

DESINTEGRACION NEUROHORMONAL "IN VITRO" DE LA VESICULA GERMINAL DEL OOCITO DE VENUS ANTIQUA ANTIQUA (MOLLUSCA: PELECYPODA: VENERIDAE).

Miguel Padilla, M.Sc.*

ABSTRACT. The involvement of a neurohormone in the "in vitro" germinal vesicle breakdown of the oocyte of the clam *Venus antiqua antiqua*.

Meiotic maturation in oocytes of the clam *Venus antiqua antiqua* was found to be under hormonal control. Oocytes suspended in a homogenized extract of the nerve ganglia showed 91.3% germinal vesicle breakdown (GVBD). The use of 1-methyl-adenine and its mimetic Dithiothreitol were not effective on oocytes of this clam. Also oocytes stripped of their follicular and jelly coats by acid treatment showed high GVBD activity when exposed to the hormonal extract.

Intracellular mechanisms which cause GVBD are discussed.

Keywords: Germinal vesicle, meiotic maturation, neurosecretion, Aequorin, Obelin, cytosolic calcium.

INTRODUCCION

En el presente trabajo se ha convenido definir la madurez final del oocito como la consumación de la meiosis, al mismo tiempo, y considerando que la iniciación de este fenómeno tiene como requisito necesario la desintegración de la vesícula germinal, se puede concluir que la eliminación de esta

* Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso, Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile.

NOTA: La ejecución del presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Valparaíso al proyecto UV Nº 17/83.

membrana nuclear constituye el proceso visible que delata el inicio de la madurez meiótica (Fig. 2b).

Se debe también reconocer que entre las especies animales, el estado de madurez en que se produce la evacuación y la fertilización es variable y que esta última puede producirse antes, durante o después de la madurez meiótica del oocito. Esta variabilidad permitió a Rothschild (1956) clasificar a las especies animales en 4 grandes grupos:

1) Organismos donde los oocitos son evacuados antes del inicio de la madurez final. En este grupo la fecundación por el espermio sería el agente que produce la ruptura de la vesícula germinal, dando inicio a la madurez meiótica en el medio externo (Echiurida, Platyhelminthes y algunos Pelecypoda).

2) Organismos en los que la madurez del oocito progresa en la gónada hasta la profase de la primera división meiótica, estado en el que ésta se detiene y los oocitos son posteriormente reactivados, evacuados y fertilizados (insectos, ascidias y algunos moluscos bivalvos).

3) Organismos con una modalidad de reproducción similar a la anterior, donde la madurez del oocito obedece a un estímulo hormonal en el folículo, para luego ser fertilizado en la metafase de la segunda división meiótica (vertebrados).

4) Organismos cuyos oocitos concluyen su madurez meiótica dentro de la gónada antes de ser evacuados. En estos oocitos la fecundación por el espermio da inicio a la mitosis (Echinoidea).

Stevens (1970) demostró que algunos organismos marinos como los Asteroidea pueden ser fertilizados en cualquier estado de madurez meiótica después de la disolución de la vesícula germinal. Observaciones anteriores han permitido constatar que los oocitos de la almeja *Venus antiqua antiqua* se comportan de manera muy similar.

Estudios realizados por Chaet (1966) y por Kanatani & Shirai (1969), demostraron que existe una sustancia que puede ser extraída del nervio radial de las estrellas de mar, la cual induce al folículo a producir un factor que causa la iniciación de la madurez del oocito. Estos mismos autores comprueban que dicho factor no sólo elimina la vesícula germinal, sino que reduce la adhesividad interfolicular. Esta

substancia fue purificada y caracterizada por Kanatani et al. (1969) y resultó ser 1-metil-adenina (1-MA), hormona empleada extensamente en estudios sobre reproducción de equinodermos (Guerrier & Moreau 1980, Doree 1981).

Lo anterior constituye uno de los primeros indicios de que la madurez del oocito de algunos invertebrados marinos se encuentra bajo control hormonal.

Gracias a los estudios efectuados en Asteroidea, se sabe que la reiniciación de la madurez meiótica de este grupo depende de la intervención sucesiva de dos sustancias relacionadas a un mensajero secundario constituido por el calcio. En este caso, la hormona de origen neurosecretor GSS ("Gonad Stimulating Substance"), actúa sobre el folículo del oocito produciendo una segunda hormona MIS (Maturation Inducing Substance). Esta segunda hormona que no es otra que el 1-MA, constituye el factor activo que estimula los receptores ubicados en la membrana citoplasmática (Moreau & Guerrier 1980).

