

Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultivado en la ría de Vigo (noroeste de la península Ibérica)

P. Suárez Alonso¹, C. Álvarez González², P. Molist García² y F. San Juan Serrano¹

¹ Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo.

Lagoas-Marcosende, s/n. E-36200 Vigo (Pontevedra), España. Correos electrónicos: psuarez@uvigo.es; fsanjuan@uvigo.es

² Departamento de Biología Celular y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo.

Lagoas-Marcosende, s/n. E-36200 Vigo (Pontevedra), España. Correos electrónicos: carmal@uvigo.es; pmolist@uvigo.es

Recibido en marzo de 2005. Aceptado en enero de 2007.

RESUMEN

Durante el desarrollo gametogénico de *Mytilus* se han observado fenómenos de atresia de gametos en distintos momentos del ciclo. La degradación se produce en los folículos gonadales y a lo largo del gonoducto, e incluye dos etapas consecutivas: lisis de las estructuras y membranas citoplasmáticas, más evidente en ovocitos, y digestión hemocitaria del material lisado. La influencia de factores ambientales en este fenómeno es clara. La atresia es intensa en invierno, disminuye durante la primavera y vuelve a aumentar al final del ciclo gametogénico. En invierno se relaciona con la sobremaduración de gametos debida a condiciones desfavorables para el desove (bajas temperaturas y escasez de alimento). En verano, las altas temperaturas determinan la finalización del ciclo gametogénico y la degeneración y resorción total del tejido gonadal.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*, ciclo gametogénico, atresia.

ABSTRACT

Gonadal atresia during the gametogenic cycle of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultured in the ria of Vigo (northwest Iberian Peninsula)

During the gametogenic cycle of *Mytilus*, we observed atresic phenomena in gametes at different cycle stages. Gametes are degraded both within the follicle and throughout the gonoduct. This degradation shows two consecutive phases: lysis of cytoplasmatic structures and membranes, more evident in oocytes; and haemocytic digestion of lisated material. Environmental factors clearly influence this phenomenon. Atresia is intense in winter, decreases during spring, and rises again at the end of the gonadal cycle. In winter, it is related to overmaturation of gametes due to unfavourable conditions for stimulating spawning (low temperatures and lack of food availability). In summer, the high temperatures trigger the end of gametogenic cycle, and total degeneration and resorption of gonadal tissue.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, gametogenic cycle, atresia.

INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 tiene carácter anual (Suárez *et al.*, 2005). Comienza a finales de junio, con atresia elevada, resorción rápida del tejido del manto (estadio III-D) y desarrollo del tejido de reserva (estadio 0), que en la mayoría de los individuos se produce de forma paralela a las últimas puestas del ciclo anterior (III-B final). Inmediatamente después, comienza la proliferación de gonias y la formación de folículos gonadales (estadio I). La diferenciación y meiosis de las gonias (estadio II) comienza en agosto y se extiende hasta noviembre, momento en que se alcanza un estadio de madurez (III-A) al que sigue la primera emisión de gametos (estadio III-B). A estas puestas le siguen sucesivas restauraciones de las células germinales (estadio III-C), con nuevas mitosis goniales para formar nuevas cohortes de gametos, que van siendo evacuados por el gonoducto en número progresivamente mayor hasta las puestas principales en primavera. En verano, la potencialidad de la gónada disminuye paulatinamente y las puestas no son sucedidas por más restauraciones (estadio III-B final). El desarrollo gametogénico de *Mytilus* es pues un proceso dinámico y continuo en el que, desde la primera emisión de gametos, se puede diferenciar las puestas y restauraciones de invierno de las de primavera. Los primeros son procesos lentos, poco intensos, con abundante tejido de reserva, atresia elevada y degradación de gametos que no parece que culminen en puestas efectivas y viables (Suárez *et al.*, 2005), mientras que las puestas y restauraciones de primavera son procesos muy rápidos e intensos que dan lugar a puestas masivas y sincrónicas en ambos sexos.

