

ARTICULO ORIGINAL

**MORFOLOGÍA DE LAS GÓNADAS MADURAS DEL PEZ LEÓN
(*PTEROIS VOLITANS*: PISCES, SCORPAENIDAE) EN EL LITORAL
OESTE DE LA HABANA**

Morphology of mature lion fish gonads (*Pterois volitans*: Pisces, Scorpaenidae) on the west coast of Havana

Carlos Cruz López¹, Ana Sanz Ochotorena^{1,2}, Yamilka Rodríguez Gómez¹, Reyna Lara Martínez², María de Lourdes Segura Valdéz², Luis Felipe Jiménez García²

¹ Departamento Biología Animal y Humana. Facultad de Biología Universidad de La Habana.

² Laboratorio Nanobiología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

* Autor para correspondencia: anita@fbio.uh.cu

Recibido 26.05.2020

Aceptado 20.10.2020

RESUMEN

El pez león es una especie considerada invasora y registrada por primera vez en Cuba en el 2008. Varios autores han afirmado que entre los factores que han contribuido a su éxito están las características de su reproducción, por lo cual el objetivo de la presente investigación ha sido analizar la morfología de las gónadas maduras de *Pterois volitans* y la influencia de esta en su estrategia reproductiva en el litoral oeste de La Habana, Cuba. Se tomaron las medidas de Longitud Total y Peso Total en 64 ejemplares. Se procesaron fragmentos de gónadas para su análisis mediante Microscopía Óptica y Electrónica. En la población de *P. volitans* en estudio existe dimorfismo sexual: los machos muestran una Longitud y Peso Total significativamente mayor que las hembras. Esta especie, acorde al desarrollo de sus células sexuales, está activa reproductivamente durante todo el año. La espermatogénesis de *P. volitans* es semicística. El patrón morfológico de los espermatozoides del pez león es uno de los esquemas más ampliamente representados entre los peces teleósteos, descritos como espermatozoides simples anacrosomales de Tipo I. La morfología ovárica interna presentada se clasifica como estructura cistovariana Tipo II-3. La gran cantidad de gametos, ovocitos y espermatozoides, encontrados en los tejidos gonadales apoya la potencialidad del pez león como una especie invasora.

PALABRAS CLAVE: pez león, espermatogénesis, ovogénesis, ultraestructura gonadal

ABSTRACT

Lionfish is an invader species registered in Cuba for the first time in 2008. Several authors have affirmed that among the factors that have contributed to its success are the characteristics of its reproduction; therefore, the main goal of this work has been to analyze gonad's morphology of *P. volitans* and its influence in its reproductive strategy in the west littoral of Havana, Cuba. Measurements of Total Length and Total Weight were calculated. Gonad fragments were processed for analysis by Light and Electron Microscopy. Sexual dimorphism exists in the studying population of *P. volitans*: males show significantly bigger Total Length and Weight than females. This species is reproductively active throughout the year. *P. volitans* spermatogenesis is semicyclic. The morphological pattern of lionfish spermatozoa is one of the most widely represented schemes among teleostean fish, described as Type I simple anacrosomal sperm. The presented internal ovarian morphology is classified as cystovarian structure Type II-3. The great amount of gametes, oocytes and spermatozoa, found in gonad tissues supports the lionfish's potentiality as an invader species.

KEY WORDS: lionfish, spermatogenesis, oogenesis, gonadal ultrastructure.

INTRODUCCIÓN

El pez león es nativo de las aguas tropicales del Océano Pacífico occidental y el Océano Índico oriental (Meister *et al.*, 2005; Hamner *et al.*, 2007). Existen múltiples teorías con respecto a su introducción en el Océano Atlántico y en algún momento entre 1999 y 2004 el pez león devino en el primer pez exótico marino reproductivamente establecido en el oeste del Atlántico (Whitfield *et al.*, 2002; Ruiz-Carus *et al.*, 2006; Albins, 2017) pero la liberación accidental de un acuario en la Florida a través del huracán Andrew sigue siendo el escenario más probable (Harris *et al.*, 2020). En Cuba se informó la presencia del pez león por primera vez por Chevalier *et al.* (2008).