El presente trabajo tiene como objetivo principal comprobar la existencia de una substancia "hormonal" reguladora que también provoca la madurez del oocito de la almeja *Venus antiqua antiqua*.

MATERIALES Y METODOS

De la disección de 4 almejas (mínimo 1 hembra), se obtuvieron los dos ganglios cerebrales, el visceral y el pedal, los que pesaron aproximadamente 0.0257 gramos.

El tejido disectado fue colocado junto con 10 ml de agua de mar filtrada en un tubo "Potter Elvehjem" en el que se homogenizaron los ganglios hasta eliminar todo resto de tejido visible. El volumen del extracto resultante fue aumentado a 20 ml (1.29 mg/ml) y centrifugado durante 10 minutos a 3500 rpm (ϕ rotación 7 cm). Terminada la centrifugación se descartó el residuo sólido del fondo.

Oocitos de la misma especie fueron extirpados, lavados y suspendidos en este sobrenadante durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, el que resultó ser suficiente para producir la desintegración de la vesícula germinal (DVG), se obtuvo una

submuestra de 1 ml de estos oocitos, los que fueron calificados contándose aquellos que abarcaron el campo del microscopio.

El análisis cuantitativo efectuado consistió en calcular el porcentaje de oocitos que habían desintegrado su vesícula germinal como resultado de haber sido expuestos a la hormona (Tabla 2). Esta cifra fue comparada con un control de oocitos, los cuales no habían sido expuestos al extracto hormonal y los que se suponía deberían tener sus vesículas germinales intactas.

Método para comprobar que el extracto es el agente que activa el oocito:

Para establecer si la neurosecreción (GSS) induce un segundo factor hormonal en el folículo (MIS), se sometió una alícuota de oocitos de *Venus antiqua antiqua* a agua de mar pH 3.5 durante 5 minutos para enseguida resuspenderla en agua de mar pH 8.2.

El pH ácido tiene el efecto de disolver el envoltorio folicular y gelatinoso del oocito. En este experimento se procedió bajo la premisa de que al eliminar tanto la gelatina que recubre al oocito como el envoltorio folicular que recubre la gelatina, la neurosecreción no contaría con el sustrato adecuado (envoltorio folicular) sobre el cual inducir un segundo factor hormonal (MIS). Como ha sido comprobado en Asteroidea, la neurosecreción no activa la meiosis, o sea, no desintegra la vesícula germinal en oocitos sin su envoltorio folicular (Doree 1981).

Método de empleo del 1-MA y sus miméticos:

La hormona 1-MA y el agente reductor de enlaces bisulfuros "Dithiothreitol" (DTT) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. USA y empleados para la ver la reacción de los oocitos de *Venus antiqua antiqua*. También se emplearon concentraciones altas de calcio. La preparación de los agentes anteriores fue la que sigue: IMA = 1×10^{-5} M; DTT = 1×10^{-3} M; CaCl_2 = 5×10^{-2} M.

Método histológico:

El método histológico a que fueron sometidos los tejidos analizados en la Tabla 2 fue el siguiente:

El tejido fue fijado en fluido de Zenker donde permaneció un período de 24 horas. La deshidratación se llevó a efecto en una secuencia de alcohol etílico 50-70-95-100%. La inclusión se hizo en parafina líquida de punto de fusión de 562-58°C. Se procedió a seccionar el tejido incluido en un microtomo rotatorio del que se obtuvieron muestras de 7 μ m de espesor.

Algunos cortes fueron teñidos con hematoxilina de Harris y eosina alcohólica y otros con fucsina acuosa básica. Las preparaciones una vez terminadas fueron montadas en portaobjetos y selladas con bálsamo del Canadá. Las muestras de tejido fueron microfotografiadas con una cámara Leica en un microscopio convencional de luz Leitz Orthoplan (Figs. 3-8).

Método estadístico:

Para los efectos de determinar si la diferencia obtenida entre el % DVG de los oocitos expuestos a la neurohormona y el de los expuestos a agua de mar sin el extracto hormonal (control), era significativa, se hizo uso de la prueba estadística "t de Student".

Como se puede apreciar, la mayoría de los datos experimentales se encuentran referidos a porcentaje. Esto exige un examen detenido de manera de cumplir con una de las premisas básicas del análisis estadístico el que presupone que las distribuciones son normales.

Si el análisis de la Tabla 1 demostrara que los datos de % DVG caen en un rango entre 30% y 80% se podría asumir que la distribución es normal ya que la media vendría a caer alrededor del 50%. La realidad, sin embargo, demuestra que las medias son de 6.86% para el control y de 93.50% para el extracto hormonal, situación que, al estar expresada en porcentaje, hace que ambas distribuciones no sean normales sino estén severamente sesgadas. En estos casos el problema se soluciona efectuando una transformación en la que se hace uso de la tabla arco-seno donde se cambian los valores porcentuales a grados (Tabla 1).

