

MADURACION OVOCITARIA EN *EMERITA ANALOGA* (STIMPSON, 1857) (DECAPODA: ANOMURA)

OOCYTIC MATURATION IN *EMERITA ANALOGA* (STIMPSON, 1857) (DECAPODA: ANOMURA)

Humberto Cerisola y Marcelo González

RESUMEN

Se describen cambios morfológicos y bioquímicos ocurridos en el ovario de *Emerita analoga* durante su proceso madurativo. Considerando el tamaño y las principales características estructurales y ultraestructurales de las células germinativas ováricas, se caracterizaron las ovogonias y tres estados de maduración ovocitaria: ovocitos inmaduros, ovocitos vitelogénicos en maduración temprana y ovocitos en maduración avanzada. Los ovocitos vitelogénicos en maduración temprana son capaces de sintetizar su propio vitelo, ocurriendo posteriormente la incorporación de vitelo exógeno por micropinocitosis y que continúa hasta el estado de maduración avanzada. La caracterización lipídica del ovario en sus distintos estados de maduración indicó que existen variaciones cualitativas en la presencia de colesterol, fosfatidil-colina (FC), fosfatidil-serina (FS) y fosfatidil-etanolamina (FE). En el ovario inmaduro se identifica solamente FE y en el ovario maduro puede verse un predominio de FC. El perfil electroforético de proteínas de los ovocitos en diferentes estados de la vitelogenénesis reveló que existe un patrón característico de polipéptidos que varían entre 92 y 135 kDa.

Palabras clave: Crustáceos, ovogénesis, vitelogenénesis, ultraestructura.

ABSTRACT

Morphological and biochemical changes occurred during the maturation process in the ovary of *Emerita analoga* are described. Considering the size and the main structural and ultrastructural characteristics of the germinative ovarian cells, the oogonia and three oocytic maturation stages are characterized: immature oocytes, vitellogenic oocyte at early maturation, and oocyte at advanced maturation. The vitellogenic oocytes at early maturation stage are able to synthesize their own vitellus, incorporation of exogenous vitellus by micropinocytosis take place later and continues till the advanced maturation stage. The lipidic characterization of the ovary at its different stages of maturation shows qualitative variations of the presence of cholesterol, phosphatidyl-choline (PC), phosphatidyl-serine (PS), and phosphatidyl-ethanolamine (PE). Only PE is identified on the immature ovary, and predominance of PC can be seen on the mature ovary. The electrophoretic protein profile of the oocytes at different stages of the vitellogenesis, revealed the existence of a characteristic pattern of polypeptides ranging from 92 to 235 kDa.

Key words: crustaceans, oogenesis, vitellogenesis, ultrastructure.

Fecha de recepción: 6 - 10 - 95. Fecha de aceptación: 27 - 5 - 96.

INTRODUCCION

En diferentes crustáceos se han dado a conocer varios estados de maduración ovocitaria analizando su estructura y ultraestructura (Scana-

bissi & Trentini, 1979; Komm & Hinsch, 1985, 1987; Meussy & Payen, 1989), como también se ha estudiado el proceso de la vitelogenénesis mediante microscopía electrónica (Beams & Kessel, 1963; Kessel, 1968; Hinsch & Cone, 1969; Schade & Schivers, 1980; Komm & Hinsch, 1985, 1987).

Emerita analoga (Stimpson, 1857) es uno de los principales componentes de la macrofauna

de la zona intermareal de las playas arenosas de las costas de Chile (Núñez *et al.*, 1974; Varela, 1983; Jaramillo *et al.*, 1993). También existe información que se refiere a su vida reproductiva en relación a la variación geográfica (Osorio *et al.*, 1967; Dugan *et al.*, 1991), pero no hay información respecto a los cambios que ocurren en el ovario de esta especie durante su proceso madurativo.

El propósito del presente estudio es caracterizar los estados de maduración ovárica en *Emerita analoga* en base a cambios estructurales de las células de la línea germinativa, proteínas presentes en los ovocitos en diferentes estados de maduración, y cambios en la composición lipídica que ocurren en el ovario durante su proceso madurativo.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Los especímenes hembras de *E. analoga* se recolectaron en la zona intermareal de la costa de Valparaíso, en la localidad de Playa Amarilla (Con-Con) y mantenidos en agua de mar natural aireada (pH 8,4, 16°C).

Microscopía de luz y electrónica

Para la observación a microscopía de luz las muestras de tejido gonadal en distintos estados de maduración, se fijaron en Bouin. Se hicieron cortes histológicos de 5 µm y el teñido se realizó con hematoxilina eosina.

También se fijaron muestras en glutaraldehído al 2% en buffer cacodilato 0,2 M, pH 7,4 sucrosa 0,15 M final en agua bidestilada.

Las muestras se postfijaron con tetróxido de osmio 2% en buffer cacodilato 0,1 M a pH 7,4. Se deshidrataron en alcoholes de gradación creciente hasta acetona, para luego incluirlo en resina epóxica Medcast.

Secciones de tejido gonadal se realizaron mediante un ultramicrotomo Reichert OMU-2 y se analizaron bajo microscopía de luz y electrónica de transmisión.

