

EVALUACION DE LA MADUREZ VITELOGENICA EN OOCITOS EXTIRPADOS DE LA ALMEJA *VENUS ANTIQUA ANTIQUA*.

Miguel Padilla* y Guillermo Olivares**

ABSTRACT. Vitelogenic evaluation of stripped oocytes of the clam *Venus antiqua antiqua*.

The present paper distinguishes between 3 types of maturity: meiotic maturation or conclusion of profase arrest, gametogenic maturation or morphologic differentiation between oogonia and oocytes and vitelogenic maturation considered to be the incorporation of lipid into the oocytes by pinocytosis. An evaluation of vitelogenic maturation is accomplished by measuring the % transmission of the supernatant of a centrifuged oocytes suspension stripped from the clam *Venus antiqua antiqua*.

The reasoning behind this test is that post vitelogenic oocyte have incorporated the surrounding lipid and therefore interfollicular fluid should have a different optical density.

Key words: Vitelogenesis, meiotic maturation, pinocytosis, interfollicular fluid.

INTRODUCCION

La búsqueda de algunas de las causas significativas que influyen en el éxito del cultivo "in vitro" de larvas de bivalvos ha constituido el objetivo de muchas de las investigaciones llevadas a cabo en la última década. Varias de estas causas han sido señaladas pero otras han permanecido dentro de los secretos que nos guardan las especies.

El presente trabajo evalúa el estado de la vitelogénesis

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

** Instituto Profesional de Osorno, Casilla 933, Osorno, Chile.

mediante el % de transmisión del sobrenadante de oocitos centrifugados de *Venus antiqua antiqua*. El razonamiento de este análisis se basa en la premisa de que los oocitos post vitelogénicos han incorporado el lípido interfolicular y que, por lo tanto, su sobrenadante debe tener una densidad óptica diferente a la de aquellos que no lo han hecho.

Si bien es cierto que la movilidad de las suspensiones de espermios constituye un excelente indicador de su viabilidad no ocurre lo mismo con las suspensiones de oocitos, las que son inmóviles y poseen un estado de desarrollo mucho más difícil de evaluar.

La gran diferencia entre el espermio y el oocito radica en que el primero contribuye con muy poco citoplasma, aportando sólo su complemento hereditario, mientras que el oocito además del complemento hereditario contribuye también con el citoplasma necesario para mantener la síntesis proteica. El hecho que el espermio sea prácticamente un núcleo propulsado señala al citoplasma del oocito como la fuente principal de energía para un desarrollo larval adecuado.

Hay que considerar que el citoplasma del oocito sufre un proceso denominado vitelogénesis y que según el estado de avance de ésta, podremos encontrar distintos estados vitelogénicos. Por lo tanto, nos parece importante hacer una diferencia en el concepto tradicional de madurez y referirnos a una madurez gametogénica, una madurez meiótica y una madurez vitelógena, condiciones relacionadas pero distintas y a la vez indispensables si se pretende primero fertilizar oocitos bien conformados, segundo que se lleve a efecto la fertilización y tercero que se obtenga un porcentaje de sobrevivencia larval adecuado. Recordemos que la madurez meiótica se reanuda al producirse la activación del oocito, siendo la desintegración de la vesícula germinal, el evento microscópico que atestigua su reinicio. El término de la madurez meiótica lo señala la expulsión del segundo cuerpo polar cuando el oocito ha alcanzado el estado de huevo. También se ha podido apreciar que la activación en algunas especies es efectuada por el espermio, mientras que en otras ésta se encuentra bajo control hormonal (Lubet 1982, Padilla 1984 y Muruyama 1985).

La madurez gametogénica es más bien morfológica y en *Venus antiqua antiqua* tiene que ver con la transformación de oogonios de $\pm 30 \mu\text{m}$ en oocitos de $\pm 70 \mu\text{m}$ los que como culminación de su desarrollo invaden el lumen del alvéolo.

La madurez vitelogenética tiene muy poco que ver con los procesos gametogénicos y meióticos y se relaciona más bien con la cantidad de vitelo que ha sido incorporado al oocito.