La degradación y atresia de ovocitos es un proceso descrito en moluscos bivalvos (Paulet, Gérard y Lucas, 1986; Pipe, 1987a,b; Dorange y Le Pennec, 1989; Beninger y Le Pennec, 1991; Avendaño y Le Pennec, 1997; Borzone, Pezzuto y Tabares, 2003) cuyo significado fisiológico es explicado por sobre-maduración en el folículo cuando no existen estímulos que incitan la puesta, reutilización del material degradado como fuente energética (Pipe, 1987a; Borzone, Pezzuto y Tabares, 2003), situaciones de estrés por contaminación ambiental (Lowe, 1988; Steele y Mulcahy, 1999), déficit nutricional (Pipe, 1987a; Lubet *et al.*, 1987; Pardo Fernández, Matus de la Parra y San Juan Serrano, 2002; Galap,

Leboulenger y Grillot, 2004) o bajas temperaturas (Sastry, 1979; Pardo Fernández, Matus de la Parra y San Juan Serrano, 2002; Galap, Leboulenger y Grillot, 2004). La señal celular que inicia este proceso, igual que el de la apoptosis celular, no es todavía bien conocida. Diversos autores apuntan a la acción lisosomal de los propios ovocitos (Dorange y Le Pennec, 1989; Pipe y Moore, 1985; Pardo Fernández, Matus de la Parra y San Juan Serrano, 2002) y a una inducción por testosterona (Wang y Croll, 2004).

Las condiciones ambientales desfavorables son también citadas como causa de estrés y de degradación de ovocitos (Pipe, 1987a; Lubet *et al.*, 1987; Sastry, 1979). Las variables externas que más influyen tanto en el crecimiento somático como en el desarrollo gonadal de moluscos bivalvos son la temperatura y la disponibilidad de alimento (Hilbish y Zimmerman, 1988; Starr, Himmelman y Therriault, 1990; Pérez, González y Fuentes, 1991; Le Pennec *et al.*, 1991; Seed y Suchanek, 1992).

En este trabajo se describen los momentos del ciclo gonadal de *M. galloprovincialis* en los que se observa una importante atresia gonadal, la relación de ésta con las principales variables ambientales de la ría de Vigo y las etapas que histológicamente parece seguir este proceso y que ha permitido su identificación también en machos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 22 muestreos en total, distribuidos quincenalmente entre junio de 1993 y agosto de 1994, con el fin de abarcar un ciclo estacional y reproductivo completo. En cada muestreo se recogieron al azar 30 individuos adultos de entre 8 y 9 cm de longitud, siempre de la misma estructura flotante de cultivo (batea) y a una profundidad de 5 m. Los individuos fueron inmediatamente trasladados al laboratorio en tanques isotérmicos con agua de mar y procesados en el mismo día.

La parte central (0,5 cm × 1 cm) de uno de los hemimantos de cada individuo muestreado fue seccionada y utilizada en la preparación de los cortes histológicos. Cada muestra de tejido se fijó en una solución de Bouin, preparada con agua de mar artificial, durante 4 horas. A continuación se deshidrataron en baños sucesivos de concentración creciente de etanol (70°-80°-96°-100°) y xilol, incluyéndolos luego en parafina. Los cortes se realiza-

ron con un microtomo de rotación a 5 μm de espesor. Posteriormente, fueron desparafinados y rehidratados en sucesivos baños de xilol y etanol en concentraciones decrecientes y teñidos con hematoxilina-eosina. Una vez montadas las preparaciones histológicas se procedió a su examen microscópico, determinando el sexo, el estadio de desarrollo gonadal, el estado del tejido de reserva y la aparición de atresia en cada individuo.

La variación de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la concentración de nutrientes fue registrada semanalmente en la estación más cercana a la zona de muestreo, a 5 m de profundidad, durante todo el periodo de estudio. Estos datos fueron cedidos por el Centro de Control del Medio Marino de la Xunta de Galicia. La temperatura se midió utilizando un termómetro de mercurio de máxima y mínima (CTD) con una precisión de $\pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$. La disponibilidad de alimento fue estimada como concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{l}$), utilizando el método de extracción y cuantificación espectrofotométrica desarrollado por Strickland y Parsons (1968).

