

Búsqueda de marcadores de madurez de los gametos durante el ciclo gametogénico de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873)

P. Pardo Fernández, A. Matus de la Parra y F. San Juan Serrano

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo. Campus Lagoas-Marcosende. E-36200 Vigo (Pontevedra), España. Correo electrónico: ppardo@uvigo.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

El cultivo de bivalvos se ve limitado por la obtención de semilla de calidad en los criaderos. El éxito de las puestas depende de la alimentación adecuada de los reproductores, y pueden ser inducidas artificialmente mediante choque osmótico, térmico u otras técnicas. Algunos factores externos, como los ambientales, e internos, de carácter neuroendocrino, parecen contribuir a la maduración de los gametos.

El ciclo gametogénico de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) se caracteriza por largos periodos de reposo gonadal, en los que se ha encontrado una tasa elevada de degradación y atresia celular. También se aprecian diferencias considerables entre hembras y machos en los perfiles proteínicos durante el desarrollo gametogénico.

El presente trabajo está orientado a la búsqueda de marcadores del estado de madurez de los gametos como indicadores del momento más adecuado para inducir la puesta. Uno de los resultados obtenidos ha sido la visualización de una proteína de membrana en hembras, que se muestra en la fase de madurez de los ovocitos y en las puestas, que podría constituir uno de los macadores buscados.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, ciclo gametogénico, madurez gamética, proteínas de membrana, proteínas solubles, fraccionamiento subcelular.

ABSTRACT

The search for gametic maturity markers in the gametogenic cycle of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873)

One of the aims of bivalve culture is obtaining high quality broodstocks in hatcheries. Spawning feasibility depends on a suitable breeder's feeding, and can be artificially induced. Some external factors (environmental) and internal (neuroendocrinal) seem to contribute to gamete maturation.

Crassostrea gigas (Thunberg, 1873) gametogenic cycle is characterised by long resting periods during which a high rate of degradation and cellular atresia has been observed. There are also remarkable differences between male and female protein profiles during gametogenic development.

Our group has been searching for molecular indicators of the state of maturation, and the most suitable moment for spawning induction. One of our most promising results was the appearance of a membrane protein in females thought to be a signal receptor in oocyte maturation and spawning.

Keywords: *Crassostrea gigas*, gametogenic cycle, gamete maturation, membrane proteins, soluble proteins, subcellular fractioning.

INTRODUCCIÓN

La introducción en Galicia de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en 1991 supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *Ostrea edulis* L., 1758, de cultivo tradicional y autóctona de esta zona.

Existen numerosos estudios acerca de la reproducción de *Crassostrea* que versan sobre el uso de las reservas bioenergéticas durante la gametogénesis y sobre el estado histológico de la gónada en cada estadio del ciclo reproductivo. Estos trabajos reconocen que una adecuada alimentación de los reproductores conlleva una calidad superior de los ovocitos y, por tanto, tasas más elevadas de fecundación y supervivencia larvaria. Sin embargo, esta correlación no se produce siempre en los cultivos y, a pesar del mantenimiento de los reproductores en las condiciones más adecuadas y del suministro de dietas muy específicas, la viabilidad embrionaria y larvaria de las puestas inducidas es reducida. Este hecho constituye uno de los principales factores limitantes en la obtención de semilla de bivalvos en los criaderos, y apunta a la existencia de otros factores responsables de la inducción a la maduración de los ovocitos y a la puesta que hasta ahora no han sido identificados.

Diversos autores han constatado el control que ejercen sobre la gametogénesis los productos neuroendocrinos segregados por los ganglios cerebrales y viscerales. Sin embargo, se desconocen las rutas de transporte y su modo de actuación, y aun permanece sin dilucidarse si inciden directamente sobre la gónada o si son moléculas intermediarias, existiendo mensajeros hormonales secundarios de acción local. En cualquier caso, la participación de neurohormonas implica la presencia de receptores hormonales en las células diana, que podrían ser utilizados como marcadores de la madurez de los gametos y, consecuentemente, como indicadores del momento más adecuado para llevar a cabo la inducción a la puesta, garantizando un éxito reproductivo mayor.

Este trabajo constituye un primer intento para identificar los marcadores de madurez en los gametos de *Crassostrea*. Si este proceso es controlado hormonalmente, como se supone, debe haber un incremento en los niveles de los receptores respectivos de las células diana, que, en la mayoría de los organismos, son de naturaleza proteínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de *C. gigas* utilizados en este estudio fueron recolectados quincenalmente entre marzo de 1997 y febrero de 1998 en la bahía de Marèennes-Oleron (Francia). El tejido utilizado para el trabajo fue la gónada de los organismos, que se diseccionó y dividió en varias partes. Una de ellas se destinó a análisis histológicos, para lo que se fijó en Bouin®, se incluyó en parafina y se seccionó cortes de 5 µm de espesor que se sometieron a la tinción tricrómica de Wheatley. El resto del tejido se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La determinación de los estadios gametogénicos de los individuos se llevó a cabo estudiando los cortes histológicos con microscopía óptica. Tras la asignación de los estadios del ciclo, se eligieron machos y hembras representativos de cada uno para el estudio comparativo de las proteínas de membrana y citosol, que se realizó mediante el fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial en gradiente de densidad.