Cortes de 1 µm de grosor se montaron en placas de vidrio y teñidas con azul de toluidina 1%. Las secciones ultrafinas para microscopía electrónica se tiñeron con acetato de uranilo al

2% y citrato de plomo al 2% y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-900.

Extracción de lípidos

El tejido gonadal se homogeneizó con una solución 0,53 M de KCl conteniendo 1 mM de EDTA (pH 7,0). El homogeneizado se centrifugó a 3.000 rpm por 4 min y luego se extrajo el sobrenadante y se procesó para extraer los lípidos totales mediante el método de Bligh y Dyer (1959).

Cromatografía en capa fina

Los lípidos se separaron mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de Silica Gel 60 (Merck). Los lípidos secos se disolvieron en 5 µl de cloroformo: metanol (2:1). La separación se realizó utilizando una mezcla que contiene cloroformo: metanol: sol. de amoníaco al 25%: agua desionizada, en proporción de 6.0: 3.: 0,3: 0,4 a 4°C. Se utilizaron lípidos estándares (Sigma) para comparar las distancias de migración (Rf) de éstos con los de la muestra a analizar. Se detectó los lípidos totales por exposición a vapores de yodo. Se reveló los lípidos que contienen grupos amino en una solución de ninhidrina al 0,30% en butanol, conteniendo ácido acético al 3% visualizándolos después de 10 minutos a 60°C.

Electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE-SDS)

Ovocitos de diferentes tamaños fueron precipitados con ácido tricloroacético (TCA) al 15%, los precipitados se secaron en una cámara de vacío y posteriormente se disolvieron en solución cargadora con SDS. Se realizó la electroforesis según lo propuesto por Laemmli (1970) utilizando acrilamida a una concentración de 3% en el gel de concentración y de 10% en el gel de separación, aplicando un voltaje constante de 80 volts en el gel de concentración y 120 volts en el gel de separación por tres horas. Para visualizar las proteínas se tiñeron los geles con azul de Coomassie. Los marcadores de peso molecular fueron adquiridos en Sigma (USA). La determinación de proteínas se realizó según Lowry *et al.* (1951).

RESULTADOS

Anatomía del ovario

El ovario de *Emerita analoga* es un órgano pareado que se extiende desde el inicio de la región cefalotorácica hasta el primer segmento abdominal ubicado dorsalmente en relación al aparato digestivo (Fig. 1). Al examen macroscópico se presenta lobulado, manteniéndose el patrón de lobulación en los distintos estados de maduración variando solamente el tamaño de la masa gonadal. En su forma madura, se distinguen claramente dos grandes lóbulos anteriores, los cuales se comunican en su parte posterior por una gruesa unión transversal. Esta región se continúa hacia la parte posterior a través de dos cordones paralelos que denominaremos cordones centrales. Los oviductos se originan a cada lado de la región posterior de los cordones centrales y desembocan en las coxas del tercer par de periópodos. Caudalmente estos dos cor-

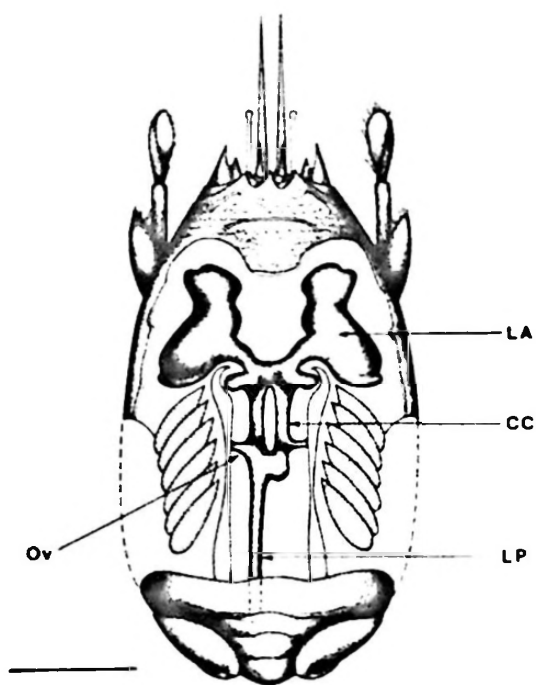


Figura 1. Diagrama del sistema reproductor en la hembra de *E. analoga*, vista dorsal. Se observa el lóbulo anterior del ovario (LA), cordón central (CC), lóbulo posterior del ovario (LP) y oviducto (Ov.) Barra = 1 cm.

Diagram of the reproductive system of female *E. analoga*, dorsal view. (LA) anterior lobule of ovary, (CC) central cord, (LP) posterior lobule and (OV) oviduct. Bar = 1 cm.

dones centrales se unen para formar un sólo lóbulo posterior, de aspecto más delgado que se extiende hasta el primer segmento abdominal.

