
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

EMMA FACCHINI PAJETTA, GIULIO LANZAVECCHIA

Morfologia ultrastrutturale degli oociti in fase previtellogenetica di *Carassius auratus* Linn

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.6, p.
1140–1145.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_6_1140_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Morfologia ultrastrutturale degli oociti in fase previtellogenetica di Carassius auratus Linn* (*). Nota di EMMA FACCHINI PAJETTA e GIULIO LANZAVECCHIA, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — Oocytes of *Carassius auratus* Linn., before the beginning of yolk synthesis, have been studied by means of electron microscopy. During this period of development, it is possible to recognize in the growing oocytes a succession of morphological steps, i.e., cytolisome formation related to the elimination of useless substances and organelles; relationships between nucleus and mitochondria, and mitochondrial multiplication; increasing of cytoplasmic basophilia; cortex evolution and beginning of pinocytotic activity on the oocyte surface.

L'accrescimento degli oociti, anche a prescindere dai fenomeni nucleari, può essere distinto in due fasi principali. La prima, previtellogenetica, ha la funzione di predisporre l'oocita ad intraprendere la seconda fase, vitellogenetica, nel corso della quale la cellula si carica di materiale di riserva.

In questa Nota vengono descritte le caratteristiche morfologiche ultrastrutturali degli oociti di *Carassius auratus* Linn. nel corso della loro prima fase di sviluppo. Alcuni problemi della vitellogenesi e previtellogenesi degli oociti dei Teleostei sono già noti per le osservazioni di alcuni Autori, anche al microscopio elettronico (Zahnd e Porte, 1962, 1963; Chambolle e coll., 1962; Porte e Zahnd, 1962; M. Yamamoto, 1963, 1964; K. Yamamoto e Onozato, 1965). Tuttavia esistono ancora controversie e dubbi di interpretazione, in parte dipendenti dal fatto che le osservazioni si riferiscono ad animali diversi, ed in parte alla incompletezza delle osservazioni stesse.

Le ovaie, esaminate secondo le tecniche istologiche classiche, mostrano un aspetto costante negli individui sessualmente maturi durante l'intero periodo dell'anno. Ciascuna ovaia è suddivisa in lobi alle cui pareti sono addossati gli elementi più piccoli. Questi, nel corso dell'accrescimento, si spingono verso il centro dei lobi, mescolandosi con gli oociti di maggiori dimensioni. In uno stesso lobo si possono così trovare frammisti oociti di varie dimensioni. Ciascun oocita è circondato da uno strato di cellule follicolari, e quindi dalle cellule della teca, tra cui si osservano i capillari.

MATERIALI E METODI.

Oociti di *Carassius auratus* Linn. sono stati prelevati dalle ovaie di animali appena uccisi e fissati in acido osmico 1% secondo Millonig (1961). La disidratazione e la successiva inclusione in Vestopal W sono state effettuate

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano (Sezione di Microscopia elettronica «Fondazione C. Erba») dal Gruppo di ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 22 giugno 1966.

secondo le tecniche usuali. Le sezioni, ottenute con l'Ultratome LKB, « colorate » con acetato di uranile e idrossido di piombo, sono state esaminate con il microscopio elettronico Hitachi HS 7.

OSSERVAZIONI.

Gli oociti più piccoli che sono stati esaminati per questa ricerca (diametro di 20 μ circa), sono già completamente rivestiti da uno strato di cellule follicolari che aderiscono ad essi senza l'interposizione di una membrana vitellina (Tav. I, fig. 1; Tav. III, fig. 9; Tav. IV, fig. 14). Le cellule follicolari sono estremamente appiattite, con grosso nucleo e pochi e grandi mitocondri; esse sono separate mediante una membrana basale dalle cellule della teca. Queste ultime sono disposte a formare un unico strato cellulare (alcuni lembi citoplasmatici possono tuttavia essere parzialmente sovrapposti), che si solleva in corrispondenza dei capillari sanguigni, situati esternamente alla membrana basale (Tav. III, fig. 9). Il citoplasma di questi oociti, che non modificano sensibilmente la loro morfologia fino al raggiungimento di un diametro di circa 50 μ , risulta molto povero di organuli: il reticolo endoplasmico è praticamente assente, i ribosomi sono scarsi e così pure i mitocondri ed i corpi di Golgi (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 5). Raramente si osservano dei mitocondri con poche o nessuna cresta e con la matrice completamente sostituita da una massa di alta densità elettronica, a struttura chiaramente cristallina. Le immagini ottenute sono troppo scarse per consentire uno studio della organizzazione spaziale di tali cristalli: essi appaiono solo caratterizzati da sistemi di linee parallele, regolarmente spaziate di circa 130 Å (Tav. II, fig. 8). Per tale carattere e per la localizzazione all'interno dei mitocondri, questi cristalli appaiono simili a quelli del vitello endomitocondriale II, descritti negli oociti di *Rana esculenta* (Lanzavecchia, 1966). Va tuttavia fatto presente che essi sono stati osservati solo in stadi molto precoci di sviluppo, prima della moltiplicazione dei mitocondri.