Tabla 1

Réplica	EXTRACTO HORMONAL					CONTROL				
	n=si	n=no	Total	% DVG	Grados	n=si	n=no	Total	% DVG	Grados
1	19	2	21	90.5	62.05	1	21	22	4.5	12.25
2	17	1	18	94.4	76.31	1	17	18	5.5	13.56
3	24	2	26	92.3	73.89	2	19	21	9.5	17.95
4	21	1	22	95.4	77.61	2	22	24	8.3	16.74
5	22	1	23	95.6	77.89	2	18	20	10.0	18.44
6	20	1	21	95.2	77.34	1	20	21	4.8	12.66
7	22	1	23	95.6	77.89	1	19	20	5.0	12.92
8	22	1	23	95.6	77.89	2	23	25	8.0	16.43
9	25	2	27	92.6	74.21	2	24	26	7.7	16.11
10	22	3	25	88.0	69.73	1	17	18	5.5	13.56
	$\bar{X} = 93.50$					$\bar{X} = 6.86$				

Una vez efectuada la transformación de los datos se procede con el análisis estadístico correspondiente (Tabla 5).

RESULTADOS

Comprobación de la existencia de la hormona

Los oocitos además de ser sometidos a la acción del tejido ganglionar se sometieron a extractos de otros tejidos como el ventrículo, los sifones y las branquias. Esto se efectuó para comprobar que la acción hormonal se reducía a los ganglios y no se encontraba diseminada en otros tejidos de la almeja.

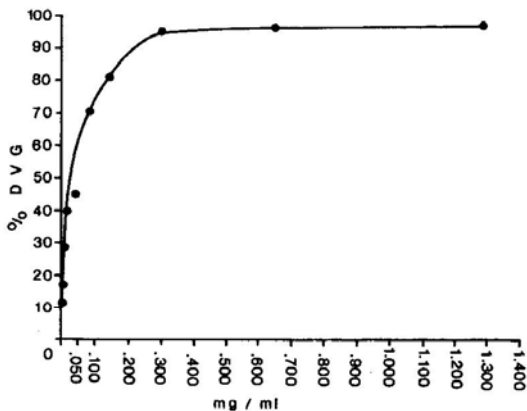
Las suspensiones de oocitos en el sobrenadante de extractos centrifugados de los diferentes tejidos dieron como resultado los porcentajes de DVG indicados en la Tabla 2.

Tabla 2

TEJIDO	% DVG	n
Ganglios nerviosos	91.3	23
Sifones	8.3	24
Ventrículo	4.5	22
Branquias	4.7	21
Control	4.0	25

Curva dosis respuesta

La respuesta expresada en % DVG para las concentraciones del extracto hormonal fueron las siguientes y se grafican en la Fig. 1.



Concentración del Extracto Hormonal	% D V G
1 1.285 mg / ml	95.8
2 .642 "	95.0
3 .321 "	95.0
4 .160 "	80.9
5 .080 "	70.5
6 .040 "	45.4
7 .020 "	40.0
8 .010 "	28.5
9 .005 "	17.6
10 .002 "	12.5

Fig. 1

Activación del oocito sin inducción de un segundo factor hormonal:

Para comprobar que el extracto de ganglios activa el oocito sin inducir un segundo factor hormonal se comparó el % DVG para:

- Oocitos no sometidos a tratamiento con ácido y expuestos a la hormona (1)
- Oocitos no sometidos a tratamiento con ácido, no expuestos a la hormona (2)
- Oocitos sometidos a tratamiento con ácido y expuestos a la hormona (3) (Tabla 3).

Tabla 3

(1) % DVG	(2) % DVG	(3) % DVG
95.4	9.5	95.6
n = 22	21	23
pH = 7.8	8.1	7.2

Resultado del empleo del 1-MA y sus miméticos:

El resultado del empleo de la hormona de los asteroideos (1-MA) con los oocitos de la almeja, como el de sus miméticos, el DTT y la alta concentración de calcio externo, se incluye en la Tabla 4.

Tabla 4

AGENTE	CONCENTRACION	% DVG	n
Hormona	1.28 mg/ml	90.9	22
IMA	1×10^{-5} M	9.5	21
DTT	1×10^{-3} M	10.0	20
CaCl ₂	5×10^{-2} M	57.9	19
Control	-	9.1	22

Resultados estadísticos:

Las réplicas del % DVG del extracto hormonal y las del % DVG del control, fueron transformadas a grados y sometidas al análisis estadístico "t" (Tabla 5).