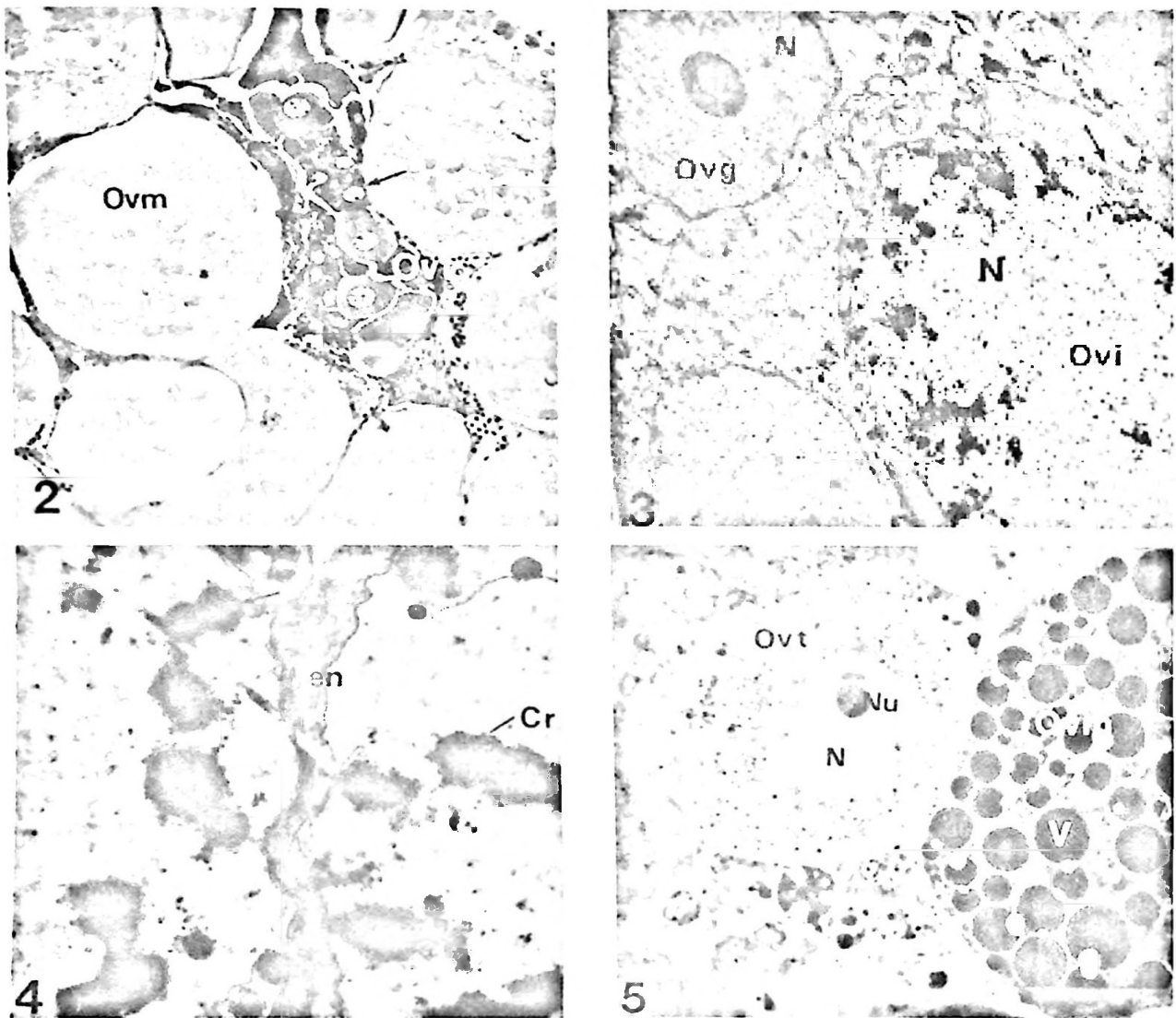
Estados de maduración gonadal y desarrollo ovocitario

La coloración de la gónada varía según su estado de maduración, reconociéndose tres coloraciones: un color blanco para la gónada inmadura, un color amarillo para el estado intermedio y un color naranja que indica un estado de maduración avanzada. Los diferentes estados de maduración de los ovocitos avanzan desde el centro a la periferia, encontrándose ovogonias y ovocitos en vitelogénesis temprana en el cordón central (Fig. 2).

Ovogonias: Los estados celulares más tempranos de la línea germinativa corresponden a las ovogonias. Miden aproximadamente 16 μm de diámetro, presentan un núcleo prominente que ocupa aproximadamente el 80% del volumen de la célula (Fig. 3). La cromatina en su interior es homogénea y presenta un nucléolo esférico y pequeño. El citoplasma de estas células es escaso.

Ovocitos inmaduros: Miden aproximadamente 25 a 30 μm de diámetro. Presentan un núcleo grande y redondo y su cromatina en algunas zonas aparece de consistencia filamentososa cerca de la envoltura nuclear (Fig. 3). Algunos de estos ovocitos se presentan en estado de zigonema/paquinema de la meiosis, los cuales se distinguen por la presencia de los complejos sinaptonémicos. Los cromosomas se encuentran unidos a la envoltura nuclear por medio de sus telómeros (Fig. 4). En varios lugares de la lámina externa de la envoltura nuclear se puede ver evaginaciones que contienen en su interior un material granular de tamaño variable.