In prossimità della superficie di oociti di 20–25 μ di diametro si osservano frequentemente dei gruppi di corpi a morfologia complessa e varia, delimitati da una membrana, e contenenti internamente dei sistemi concentrici di membrane (formazioni mieliniche), ovvero tubuli regolarmente orientati. Per la loro morfologia essi dimostrano chiaramente di appartenere alla categoria dei vacuoli autofagici o citolisomi (Tav. IV, figg. 14, 15 e 16). Queste osservazioni risultano praticamente identiche a quelle condotte su oociti di diversi Anfibi in stadi analoghi di sviluppo (Lanzavecchia, 1966), e che vennero interpretati come la manifestazione morfologica di un processo di eliminazione e distruzione di sostanze od organuli prima dell'inizio del nuovo ciclo di attività dell'oocita. Sembra che la stessa funzione possa essere attribuita ai citolisomi degli oociti del pesce rosso. Analogamente a quanto è stato osservato per gli Anfibi, questi citolisomi hanno una vita molto breve, e non sono più reperibili nei successivi stadi di sviluppo dell'oocita.

Alla scomparsa dei citolisomi segue un periodo essenzialmente caratterizzato dalla moltiplicazione del condrioma, e da un aumento generale della basofilia citoplasmatica. Il cortex per contro continua a rimanere identico a quello precedentemente descritto, senza che si formino nè microvilli nè uno spazio perivitellino tra l'oocita e le cellule follicolari. Il nucleo incomincia in questo periodo a complicare la propria membrana, che diventa variamente ripiegata, per cui la superficie di scambio con il citoplasma risulta notevolmente sviluppata (Tav. I, fig. 2). In accordo con quanto osservato in tutti gli oociti, i pori della membrana nucleare sono particolarmente numerosi (Tav. I, fig. 3). Il nucleoplasma appare costituito da materiale di scarsa densità, a struttura finemente dispersa. In esso non si osservano strutture definite all'infuori dei nucleoli, che, come in tutti i tessuti in rapido accrescimento, sono assai grandi. Essi inoltre sono numerosi e distribuiti alla periferia del nucleo. Nel citoplasma, soprattutto in prossimità della membrana nucleare, si notano delle masserelle di materiale finemente granulare, la cui morfologia pare identica a quella della *pars amorpha* dei nucleoli (Tav. I, figg. 2, 3 e 4). Materiale analogo è stato osservato intorno al nucleo di diversi oociti, ed è stato interpretato generalmente come proveniente da tale organulo (Miller, 1962; Lanzavecchia, 1962; Lanzavecchia e Mangioni, 1963; Balinsky e Devis, 1963; Kessel, 1966). Quanto alla sua natura chimica le opinioni sono ancora controverse, così come è ancora dubbio il suo significato. Secondo le osservazioni di Kessel (1966) sarebbe materiale ribonucleico da considerarsi quale precursore dei ribosomi. In tale senso vi sarebbe accordo con l'opinione di André (1962) a proposito del « cemento » intramitocondriale negli spermatozoi di ratto. Intorno a tali masse di materiale si osservano alcuni mitocondri che vanno via via aumentando di numero (Tav. II, figg. 5, 6 e 7), costituendo delle formazioni di dimensioni cospicue in cui mitocondri e materiale nucleare sono strettamente associati. Come è già stato fatto rilevare in altri oociti (Lanzavecchia, 1962; Lanzavecchia e Mangioni, 1963), l'associazione tra mitocondri e materiale nucleare coincide con l'inizio di quel processo di rapida moltiplicazione del condrioma che caratterizza il periodo di maturazione dell'oocita precedente la vitellogenesi. Già da tempo del resto Chèvremont e Frédéric (1951) avevano messo in evidenza l'importanza dei rapporti nucleo-citoplasmatici nella moltiplicazione del condrioma. Un fenomeno analogo a quello descritto negli oociti di Pesci, Anfibi ecc., può essere considerato quello che si realizza nell'oocita umano, in quella fase precoce di sviluppo caratterizzata dalla migrazione dei mitocondri a ridosso della membrana nucleare (Lanzavecchia e Mangioni, 1964).

