

## Microanatomía del ovario y ovogénesis del anfípodo *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942

### Ovary microanatomy and oogenesis of amphipod *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942

Estela C. Lopretto<sup>1</sup>  
lopretto@fcnym.unlp.edu.ar

Bettina S. Gullo<sup>1</sup>  
bgullo@fcnym.unlp.edu.ar

## Resumen

El conocimiento de la gametogénesis en crustáceos permite diferenciar los estadios de desarrollo durante el ciclo reproductor e interpretar aspectos de su dinámica poblacional. Se realizó el estudio microanatómico del ovario y la ovogénesis del anfípodo dulceacuícola *Hyalella curvispina*. Los crustáceos fueron recolectados en el Arroyo Rivera (Saldungaray, provincia de Buenos Aires, Argentina). Se describieron los tipos celulares del ovario y se caracterizaron microscópicamente las células germinales (ovogonias, ovocitos en previtelogénesis, vitelogénesis incipiente y avanzada) y sus modificaciones a lo largo de la ovogénesis. El ovario se caracteriza por presentar una zonación intraovárica debido a que los elementos germinales se desarrollan en bandas longitudinales superpuestas. La ovogénesis comprende cuatro etapas: meiosis, previtelogénesis, vitelogénesis primaria y secundaria. Durante la vitelogénesis el ovocito I incrementa su talla nuclear y citoplasmática como producto de la síntesis y acumulación de las reservas. El vitelo resultante de la vitelogénesis primaria es endógeno. El marcado incremento en las tallas ovocitarias es concomitante con la aparición de las células foliculares, las que desempeñan un papel preponderante durante la vitelogénesis secundaria (exógena).

**Palabras clave:** histología, gónada, Amphipoda, agua dulce.

## Abstract

The knowledge of gametogenesis in crustaceans allows to differentiate the stages of development during the reproductive cycle and to interpret aspects of its population dynamics. A microanatomical study of the ovary and oogenesis of the freshwater amphipod *Hyalella curvispina* was performed. The crustaceans were collected in Arroyo Rivera (Saldungaray, Buenos Aires Province, Argentina). Ovarian cell types were described and germ cells (oogonies, oocytes in previtellogenesis, incipient and advanced vitellogenesis) and their modifications throughout oogenesis were characterized microscopically. The ovary is characterized by an intraovarian zonation because the germinal elements develop in superimposed longitudinal bands. Oogenesis comprises four stages: meiosis, previtellogenesis, primary and secondary vitellogenesis. During vitellogenesis, the oocyte I increases its nuclear and cytoplasmic size as a product of the synthesis and accumulation of the reserves. The yolk resulting from primary vitellogenesis is endogenous. The marked increase in oocyte sizes is concomitant with the appearance of follicular cells, which play a preponderant role during secondary (exogenous) vitellogenesis.

**Keywords:** histology, gonad, Amphipoda, freshwater.

<sup>1</sup> Cátedra Zoología Invertebrados I, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). 122 y 60, (1900) La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

## Introducción

Los anfípodos son crustáceos de particular interés debido a su importancia ecológica y su uso intensivo en bioensayos. En el caso de *Hyaella curvispina* y atendiendo a su amplia distribución geográfica, fácil cría en laboratorio (Somma *et al.*, 2011) y por ser parte de la fauna endémica de América del Sur, es el taxón más utilizado como organismo prueba tanto en bioensayos de toxicidad como en matrices acuosas (Ferrari, 2015; Peluso *et al.*, 2016).

La microanatomía de la gónada en crustáceos anfípodos ha sido estudiada en contadas especies de gammáridos: *Gammarus pulex* (LINNAEUS 1758) (Sutcliffe, 1992), *G. duebeni* LILLJEBORG 1852 (Schmitz, 1992), *G. lacustris* SARS 1864 (Schmitz, 1992) y en el talítrido *Orchestia gammarellus* (PALLAS 1766) (Meusy, 1963, 1968, 1980; Charniaux-Cotton, 1973, 1978, 1985; Zerbib, 1976, 1980; Charniaux-Cotton y Zerbib, 1979). En *H. curvispina* el primer estudio microanatómico del testículo y espermatogénesis fue abordado por Gullo *et al.* (2016).