La correlación entre temperatura y clorofila *a* fue estimada por el coeficiente de Pearson (*rs*) utilizando el programa informático SPSS, v. 9.0.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento anual de las dos variables medioambientales estudiadas (temperatura y disponibilidad de alimento) muestra cómo la temperatura aumenta progresivamente en el transcurso de primavera-verano, alcanzando su valor máximo (18 $^{\circ}\text{C}$) en julio. Posteriormente, a partir de octubre, co-

mienza a disminuir paulatinamente durante otoño-invierno, alcanzando el mínimo (12 $^{\circ}\text{C}$) en febrero. A partir de entonces, y con la llegada de la primavera, la temperatura vuelve a aumentar hasta el verano siguiente. Por su parte, el perfil de evolución de la concentración de clorofila *a* como indicador de la biomasa fitoplanctónica, presenta sus mínimos valores durante el invierno, y aumenta de forma progresiva desde mediados de marzo hasta el verano, momento en que alcanza sus valores máximos (figura 1). Existe una clara correlación significativa ($0,001 < p < 0,01$) entre ambas variables: las bajas temperaturas de invierno coinciden con los mínimos valores de clorofila *a*, que aumentan al incrementarse la temperatura del agua a partir de primavera.

El seguimiento histológico del desarrollo gametogénico de *Mytilus* ha permitido observar la existencia de fenómenos de atresia y degeneración de gametos en distintos momentos del ciclo. Esta degradación es más evidente en hembras y se produce tanto dentro de los folículos gonadales como a lo largo del gonoducto (figura 2) desde la formación de los primeros ovocitos maduros. Es más intensa en invierno, desaparece en primavera, cuando se producen las puestas efectivas y masivas, con restauraciones rápidas e intensas, y vuelve a aumentar en verano, al final del ciclo gametogénico (figura 2).

Parece existir una relación clara entre la aparición e intensidad de la atresia ovocitaria y los cambios en las dos variables medioambientales estudiadas. La atresia invernal parece estar relacionada con una sobremaduración ovocitaria debida a condiciones desfavorables para el desove (bajas tempe-

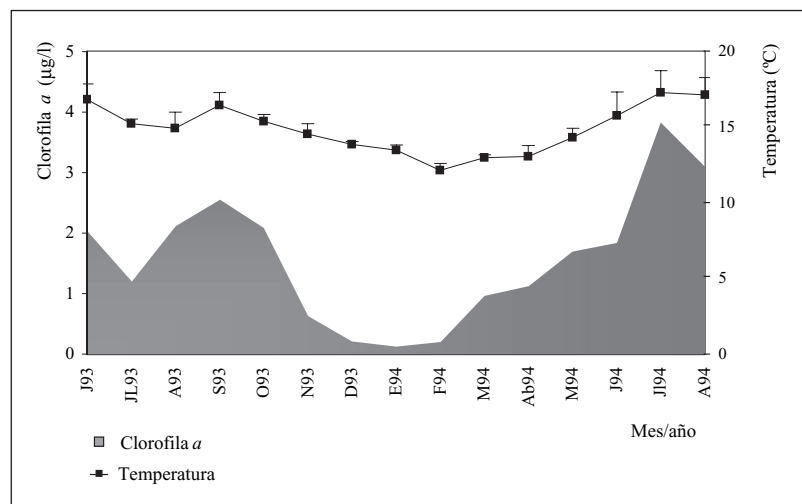


Figura 1. Evolución temporal de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y de la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{l}$) a lo largo del periodo de estudio.