In questo periodo di sviluppo cominciano a formarsi sul cortex i primi villi, la cui presenza condiziona ovviamente la comparsa tra oocita e cellule follicolari di uno spazio che diventerà sede della membrana vitellina (Tav. III, fig. 10). I villi tuttavia si cominciano a formare solo in zone circoscritte del cortex, ove costituiscono dei ciuffi che vanno via via estendendosi (Tav. III, fig. 11). In rapporto ai villi cominciano ad apparire anche vescicole di pino-citosi (Tav. III, figg. 10 e 11; Tav. IV, fig. 13). Quando tutto l'oocita è cir-

condato da una serie continua di villi che si proiettano nello spazio perivitellino, inizia la deposizione di una membrana vitellina, che appare al microscopio elettronico come materiale denso agli elettroni, finemente granulare o filamentoso che incomincia ad apparire a ridosso dell'oocita e va man mano aumentando di spessore (Facchini Pajetta, 1966) (Tav. III, fig. 12; Tav. IV, fig. 13). Questa membrana vitellina forma intorno all'oocita una sorta di lamina cribrosa, essendo perforata in rapporto ai villi del cortex che si prolungano fino a toccare le cellule follicolari. Durante il processo di ispessimento di questa membrana vitellina il citoplasma si arricchisce di un altissimo numero di mitocondri, i quali appaiono per lo più liberi, pur esistendone ancora alcuni addossati al materiale nucleare. Anche i ribosomi sono estremamente numerosi, ed appaiono distribuiti con una certa uniformità nel citoplasma, mentre non si osservano chiari raggruppamenti di tipo polisomico. I ribosomi sono tuttavia assenti nell'asse citoplasmatico dei microvilli, il quale si prolunga per un breve tratto anche all'interno dell'oocita. Il reticolo endoplasmatico ed i corpi di Golgi presentano uno sviluppo piuttosto scarso, e ciò può essere correlato con il fatto che l'oocita è in una fase di attività ridotta. L'oocita sembra tuttavia avere raggiunto le condizioni strutturali che gli consentono di iniziare il processo di vitellogenesi: infatti negli oociti che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo ora descritto cominciano gradatamente a comparire i primi piccoli globuli vitellini, accompagnati da una serie di variazioni nell'architettura del citoplasma che verranno descritte in una successiva Nota. Tale passaggio alla fase vitellogenetica si realizza comunque con notevole gradualità, il che non permette di tracciare un limite netto tra questa fase e la precedente di previtellogenesi. Le osservazioni che sono state condotte su quest'ultima fase permettono di riconoscere in essa l'esistenza di una serie regolare di eventi che hanno la funzione di organizzare l'oocita onde consentirgli di iniziare la vitellogenesi: eliminazione delle sostanze od organuli inutili mediante formazione di citolisomi; moltiplicazione dei mitocondri; aumento della basofilia citoplasmatica; sviluppo della superficie del cortex ed inizio dell'attività pinocitotica.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. ANDRÉ, « J. Ultrastructure Research », suppl. 3, 1 (1962).
- [2] B. I. BALINSKY e R. J. DEVIS, « Acta Embryol. et Morphol. Exptl. », 6, 55 (1963).
- [3] P. CHAMBOLE, R. CAMBAR e P. GENDRE, « C. R. Soc. Biol. », 156, 2018 (1962).
- [4] M. CHÉVREMONT e J. FRÉDÉRIC, « C. R. Soc. Biol. », 145, 1245 (1951).
- [5] E. FACCHINI PAJETTA, *Atti V Congr. It. Micr. Elettr.*, Bologna, (1966, in corso di stampa).
- [6] R. G. KESSEL, « J. Ultrastructure Research », 15, 181 (1966).
- [7] G. LANZAVECCHIA, in S.S. BRESE JR. Ed., *Electron Microscopy*, Academic Press, New York (1962), Vol. 2, ww 13.
- [8] G. LANZAVECCHIA, « Atti Accad. Naz. Lincei (Memorie Sci. fis. mat. nat.) », 8, 1 (1966).
- [9] G. LANZAVECCHIA e C. MANGIONI, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) » B97, 341 (1963).
- [10] G. LANZAVECCHIA e C. MANGIONI, « J. Microscopie », 3, 447 (1964).