Dado que la comprensión de la histología básica del ovario y ovogénesis de *Hyaella curvispina* es importante para diferenciar los estadios de desarrollo durante el ciclo reproductor e interpretar aspectos de su dinámica poblacional, el objetivo de este trabajo fue describir la microanatomía gonadal de esta especie.

## Materiales y métodos

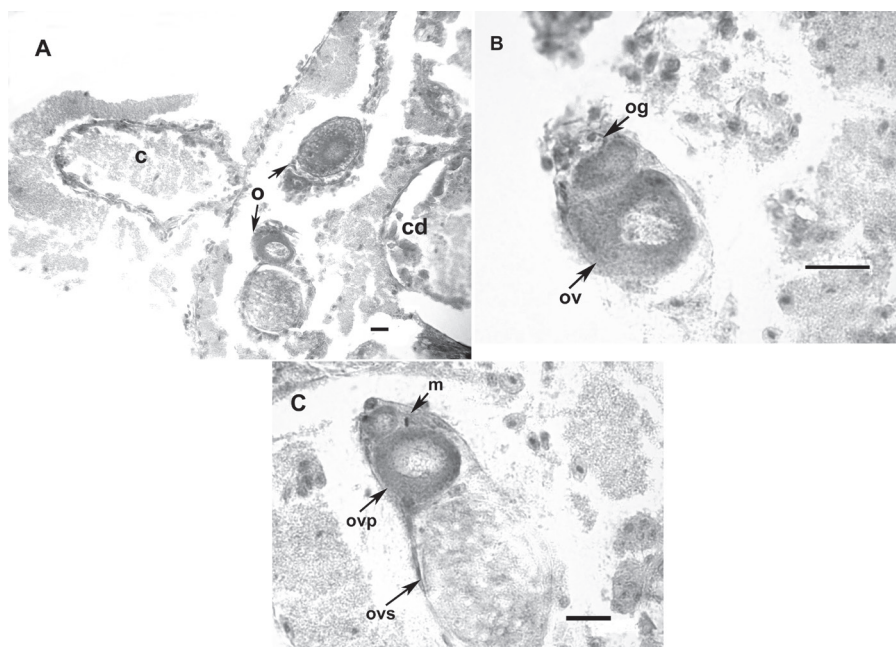
Las hembras de *Hyaella curvispina* fueron recolectadas en la misma localidad y período en que lo fueron los machos en una contribución anterior (Gullo *et al.*, 2016). Se trata del Arroyo Rivera (38° 18' S 61° 47' O; elevación 213 m) ubicado en Saldungaray (Partido de Tornquist) al sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina, utilizando un tamiz de 0,01 mm de abertura de malla.

Para el examen microanatómico fueron fijadas *in situ* y analizadas 30 hembras adultas empleando la metodología indicada en Gullo *et al.* (2016).

## Resultados

Los ovarios son pares y se ubican dorso-lateralmente al tubo digestivo y por debajo del sistema vascular (Figura 1A). Se extienden desde el segundo toracómero hasta casi la mitad del séptimo. Los estrechos oviductos se abren en la base de la quinta placa coxal.

La ovogénesis tiene lugar desde el borde interno al externo del ovario y se desarrolla en estratos longitudinales. En la capa germinativa se reconocen células foliculares y elementos germinales (ovogonias). En el siguiente estrato se ubican los ovocitos en profase de la primera división meiótica, en tanto los ovocitos en pre-



**Figura 1.** *Hyaella curvispina* hembra. A: Sección transversal del cuerpo. B-C: Secciones sagitales del ovario: etapa I de la ovogénesis. Corazón (c), ciegos digestivos (cd), mitosis (m), ovario (o), ovogonia (og), ovocito (ov), ovocito en vitelogénesis primaria (ovp), ovocito en vitelogénesis secundaria (ovs). Escalas: 20  $\mu$ m (A y C), 50  $\mu$ m (B).