Según Crisp (1975) la estrategia larval planctotrófica de los moluscos bivalvos consiste en la producción de un máximo número de huevos, cada uno con la menor reserva de energía posible, pero compatible con un desarrollo exitoso. Este mismo autor nos hace ver que los lípidos pueden almacenar una mayor cantidad de energía que los carbohidratos o las proteínas y que al ser más boyantes constituyen el elemento energético ideal para los oocitos.

Tan parca asignación de energía hace, sin embargo, que en la práctica cualquier demanda imprevista produzca un déficit que redunde en oocitos incapaces de poder sobrepasar su propio desarrollo embrionario. Esto es precisamente lo que puede ocurrir al sacar los bivalvos marinos de su medio ambiente natural e introducirlos a las condiciones artificiales del laboratorio (Bayne et al. 1975).

Las especies en sus hábitats naturales se encuentran según Bayne et al. (1978) en un estado fisiológico estable y cualquier alteración de este estado va a significar un cambio en ciertas tasas internas, que causan un "stress" o tensión fisiológica. Bayne (1980) define al "stress" como una alteración de un estado fisiológico estable inducido por un cambio del medio y establece que puede ser medido por medio de la fórmula A-R, que es la diferencia entre la ración asimilada A y la energía perdida por la respiración R.

Investigaciones efectuadas por Helm, Holland & Stephenson (1973) y por Bayne et al. (1978) han logrado además establecer que existe una relación muy clara entre la condición del adulto reproductor y la sobrevivencia de la larva. Estos mismos autores han podido comprobar que los reproductores que deben soportar las bajas raciones y altas temperaturas que caracterizan las condiciones de laboratorio, producen oocitos con una notoria reducción en su contenido de lípidos. Esto es explicable si se considera que bajo condiciones de "stress" la energía procedente del glicógeno acumulado no se moviliza en dirección a los lípidos requeridos por la vitelogénesis, sino hacia la energía necesaria para los procesos vitales y aquella indispensable para contrarrestar las condiciones artificiales (Holland 1978).

Todo lo anterior nos está indicando que el éxito del culti-

vo "in vitro" de los moluscos bivalvos está íntimamente relacionado a que se lleve a efecto la madurez vitelogénica del oocito, por lo que nos pareció necesario desarrollar algún método que nos permitiera evaluar la vitelogénesis en los oocitos que se pretenden cultivar.

Habiendo observado que el sobrenadante de las suspensiones de oocitos centrifugados varía de un espécimen a otro en cuanto a su transparencia, se nos ocurrió que esta variación podría estar relacionada en alguna forma con la vitelogénesis. Consideramos también que si esta suposición podía ser comprobada experimentalmente, estaríamos ante un método rápido y práctico que nos permitiría discriminar entre oocitos pre y post vitelogénicos.

El aumento de tamaño, si bien es cierto, constituye un criterio útil para oocitos telolecíticos de peces de tamaños mayores a los 600 μm , no resulta práctico en oocitos isolecíticos de bivalvos cuyos diámetros oscilan entre los 60 μm y 70 μm .

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la madurez vitelogénica por medio de una relación entre el porcentaje de transmisión del sobrenadante de una suspensión de oocitos centrifugados y el porcentaje de sobrevivencia que demuestran los oocitos de ese mismo sobrenadante. Mediante esta relación se pretende también determinar el valor de transmisión que corresponda a una sobrevivencia aceptable para las larvas de la almeja *Venus antiqua antiqua*.

MATERIALES Y METODOS

Para obtener las suspensiones de oocitos se eligieron almejas de dimensiones semejantes (± 80 mm) con las que se procedió a separar las valvas y a guardar las vísceras eliminando sólo el manto, las branquias y el pericardio. La extracción de los oocitos de la gónada se realizó haciendo dos incisiones paralelas a los gonoductos terminales y separando la pared gonadal. Los oocitos fueron desalojados con una botella para lavado con agua de mar filtrada y la suspensión recogida en un vaso de precipitado de 250 ml. Debe tenerse cuidado de que la suspensión de oocitos alcance pero no sobrepase los 100 ml de manera que los sobrenadantes comparados tengan igual dilución.