Tabla 5

OOCITOS SOMETIDOS AL EXTRACTO HORMONAL			CONTROL		
Grados			Grados		
x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²	x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
72.05	- 3.431	11.771761	12.15	- 2.812	7.907344
76.31	0.829	0.687241	13.56	- 1.502	2.256004
73.89	- 1.591	2.531281	17.95	2.888	8.340544
77.61	2.129	4.532641	16.74	1.678	2.815684
77.89	2.409	5.803281	18.44	3.378	11.410884
77.34	1.859	3.455881	12.66	- 2.402	5.769604
77.89	2.409	5.803281	12.92	- 2.142	4.588164
77.89	2.409	5.803281	16.43	1.368	1.871424
74.21	- 1.271	1.615441	16.11	1.048	1.098304
69.73	- 5.751	33.074001	13.56	- 1.502	22.256004
$\bar{x} = 75.481$			$\bar{x} = 15.062$		
N = 10			N = 10		
$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 75.07809$			$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 48.31396$		
Desv Std = 2.888253798			Desv Std = 2.31694147		
Error Std = 0.913346046			Error Std = 0.732681225		
Error Std de la Dif. = 1.170906818					
"t" de Student = 51.6001778					
Grados de libertad = 18					

Nota: Ver conclusiones finales

Fotomicrografías de las células neurosecretoras:

Los tejidos de los ganglios cerebrales, viscerales y pedales seccionados y teñidos con fucsina acuosa básica demostraron poseer una reacción positiva a la fucsina. Esto indica la alta probabilidad de que el material con coloración intensa que se observa en la periferia de los cortes de ganglios sean células neurosecretoras (Figs. 3-8). La forma y dimensión de estas células (20 μ m) guarda relación con lo descrito por Tombes (1970) para células neurosecretoras de bivalvos conocidos.

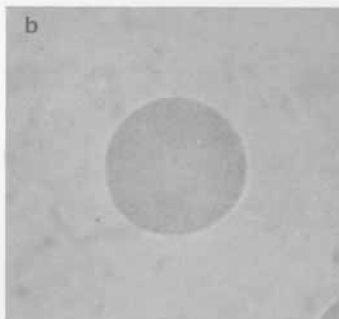
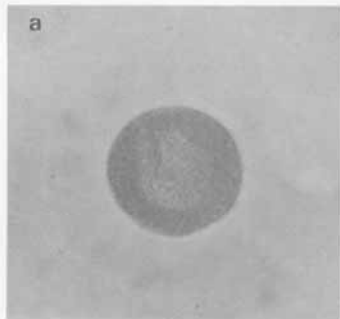