Después de diversas pruebas de puesta a punto para su aplicación a la gónada de *Crassostrea*, se estableció el protocolo siguiente: homogeneización del tejido con tampón Tris HCl 40 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM, KCl 120 mM y EDTA 5 mM, en una relación 1:6 (peso del tejido/volumen de tampón). Para evitar la degradación de las proteínas se incorporó al tampón un compuesto comercial, mezcla de varios inhibidores de proteasas y con amplia especificidad para la inhibición de serina, cisteína y metaloproteasas (de Roche Molecular Biochemicals).

La separación de los núcleos se llevó a cabo por centrifugación a 1 000 G durante 10 minutos a 4 °C. Después de varios lavados, el sobrenadante se sometió a una segunda ultracentrifugación a 17 210 G durante 30 minutos, en la que precipitan las mitocondrias y la membrana plasmática y quedan en el sobrenadante partículas del retículo endoplasmático, del aparato de Golgi y el citosol. Tras varios lavados, el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón de extracción y se sometió a otra ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (1,34 M) a 107 170 G durante 60 minutos para separar la fracción de la membrana plasmática y de las mitocondrias. Estas últimas precipitan en el fondo del tubo, mientras que la fracción de membrana se sitúa en la interfase del gradiente. Ésta se succionó con micropipeta

y se recogió en el precipitado de una nueva ultracentrifugación a 150 000 G durante 40 minutos. Después de nuevos lavados, fue resuspendida en otros 5 ml de tampón de extracción. El sobrenadante de esta última centrifugación se unió al sobrenadante obtenido en el primer paso y se sometió a una última ultracentrifugación a 250 000 G durante 3 horas para separar las partículas de retículo endoplasmático y del aparato de Golgi de la fracción citosólica y los lisosomas. Todos y cada uno de los pasos del proceso de fraccionamiento fueron realizados a 4°C (figura 1).

La bondad del fraccionamiento, es decir, la pureza de cada una de las fracciones subcelulares recogidas y su posible contaminación, fue valorada mediante la determinación de la actividad de distintas enzimas marcadoras: succinato deshidrogenasa (mitocondrias); fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa (membrana plasmática); β -D-glucosidasa

(retículo endoplasmático); tiamina pirofosfatasa (vesículas de Golgi); fosfatasa ácida (lisosomas, que se recogen en la fracción de citosol).

La cuantificación de las proteínas totales en cada una de las fracciones obtenidas se realizó por el método del ácido bicinchonínico (BCA), después de solubilizar las proteínas de membrana con una solución detergente de Triton X-100® en proporción 1/2.

El perfil de proteínas en machos y hembras a lo largo de todo el ciclo gametogénico se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones no desnaturalizantes. Las fracciones analizadas principalmente fueron las de membrana plasmática y citosol. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V y 4 mA durante 90 minutos. Las distintas bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción de plata (Merril, Switzer y Van Keuren, 1979; San Juan, inédito).