Ovocitos vitelogénicos en maduración temprana: Miden aproximadamente 70-80 μm de diámetro, presentando un núcleo grande y esférico cuyo diámetro oscila entre 40 y 50 μm , con una heterocromatina y un nucléolo destacado (Fig. 5). La envoltura nuclear presenta ondulaciones que no habían sido observadas en el estado anterior. En el citoplasma cerca de la cara externa de la envoltura nuclear se presenta una



Figuras 2-5. Fig. 2. Vista general de ovario maduro seccionado longitudinalmente. Se observa un cordón central constituido por ovogonias (flecha), ovocitos vitelogénicos en maduración temprana (Ovt) y ovocitos maduros (Ovm). 100 X. Fig. 3. Microfotografía electrónica de transmisión (MET) del lóbulo anterior en la que se observa una ovogonia (Ovg) con un gran núcleo (N) y un prominente nucléolo (Nu). Se muestra además un ovocito inmaduro en profase meiótica en estado de zigonema/paquinema (Ovi) y la formación de evaginaciones en la envoltura nuclear conteniendo material granular denso (flecha) 4.300 X. Fig. 4. MET de un ovocito inmaduro en estado de zigonema/paquinema en el cual se observan los cromosomas (Cr) unidos a la envoltura nuclear (en) y la presencia de complejos sinaptonémicos (flecha). 9000 X. Fig. 5. Corte semifino de un ovocito vitelogénico en maduración temprana (Ovt) y un ovocito maduro (Ovm). El primero presenta en el núcleo (N) un nucléolo prominente (Nu) y en su citoplasma pequeños granulos de vitelo. El ovocito maduro contiene grandes vesículas de vitelo (V). 600 X.

Fig. 2. General view of mature ovary longitudinal section. We observe a central cord of oogonia (arrow), vitellogenic oocytes (Ovt), mature oocytes (Ovm). 100X. Fig. 3. Electronic microphotography (MET) of anterior lobule, we observe a oogonia (Ovg) with a large nucleus (N) and a conspicuous nucleoli (Nu). Fig. 4. MET of a immature oocyte 900X. Fig. 5. View of a vitellogenic oocyte (Ovt) and a mature oocyte (Ovm). 600X

acumulación de material electrónico denso, libre de membrana, o nuage (Fig. 6).

El citoplasma presenta una gran cantidad de vesículas de retículo endoplásmico que contienen material granular denso rodeado por membrana y la presencia de un aparato de Golgi cercano a las vesículas del retículo (Fig. 7) La superficie del ovocito presenta una gran cantidad de microvellosidades dirigidas hacia el espacio perivitelino y se observa también actividad micropinocitósica y presencia de vesículas recubiertas y cuerpos multivesiculares (Fig. 8), estos últimos van aumentando de tamaño a medida que progresa la maduración y formarán lo que se denomina vitelo de tipo exógeno (Fig. 9) Los ovocitos se encuentran asociados a células foliculares redondas y grandes, con ausencia de prolongaciones citoplasmáticas, con un núcleo que se caracteriza por tener la cromatina muy condensada en la periferia.

Ovocito maduro o en maduración avanzada: Tienen un tamaño que varía entre los 300 y 370 μm de diámetro, no se observa núcleo en esta etapa (Fig. 5). Los ovocitos se encuentran rodeados por células foliculares planas y alargadas. A la microscopía electrónica el vitelo se presenta constituido por vesículas muy grandes de vitelo endógeno. No se ven microvellosidades ni actividad micropinocitósica en estos ovocitos maduros se observa por la presencia de grandes gotas de lípidos (Fig. 10).

Caracterización fosfolipídica de la gónada: La composición lipídica también indica cambios en su maduración. Fue posible identificar tres tipos de fosfolípidos utilizando marcadores comerciales y tinciones específicas (Fig. 11). Se reconocieron fosfatidilcolina (FC), fosfatidilserina (FS), fosfatidiletalonamina (FE) y colesterol (C). En el estado inmaduro de la gónada es posible identificar solamente FE mediante la tinción con ninhidrina y vapores de Yodo. Otro fosfolípido, para el cual no tenemos un patrón de referencia, se ubica inmediatamente por encima de la banda correspondiente a FE, el cual no se tiñe específicamente con la ninhidrina, pero sí con los vapores de Yodo. Este fosfolípido aparece solamente en este estado de maduración de la gónada. En el estado intermedio, a la tinción con vapores de Yodo, aparecen solamente FE, FC, FS y colesterol, mientras que con ninhidrina

se identifican solamente FE y FS que corresponden a fosfolípidos con grupo amino. En la gónada madura se mantiene la presencia de los fosfolípidos anteriormente nombrados más colesterol pero puede verse que predomina FC. En este mismo estado, con la tinción de ninhidrina aparecen, además, cuatro fosfolípidos que contienen grupos aminos de los cuales no tenemos patrón de referencia y que presentan Rfs muy bajos, ya que se ubican muy cerca del origen. El colesterol en este estado aumenta considerablemente en relación a los estados anteriores.

Proteínas presentes durante la vitelogénesis: Se analizó el perfil electroforético de las proteínas extraídas de ovocitos de diversos tamaños y en diferentes estados de la vitelogénesis. Los tamaños de los ovocitos estudiados corresponden a: 0,12, 0,18 y 0,35 mm. El patrón electroforético de los ovocitos revela la presencia de numerosas bandas de polipéptidos. A medida que avanza en su crecimiento y en su vitelogénesis se puede apreciar la mantención de un patrón característico de 4 bandas que corresponden a polipéptidos de 135, 115, 108 y 92 kDa (Fig. 12).