Fig. 2

- a. Vesícula germinal intacta
- b. Vesícula germinal desintegrada

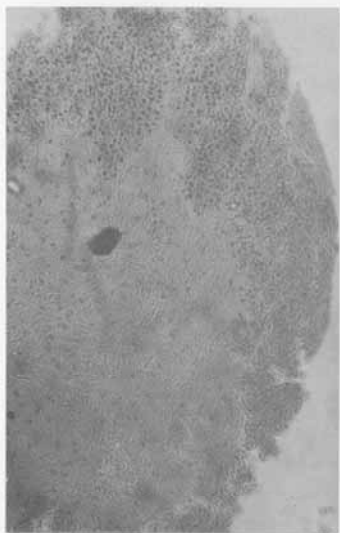


Fig. 3. Ganglio visceral 100 X

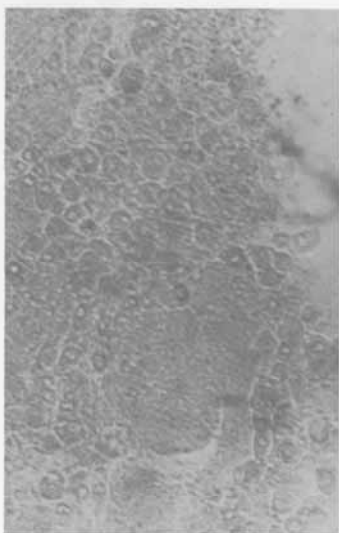


Fig. 4. Ganglio visceral 250 X

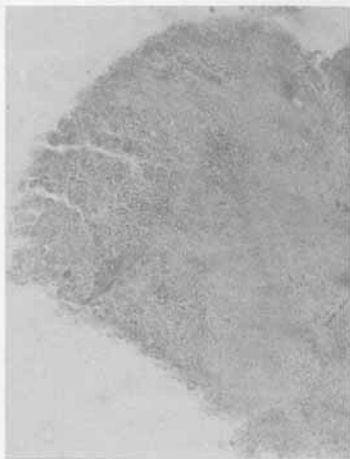


Fig. 5. Ganglio cerebral 100 X

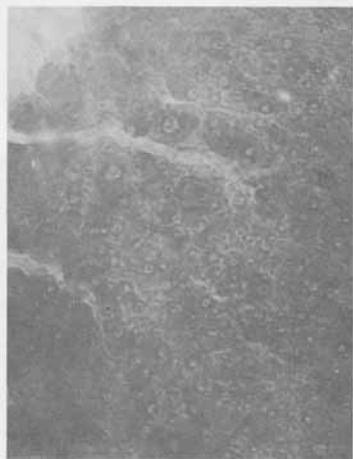


Fig. 6. Ganglio cerebral 250 X

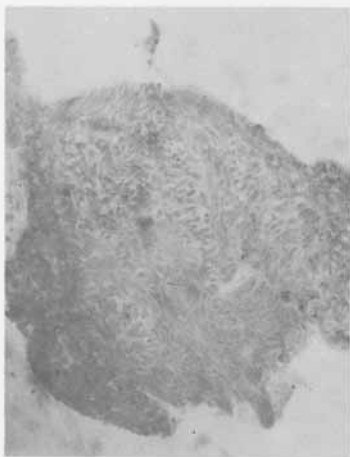


Fig. 7. Ganglio pedal 100 X

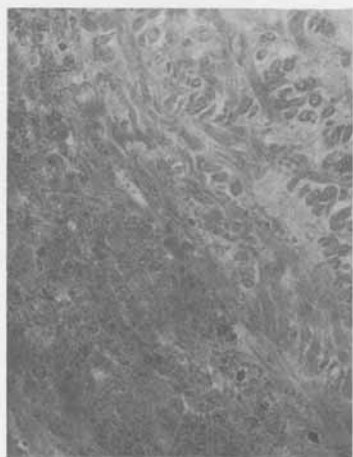


Fig. 8. Ganglio pedal 250 X

DISCUSION

A excepción de aquellos organismos que concuerdan con lo descrito para el primer grupo de la clasificación de Rothschild (1956), el resto de las especies animales desovan gametos cuya madurez se encuentra parcial o totalmente relacionada a los procesos internos de la gónada. Estos procesos implican la transformación de oogonios en oocitos a los que en algunas instancias, solamente les faltaría concluir su fase de madurez meiótica. En el caso de *Venus antiqua antiqua* se ha podido comprobar que la madurez final de esta especie se encuentra regulada por un agente hormonal que produce la ruptura de la vesícula germinal. Los oocitos extirpados antes de que la hormona haya producido su efecto de reactivación permanecen con su vesícula germinal intacta (Fig. 2a) y las fertilizaciones realizadas con estos gametos han demostrado que esta vesícula no se desintegra ante el solo estímulo de la fecundación. Lo anterior implica que la única forma de fertilizar oocitos de *Venus antiqua antiqua*, extirpados en forma previa a la acción hormonal, es el empleo de procedimientos partenogenéticos entre los cuales se pueden señalar el ácido butírico y la solución hipertónica de NaCl (Loeb 1913) y las bases débiles como el NH_4OH y el NH_4Cl (Mazia 1974).

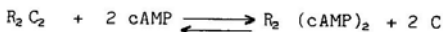
El conocimiento actual permite establecer que en Asteroidea, la hormona GSS de origen neurosecretor induce al folículo del oocito a producir una segunda hormona MIS que actúa sobre los receptores de la membrana. Esta segunda hormona descrita por Kanatani et al. (1969) como 1-MA es la que se presume induce la producción de un factor citoplasmático MPF (Maturation Promoting Factor), responsable en última instancia de la madurez meiótica del oocito.

Como se ha podido deducir de los experimentos con los oocitos de *Venus antiqua antiqua* ni el 1-MA ni su mimético el DTT producen la ruptura de la vesícula germinal de la almeja (Tabla 4). También se ha podido comprobar que al eliminar el envoltorio folicular y al disolver la gelatina del oocito con ácido (pH 3.5), la hormona (GSS) puede actuar sobre el oocito por sí sola induciendo la iniciación de la meiosis (Tabla 3).