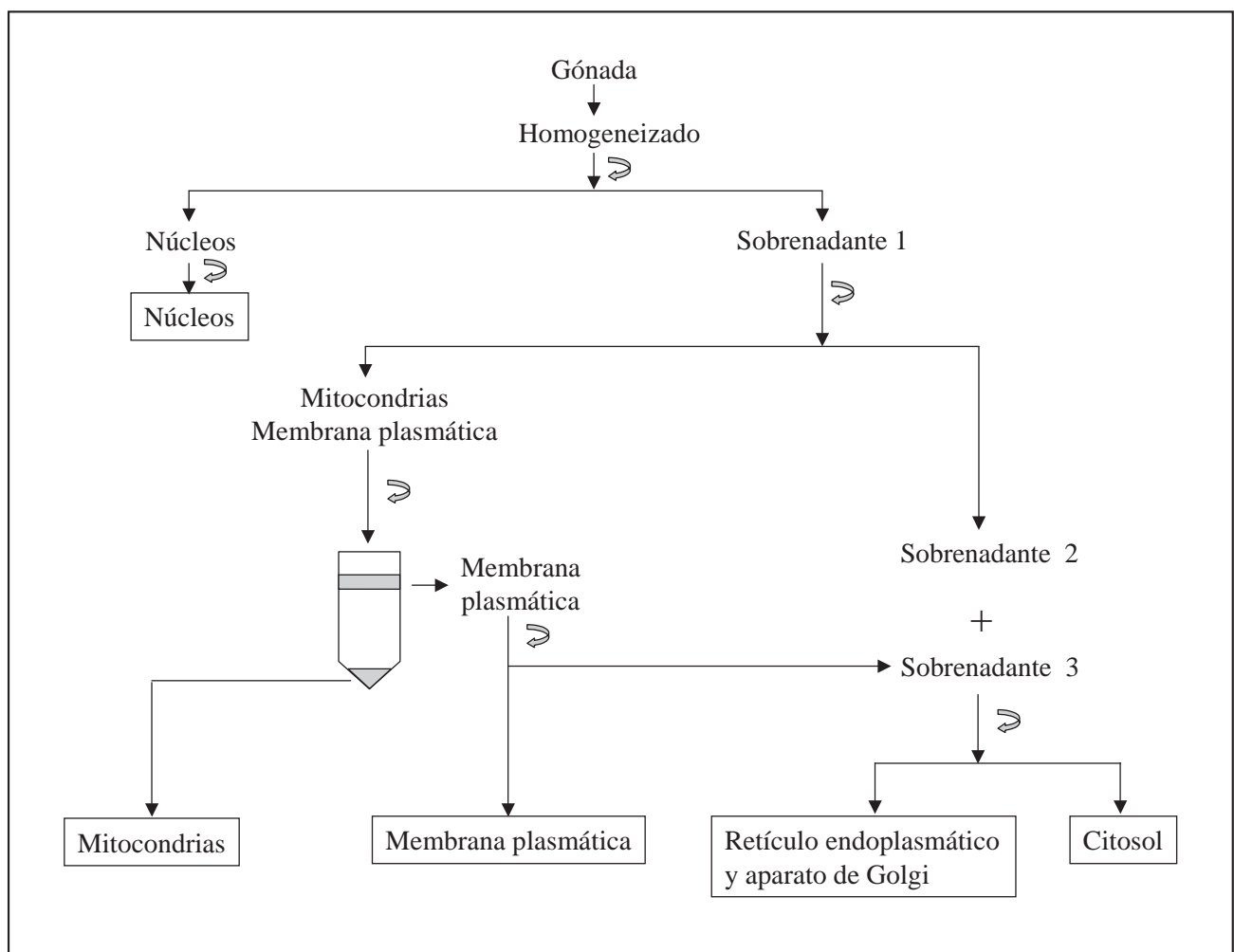


Figura 1. Esquema del proceso de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial en gradiente de densidad (↻: centrifugación en las condiciones especificadas en el texto).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del estudio de las preparaciones histológicas de todos los individuos muestreados (169), y teniendo como base las distintas fases descritas por Coe (1963) para el primer desarrollo de la gónada de *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) y los diferentes estadios descritos por Lubet (1959) para *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, se puede describir el desarrollo gonadal de *C. gigas* del modo siguiente.

El ciclo gametogénico comienza hacia finales de agosto y principios de septiembre con un periodo de restauración del tejido de reserva, que será utilizado posteriormente para sostener el desarrollo gametogénico. Este principio del ciclo, denominado estadio 0, se caracteriza, también, por una ausencia de células germinales (figura 2a).

Transcurrido un tiempo reducido, comienza la producción, proliferación y propagación de las gonias (figura 2b), así como la formación de los folículos, divertículos en los que éstas se asientan. Esta fase, denominada estadio I, se caracteriza porque prácticamente el 100 % de los individuos son indeterminados, y se aprecian las líneas germinales de ambos sexos en un mismo organismo. Es lo que se ha denominado gónada intersexual primaria (figura 2c), si bien, en toda esta etapa, los pequeños ovocitos previtelogénicos son más evidentes, confiriendo apariencia de hembras a la mayoría de los individuos (figura 2d).

Durante el largo periodo de invierno (noviembre-marzo) se producen pocos cambios, y el desarrollo

folicular continúa muy lentificado. Esta etapa, que se podría llamar de hibernación, se caracteriza por una atresia elevada y la degradación hemocitaria (de las células germinales parcialmente diferenciadas) (figura 3a).

En marzo, coincidiendo con un aumento importante de la temperatura del agua, se reanuda la gametogénesis y se alcanza el estadio II, en el que se hacen visibles todos los tipos celulares de cada línea germinal, aunque con predominio notable de ovocitos previtelogénicos y espermatocitos frente al escaso número de gametos maduros. En los individuos que se desarrollan como machos proliferan las espermatogonias y los espermatocitos I, y los ovocitos primarios que contenían van desintegrándose (figura 3b). El desarrollo en las hembras es más lento en ese momento, y aunque se observa un crecimiento en tamaño y número de los ovocitos previtelogénicos (figura 3c), éstos son continuamente degradados (figura 3d).

Entre abril y junio los machos alcanzan la madurez sexual y producen las primeras puestas parciales (estadio IIIA) (figura 4a). Coincidiendo con estas emisiones de esperma al medio, va cesando la atresia en las hembras, que progresan en su desarrollo hasta que, a finales de junio, alcanzan también el estadio IIIA (figura 4b) y se producen sus primeros pulsos de puesta (figura 4c).