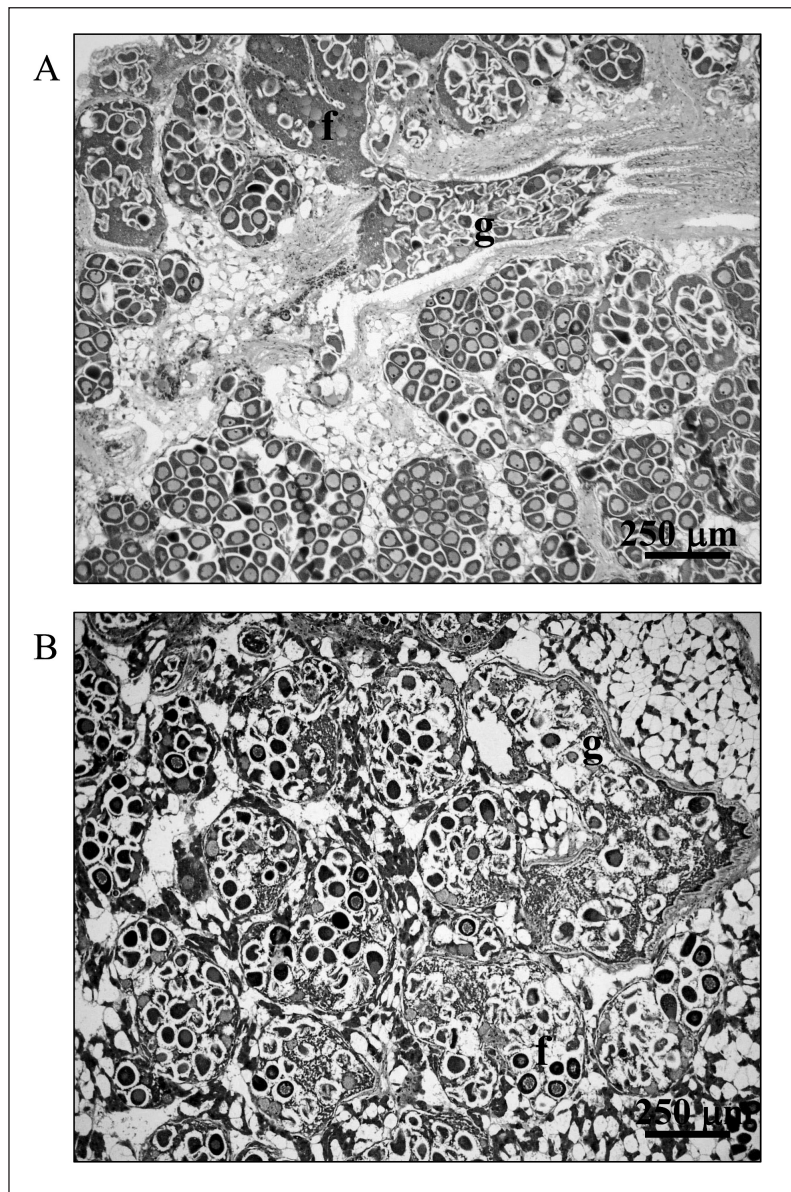


Figura 2. Atresia ovocitaria en hembras de *M. galloprovincialis* en invierno (A) y en verano al final del ciclo gonadal (B). La degradación de ovocitos tiene lugar en el interior de los folículos y en el gonoducto. (f): folículo; (g): gonoducto.

raturas y escasez de alimento), como también sugieren otros autores en diferentes especies (Sastry, 1979; Pipe, 1987a; Lubet *et al.*, 1987; Pardo Fernández, Matus de la Parra y San Juan Serrano, 2002; Galap, Le Boulenger y Grillot, 2004). Durante el invierno, la baja temperatura del agua, junto a un corto fotoperiodo y la escasez de alimento en el medio marino, parecen inhibir la puesta de los ovocitos formados. Al no existir puesta, los ovocitos dejan de ser viables y entran en atresia. También el pequeño número de gametos maduros que llegan al gonoducto son, en la mayoría de los casos, degradados a este nivel, sin llegar a ser emitidos, por lo que creemos que estas puestas invernales no son efectivas, siguiendo la opinión de Suárez *et al.*, 2005.