La modalidad específica de la transformación del mensaje hormonal en mecanismos intracelulares que conducen a la activación del oocito, ha podido ser parcialmente deducida debido al aumento de calcio interno detectado por la inyección de

las fotoproteínas Aequorin u Obelin (Moreau & Guerrier 1980). El hecho es que resulta comprometedor el que los destellos de calcio que registra el fotomultiplicador prosigan siempre a la aplicación de la hormona. Gracias a estas fotoproteínas se ha podido establecer que uno de los primeros efectos de la acción hormonal sobre la superficie del oocito es la liberación del calcio secuestrado por el borde interno de la membrana citoplasmática. El calcio citosólico liberado (Ca^{2+}) constituye la llave maestra de la cual parecen depender: la depolarización de la membrana (Miyazaki et al. 1975), el aumento de la permeabilidad de Na^+ (Doree 1981), el aumento intracelular de pH (Nishioka 1980), el incremento de K^+ (Shen & Steinhardt 1980) y la baja de 3'5' adenosina monofosfato cíclico (cAMP) que actúa sobre las quinasas responsables de la fosforilización proteica. El calcio, por lo tanto, se ha constituido en el segundo mensajero de la hormona y conforma o permite conformar el tercer mecanismo involucrado, el cual a pesar de contar con sigla propia MPF, resulta ser en la actualidad el más desconocido de todos. Lo que actualmente se sabe sobre el MPF es que se trata de un factor de madurez citoplasmático, no específico, el que puede ser amplificado y el que induce una madurez meiótica al ser inyectado en oocitos no estimulados por la hormona (Masui & Market 1971). El MPF además de producir la ruptura de la vesícula germinal también activa las proteínas quinasas especialmente aquellas que fosforilan las histonas (Gurley et al. 1975).

Cabe hacer notar que la detención en profase de los oocitos de *Venus antiqua antiqua* depende del nivel intracelular de cAMP que éstos posean. Antes de la liberación de calcio, este nucleótido es bastante abundante, pero decae bruscamente al producirse la onda liberadora del catión bivalente. Concentraciones elevadas de cAMP han demostrado casi siempre una correlación inversa con la actividad mitótica (Bustos & Thumann 1979), lo mismo al parecer ocurre con la actividad meiótica ya que ésta como se ha dicho, se encuentra detenida en la profase de la primera división meiótica. Lo interesante es que este bloqueo temporal es mantenido por la actividad de una quinasa que cataliza el factor que impide la reiniciación de la meiosis. Debe tenerse presente, sin embargo, que las proteínas quinasas se encuentran estructuradas por subunidades que son o reguladoras (R) o catalíticas (C) y que la asociación del cAMP a la unidad reguladora produce la disociación de la holoenzima en una reacción que, Maller & Krebs (1977), describen a través de la siguiente ecuación:



Los estudios efectuados por estos mismos autores demuestran que la madurez meiótica requiere de una disminución del nivel de cAMP intracelular, esto debido a que esta baja promueve la recombinación de las subunidades R y C de la holoenzima, volviéndola inactiva (Allende 1972). Esta inactividad se debe fundamentalmente a que la reunión de las dos subunidades holoenzimáticas cubren la zona activa de la subunidad catalítica, lo que elimina la "fuente" de donde proviene el factor que mantiene al oocito bloqueado. La baja del cAMP, por lo tanto, suspende el bloqueo en profase del oocito (Fig. 9).

NIVEL	c AMP	HOLOENZIMA		MADUREZ
		Sub.U. Reg.	Sub.U. Cat.	
+	▶	▶	◻	ARRESTO → EN PROFASE
-		◻	▶	MADUREZ MEIOTICA

Fig. 9

Si bien es cierto que la activación de las proteínas quinasas regulan la actividad celular en general, esta regulación como se ha podido apreciar puede manifestarse tanto inhibiendo como estimulando reacciones. Se debe considerar además que la liberación de Ca^{2+} responsable de la disminución del cAMP dura muy corto tiempo, por lo que es posible suponer que los niveles de este nucleótido son restablecidos en cuanto los cambios transformativos de la adenil ciclasa lo permitan. Es probable como lo expresan Rasmussen & Goodman (1977), que se trate de un ciclo en el que la acción del calcio se hace sentir en diferentes áreas del oocito a diferentes tiempos.

El efecto hormonal detectado sobre las suspensiones de oocitos a través de la desintegración de la vesícula germinal puede también ser explicado como una liberación de calcio interno, que activa la fosfodiesterasa, enzima que degrada y, por lo tanto, disminuye la concentración de cAMP. Lo anterior está de acuerdo con lo expresado por Epel (1978) quien en su diagrama (Fig. 10), reconoce al calcio como uno de los efectores primarios de la activación del oocito del erizo *Strongilocentrotus purpuratus*.