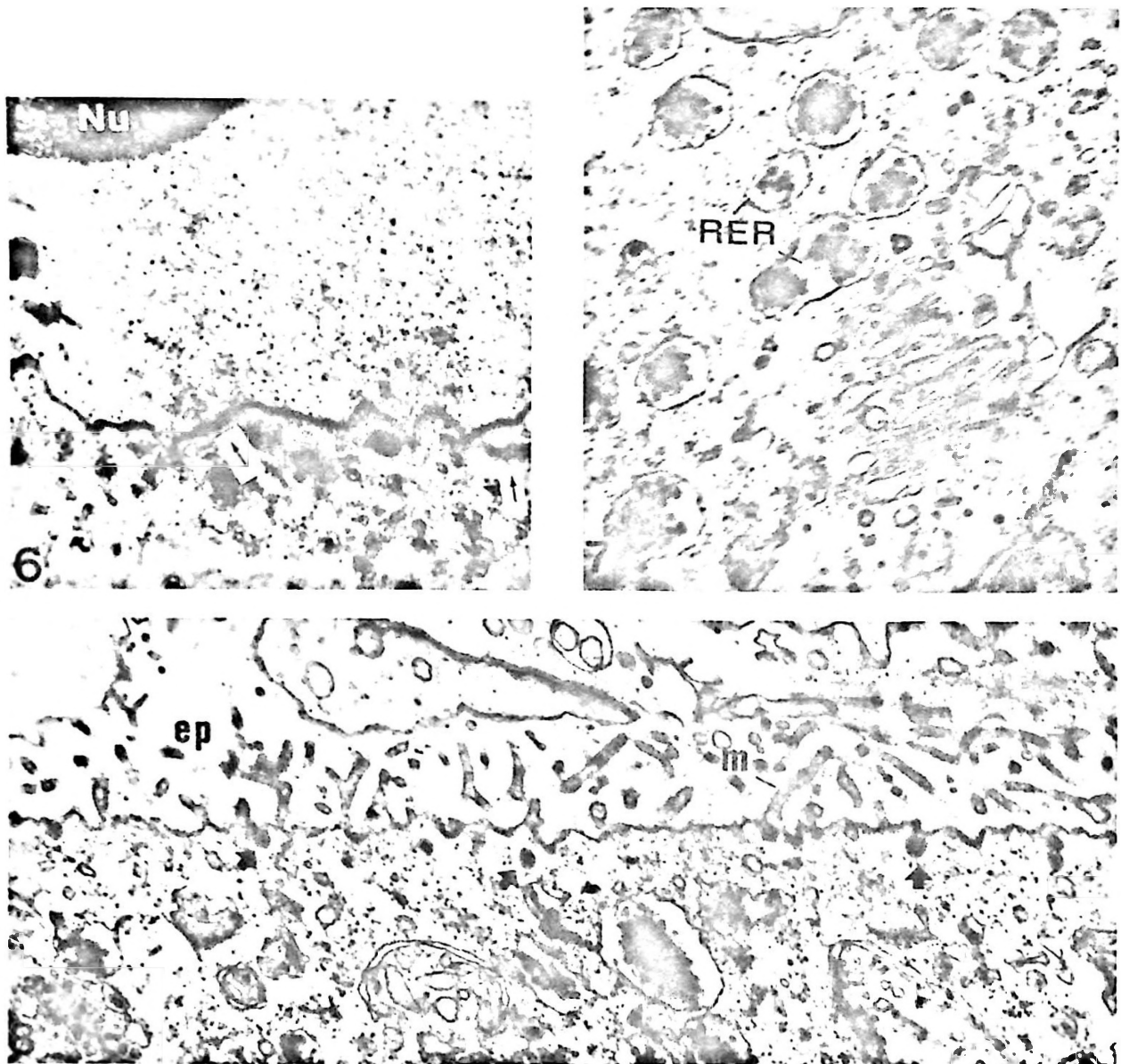
DISCUSION

Los resultados del presente estudio han permitido conocer algunas características del ovario de *Emerita analoga*, de las cuales no se tenía información hasta ahora, como es: la definición de los estados de desarrollo ovocitario, su caracterización fosfolipídica y algunas proteínas presentes durante la vitelogénesis ovocitaria.

El ovario de *E. analoga* posee una estructura semejante a la observada en *Emerita asiática* Milne Edwards por Subramoniam (1981) en cuanto a su lobulación, pero esta información se refiere especialmente a cambios gonadales durante la reversión sexual.