- [11] O. L. MILLER Jr., in S.S. BRESEE Jr. Ed., *Electron Microscopy*, Academic Press, New York (1962), Vol. 2, nn. 8.
- [12] G. MILLONIG, « J. Appl. physics », **32**, 1632 (1961).
- [13] A. PORTE et J. P. ZAHND, « C.R. Soc. Biol. », **156**, 912 (1962).
- [14] K. YAMAMOTO e H. ONOZATO, « Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ. », **13**, 79 (1965).
- [15] M. YAMAMOTO, « J. Fac. Sci. Univ. Tokyo », **10**, 123 (1963).
- [16] M. YAMAMOTO, « J. Fac. Sci. Univ. Tokyo », **10**, 335 (1964).
- [17] J. P. ZAHND e A. PORTE, « C.R. Soc. Biol. », **156**, 915 (1962).
- [18] J. P. ZAHND e A. PORTE, « C.R. Soc. Biol. », **157**, 1793 (1963).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I.

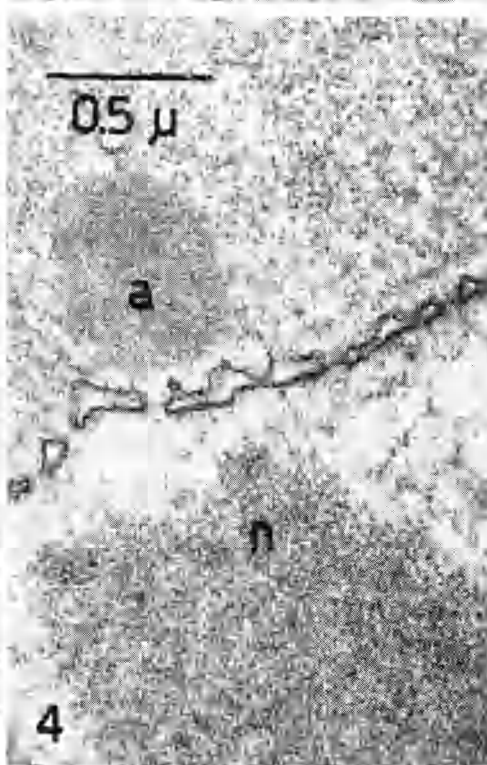
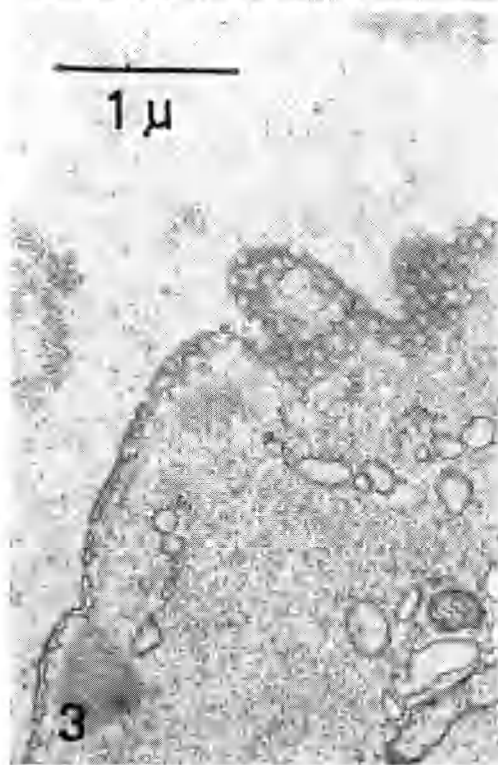
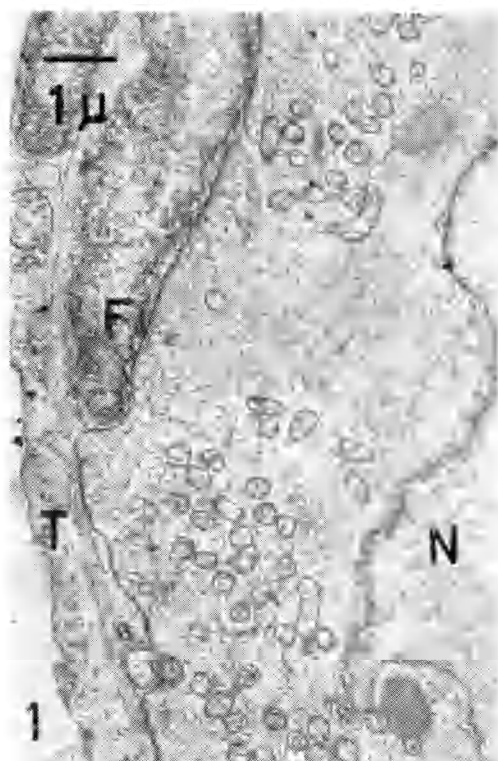
- Fig. 1. - Piccolo oocita (diametro di circa 25 μ). Nel citoplasma si osservano mitocondri e masse di materiale in prossimità della membrana nucleare. N = nucleo dell'oocita F = cellula follicolare; T = cellula tecale. Tra questa ultima e la cellula follicolare è visibile la membrana basale. Le membrane dell'oocita e della cellula follicolare decorrono parallelamente senza che sia visibile tra esse uno spazio perivitellino. ($\times 9.000$).
- Fig. 2. - Aspetto della membrana nucleare in un oocita di 50 μ di diametro. Sono visibili numerosi pori tagliati trasversalmente. Nel citoplasma si osservano masse di materiale finemente granulare, una delle quali è in rapporto con un piccolo mitocondrio ($\nearrow$). N = nucleo. ($\times 17.000$).
- Fig. 3. - Aspetto della membrana nucleare in una sezione parzialmente tangente la superficie. I pori nucleari appaiono come piccoli cerchi con diametro interno di circa 700 Å. All'interno di alcuni di essi è visibile un granulo di materiale opaco. ($\times 24.000$).
- Fig. 4. - Aspetto a maggiore ingrandimento del limite tra nucleo e citoplasma. La struttura della *pars amorpha* del nucleolo (n) e del materiale opaco perinucleare (a) appare identica. ($\times 45.000$).