No hay estudios acerca de la reproducción de esta especie en nuestro territorio, y aún son desconocidos muchos aspectos de la estructura y ultraestructura gonadal de *P. volitans* que pudieran explicar en parte su extraordinario éxito reproductivo.

Varios autores (Morris, 2009; Morris *et al.*, 2011) han afirmado que entre los factores que han contribuido al éxito de *P. volitans* en el Atlántico están las características de su biología reproductiva. Las hembras durante la cópula liberan dos masas gelatinosas huecas, cada una de las cuales envuelve una cantidad aproximada de 15 000 huevos (Fishelson, 1978); mientras que los machos liberan los espermatozoides en el interior de dichas masas. Algunos autores, como Morris *et al.* (2011), consideran la morfología de las bolsas de huevos como una adaptación para atrapar y concentrar espermatozoides, y de esta forma garantizar la fertilización de los ovocitos. Además, esta especie puede mantenerse activa reproductivamente durante todo el año, con una frecuencia de desove potencial de cada tres o cuatro días, y una fecundidad anual de más de dos millones de huevos por hembra (Morris, 2009). Por las razones antes expuestas, el objetivo del presente trabajo fue analizar la morfología de las gónadas maduras de *P. volitans* y la influencia de esta en su estrategia reproductiva en el litoral oeste de La Habana, Cuba.

Como novedades destacan la utilización por primera vez de la microscopía electrónica en la caracterización de las células sexuales del pez león y la tinción con un compuesto intercalante (DAPI) con el fin de detectar grados de compactación de la cromatina. La presente constituye la primera caracterización detallada de la estructura testicular de *P. volitans*, y en particular de la ultraestructura de su peculiar

espermatozoide, tanto en el Atlántico como en su rango nativo. Se observaron algunos elementos que destacan por su exclusividad en el grupo los cuales se informan por primera vez en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de pez león se capturaron en la porción de arrecife costero ubicada frente al litoral del Acuario Nacional de Cuba (ANC), provincia La Habana (Fig. 1). Se realizaron siete muestreos durante el período Octubre/2013-Septiembre/2014 (octubre/2013, noviembre/2013 y febrero, abril, junio, julio y septiembre/2014), en los cuales se capturó un promedio de nueve individuos por muestreo, para un total de 64 ejemplares en el estudio. Para las capturas se emplearon redes de mano. Luego los peces se introdujeron en bolsas de nylon,

y para mayor seguridad se mantuvo el recipiente colector con los peces capturados a cierta distancia del buzo, mediante una cuerda de cinco metros de largo y una boya.

Los ejemplares se sacrificaron y disecaron siguiendo los protocolos de Green *et al.*, (2012). Se determinó de cada animal la Longitud Total (LT) con un pie de rey digital marca Mitutoyo precisión 0,1mm y el Peso Total (PT) mediante una balanza Ohaus, con resolución 0,01g.

Se tomaron fragmentos de cada gónada de aproximadamente un gramo de masa, se colocaron en paraformaldehído al 4 % como fijador, mínimo por 24 horas y se sometieron a la técnica clásica de inclusión en parafina. Los cortes se obtuvieron entre 5 y 7 μm con un micrótopo de rotación manual marca Sakura; se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente

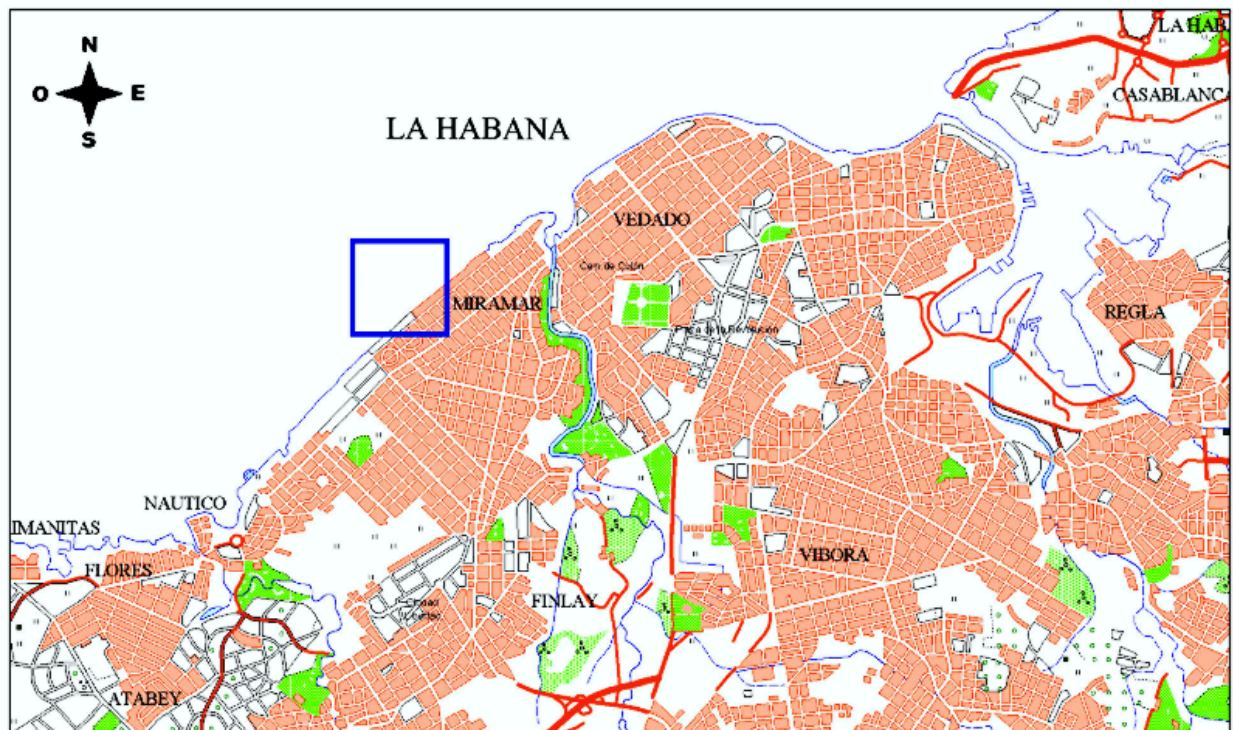


Fig. 1. Ubicación del sitio de muestreo en el litoral de La Habana. El área del sitio de recolecta se ha encerrado en un cuadrado.

y se tiñeron con las técnicas Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Mallory y Mason. Las observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss modelo Axiomat, con objetivos de 20 X, 40 X y 100 X; con cámara digital Nikon E400 para el registro fotográfico.

También se fijaron, de cada animal, fragmentos de la gónada izquierda en glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato de sodio a pH 7,4. Estos se procesaron luego mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET) según Vázquez-Nin y Echeverría, (2000). Se obtuvieron cortes semifinos —teñidos con azul de toluidina— de 2-4 μm y ultrafinos de 40-60 nm, con un micrótomo modelo Ultracut de Leica contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes se observaron bajo un microscopio JEOL JEM 1010 que opera a 80kV.

Un grupo de muestras se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), compuesto intercalante que se sitúa entre los surcos mayores de la doble hélice del ADN, a partir del procedimiento propuesto por Rodríguez (2008). Las preparaciones teñidas con este reactivo se analizaron con la técnica de iluminación epifluorescente con el objetivo de detectar los grados de compactación de la cromatina nuclear en los diferentes estadios de la ovogénesis. Se observaron con un microscopio óptico con aditamento de epifluorescencia (Nikon E800).

Tabla I. Valores medios de Longitud Total (LT), log10 del Peso Total (PT), para ambos sexos de *Pterois volitans*. Los asteriscos indican los valores estadísticamente diferentes (Student, $p < 0.05$).

Sexo	N	LT (cm)	log10 (PT)
Machos	28	25, 8 *	2, 29 *
Hembras	26	21, 5 *	2, 09 *

Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio mediante el programa FlashPoint 3D FPG.