A la vista de nuestras observaciones, parece que la atresia invernal va emparejada a la formación de nuevas cohortes de gametos en los folículos y, a menudo, además, se produce también la degeneración de toda la estructura folicular, y su lugar es nuevamente ocupado por células del tejido de reserva, principalmente células adipogranulares. Algunos autores han sugerido que los productos derivados del material lisado podrían ser reabsorbidos por las células auxiliares, los hemocitos o las células epiteliales de los gonoductos (Pipe, 1987b; Lubet *et al.*, 1987; Dorange y Le Penneec, 1989; Le Penneec *et al.*, 1991). A la vista de los resultados, la ausencia de nutrientes durante todo el invierno lleva también a la hipótesis de la reabsorción y recu-

peración del material gonadal degradado y su acumulación, de nuevo, en las células de reserva. De esta forma, las reservas energéticas gastadas en formar las primeras cohortes de gametos podrían ser recicladas y mantenidas hasta su utilización efectiva en momentos ambientalmente favorables no solo para la puesta: también para la fecundación y el desarrollo embrionario y larvario.

A medida que se aproxima la primavera, la atresia disminuye hasta desaparecer. En ese momento, la temperatura, el aumento de nutrientes y, probablemente, también el aumento del fotoperiodo, como indican Fabioux *et al.* (2005), favorecen la maduración final y sincrónica de los gametos, concluyendo en puestas masivas que dejan los folículos completamente vacíos. Es en primavera cuando se producen las masivas puestas efectivas de *Mytilus* y cuando las concentraciones de larvas y semilla de este molusco son abundantes.

En verano se observa cómo los folículos se hacen cada vez más pequeños y contienen menor carga de gametos, aumentando nuevamente la intensidad de la atresia. En esta última etapa del ciclo parecen influir decisivamente las temperaturas relativamente altas que se alcanzan en julio-agosto, pudiendo determinar, junto a otros factores internos, la finalización del ciclo gametogénico y la degeneración y resorción total del tejido gonadal (figura 3).

El fenómeno de la atresia ovocitaria en moluscos bivalvos ha sido relacionado con la actividad lisoso-

mal de los propios ovocitos (Dorange y Le Pennec, 1989; Pipe y Moore, 1985; Pardo Fernández, Matus de la Parra y San Juan Serrano, 2002). En nuestro trabajo, el estudio de este fenómeno de degradación ovocitaria, en los distintos momentos del ciclo reproductor de *Mytilus* en los que aparece, se han establecido dos etapas consecutivas bien diferenciadas microscópicamente. En primer lugar, se produce una lisis de las estructuras citoplasmáticas y de la membrana de los ovocitos, probablemente mediada por los propios lisosomas, causando la vacuolización del ovoplasma, la rotura de las membranas y la salida del contenido citoplasmático. Esta lisis da lugar a imágenes de grandes masas de material citoplasmático disperso en el lumen folicular o en el gonoducto, con numerosos núcleos, de contorno más o menos definido, pero que aparecen teñidos con una coloración más translúcida que los núcleos de ovocitos normales, y sin nucleolo (figura 4a). A continuación, tiene lugar la degradación o digestión hemocitaria del material lisado. Asociado al fenómeno de atresia, aparece siempre una gran afluencia de hemocitos, que se localizan tanto en el lumen de los folículos como alrededor de éstos y en el gonoducto (figura 4b). Borzone, Pezzuto y Tabares (2003) indican también la aparición de amebocitos dominando el espacio interfolicular al final del ciclo reproductor del pectínido *Euvola ziczac* (L., 1758) (Borzone, Pezzuto y Tabares, 2003) en la fase que denominan de reversión. Estos hemocitos podrían estar impli-