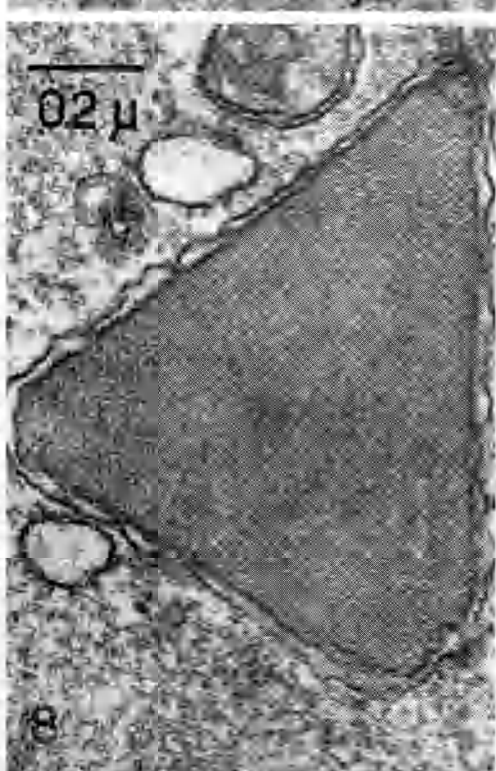
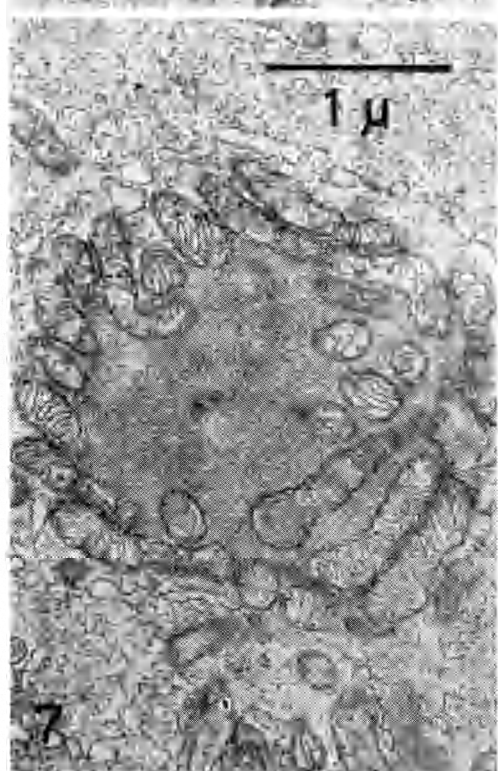
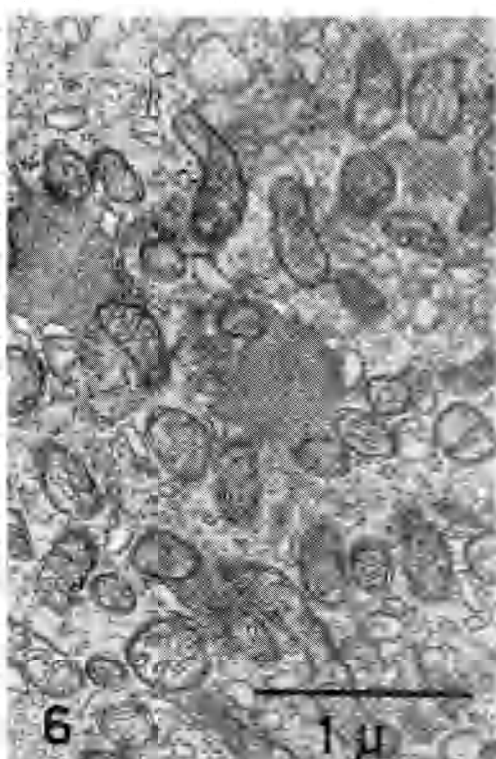
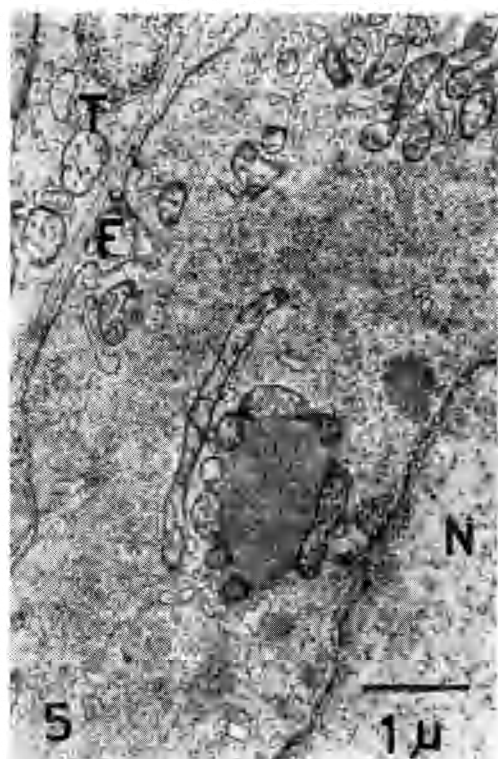
TAVOLA II.