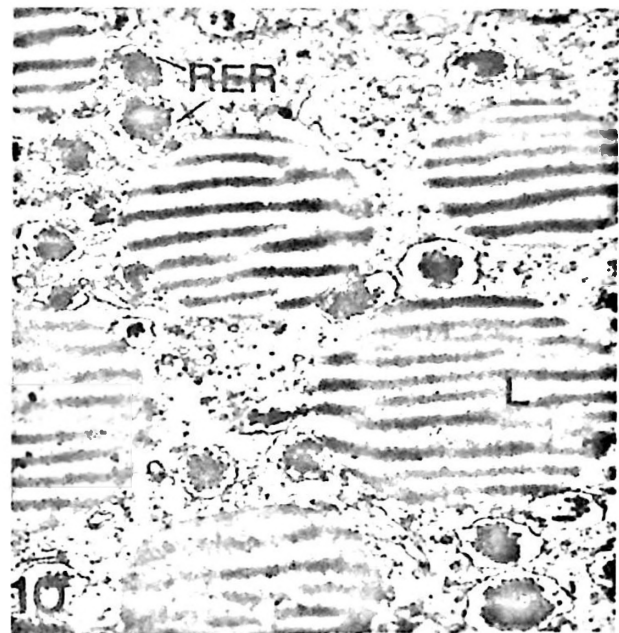
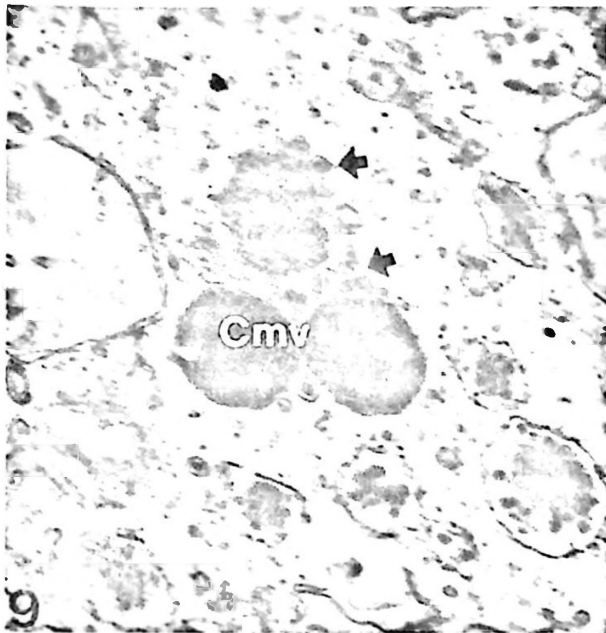
En la definición de los diferentes estados de maduración ovocitarias, se consideraron algunas características citoplásmicas, del vitelo y nucleares. Fue posible apreciar un predominio de ciertos estados de maduración ovocitaria sobre otros, indicándonos que se trata de un proceso de maduración sincrónica y parcial.

Las ovogonias agrupadas en cordones centrales se encuentran rodeadas por ovocitos



Figuras 6-8. Fig. 6. MET de un ovocito vitelogénico en maduración temprana. Se observa un nucléolo grande (Nu), la envoltura nuclear presenta ondulaciones y cerca de la cara externa de ésta, se presenta una acumulación de material electrónico denso (flechas). 7.300 X. Fig. 7. MET de un ovocito vitelogénico en maduración temprana que muestra la asociación entre las vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER) que contiene material electrónico denso y las vesículas del aparato de Golgi (G). 18.000 X. Fig. 8. MET que muestra una microvellosidad (m) en el espacio perivitelino (ep) y vesícula micropinocitóticas (flechas) en la superficie de un ovocito vitelogénico en maduración temprana. 20.000 X.

Fig. 6. MET of a vitellogenic oocyte in early maturation. We observe a large nucleolus (Nu). 7.300X. Fig. 7. MET of a vitellogenic oocyte in early maturation. Fig. 8. Microvilli (m). 20.000X.



Figuras 9-10. Fig. 9. MET de la formación de cuerpos multivesiculares (Cmv) a partir de la fusión de vesículas micropinocitóticas (flechas) en un ovocito vitelogénico en maduración temprana. 18.000 X. Fig. 10. MET en que se observa el citoplasma de un ovocito maduro con gran cantidad de gotas de lípidos (L) y vesículas de retículo endoplásmico rugoso (RER). 9.450 X.

Fig. 9. MET of vesicular bodies (Cmv) 18.000X. Fig. 10. MET of the cytoplasm of a mature oocyte. 9.450X.

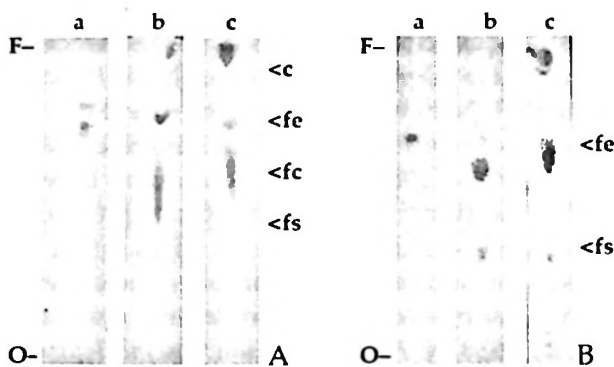


Figura 11. Cromatografía en capa fina de lípidos totales en los diferentes estados de maduración de la gónada. Gónada inmadura (a); gónada intermedia (b); gónada madura (c). a. Revelado con vapores de yodo. b. Revelado con ninhidrina. En el lado derecho se muestran las movilidades relativas de los marcadores c, fe, fc y fs. O = origen; F = frente del solvente.

Thin layer chromatography of total lipids in a gonad. (a) Immature gonad (b) Intermediate gonad (c) Mature gonad.