A partir de ese momento el desarrollo de ambos sexos se sincroniza, produciéndose una rápida restauración del tejido gonadal (estadio IIIC) (figuras 4d y 5a) para dar lugar, en el mes de julio, a la pue-

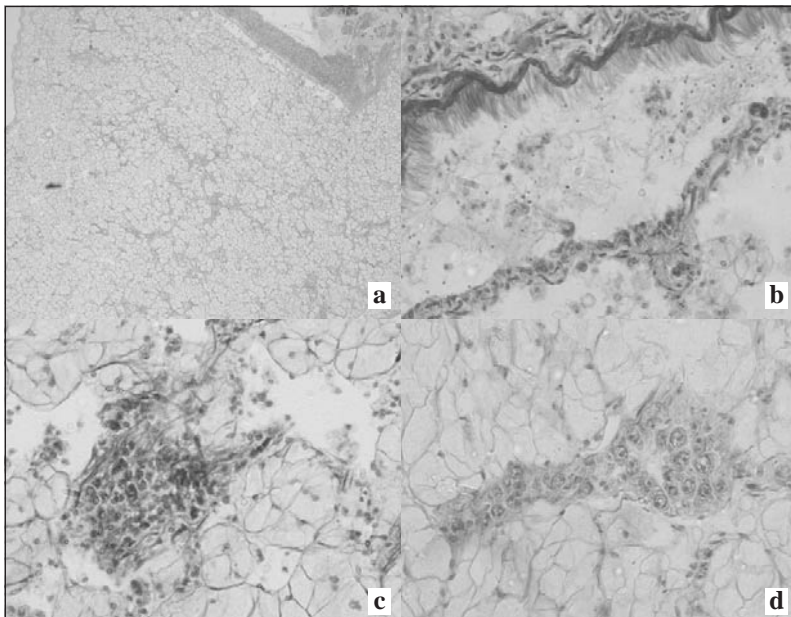
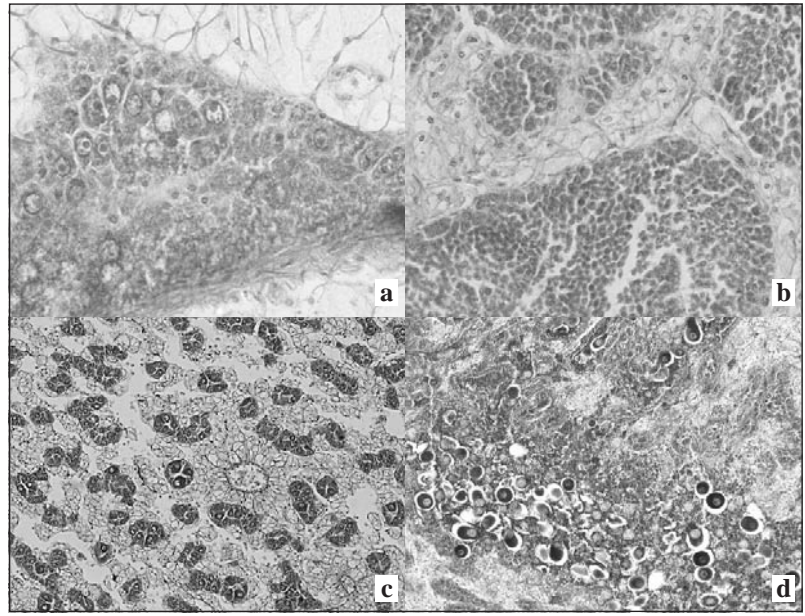


Figura 2. (a): estadio 0; sólo el tejido de reserva está presente ($\times 12$). (b): estadio I; proliferación y propagación de gonias ($\times 120$). (c): estadio I; formación de folículos y gónada intersexual primaria ($\times 120$). (d): estadio I; evidencia de ovocitos previtelogénicos en la gónada intersexual primaria ($\times 120$).

Figura 3. (a): estadio I; hibernación y atresia de las células germinales parcialmente diferenciadas ($\times 120$). (b): estadio II de machos; se observan todos los tipos celulares de la línea germinal (espermatozonias, espermatozonios I, espermatozonios II, espermátidas y algunos espermatozoides) y muchos ovocitos primarios residuales de la gónada intersexual primaria ($\times 120$). (c): estadio II de hembras; el crecimiento y desarrollo de los folículos es menor que en machos; se observan numerosas gonias, ovocitos previtelogénicos en distintos estados de maduración y algún ovocito vitelogénico ($\times 30$). (d): estadio II de hembras; durante todo el estadio II se sigue observando una atresia ovocitaria intensa ($\times 120$).



ta principal y total (estadio IIIB) (figura 5b,c). Tras la puesta masiva, la gónada se ve invadida por hemocitos, que asumen su limpieza degradando el material no liberado. Esto supone el fin de un ciclo reproductivo (estadio IIID) (figura 5d) y da paso a la recuperación del tejido de reserva, inicio de un ciclo nuevo.