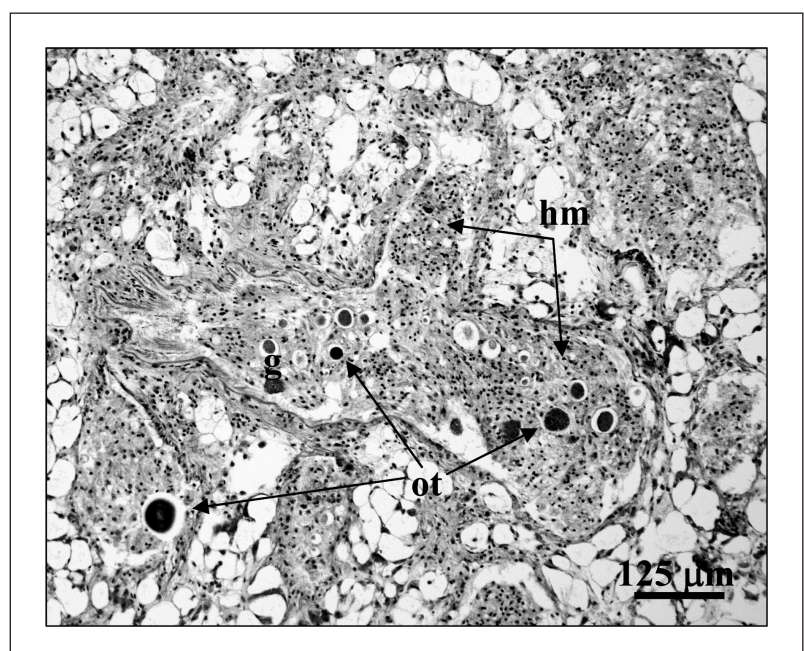


Figura 3. Al final del ciclo gonadal (verano) se produce, junto a una elevada atresia ovocitaria, la degeneración y resorción total de todas las estructuras gonadales. (ot): ovocitos atrésicos; (hm): hemocitos; (g): gonoducto.

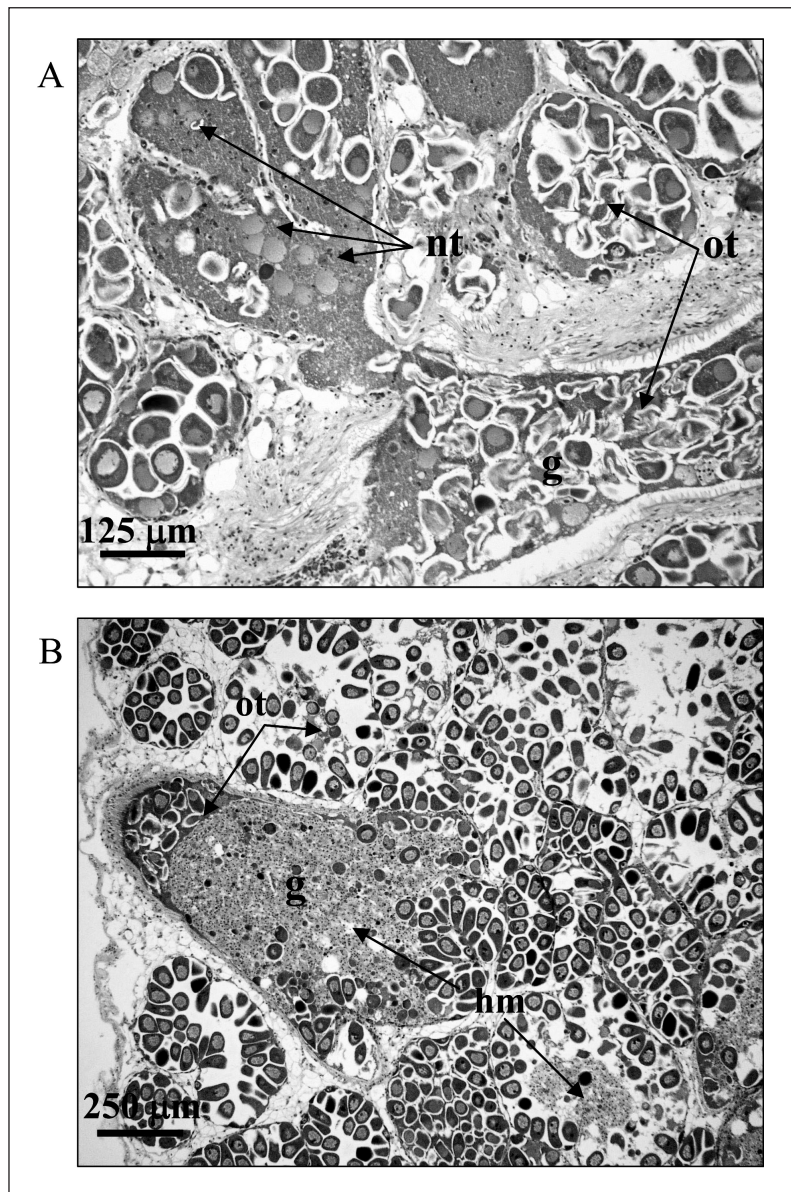


Figura 4. Etapas en el proceso de atresia ovocitaria. (A): autólisis de las membranas y estructuras citoplasmáticas de los ovocitos. (B): invasión de hemocitos en el lumen foliolar y en el gonoducto. (nt): núcleos atrésicos; (ot): ovocitos atrésicos; (hm): hemocitos; (g): gonoducto.

cados en la reutilización del material lisado, como sugiere Pipe (1987a).

