (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A formação de numerosos nucléolos durante a ovogênese é fato bem conhecido. Esses nucléolos aparecem durante a profase I da meiose, concomitantemente aos cromosso-

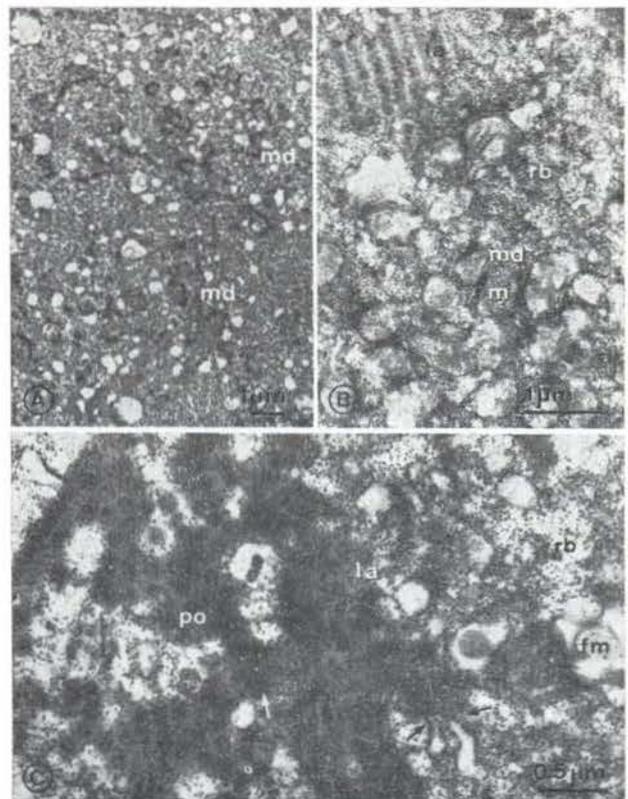


Fig. 5 — A) — Dispersão do material denso (md) com fragmentação do retículo inicial; B) — Associação de mitocôndrios (m) material denso (md) e lamelas anuladas (1a); C) — Lamelas anuladas (1a) em corte tangencial mostrando a ocorrência de poros (po) e alguns pontos que parecem dar origem a membranas do retículo. rb=ribossomos, fm=figuras mielínicas (*Serrasalmus* sp.)

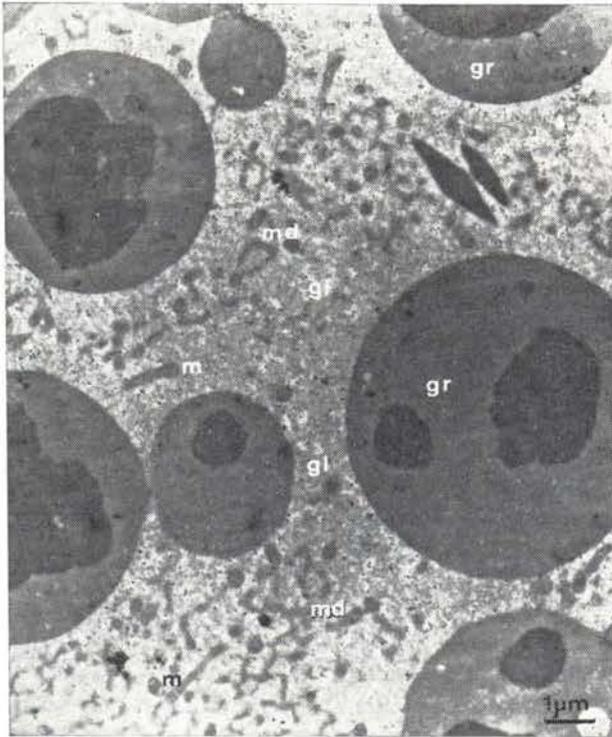


Fig. 6 — Citoplasma de ovócito mostrando já alguns grãos de vitelo (gr) e por entre estes o material denso (md) ainda associado a mitocôndrios (m). gl=glicogênio (*Crencichla johanna*)

mos plumulados e muito do seu material é originado nas alças destes cromossomos. Estes, são, portanto, nucléolos que provavelmente não contêm apenas material da região organizadora do nucléolo e que não se conservam ligados aos cromossomos de origem, sendo a sua localização na periferia do núcleo, também, bastante conhecida (Müller, 1966).