La descripción del ciclo gametogénico de *C. gigas* instruyó sobre la elección de los individuos más representativos de cada uno de los estadios propuestos que se destinarían al análisis de los patrones proteínicos de membrana plasmática y de citosol. Una vez realizado el fraccionamiento

subcelular en el tejido gonadal de cada individuo, previamente almacenado a -80°C , se comprobó la pureza de las fracciones y la eficacia del fraccionamiento en cada caso con la determinación de la actividad específica (medida en unidades internacionales de actividad enzimática por miligramo de proteína) de las enzimas marcadoras descritas en el apartado de epígrafe Material y métodos.

Aunque la finalidad única de estas mediciones de actividad enzimática era comprobar la efectividad del fraccionamiento subcelular, al comparar las medidas entre sí considerando los estadios correspondientes, se observaron variaciones acusadas

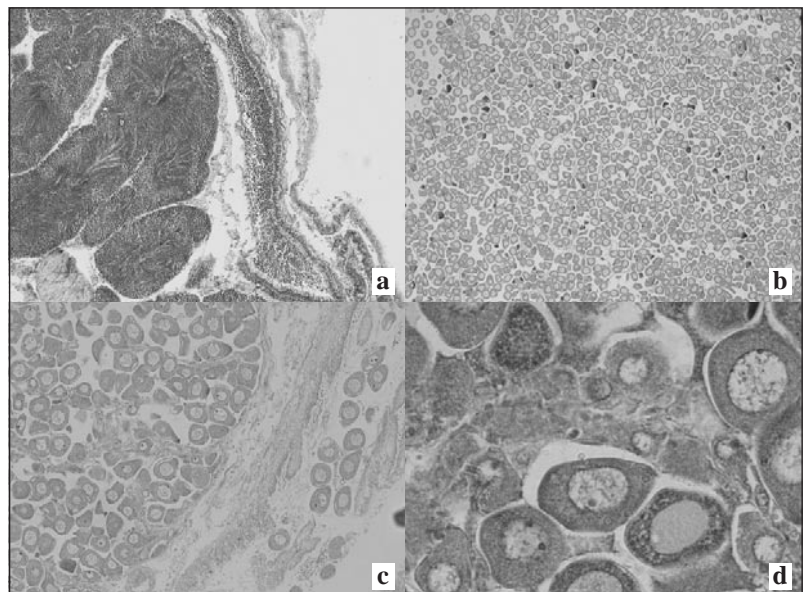


Figura 4. (a): estadio IIIA de machos; madurez sexual y primeros pulsos de puesta ($\times 30$). (b): estadio IIIA de hembras; sólo después de los pulsos de puesta de los machos desaparece la intensa atresia ovocitaria de las hembras ($\times 30$). (c): estadio IIIA de hembras; pulso de puesta ($\times 120$). (d): estadio IIIC de hembras; restauración gonadal; se observa nuevamente una intensa proliferación y división de gonias ($\times 180$).

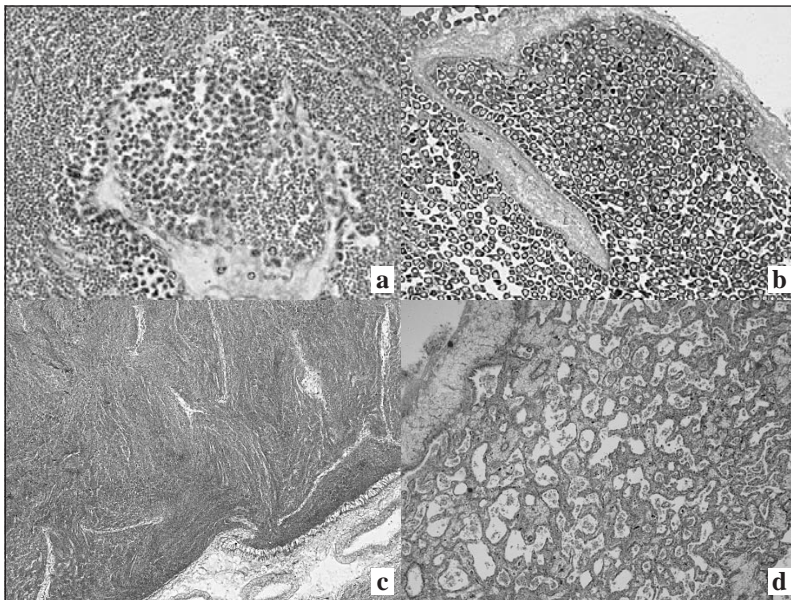


Figura 5. (a): estadio III C de machos; restauración gonadal; de nuevo se observa una intensa proliferación y división gonial y también de espermatocitos I y II ($\times 180$). (b): estadio III B de hembras; puesta masiva y total de los ovocitos maduros en el mes de julio; se observa el gonoducto lleno de ovocitos que están siendo expulsados al exterior ($\times 30$). (c): estadio III B de machos; puesta masiva y total de espermatozoides en el mes de julio; se observa el gonoducto, con una inmensa masa de espermatozoides que están siendo expulsados al exterior ($\times 30$). (d): estadio III D; degradación y reabsorción del tejido gonadal al final de un ciclo reproductivo ($\times 30$).

y una relación inversa entre las enzimas marcadoras de membrana plasmática y las de citosol. Ya se advertía de la elección de la enzima fosfatasa ácida como marcador de la fracción citosólica; esta enzima se encuentra localizada en el compartimento lisosomal, y estos orgánulos, por su pequeño tamaño y densidad, son recogidos junto con el citosol.