Se eligieron 5, de más de 50 suspensiones medidas, cuyos rangos de transparencia se distribuyeron en una gama de porcentajes arbitrarios establecidos (Tabla 1). Los sobrenadantes de estas 5 suspensiones de oocitos, correspondientes a diferentes hembras de la especie *Venus antiqua antiqua*, fueron separados con una centrífuga manual y medidos con un fotómetro portátil Delta-50 a 515 nm.

TABLA 1. Análisis fotométrico de los sobrenadantes de suspensiones de oocitos, de 5 hembras de *V. antiqua*, seleccionados para cultivo.

MUESTRA DEL SOBRENADANTE	% TRANSMISION
Oocitos muestra hembra Nº 1	66%
" " " Nº 2	34%
" " " Nº 3	30%
" " " Nº 4	22%
" " " Nº 5	15%

Aproximadamente 300.000 oocitos procedentes de cada una de las 5 hembras seleccionadas fueron cultivados separadamente bajo idénticas condiciones, obteniéndose para cada cultivo un porcentaje de sobrevivencia en un máximo de 22 días de cultivo.

La cantidad de oocitos se estimó en base a su volumen compacto (Tabla 2).

TABLA 2. Tabla relación volumen compacto, número de oocitos de *V. antiqua*.

Volumen compacto	Número de oocitos
4.0 ml	2.600.000
3.5 ml	2.300.000
3.0 ml	2.000.000
2.5 ml	1.600.000
2.0 ml	1.300.000
1.5 ml	1.000.000
1.0 ml	600.000
.5 ml	300.000

Los oocitos fueron activados con NH_4OH 0.1N y fertilizados con espermios móviles. El cultivo de larvas se efectuó en baldes de 10 l con aireación moderada y bajo luz tenue (Loosanoff & Davies 1983). El agua de mar se irradió con luz ultravioleta (1 hora), se filtró y se cambió cada dos días. Debe tenerse el cuidado de no irradiar el cultivo especialmente durante la segmentación del oocito.

La alimentación de las larvas estuvo constituida por 50 ml de *Tetraselmis suecica* sometida a antibióticos 4 horas antes de ser incorporada al cultivo (Cloromicetina 4 mg/l). El alga se centrifugó a 3500 rpm, se reconstituyó en agua de mar filtrada, la que se volvió a filtrar en una red de 45 μm momentos antes de ser ofrecida a las larvas (Walne 1956).

El número de larvas vivas de los cultivos comparados, fue estimado cada dos días para lo cual se extrajo 1 ml de cultivo en agitación, el que se fijó y se contó en una celda cuadrículada del mismo volumen.

Los valores de sobrevivencia larval de los oocitos cultivados fueron comparados con los porcentajes de transmisión de los sobrenadantes correspondientes.

Los sobrenadantes de otras 5 hembras con diferentes porcentajes de transmisión fueron separados para los efectos de analizar su contenido de lípidos de acuerdo al método de Bligh & Dyer (1959). Para la ejecución de este método se mezclaron 20 ml de sobrenadante con 50 ml de alcohol metílico y 50 ml de cloroformo, lo que se agitó durante 30 minutos. A continuación se agregaron 40 ml de agua destilada y se procedió a agitar en un embudo de decantación durante 30 segundos. Después de 5 minutos se separó la capa clorofórmica la que se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se pipetearon 20 ml de sobrenadante a un vaso previamente tarado, del que se evaporó el contenido líquido, calculándose el peso de los lípidos totales en mg/20 ml.

RESULTADOS

En la Fig. 1, se indica la curva de sobrevivencia durante 22 días, de los oocitos de los 5 cultivos, provenientes de cada una de las 5 hembras seleccionadas.