En los espermatozoides, la lisis no es tan evidente como en los ovocitos, debido a que carecen prácticamente de citoplasma. Sin embargo, también se ha observado en machos la presencia de las grandes masas de hemocitos que acompañan a la lisis ovocitaria, tanto en el interior como en el exterior de los folículos (figura 5a) y en los gonoductos (figura 5b). Estas masas hemocitarias aparecen, además, en los mismos momentos del ciclo gametogénico en que se detectan fenómenos de atresia ovocitaria. Estos datos sugieren la existencia de atresia de los gametos masculinos, no descrita hasta el momento.

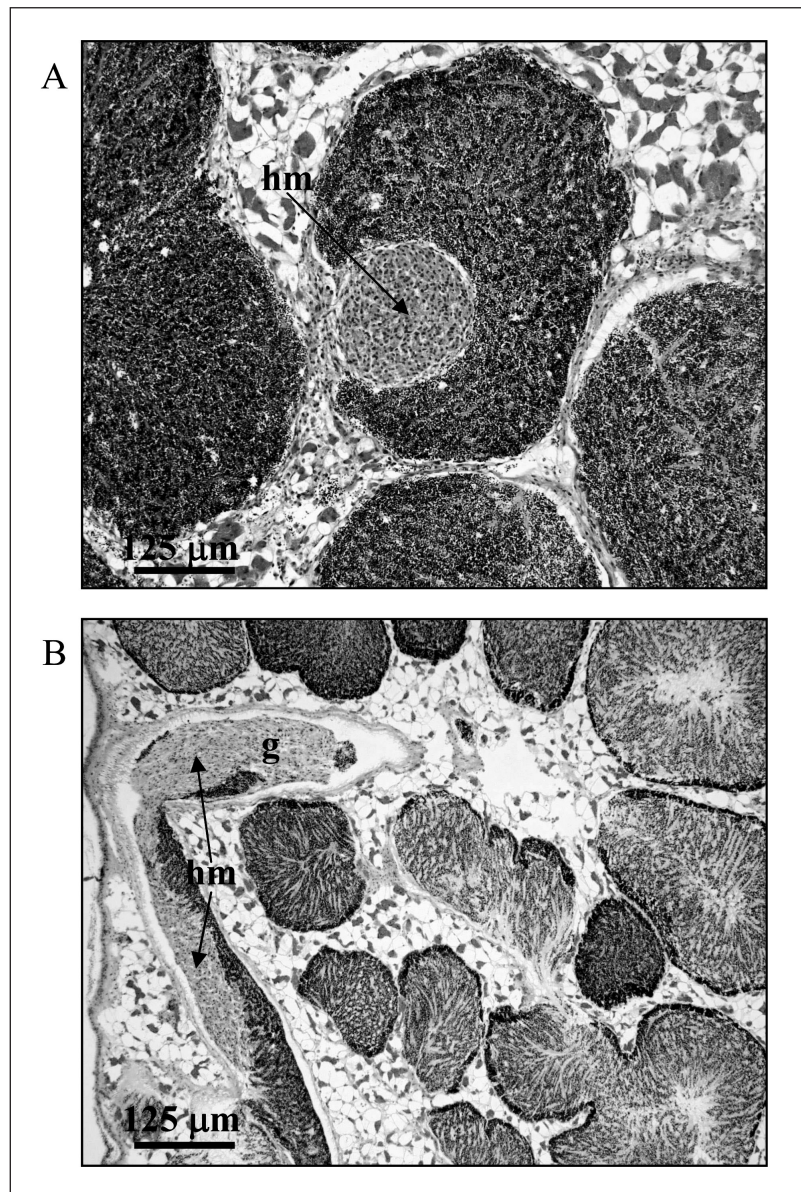
AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está incluido dentro de un proyecto subvencionado por la Xunta de Galicia (PGI-DIT03RMA30102PR) y la Universidad de Vigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Avendaño, M. y M. Le Pennec. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquaculture Research* 28: 175-182.
- Beninger, P. G. y M. Le Pennec. 1991. Functional anatomy of scallops. En: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Development in Aquaculture and Fisheries Science*. S.