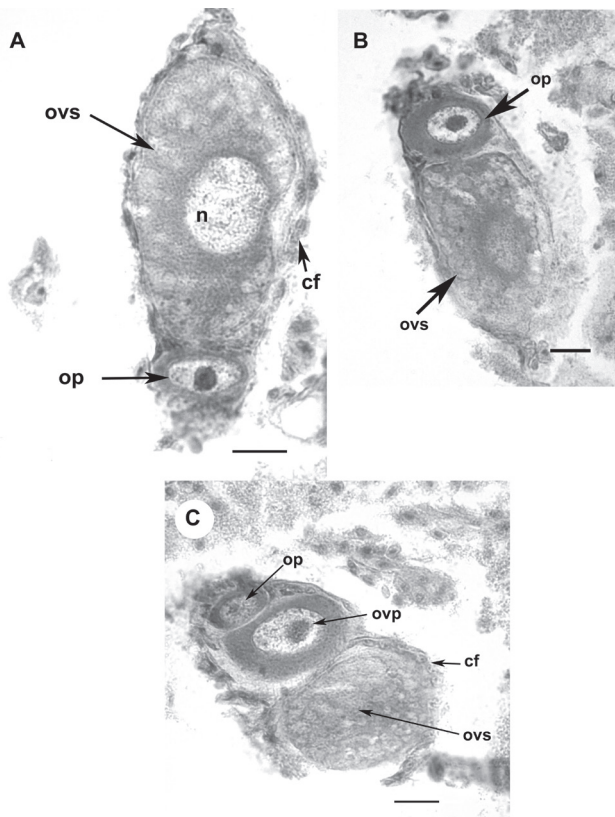
**Figure 1.** Female of *Hyaella curvispina*. A: Transverse section of the body. B-C: Sagittal sections of the ovary: oogenesis stage I. Heart (c), digestive caeca (cd), mitosis (m), ovary (o), oogonium (og), oocyte (ov), primary vitellogenesis of the oocyte (ovp), secondary vitellogenesis of the oocyte (ovs). Scale bars: 20  $\mu$ m (A and C), 50  $\mu$ m (B).

vitelogénesis y vitelogénesis ocupan el resto del ovario. Cuando se inicia la vitelogénesis el ovocito se rodea de células foliculares que se aplanan y conforman la envoltura folicular. Se reconocen cuatro fases que se describen a continuación:

- Etapa I, multiplicación de elementos germinales y meiosis. Las ovogonias presentan núcleo esférico o ligeramente oval y la cromatina tiene disposición perinuclear. El nucléolo es subcentral. Estas células se dividen mitóticamente y luego experimentan la profase de la primera división meiótica. La talla nuclear promedio es de  $9,94 \mu\text{m} \pm 0,97$ ;  $n = 5$  (Figuras 1B-C).
- Etapa II, previtelogénesis. Los ovocitos previtelogénicos se caracterizan por el incremento de la talla celular. Se evidencia basofilia en el citoplasma debido a la síntesis de vitelo aunque aún no son visibles los gránulos ni las placas. La talla nuclear promedio es

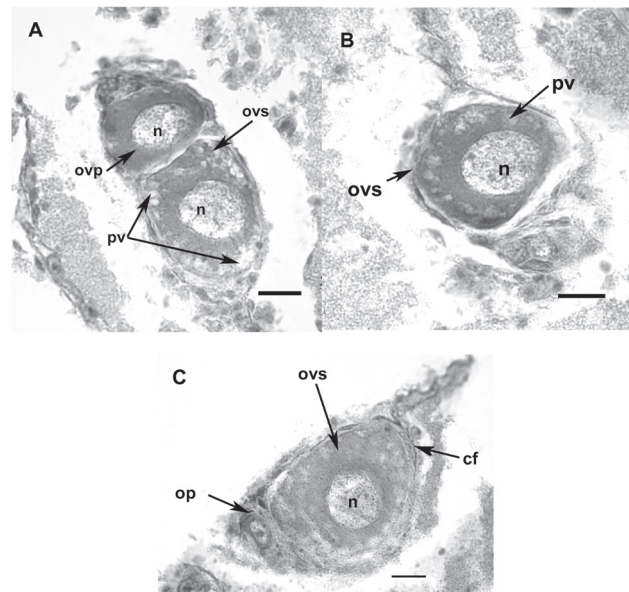
de:  $16,68 \mu\text{m} \pm 2,39$  y la talla citoplasmática es de  $24,85 \mu\text{m} \pm 2,89$ ;  $n = 10$  (Figuras 2A-B).