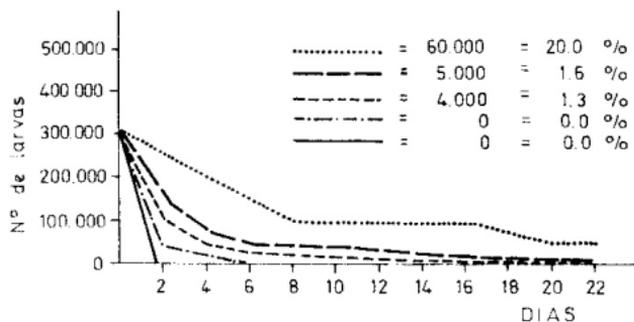


Fig. 1. Curvas de sobrevivencia para los oocitos cultivados, provenientes de 5 hembras de *V. antiqua*. Se indica el total de larvas y el porcentaje de ellas que alcanzaron los 22 días, en los 5 cultivos.

La comparación efectuada entre los porcentajes de transmisión de los sobrenadantes y los porcentajes de sobrevivencia correspondientes de los oocitos cultivados, demostró que las sobrevivencias mayores pertenecían a los valores más altos de los porcentajes de transmisión (Tabla 3). Al mismo tiempo, la comparación efectuada entre los porcentajes de transmisión y el contenido total de lípidos de sobrenadantes, demostró que los valores de transmisión más altos tenían una menor cantidad de lípidos totales (Fig. 2). Esto fue interpretado como que aquellos sobrenadantes de mayor transparencia, o sea, menos "lechosos" que han incorporado todo el vitelo suspendido al oocito, corresponden a gametos de una madurez vitelogénica mucho más avanzada.

El "test" que presupone el presente trabajo, se reduce a establecer una escala de transparencia del sobrenadante que refleje el estado de madurez de los oocitos que contiene. Esta escala nos permite fijar un límite bajo el cual no vale la pena iniciar un cultivo, lo anterior debido a que las mediciones efectuadas bajo el límite establecido (Tabla 3), pronostican una sobrevivencia larval demasiado baja. El poder evaluar cuantitativamente la madurez de los gametos que van a ser fertilizados constituye una ventaja ya que permite rechazar aquellos gametos inmaduros antes de vernos involucrados en los complejos preparativos que requiere el cultivo.

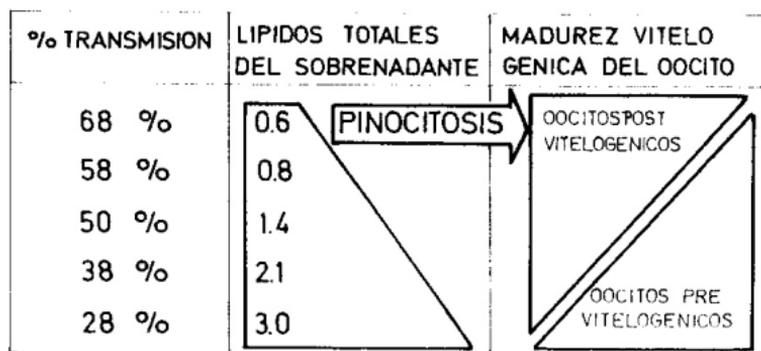


Fig. 2. Comparación entre % de transmisión, lípidos totales y madurez vitelogénica del oocito.

Deben ser descartados del presente análisis aquellos especímenes en evidentes malas condiciones. Corresponden a esta categoría almejas excesivamente parasitadas cuyas suspensiones contienen escasa cantidad de gametos, la mayoría en avanzado estado de autólisis. Estos casos extremos aunque pueden dar valores altos de transmisión son afortunadamente escasos y fáciles de detectar. Generalmente una inspección macroscópica de la gónada delata una coloración oscura debido a la falta de desarrollo gametogénico en torno a la glándula digestiva.

Las mediciones efectuadas en el presente trabajo dejan en claro que cultivos con oocitos cuyos sobrenadantes expresan un 30% de transmisión producen un 1.3% de sobrevivencia, valores de un 66% de transmisión, sin embargo, producen un 20% de sobrevivencia (Tabla 3).