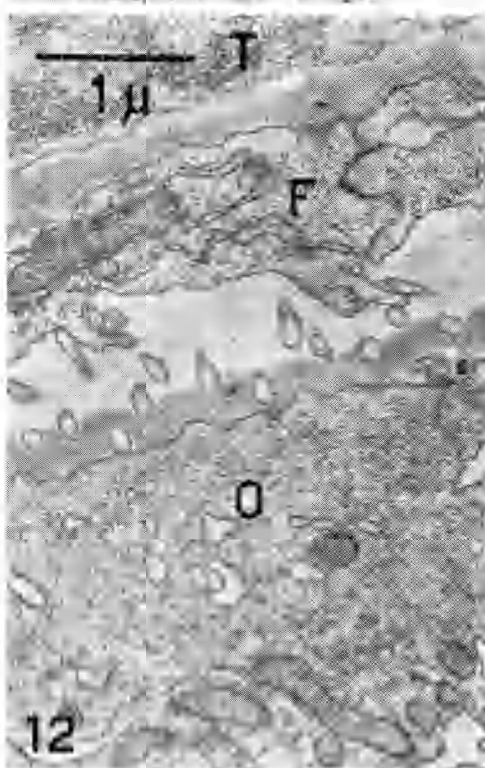
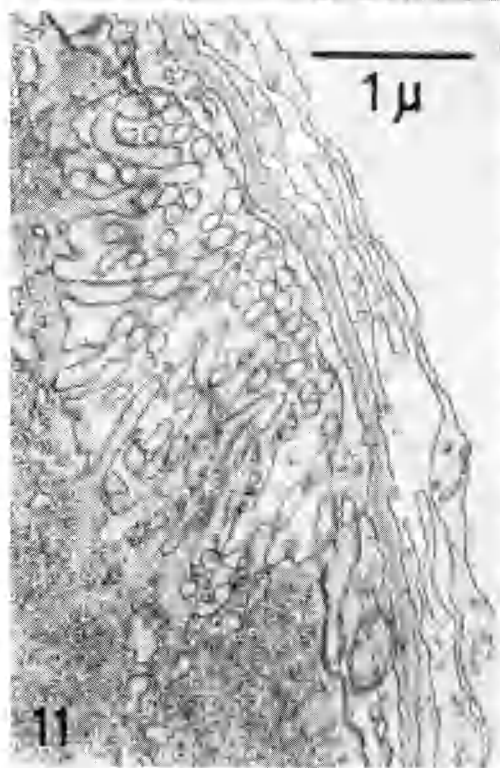
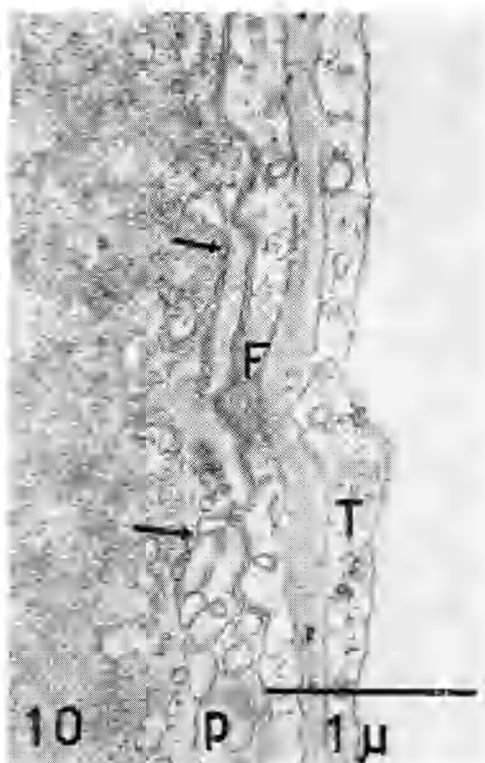
- Fig. 5. - Relazioni tra mitocondri e materiale amorfo perinucleare in un oocita di 25 μ di diametro. N = nucleo; F = cellula follicolare; T = cellula della teca. ($\times 14.000$).
- Fig. 6. - Relazioni tra mitocondri e materiale amorfo perinucleare in un oocita di circa 40 μ di diametro. ($\times 28.000$).
- Fig. 7. - Raggruppamento di mitocondri attorno ad una massa di materiale perinucleare. ($\times 24.000$).
- Fig. 8. - Oocita di 25 μ di diametro. Mitocondrio contenente all'interno un cristallo triangolare di materiale di alta densità elettronica. ($\times 75.000$).