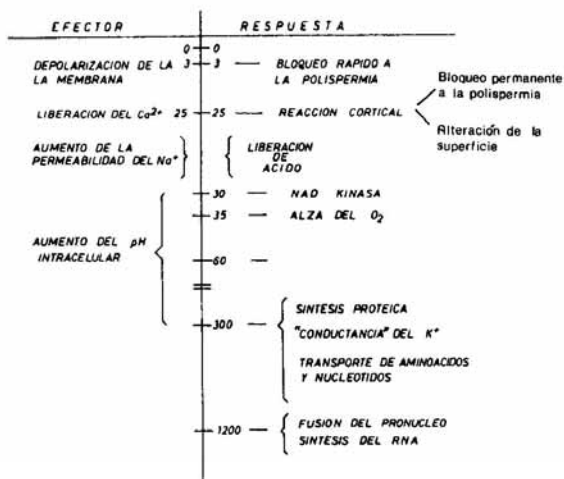


Fig. 10

No puede dejar de mencionarse que factores mitóticos recientemente descubiertos han demostrado la capacidad tanto de disolver la vesícula germinal como de producir la condensación cromosómica del oocito. Los experimentos de Sunkara *et al.* (1979) demuestran que extractos citoplasmáticos de cultivos "in vitro" de células somáticas He La, que se encuentran en la fase G2 de su ciclo de transición celular, inducen, al ser inyectados, madurez meiótica en oocitos de una variedad bastante amplia de especies animales. Lo mismo ha sido observado con los factores mitóticos de las células CHO (Nelkin *et al.* 1980). Esto permite apreciar que los factores asociados a la mitosis y a la meiosis son similares.

El carácter no específico que demuestra el MPF, el que al ser inyectado también induce la meiosis en organismos disímiles (el MPF de anfibios produce la madurez meiótica en la estrella de mar, Guerrier & Moreau 1980), permite pensar en la posibilidad de que el MPF y los factores mitóticos descritos constituyan mecanismos similares de amplia difusión en el reino animal.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha logrado demostrar la existencia de una sustancia hormonal capaz de producir la ruptura de la vesícula germinal de *Venus antiqua antiqua*.

Se ha concluido que el sobrenadante del homogenizado obtenido constituye una hormona, por haber demostrado ser un mensajero químico que actúa a nivel de la membrana y que da inicio a la madurez meiótica del oocito.

Refuerza la anterior denominación el que Maddrell & Nordmann (1979) se refieran a las neurosecreciones como a neurohormonas y el que Guerrier & Moreau (1980) y también Doree (1981) reconozcan a estas neurohormonas como hormonas que regulan la madurez meiótica en equinodermos.

Lubet (1981) se refiere a las neurohormonas como factores neuroendocrinos, factores neurohormonales o acción hormonal que regula la madurez del oocito de *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas*.

Las experiencias efectuadas con el sobrenadante del homogenizado también señalaron que este extracto activa la madurez meiótica del oocito sin inducir una segunda hormona en el envoltorio folicular.

Las células periféricas de los cortes de ganglios (Figs. 3-8) fueron identificadas como neurosecretoras tanto por demostrar una reacción positiva a la fucsina como por poseer la forma y dimensión (20 μm), que Tombes (1970) le atribuye a células neurosecretoras de bivalvos comunes.

Aunque no se conoce la forma cómo la neurohormona llega a los alvéolos de la gónada, no se descarta la posibilidad de la existencia de un área neurohemal como la observada por Umiji (1969) en *Mytilus perna*. Sin embargo, si esta área no existiera bastaría que los terminales de los axones que portan los gránulos neurosecretores estuvieran cerca de algún seno o vaso hemolinfático para que la exocitosis del contenido de estos gránulos pudiera difundirse a los alvéolos de la gónada y ejercer su acción sobre la vesícula germinal.

La liberación de oocitos al ser suspendido un trozo de gónada de *Venus antiqua antiqua* en el extracto hormonal (GSS), hace presumir que la acción de la hormona no sólo se

limita a la disolución de la vesícula germinal sino que también disuelve el retículo folicular que mantiene a los oocitos atrapados en el lumen del alvéolo.

La eliminación del envoltorio folicular o capa que encierra la gelatina del oocito, deja a esta última en contacto directo con el agua de mar, lo que explica el que algunas veces haya una cantidad apreciable de oocitos que han perdido gran parte de su cobertura gelatinosa. Esto generalmente ocurre después de que los oocitos han sido sometidos a un proceso de lavado con la centrífuga manual.