DISCUSION

Un análisis más profundo de lo que es la madurez del oocito, nos ha permitido discriminar entre tres aspectos que hay necesidad de diferenciar cuando nos referimos a los estados de madurez sexual de la gónada. El primer aspecto se refiere a la madurez gametogénica, la que diferencia los estados morfológicos del oogonio y el oocito principalmente por medio de

TABLA 3. Tabla relación del % de transmisión, % sobrevivencia y madurez vitelogenética de los oocitos, basada en el éxito de sobrevivencia larval hasta 22 días, en cultivos de 5 hembras seleccionadas de *V. antiqua*.

	% TRANSMISION	% SOBREVIVENCIA	MADUREZ VITELOGENICA	
(65%)	66%	20%	maduros	Límite establecido
	34%	1.6%		
	30%	1.3%	inmaduros	
	22%	0.0%		
	15%	0.0%		

sus dimensiones. El segundo aspecto se refiere a la madurez meiótica, proceso que activa el oocito, sacándolo de su arresto en profase. El tercer aspecto se refiere a la madurez vitelogenética, la que tiene que ver con la incorporación por medio de la pinocitosis, de los gránulos de vitelo que proporcionarán al oocito la energía necesaria para sobrepasar exitosamente la fase larval.

Nuestras observaciones respecto a los mecanismos que rigen la reproducción de los moluscos bivalvos, nos han llevado a considerar que los resultados irregulares que se observan en los cultivos de larvas en el laboratorio, se deben, en gran parte, a una falta de madurez vitelogenética de los oocitos fertilizados. Lo anterior implica que una adecuada evaluación de la madurez del oocito es imprescindible antes de proceder a su fertilización.

Eble (1969) nos señala que si bien es cierto que en los mamíferos, el almacenamiento del glicógeno se lleva a efecto en el hígado, en los bivalvos existe una reducción de la función hepática en este sentido, lo que ha resultado en la proliferación de tejido de Leydig cerca de la gónada con los fines de un almacenamiento más localizado del glicógeno.

La madurez vitelogenética de la gónada implica: depositar la energía procedente de los alimentos en ese "vehículo" constituido por el glicógeno, almacenar este glicógeno en las células de Leydig para su posterior utilización (Bayne et al.

1978), transformar el glicógeno acumulado a lípidos (principalmente triglicéridos), e incorporar estos lípidos al oocito (Fig. 3, Gabbott 1976).

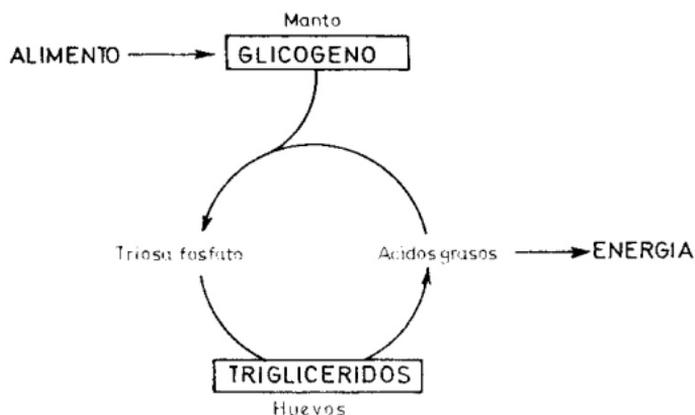


Fig. 3. Almacenamiento y transformación del alimento en energía (*Mytilus edulis*) según Gabbott 1976.

Como podremos apreciar la vitelogenénesis requiere de una conversión de glicógeno a lípidos (lipogénesis) (Fig. 4, Gabbott 1976), los que en última instancia conforman la parte de los gránulos de vitelo que permite el desarrollo lecitotrófico de la larva.

Bajo condiciones naturales, la vitelogenénesis del gameto femenino ocurre durante el arresto en profase de la primera división meiótica (Fig. 5) y es durante este receso meiótico cuando al promediar condiciones ambientales favorables se da inicio a esta vitelogenénesis. Como hemos podido apreciar las larvas de los moluscos bivalvos necesitan del vitelo acumulado, debido a que durante la segmentación son lecitotróficas y sólo dejan de serlo cuando están en condiciones de procurar su propio alimento.