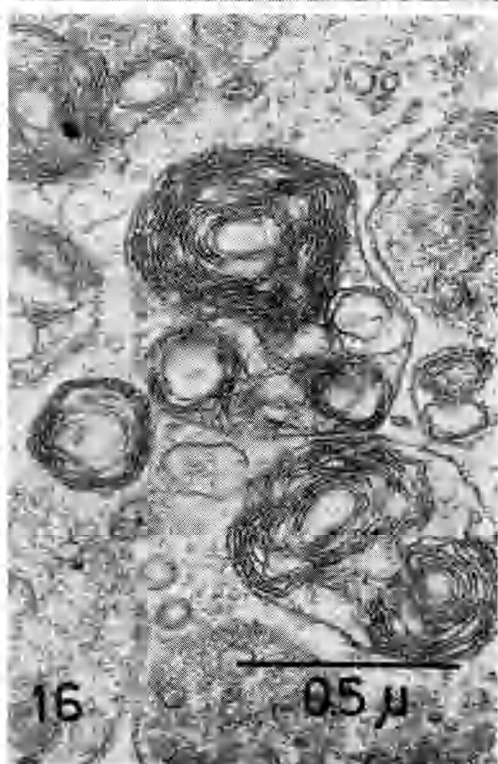
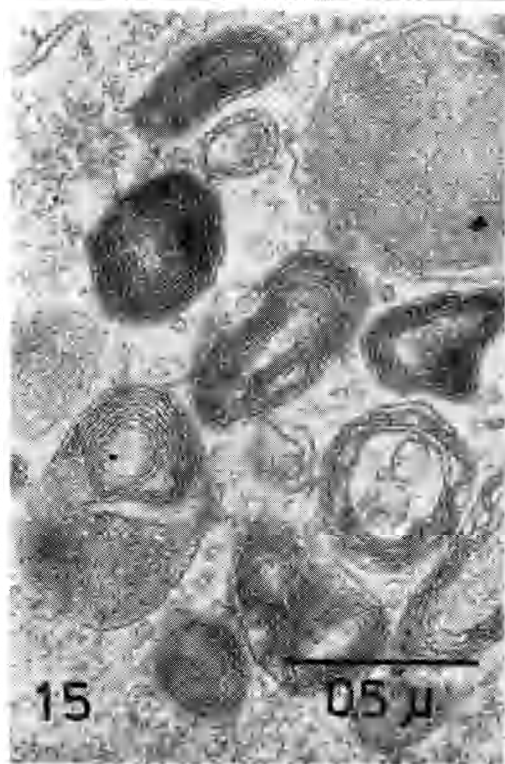
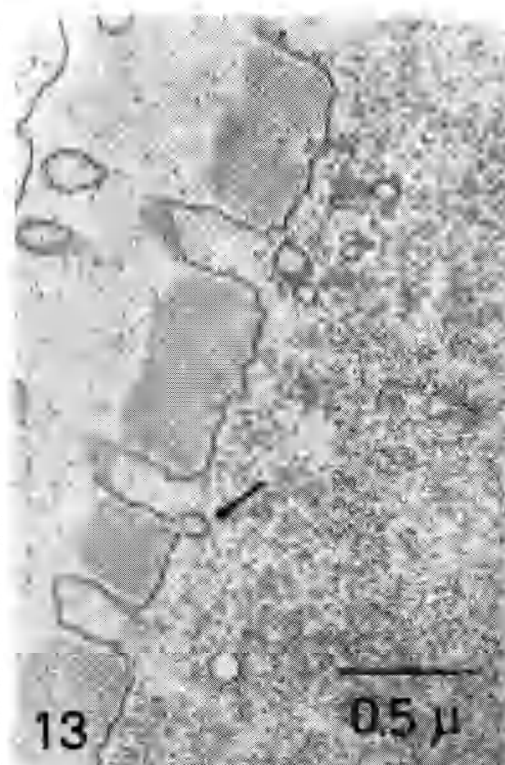
TAVOLA III.