- Etapa III, vitelogénesis primaria (incipiente). Durante esta etapa los ovocitos se rodean de células foliculares. Se caracterizan por una marcada basofilia debida a la presencia de gránulos de vitelo. Se evidencia un incremento de la talla ovocitaria (talla nuclear promedio:  $20,15 \mu\text{m} \pm 1,802$ ; talla citoplasmática promedio:  $37,07 \mu\text{m} \pm 1,87$ ;  $n = 9$ ). En la periferia del ovocito no se observan aún placas de vitelo (Figura 2C).
- Etapa IV, vitelogénesis secundaria (avanzada). Durante esta última, el ovocito I crece acentuando su talla en el marco del proceso de vitelogénesis, que tiene lugar entre dos mudas sucesivas. Los ovocitos se caracterizan por el aumento en el número y tamaño de las placas de vitelo, que se desplazan en dirección al núcleo. Son ligeramente poligonales y muy eosinófilas (talla:  $9,94 \mu\text{m} \pm 0,917$ ). Las placas se disponen formando varios verticilos, lo cual incrementa marcadamente la talla promedio del ovocito (nuclear:  $23,07 \pm 1,87$ ; citoplasmática:  $57,15 \mu\text{m} \pm 3,11$ ;  $n = 10$ ). Esta talla corresponde al inicio de la vitelogénesis secundaria. La disposición verticilar de las placas de vitelo se mantiene hasta completar el desarrollo del ovocito (Figuras 3A-C).



**Figura 2.** Secciones sagitales del ovario de *Hyalella curvispina*. A-B: Etapa II de la ovogénesis. C: Etapa III de la ovogénesis. Células foliculares (cf), núcleo (n), ovocito en previtelogénesis (op), ovocito en vitelogénesis primaria (ovp), ovocito en vitelogénesis secundaria (ovs). Escalas: 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Sagittal sections of the ovary of *Hyalella curvispina*. A-B: Oogenesis stage II. C: Oogenesis stage III. Follicular cells (cf), nucleus (n), oocyte in previtellogenesis (op), primary vitellogenesis of the oocyte (ovp), secondary vitellogenesis (ovs). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Secciones sagitales del ovario de *Hyalella curvispina*. A-C: Etapa IV de la ovogénesis. Células foliculares (cf), núcleo (n), ovocito en previtelogénesis (op), ovocito en vitelogénesis primaria (ovp), ovocito en vitelogénesis secundaria (ovs), placas de vitelo (pv). Escalas: 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3.** Sagittal sections of the ovary of *Hyalella curvispina*. A-C: Oogenesis stage IV. Follicular cells (cf), nucleus (n), oocyte in previtellogenesis (op), primary vitellogenesis of the oocyte (ovp), secondary vitellogenesis (ovs), yolk plates (pv). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .

## Discusión

La estructura del ovario y ovogénesis de *Hyalella curvispina* presenta similitudes a las observadas en *Orchestia gammarellus* (Charniaux-Cotton, 1973, 1978, 1985; Meusy, 1963; Zerbib, 1980), en particular en las características nucleares de la línea germinal y en el crecimiento del ovocito.

La ovogénesis en *H. curvispina*, que se desarrolla en estratos longitudinales como en *O. gammarellus* (Meusy, 1963), ha sido dividida en cuatro etapas siguiendo el criterio de Zerbib (1980): (I) multiplicación de elementos germinales y meiosis, (II) previtelogénesis, (III) vitelogénesis primaria y (IV) vitelogénesis secundaria, teniendo en cuenta las variaciones en la relación talla nuclear-citoplasmática, presencia y evolución de las reservas.

La etapa I en *H. curvispina* se pone en evidencia por la presencia de ovogonias y por la multiplicación de los elementos germinales que precede a la meiosis, aunque a diferencia *O. gammarellus* (Meusy, 1963; Zerbib, 1980) no fue posible observar figuras profásicas.