Los lípidos provenientes de las células de Leydig, son el resultado de la transformación de glicógeno en triglicéridos y son incorporados al oocito junto con la vitelogenina. Hay

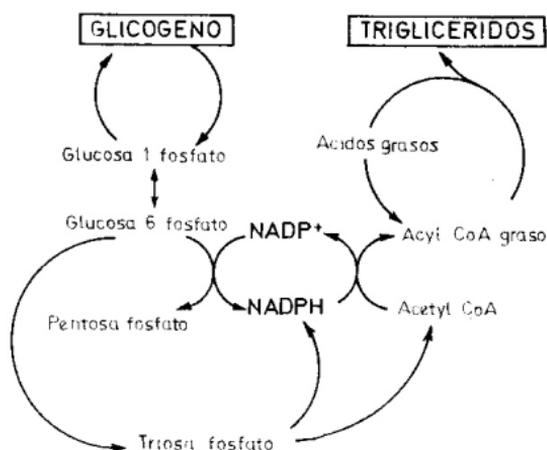
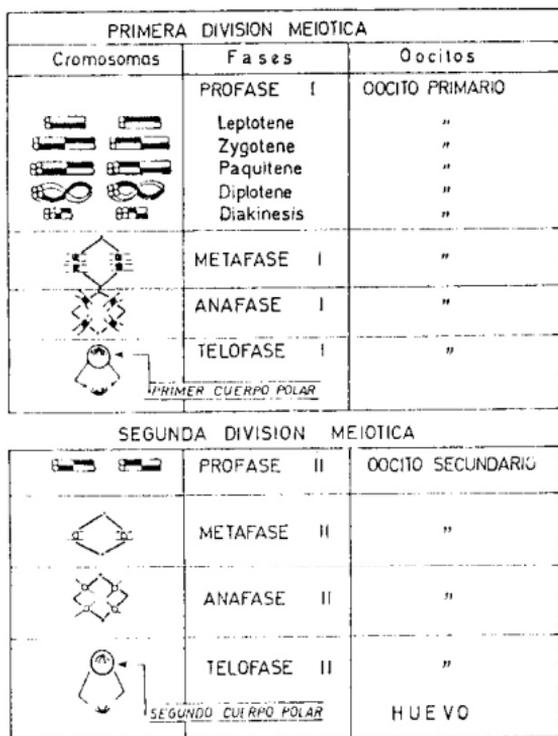


Fig. 4. Lipogénesis según Gabbott 1976.

necesidad de establecer, sin embargo, que la proteína, aunque cuantitativamente mayoritaria, no constituye la base energética del oocito. Tanto los lípidos como la vitelogenina al parecer se introducen al oocito a través del folículo mediante una pinocitosis. Esta heterosíntesis más otras autosíntesis propias del oocito constituyen los gránulos del vitelo que van a nutrir la larva.

Nuestras experiencias han logrado demostrar que sólo la activación y fertilización de oocitos post vitelogénicos conduce a cultivos en los que se puede esperar un porcentaje de sobrevivencia adecuado (Tabla 3). De lo anterior se desprende la importancia de poder determinar si la suspensión de oocitos que deseamos fertilizar es pre o post vitelogénica.

Los resultados obtenidos nos han permitido establecer que en especímenes en buenas condiciones, los porcentajes de transmisión más altos corresponden a oocitos post vitelogénicos. Además los resultados provenientes del análisis de la cantidad de lípidos correspondientes a los sobrenadantes medidos, nos permiten concluir que aquellos sobrenadantes de mayor transparencia, o sea, menos "lechosos", que han incorporado todo el vitelo suspendido al oocito, corresponden a gametos de una madurez vitelogénica mucho más avanzada (Fig. 2).



M. PADILLA

Fig. 5. Esquema de la madurez meiótica.

En el presente trabajo se cultivaron fertilizaciones de oocitos cuyas aguas ovulares (sobrenadantes) mostraban porcentajes de transmisión que van desde 15% a 66% (Tabla 1), y se pudo comprobar que con las transparencias que están sobre el 65% se pueden obtener porcentajes de sobrevivencia de 20%, mientras que en los cultivos correspondientes a un agua ovular de 34% se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de sólo un 1.6%. Valores de 22% y 15% de transparencia no acusaron sobrevivencia (Tabla 3).