En las hembras, la actividad fosfatasa ácida parece descender entre agosto y septiembre, mientras que aumentan las actividades marcadoras de membrana plasmática (fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa) (figura 6). En ese momento, como se describía, se está restaurando el tejido de reserva con la proliferación de sus células, y la actividad biosintética es elevada (estadio 0). Durante el otoño y el invierno

no la actividad fosfatasa ácida se mantiene aproximadamente constante, y la actividad de la fosfatasa alcalina y de la 5'-nucleotidasa aumentan inicialmente, para caer después a sus valores más bajos. A principios de otoño se observó histológicamente la proliferación de gonias y la formación de los folículos gonadales (estadio I). Este aumento inicial de las actividades marcadoras de membrana plasmática parece reflejar esa proliferación y división de células goniales. Durante el invierno el desarrollo gametogénico se detiene y se produce la atresia continuada de las células germinales parcialmente diferenciadas.

Los fenómenos de atresia descritos en otros bivalvos suelen llevar asociados lisis hemocitaria

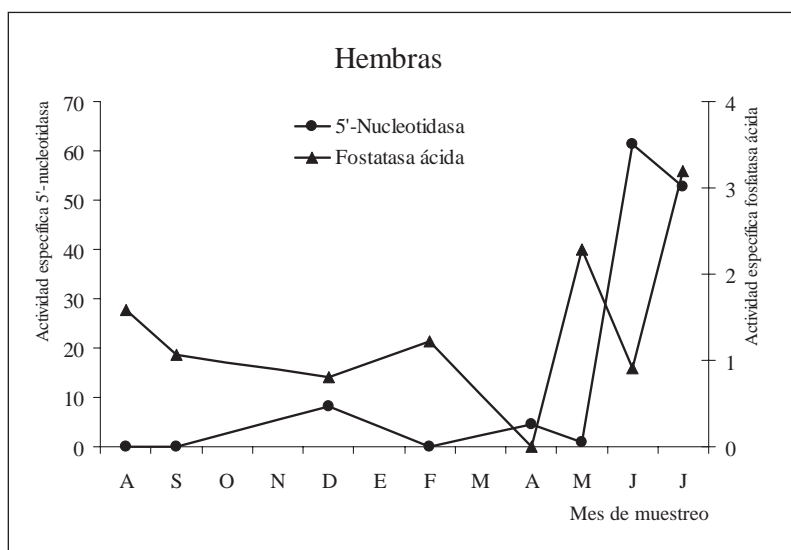


Figura 6. Variación de la actividad específica de las enzimas marcadoras de membrana plasmática y citosol (lisosomas) en la gónada de hembras de *C. gigas* a lo largo de todo un ciclo reproductivo. Las dos actividades marcadoras de membrana valoradas presentaron evoluciones idénticas, por lo que, para facilitar la lectura comparativa, sólo se representa la actividad 5'-nucleotidasa.

(Pipe, 1987; Dorange y Le Pennec, 1989) y reabsorción del material digerido para ser reutilizado posteriormente en la formación de nuevos gametos (Lubet *et al.*, 1987; Pipe, 1987; Le Pennec *et al.*, 1991). No se conoce con exactitud la señal que desencadena estos fenómenos, aunque algunos autores conjeturan con el aumento de la actividad lisosomal durante estos procesos (Pipe y Moore, 1985; Dorange, 1989), lo que sería congruente con la disminución de la actividad de las enzimas de membrana plasmática, con la menor cantidad de esta fracción aislada en esos momentos y también con el aumento de actividades lisosomales en el periodo que hemos establecido como de hibernación.