Figura 5. Atresia de gametos en machos de *M. galloprovincialis*. La autólisis de membranas y estructuras citoplasmáticas no es evidente en espermatozoides por su reducido tamaño y por carecer de citoplasma. La invasión hemocitaria de la segunda etapa del proceso de atresia es observada tanto en el lumen folicular (A) como en el gonoducto (B). (hm): hemocitos; (g): gonoducto.



- Schumway (ed.) 2: 133-233. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Borzone, C. A., P. R. Pezzuto e Y. A. G. Tabares. 2003. Características histológicas del ciclo reproductivo de *Euvola ziczac* (Linnaeus) (Pectinidae, Bivalvia) del litoral sur-sudeste del Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 20: 763-772.
- Dorange, G. y M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from by the bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Fabioux C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Le Pennec y S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250: 458-470.
- Galap, C., F. Le Boulenger y J. P. Grillot. 2004. Seasonal variations in biochemical constituents during the reproductive cycle of the female dog cockle *Glycymeris glycymeris*. *Mar. Biol.* 129: 625-634.
- Hilbish, T. J. y K. M. Zimmerman. 1988. Genetic and nutritional control of the gametogenic cycle in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 98: 223-228.
- Le Pennec, M., P. G. Beninger, G. Dorange e Y. M. Paulet. 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten Maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Mar. Biol. Assoc. (UK)* 71: 451-463.
- Lowe, D. M. 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 91-100.
- Lubet, P., J. Y. Bernard, R. Faveris e I. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis* 13 (3): 265-290.
- Pardo Fernández, P., A. Matus de la Parra y F. San Juan Serrano. 2002. Búsqueda de marcadores de madurez de los gametos durante el ciclo gametogénico de *Crassostrea*

- gigas* (Thunberg, 1873). En: *VIII Congreso nacional de acuicultura: Acuicultura y desarrollo sostenible* (22-25 de mayo, 2001. Santander, Cantabria, España). I. Arnal Atarés, C. Fernández-Pato, C. Martínez-Tapia y C. Mosquera de Arancibia (eds.). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 165-173
- Paulet, Y. M., A. Gérard y A. Lucas. 1986. Reproduction strategy of two populations of *Pecten maximus*. En: *Advances in Invertebrate Reproduction*. M. Porchet, J. C. Andries y A. Dainhaut (eds.) 4: 1-535. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Pérez, A., R. González y J. Fuentes. 1991. Mussel culture in Galicia. *Aquaculture* 94: 263-78.
- Pipe, R. K. 1987a. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar. Biol.* 95: 405-414.
- Pipe, R. K. 1987b. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 96: 519-528.
- 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.
- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: *Reproduction of Marine Invertebrates: Pelecypods and Lesser Classes*. A. C. Giese y J. S. Pearse (eds.): 113-292. Academic Press. Nueva York.
- Seed, R. y T. H. Suchanek. 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. En: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. E. M. Gosling (ed.): 87-169. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Starr, M., J. H. Himmelman y J. Therriault. 1990. Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplankton blooms. *Science* 247: 1071-1074.
- Steele, S. y M. F. Mulcahy. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)* 79: 673-686.
- Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons. 1968. A practical handbook of sea water analysis. *Fish. Res. Board Can. Bull.* 167: 1-10.
- Suárez, M. P., C. Álvarez, P. Molist y F. San Juan. 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis*, cultured in the Estuary of Vigo. *J. Shellfish Res.* 24 (2): 531-540.
- Wang, C. y R. P. Croll. 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 238: 483-498.