La LT y el PT de machos y hembras se compararon mediante el estadístico t de Student, con el fin de encontrar un posible dimorfismo sexual. Se realizó también un análisis de medias con los valores de LT y PT.

RESULTADOS

De los 64 ejemplares de *P. volitans* muestreados en el litoral oeste de La Habana se identificaron 28 machos y 26 hembras (Tabla I). Los valores de talla y peso de individuos maduros alcanzaron cifras máximas de 37,2 cm para machos y 30,0 cm para las hembras en cuanto a LT y 589,1 g y 304,1 g respectivamente en relación al PT. Como se aprecia, en la Tabla I las hembras difieren significativamente de los machos en cuanto a LT y log10 del PT.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LAS GÓNADAS:

Las gónadas de *P. volitans* son órganos pares localizados en la región posterior de la cavidad del cuerpo, por detrás del estómago, debajo de la vejiga natatoria y justo encima del intestino. (Fig.2 A y Fig. 2B). Los ovarios maduros (Fig. 2A) tienen forma de saco con una coloración crema rojiza, y se unen posteriormente para formar el oviducto, el cual desemboca en el poro genital detrás del ano. Los testículos son alargados y de color crema claro (Fig.2B).

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS TESTÍCULOS:

Los testículos del pez león *P. volitans* muestran una elevada organización de los tejidos germinales y somáticos durante la espermatogénesis. En sección transversal

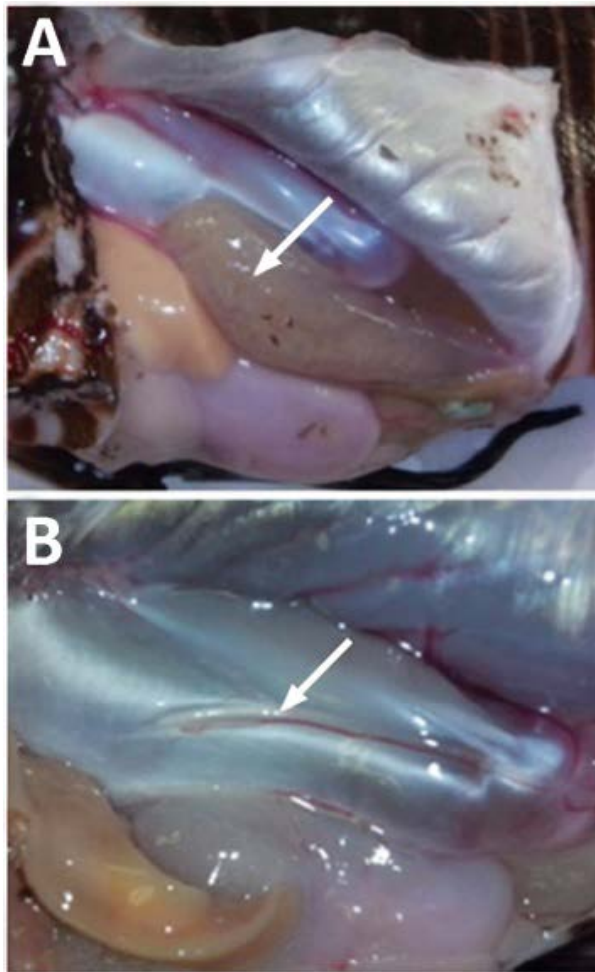


Fig. 2. A Vista lateral de la región abdominal de una hembra del pez león *Pterois volitans*. La flecha indica el ovario. B: Vista lateral de la región abdominal de un macho del pez león *Pterois volitans*. La flecha indica el testículo.

son estructuras reniformes con los principales conductos espermáticos ubicados interna y externamente en el lado cóncavo (Fig. 3). La pared de la gónada masculina está constituida por la túnica albugínea, que se aprecia como una fina capa de tejido conectivo fibroso. Los túbulos seminíferos aumentan su diámetro interno en el eje convexo-cóncavo en el interior de la gónada. Las células sexuales se desarrollan en el epitelio germinal que forma los túbulos seminíferos, llegan en su desarrollo al lumen