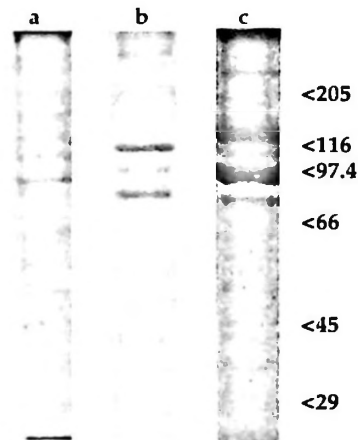


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS) de ovocitos en diferentes estados de maduración. El diámetro de los ovocitos es: (a) 0,12 mm; (b) 0,18 mm; (c) 0,35 mm. Al lado derecho aparecen los pesos moleculares de los marcadores expresados en kDa.

Polyacrilamide gel electrophoresis in SDS of oocytes in different maturation stages, the diameter of oocyte is (a) 0.12mm (b) 0.18mm (c) 0.35mm.

previtelogénicos lo cual es semejante a lo observado en *Coenobita clypeatus* Herbst por Komm & Hinsch (1985), en cambio es diferente en *Orchestia gamarella* Pallas (Charniaux-Cotton 1960) en que este cordón se presenta a nivel cortical del ovario. Los ovocitos inmaduros se presentan por lo general, en un estado de profase meiótica. La formación de complejos sinaptonémicos sirve para caracterizar a esos ovocitos en un estado de paquinema-zigonema. Estos complejos sinaptonémicos han sido descritos por Scanabissi & Trentini (1979) en *Triops cancriformis* Bosc y por Komm & Hinsch (1985) en *Coenobita clypeatus*.

Teóricamente las vesículas de retículo endoplásmico se originarían a partir de las evaginaciones de la membrana nuclear externa en los ovocitos inmaduros, en este aspecto es similar a lo observado en *Cambarus* sp. y *Orconectes* sp. por Beams & Kessel (1963), en *Homarus* sp. y *Panulirus* sp. por Kessel (1968), en *Libinia emarginata* Leach por Hinsch & Cone (1969) y en *Coenobita clypeatus* por Komm & Hinsch (1985). Al respecto, Blades-Eckelbarger & Youngbluth (1984) en observaciones de ovocitos del copépodo *Labidocera aestiva* Wheeler, determinan que las vesículas de retículo endoplásmico contribuyen a formar esferas de vitelo en esta especie. Se supone que en *E. analoga*, dicho material granular estaría comprometido en la formación de vitelo, ya que tiene semejanza morfológica con el vitelo de los ovocitos de las especies citadas anteriormente.

El material electrónicamente denso y libre de membrana (nuage), que se presenta en el citoplasma de la región cerca al núcleo de los ovocitos vitelogénicos o en maduración temprana, también se presenta en ovocitos y espermatocitos primarios en *L. aestiva* (Blades-Eckelbarger & Youngbluth, 1982-1984) y en ovocitos de *Coenobita plypeatus* (Komm & Hinsch, 1987).

En los ovocitos en vitelogénesis temprana se incrementa notoriamente la cantidad de ribosomas libres y de retículo endoplásmico rugoso, estos datos son congruentes con lo observado en otros crustáceos (Beams & Kessel, 1963; Kessel 1968; Hinsch & Cone, 1969; Shade & Shivers, 198; Komm & Hinsch, 1985, 1987), lo cual nos sugiere que la abundancia de vesículas de retículo endoplásmico rugoso indicaría

que el ovocito, en una primera etapa, sería capaz de sintetizar su propio vitelo.

En los diversos estudios realizados sobre el proceso de la vitelogénesis, tanto en *Libinia emarginata* (Hinsch & Cone, 1969), como en *L. aestiva* (Blades-Eckelbarger & Youngbluth, 1984) y en *C. clypeatus* (Komm & Hinsch, 1987), se ha visto que existe una relación muy próxima entre la actividad realizada por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, los cuales producen vesículas que se fusionan para formar el vitelo endógeno. Aunque en la presente investigación no se observó la fusión de vesículas de los organoides celulares mencionados, estimamos que podrían estar comprometidos en la formación de vitelo endógeno.

La incorporación de vitelo exógeno en *E. analoga* se produce por micropinocitosis y formación de vesículas recubiertas. Estos datos son similares a los informados por Schade & Shivers (1980) en langosta americana *Homarus americanus* Milneç Edwards y por Kessel (1968) para varios otros crustáceos.

En *E. analoga* se presenta, por lo tanto, la combinación de procesos intra y extra ovocitarios en la formación del vitelo, que será de vital importancia para el desarrollo embrionario después de la fecundación.

En los ovocitos maduros o en maduración avanzada la migración del núcleo hacia la periferia y el posterior rompimiento de éste, es concordante con lo planteado por Meusy & Payen (1988) y Yano (1988) en *Penaeus japonicus* Bate.

Las modificaciones morfológicas que experimentan las células foliculares en cuanto a su grosor son similares a los cambios que experimentan las mismas células en *Penaeus japonicus* (Yano, 1988) y *Macrobrachium rosenbergii* de Man (Chang & Shih 1995).

La caracterización lipídica de la gónada en sus distintos estados de maduración, demostró que existen variaciones cualitativas en la presencia de colesterol y fosfolípidos. El origen de estos componentes del vitelo ha sido atribuido al hepatopáncreas, a que tendría una función de síntesis según lo reportado por Shafir *et al.* (1992) en el camarón *Penaeus semisulcatus* de Haan y por Paulus y Laufer (1987) en los cangrejos *Carcinus maenas* Linnaeus y *Libinia emarginata*.