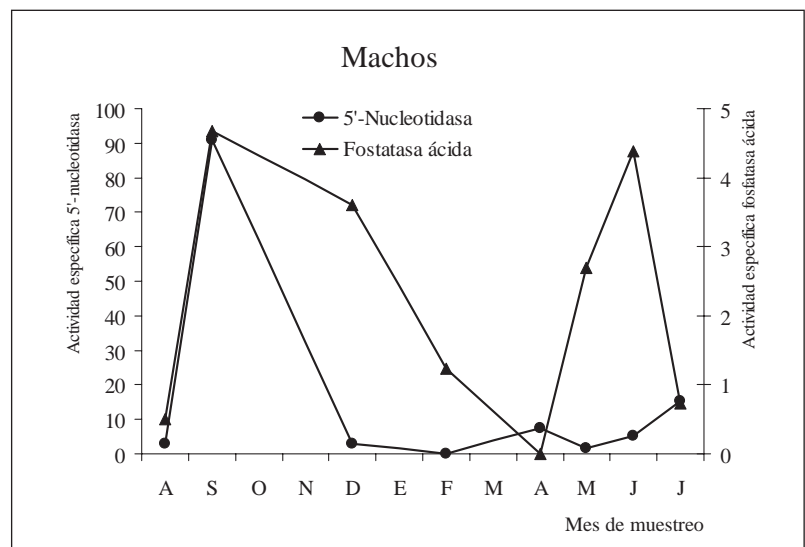
En abril-mayo la gónada de las hembras se desarrolla más (II), aunque aun se observa atresia elevada, que alcanza su intensidad máxima en estos meses y coincide con un aumento brusco de la actividad lisosomal (figura 6). En junio-julio tienen lugar una restauración gonadal rápida e intensa (estadio IIIC) y la maduración completa y puesta de los ovocitos (estadio IIIB). Estos estadios se correlacionan con una mayor recuperación de la fracción de membrana plasmática y un aumento de las actividades de las enzimas marcadoras de esta fracción, incrementos simultáneos a la desaparición de la atresia y a la disminución drástica de la actividad lisosomal (figura 6). Posteriormente, después de la puesta principal y total, al término del ciclo reproductivo, vuelven a disminuir las actividades de membrana y a aumentar la actividad lisosomal, debido, probablemente, a la degradación de los gametos residuales que no han llegado a emi-

tirse y a la reabsorción de la gónada (estadio IIID) (figura 6).

Por otra parte, la fosfatasa ácida (actividad lisosomal) en los machos tiene una evolución similar a la descrita para las hembras, asociada a periodos de paralización de la gametogénesis y de atresia, aunque los valores son superiores. Esto quizá sea debido a que, aunque el número de espermatozoides es muy superior, por su menor tamaño, no se aprecien los fenómenos de atresia en las preparaciones histológicas tan evidentemente como en las hembras (figura 7). Las actividades 5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina tienen un comportamiento ligeramente distinto al descrito en hembras, pues aumenta notablemente después de la puesta principal, a finales de verano, y es mínima durante todo el invierno, hasta los meses de marzo y abril.

En *C. gigas*, aunque no se ha mencionado en la descripción del ciclo gametogénico, las temperaturas altas, superiores a una mínima determinada, parecen inducir el desarrollo en los machos. Al final del verano las temperaturas del agua siguen siendo elevadas, y es muy frecuente observar todavía un rápido desarrollo gametogénico en machos, que incluso puede dar lugar a una segunda puesta a finales de otoño, aunque no se conoce con certeza su efectividad. En el mes de marzo, como se ha descrito, al aumentar la temperatura al comienzo de la primavera, se desencadena nuevamente la gametogénesis, mucho más rápida en los machos. Por tanto, el aumento de las actividades marcadoras de membrana plasmática en ese momento debe estar relacionado con la rápida e in-

Figura 7. Variación de la actividad específica de las enzimas marcadoras de membrana plasmática y citosol (lisosomas) en la gónada de machos de *C. gigas* a lo largo de todo un ciclo reproductivo. Las dos actividades marcadoras de membrana valoradas presentaron evoluciones idénticas, por lo que, para facilitar la lectura comparativa, sólo se ha representado la actividad 5'-nucleotidasa.



tenza multiplicación gonial y la proliferación de espermatoцитos I y II, espermatídas y espermatozoides observadas.

Los resultados de las electroforesis en gel de las fracciones mencionadas muestran diversas bandas proteínicas (figuras 8 y 9). Su estudio comparativo atendiendo a los distintos estadios gametogénicos sugiere que, en las hembras, algunas surgen o se intensifican coincidiendo con la desaparición de la atresia y la maduración de los ovocitos, inmediatamente antes de la puesta. Estas proteínas podrían

corresponder bien a receptores de membrana de alguna señal hormonal emitida por los machos, ya que el cese de la atresia en las hembras es evidente sólo después de las puestas parciales o pulsos de puesta de los machos en el estadio IIIA, bien a receptores de señales internas o externas que determinen el momento óptimo y adecuado de la puesta; o bien a otras proteínas constitutivas del vitelo y necesarias para los desarrollos embrionario y larvario posteriores, por lo que podrían constituir posibles marcadores de madurez ovocitaria.