- Fig. 9. - Oocita di 20 μ di diametro, rivestito da un sottile lembo di una cellula follicolare. Questa è separata da una membrana basale dalle cellule della teca (T) che sono sollevate sull'oocita per consentire il passaggio di un capillare e la presenza di altri elementi cellulari, probabilmente fibrociti. ($\times 17.000$).









- Fig. 10. — Superficie di un oocita all'inizio del processo di formazione dello spazio perivitellino (p) e dell'attività pinocitosica ($\nearrow$). F = cellula follicolare; T = cellula della teca ($\times 28.000$).
- Fig. 11. — Ciuffo di villi variamente sezionati che si proiettano nello spazio perivitellino. Ai lati di esso (in alto e in basso nella fotografia) l'ocita e le cellule follicolari sono ancora in stretto contatto. Non si osserva alcuna traccia della membrana vitellina, mentre sono numerose le vescicole di pinocitosi. ($\times 21.000$).
- Fig. 12. — Oocita in stadio immediatamente previtellogenetico. Lo spazio perivitellino è molto ampio ed a contatto con l'ocita è visibile chiaramente la membrana vitellina in formazione. O = oocita; F = cellula follicolare; T = cellula della teca. ($\times 21.000$).

TAVOLA IV.

- Fig. 13. — Particolare della membrana vitellina in un oocita in stadio immediatamente previtellogenetico. La membrana appare perforata dai villi che si proiettano nello spazio perivitellino. Alla base dei villi si osservano vescicole di pinocitosi ($\nearrow$) ($\times 38.000$).
- Fig. 14. — Piccolo oocita (diametro 20μ). Gruppo di citolisomi di vario aspetto ($\times 24.000$).
- Fig. 15. — Particolare della figura 14, che mette in evidenza l'aspetto a « impronta digitale » dei citolisomi ($\times 50.000$).
- Fig. 16. — Immagine analoga alla precedente, con citolisomi a membrane concentriche, variamente disposte. ($\times 58.000$).