La etapa II y tal como sucede en *O. gammarellus* se caracteriza por un marcado incremento en la talla del ovocito y un aumento en la basofilia citoplasmática, lo cual se vincula con la síntesis de proteínas si bien no son visibles aún gránulos ni placas de vitelo.

Durante la etapa III el ovocito se rodea de células foliulares. Aumenta la basofilia citoplasmática lo cual se vincula con la síntesis de vitelo. Esta etapa es comparable a la vitelogénesis endógena de *O. gammarellus*.

En la etapa IV son visibles gránulos acidófilos; su densidad en la periferia del ovocito y el sentido centrípeto de desplazamiento (hacia la región perinuclear) sugiere que las células foliculares desempeñan un rol importante en esta etapa, que es comparable con la vitelogénesis exógena de *O. gammarellus*. Es posible que se incorporen aquí compuestos distintos al ovocito como ocurre en crustáceos superiores, donde es bien conocida la naturaleza de las reservas (Charniaux-Cotton, 1978; Meusy, 1980; Adiyodi y Subramonian, 1983).

## Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los dos revisores por sus valiosas sugerencias. Este trabajo fue subsidiado por el Proyecto 11/N675-2012-2015 acredi-

tado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, Argentina).

## Referencias

- ADIYODI, K.G.; SUBRAMONIAN, T. 1983. Arthropoda-Crustacea. In: K.G. ADIYODI; R.G. ADIYODI (eds.), *Reproductive biology of invertebrates. Vol. 1: Oogenesis, oviposition and oosorption*. London, John Wiley & Sons. p. 443-495.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1973. Description et contrôle de l'ovogenèse chez les Crustacés supérieurs. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, **13(Hors-série)**:21-37. <https://doi.org/10.1051/rnd:19730502>
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1978. L'ovogenèse, la vitellogénine et leur contrôle chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Comparaison avec d'autres Malacostracés. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **119**:365-397.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoologist*, **25**(1):197-206.
- FERRARI, L. 2015. La ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: el caso del río Reconquista. *Ciencia e Investigación*, **65**(2):17-35.
- GULLO, B.S.; VIRGOLINI M.B.; LOPRETTO, E.C. 2016. Microanatomía del testículo y espermatogénesis del anfípodo *Hyalella curvispina* Shoemaker 1942. *Neotropical Biology and Conservation*, **11**(2):80-85. <https://doi.org/10.4013/nbc.2016.112.04>
- MEUSY, J.J. 1963. La gamétogénese d'*Orchestia gammarella* Pallas, Crustacea Amphipoda. *Bulletin Société Zoologique de France*, **88**(2-3):197-221.
- MEUSY, J.J. 1968. Ultrastructure de la zone germinative et des gonies du testicule et de l'ovaire d'*Orchestia gammarella* P. (Crustacé Amphipode). *Annales des Sciences Naturelles Zoologie Paris*, 12<sup>e</sup> Série, **10**:102-116.
- MEUSY, J.J. 1980. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea: A review. *Reproduction Nutrition Development*, **20**(1A):1-21. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800101>
- PELUSO, M.L.; SALIBIÁN, A.; RONCO, A.E. 2016. Esquema para la categorización de la peligrosidad de sedimentos de fondo contaminados de sistemas fluviales. *Limnetica*, **35**(1):159-174.
- SCHMITZ, E.H. 1992. Amphipoda. In: W.H. FREDERICK; A.G. HUMES (eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 9. Crustacea*. New York, John Wiley & Sons, p. 443-528.
- SOMMA, A.; GIUSTO, A.; FERRARI, L. 2011. *Manual de producción de Hyalella curvispina en laboratorio*. Ushuaia, Editorial Utopías, 25 p.
- SUTCLIFFE, D.W. 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum*, **2**(2):102-128.
- ZERBIB, C. 1976. Nature chimique des enclaves vitellines de l'ovocyte du Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). *Annales d'Histochimie*, **21**:279-295.
- ZERBIB, C. 1980. Ultrastructural observation of oogenesis in the Crustacea Amphipoda *Orchestia gammarellus* (Pallas). *Tissue and Cells*, **12**(1):47-62. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(80\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(80)90051-8)

Submitted on November 11, 2016

Accepted on March 15, 2017