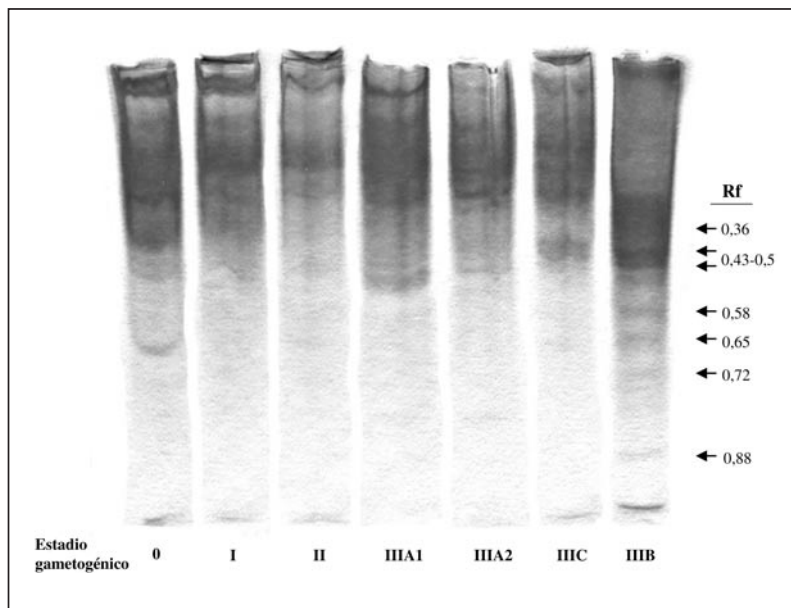


Figura 8. Patrón de proteínas citosólicas de hembras a lo largo del ciclo gametogénico. Fotografía de las electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción citosólica de hembras escogidas como representativas de cada estadio gametogénico. Los indicadores señalan las bandas de proteínas más representativas en los estadios de madurez ovocitaria y proporcionan su valor de movilidad relativa (Rf), calculado como la razón entre la distancia de migración de la proteína y la del colorante utilizado como marcador en el transcurso de la electroforesis (azul de bromofenol).

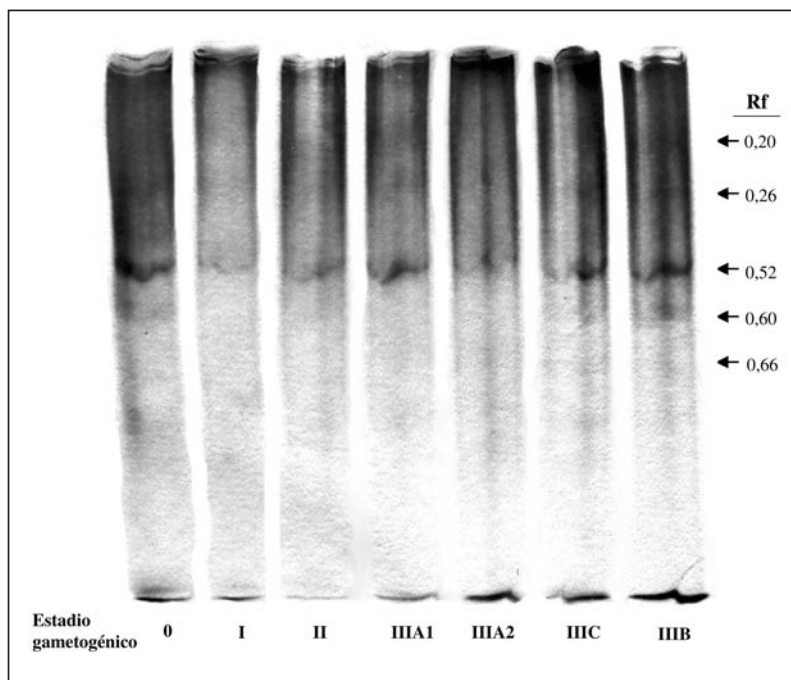


Figura 9. Patrón de proteínas de la membrana plasmática de hembras a lo largo del ciclo gametogénico. Fotografía de las electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción de membrana de hembras escogidas como representativas de cada estadio gametogénico. Los indicadores señalan las bandas de proteínas más representativas en los estadios de madurez ovocitaria y proporcionan su valor de movilidad relativa (Rf), calculado como la razón entre la distancia de migración de la proteína y la del colorante utilizado como marcador en el transcurso de la electroforesis (azul de bromofenol).

BIBLIOGRAFÍA

- Coe, W. R. 1963. Sexual phases in the american oyster (*Ostrea virginica*). *Biol. Bull.* 63: 419-441.
- Dorange, G. 1989. *Les gamètes de Pecten maximus L.* (*Mollusca, Bivalvia*). Tesis doctoral. Universidad de Breñaña Occidental: 235 p.
- Dorange, G. y M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Le Pennec, M., P. G. Beninger, G. Dorange e Y. M. Pault. 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten maximus* (*Bivalvia: Pectinidae*). *J. Mar. Biol. Ass. (UK)* 1: 451-463.
- Lubet, P. 1959. Cycle sexuel de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* dans le bassin d'Arcachon (Gironde). *L'Année Biologique* 33: 19-39.
- Lubet, P., J. Y. Besnard, R. Faveris e I. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis* 13: 265-290.
- Merril, C. R., R. C. Switzer y M. L. van Keuren. 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76 (9): 4335-4339.
- Pipe, R. K. 1987. Oogenesis in the mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar. Biol.* 95: 405-414.
- Pipe, R. K. y M. N. Moore. 1985. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 17: 939-949.