A passagem do material destes nucléolos para o citoplasma tem sido aventada por vários autores, bem como sua associação a mitocôndrios após atingir o citoplasma (Eddy, 1974; Clérot 1976). Esse fenômeno de transferência de material de origem nucleolar para o citoplasma é de ocorrência generalizada mas, raramente o fenômeno pode ser morfológicamente observado, como acontece no caso dos acúmulos de material eletrondenso perinucleares nos ovócitos, observados recentemente. Outras evidências da passagem do material nucleolar para o citoplasma são: a) a natureza morfológica semelhante dos nucléolos e das massas de material denso

citoplasmático; b) a comunicação entre os nucléolos em dissolução e os poros nucleares; c) a presença de estruturas membranosas intranucleares (Dallai, 1967; Hinsch, 1970). A ocorrência de material eletrondenso com origem e comportamento semelhante foi descrito por alguns autores, dos quais citamos Russel & Frank (1978) durante a espermatogênese. Eddy (1974) e estes últimos autores citados dão a este material a designação "nuage" justamente por em muitos casos ele se dispersar de forma irregular apresentando-se como manchas ou "nuvens" em certas regiões do citoplasma. O trabalho de Eddy consiste numa revisão sobre a relação do plasma germinativo com a origem da linhagem germinativa durante o desenvolvimento embrionário em vários animais. Nesta revisão é postulado que a "nuage", ou seja, o material eletrondenso de origem nuclear vai constituir na célula ovo o plasma germinativo o qual determina o destino de linhagem germinal dos blastômeros que o vierem a conter.

No presente caso existem evidências morfológicas da passagem de material do núcleo, mais claramente dos nucléolos para o citoplasma. Este material, provavelmente ribonucleoproteínas com função ribossômica, se associa a mitocôndrios e pôde ser seguido até depois da deposição de vitelo nos ovócitos. Este material apresenta-se morfológicamente e do ponto de vista da evolução na célula, muito semelhante àquele a quem Eddy atribue a função de plasma germinativo.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Drs. Heraldo Britski e Naércio Nascimento, do Museu de Zoologia da USP, pela identificação dos exemplares usados.

SUMMARY

The teleostean ovocytes in phase pre-vitelogenic show numerous nucleoli in the nucleus periphery. Morphological evidences indicate that the nucleolar material is transferred to the cytoplasm where it associate with mitochondria. Later this dense material of nucleolar origin disperse in the cytoplasm always associated to the mitochondria. This material can be detected even after the yolk deposition and may constitute the ovocyte germ plasm.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN, D.D. & LITINA, E.
1964 — Variations in the synthesis of stable RNA's during oogenesis and development of *Xenopus laevis*. **J. Mol. Biol.**, 8 : 688.
- CLÉROT, J.C.
1976 — Le agroupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens Cypinidés. I. Étude ultrastructurale. **J. Ultrastruct. Res.**, 54 : 461.
- DALLAI, R.
1967 — Intranuclear vesiculation in Collembola. **Monitore Zool. Ital.**, 1 : 101.
- DROLLER, M.J. & ROTH, T.F.
1966 — An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* Guppyi. **J. Cell. Biol.**, 28 : 209.
- EDDY, E.M.
1975 — Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. **Int. Rev. Cytol.**, 43 : 229.
- ESPER, H.
1965 — Studies of the nucleolar vacuole in the oogenesis of *Arbacia punctulata* Exp. **Cell Res.**, 38 : 85.
- GANSEN, P.V. & SCHRAM, A.
1968 — Ultrastructure et cytochimie ultrastructurale de la vésicule germinative et du cytoplasme périnucléaire de l'oocyte mûr de *Xenopus laevis*. **J. Embryol. exp. Morphol.**, 20 : 375.
- HINSCH, G.W.
1970 — Possible role of intranuclear membranes in nuclear-cytoplasmic exchanges in spider crab oocytes. **J. Cell Biol.**, 47 : 531.
- LEWIS, J.C. & McMILLAN, D.B.
1965 — The development of the ovary of the sea Lamprey (*Petromison marinus* L.). **J. Morphol.**, 117 : 425.
- MÜLLER, O.L.
1966 — Structure and composition of peripheral nucleoli of salamander oocytes. **Cancer Inst. Monogr.**, 23 : 53.
- PERRY, R.P.
1966 — On ribosome biogenesis. **Nat. Cancer Inst. Monogr.**, 23 : 527.
- RUSSEL, L. & FRANK, B.
1978 — Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes os the rat testis. **Anat. Rec.**, 190 : 79.

(Aceito para publicação em 06/01/79)