La conclusión del análisis estadístico destinado a comprobar si las diferencias entre hormona y control eran significativas, demostró que si entramos a la tabla "t" con 18 grados de libertad, nuestro valor "t" de 51.60 no es igual y además excede los valores críticos para niveles de confianza de 1% y 5%. Esto rechaza la hipótesis de nulidad y permite concluir que la diferencia obtenida es significativa.

AGRADECIMIENTOS. Deseo agradecer a la Srta. María Eugenia Raurich por la asistencia técnica prestada.

LITERATURA CITADA

- Allende, J.E. 1972. Biosíntesis de proteínas y el código genético. Serie Biología Monografía Nº 10. OEA Ed.
- Bustos-Obregon, E. & A. Thumann. 1979. (halona espermatogonial. Revisión crítica de la proliferación espermatogonial en la rata. Revista de Microscopía Electrónica y Biología Celular, 6 (2): 303-309.
- Chaet, A.B. 1966. Chemical control of gamete release in starfish. Biological Bulletin, 130: 43-55.
- Doree, M. 1981. Hormonal control of meiosis in starfish oocytes. Experimental Cell Research, 131: 115-120.
- Epel, D. 1978. Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Current topics Revue in Biology, 12: 115-242.
- Guerrier, P. & M. Moreau. 1980. Controle hormonal de la maturation chez les echinodermes. Bulletin de la Societé Zoologique de France. Tome 105, Nº 1, p. 163.

- Gurley, L.R.; Walters, R.A. & R.A. Tobey. 1975. Sequential phosphorylation of histone sub fractions in the Chinese Hamster Cell Cycles. *Journal of Biological Chemistry*, **250**: 3936-3944.
- Kanatani, H. & H. Shirai. 1969. Mechanisms of starfish spawning II. Some aspects of action of a neural substance obtained from radial nerve. *Biological Bulletin*, **137**: 297-341.
- Kanatani, H.; Shirai, H.; Nakanishi, K. & T. Kurokawa. 1969. Isolation of meiosis inducing substance in starfish *Asterias Amurensis*. *Nature*, **221**: 273-274.
- Loeb, J. 1913. Artificial parthenogenesis and fertilization. University Chicago Press. Ed.
- Lubet, P.E. 1981. Actions des facteurs internes sur la reproduction des mollusques lamellibranches. *Oceanis* 6 (fasc. 5): 491-510.
- Maddrell, S.H.D. & J.J. Nordmann. 1979. Neurosecretion. Ed. John Wiley & Sons, New York.
- Maller, J.L. & E.G. Krebs. 1977. Progesterone stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **252**: 1712-1718.
- Masui, Y. & C.L. Market. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, **68**: 75-80.
- Mazia, D. 1974. Chromosome cycles turned on in fertilized sea urchin eggs by treatment with NH_4OH . *Proceedings of the National Academy of Science USA*, No 71: 690-693.
- Miyazaki, S.; Ohmori, H. & S. Sasaki. 1975. Potassium rectification of the starfish oocyte membrane and their changes during oocyte maturation. *Journal of Physiology*, **246**: 55-98.
- Moreau, M. & P. Guerrier. 1980. In vitro interaction between membrane hormone and cyclic nucleotides as revealed with Aequorin. *Developmental Biology* **79**: 488-492.
- Nishioka, D. 1980. Relationship between release of acid. The cortical reaction and the increase of protein synthesis in sea urchin eggs. *Journal of Experimental Zoology*, **212**: 215-223.
- Nelkin, B.; Nichols, & B. Vogelstein. 1980. Protein factor (s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *Federation of European Biochemical Societies*, **109**: 233-238.
- Rasmussen, H. & D.B.P. Goodman. 1977. Relationships between Calcium and Cyclic nucleotides in cell activation. *Physiological Reviews*, **57** (3): 421-509.

- Rothschild, L. 1956. Fertilization. Malthuen London Ed.
- Shen, S. & R.A. Steinhardt. 1980. Intracellular pH controls the development of new K^+ conductance after fertilization of the sea urchin egg. *Experimental Cell Research*, **125**: 55-61.
- Stevens, M. 1980. Procedures for induction of spawning and meiotic maturation of starfish oocytes by treatment of methyl adenine. *Experimental Cell Research*, **59**: 482-484.
- Sunkara, P.S.; Wright, D.A. & P.N. Rao. 1979. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in Amphibian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Nº 76: 2799-2802.
- Tombes, A.S. 1970. An introduction to invertebrate endocrinology. Ed. Academic Press, London.
- Umiji, S. 1969. Neurosecrecao em *Mytilus perna*. *Boletín de Zoología y Biología Marina*. Sao Paulo. Nova Serie 26: 181-254.