En el camarón *Rhynchocinetes typus* Milne

Edwards (Muñoz *et al.*, 1990) se determinó que FE se sintetiza en el ovario y que FC y FS pueden ser sintetizados en el hepatopáncreas. Estos tres fosfolípidos fueron determinados en la gónada e *E. analoga* en sus distintos estados de maduración y se indicó que FE aparece en el estado más inmaduro, lo que podría indicar su síntesis a partir del ovario, en cambio en el estado maduro aparecen varios fosfolípidos con grupos amino que probablemente podrían ser sintetizados externamente.

En *E. analoga* se identificó mediante PAGE-SDS cuatro polipéptidos característicos en los tres tamaños de ovocitos estudiados. Determinamos la existencia de un patrón característico de polipéptidos desde un estado de vitelogénesis temprana hasta un ovocito maduro, lo que indica que estas proteínas estarían formando parte del vitelo. Este tipo de análisis contribuye a mejorar la caracterización de los estados principales de la maduración ovocitaria en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la valiosa colaboración prestada en el apoyo técnico a la señora Edith Méndez W. y al señor Juan Navia por su oportuna ayuda.

LITERATURA CITADA

- BEAMS H.W. & R.G. KESSEL. 1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. *Journal Cell Biology*, 18: 622-649.
- BLADES-ECKELBARGER, P.I. & M.J. YOUNGBLUTH. 1982. The ultrastructure of spermatogenesis in *Labidocera aestiva* (Copepoda: Calanoida). *Journal of Morphology*, 174: 1-15.
- BLADES-ECKELBARGER, P.I. & M.J. YOUNGBLUTH. 1984. The ultrastructure of oogenesis and yolk formation in *Labidocera aestiva* (Copepoda: Calanoida). *Journal of Morphology*, 179: 33-46.
- BLIGH, E.G. & W.J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37: 911-917.
- CHANG, C.F. & T.W. SHIH. 1995. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction Development*, 27: 11-20.
- CHARNIAUX-COTTON H. 1960. Sex determination. En: *The Physiology of Crustacea*. 1: 411-447. T.H. Waterman (ed.) Academic Press, New York.
- DUGAN, H.E., A.M. WENER & D.M. HUBBARD. 1991. Geographic variation in the reproductive biology of the sand crab *Emerita analoga* (Stimpson) on the California coast. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*, 150: 63-81.
- HINSCH, G.W. & M.V. CONE. 1969. Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. *Journal Cell Biology* 40: 336-342.
- JARAMILLO, E. A. McLACHLAN & P. COETZEF. 1993. Intertidal zonation patterns of macroinfauna over a range of exposed sandy beaches in south-central Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 110 (1-2): 105-118.
- KESSEL, R.G. 1968. Mechanisms of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. *Zeitschrift für Zellforschung*, 89: 17-38.
- KOMM, B.S. & G.W. HINSCH. 1985. Oogenesis in the terrestrial hermit crab *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura). I Previtellogenic oocytes. *Journal of Morphology* 183: 219-224.
- KOMM, B.S. & G.W. HINSCH. 1987. Oogenesis in the terrestrial hermit crab, *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura): II Vitellogenesis. *Journal of Morphology*, 192: 269-277.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBOUGH, A.L. FARR & R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MEUSY, J. & G. PAYEN. 1988. Female reproduction in Malacostracan Crustacea. *Zoological Science*, 5: 217-265.
- MUÑOZ, G., S. DONGHI & H. CERISOLA. 1990. Vitellogenesis in the crayfish *Rhynchocinetes typus*: Role of the hepatopancreas in the lipid yolk biosynthesis. *Cellular Molecular Biology*, 36(5): 531-536.
- NÚÑEZ, J., O. ARACENA & M.T. LÓPEZ. 1974. *Emerita analoga* en Llico, Provincia de Curicó (Crust. Dec. Hippidae). *Boletín Sociedad Biología de Concepción*, Tomo XLVIII, Pp. 11-22.
- OSORIO, C., N. BAHAMONDE & M.T. LÓPEZ. 1967. El limanche (*Emerita analoga*. Stimpson) en Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*, 29(6): 61-116.
- PAULUS, J.E. & H. LAUFER. 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda, brachyura). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 11: 29-44.
- SCANABISSI, S. & M. TRENTINI. 1979. Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). Early developmental stages of the oocyte. *Cell Tissue Research* 201: 361-368.
- SCHADE, M.L. & R.P. SHIVERS. 1980. Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope-protein tracer study. *Journal of Morphology*, 163: 13-26.
- SHAFIR, S., M. OVADIA & M. TOM. 1992. In vivo incorporation of labelled methionine into proteins vitellogenin and vitellin in females of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Biological Bulletin*, 183: 242-247.
- SUBRAMONIAN, T. 1981. Protrandric hemafroditism in a mole crab, *Emerita asiatica* (Decapoda: Anomura). *Biological Bulletin*, 160(1): 161-174.
- VARELA, C. 1983. Anfípodos de las playas de arena del Sur de Chile (Bahía de Maiquillahue, Valdivia). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 18: 25-51.
- YANO, I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 99: 547-553.