Las cifras anteriores nos permiten efectuar una clasificación preliminar de los oocitos de la almeja *Venus antiqua* en la que se considera como oocitos post vitelogénicos a todos aquellos cuyos sobrenadantes acusan un porcentaje

de transmisión que sobrepase el límite arbitrariamente establecido de 65% y como oocitos pre vitelogénicos a todos aquellos oocitos cuyo sobrenadante acuse un porcentaje de transmisión inferior a ese límite (Tabla 3).

El ideal es que el oocito reinicie su meiosis en el estado post vitelogénico donde las reservas de vitelo son las suficientes como para asegurar un desarrollo adecuado, lamentablemente bajo condiciones artificiales la meiosis también puede ser reasumida cuando los oocitos se encuentran en un estado pre vitelogénico y es bajo estas condiciones donde la falta de vitelo incorporado impide un desarrollo larval adecuado.

Es posible que el presente trabajo se aleje un poco de los conceptos tradicionales de madurez, los que durante los últimos años han sido considerados como los procesos que conducen al oocito a ser competente para la fecundación. Nosotros hemos querido hacer ver que el concepto tradicional de madurez es incompleto, ya que no basta que el oocito sea competente para ser fecundado. Los cultivos efectuados en el laboratorio han demostrado una y otra vez que el éxito de la fecundación "in vitro" no asegura una sobrevivencia larval. También se ha logrado comprender que la transformación del glicógeno a lípido con el fin de ser incorporado al oocito puede, bajo situaciones de "stress", seguir otra vía sin llegar al oocito. Por lo tanto, debemos aceptar que aunque pueda existir éxito en la fecundación "in vitro", este éxito resulta esfímero cuando no se encuentra acompañado de una madurez vitelogenética.

AGRADECIMIENTOS. Deseamos agradecer al señor Alejandro Salinas, por su asistencia en los análisis químicos efectuados.

LITERATURA CITADA

- Bayne, B.L., Gabbott, P.A. & J. Widdows. 1975. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55: 675-689.
- Bayne, B.L., Holland, D.L., Moore, M.N., Lowe, D.M. & J. Widdows. 1978. Further studies on the effect of stress in the adult on eggs of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58: 825-841.

- Bayne, B.L. 1980. Physiological measurements of stress. *Rapports et Procès-Verbaux des Reunions. Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **179**: 56-62.
- Bligh, E.G. & W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917.
- Crisp, D.J. 1975. The role of pelagic larvae in: perspectives in experimental biology. Vol. 1 ed. Spencer and Davies.
- Eble, A.F. 1969. A histochemical demonstration of glycogen, glycogen phosphorylase and branching enzyme in the American Oyster. *Proceedings National Shellfish Association*. Vol. 59, p. 27-34.
- Gabbott, P.A. 1976. Energy metabolism in marine mussels: their ecology and physiology. Ed. by B.L. Bayne.
- Helm, M.M., Holland, D.L. & R.R. Stephenson. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **53**: 673-684.
- Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates in: *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press Ed.
- Loosanoff, V. & H.C. Davies. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Advances Marine Biology*, **1**: 1-136.
- Lubet, P. & W. Streiff. 1982. Neuroendocrine control of reproduction in molluscs. *Journal de Physiologie, Paris*, **78** (6): 537-542.
- Muruyama, Y.K. 1985. Holothurian oocyte maturation induced by radial nerve. *Biological Bulletin*, **168**: 249-262.
- Padilla, M. 1984. Desintegración neurohormonal "in vitro" de la vesícula germinal del oocito de *Venus antiqua antiqua*. *Revista de Biología Marina, Valparaíso*, **20** (1): 39-60.
- Raven, C.P. 1966. Morphogenesis. The analysis of molluscan development. Pergamon Press Ed. 2 Ed. Oxford 365 pag.
- Walne, P.R. 1956. Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L. in the laboratory. *Fishery Investigations, Serie II, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*, Nº 20, 23 pp.