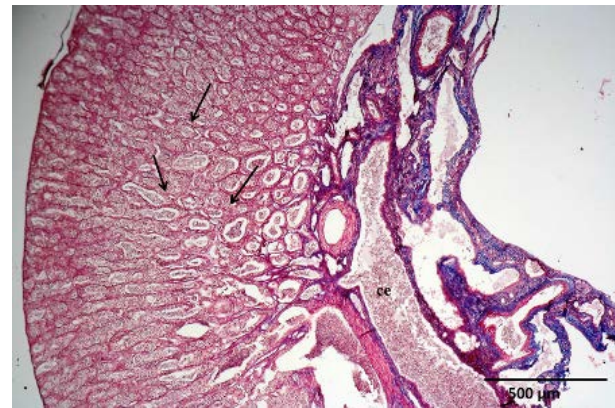


Fig. 3. Sección transversal al Microscopio de Campo Claro del testículo (Masson). Las flechas indican los túbulos seminíferos. ce: conducto espermático.

de los túbulos seminíferos, pasan hacia los conductos espermáticos y se agrupan finalmente hacia el lumen (Fig. 3). Estas se organizan en grupos de células llamados cistos (Fig. 4A y Fig 4B), los cuales contienen células germinales en un mismo estadio de desarrollo. Se observó que los cistos pueden desintegrarse antes de culminar la gametogénesis (Fig. 4A), con un patrón de espermatogénesis semicística.

En los testículos de los machos sexualmente maduros estudiados se observaron células germinales en todos los estadios de desarrollo (espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides). Las espermatogonias (Fig. 4A) aparecen como células relativamente grandes distribuidas en diferentes secciones de los túbulos seminíferos. Se caracterizan por presentar un núcleo redondeado, con la cromatina difusa, clara y un solo nucléolo prominente. En la siguiente fase, los espermatoцитos primarios se caracterizan por un núcleo con cromatina visible y con figuras cromosómicas en el nucleoplasma (Fig. 4A, Fig. 5 y Fig. 6). Estos se observaron en diferentes fases de la profase I de la meiosis como puede observarse una fase paquitena en la Fig. 4B y una diplotena en el cisto de espermatoцитos

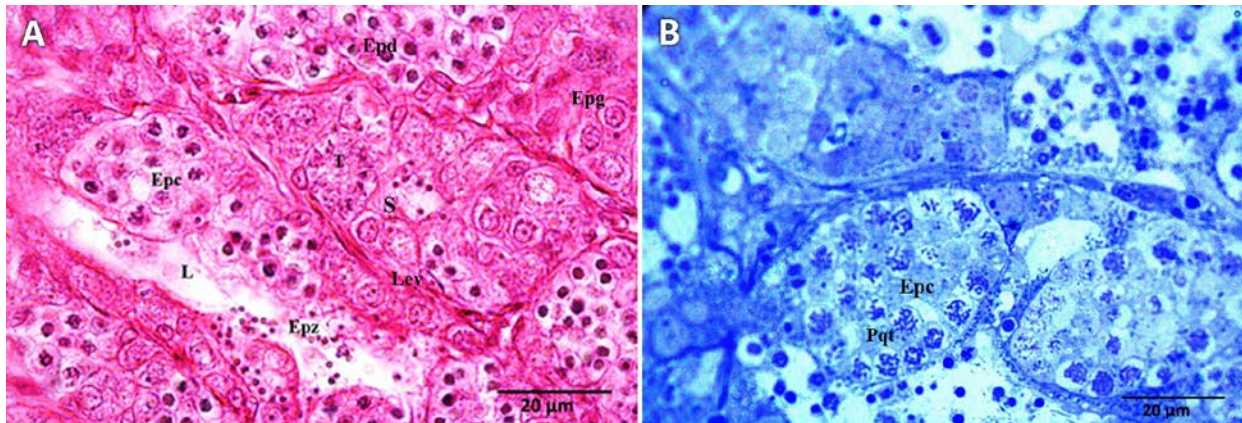


Fig. 4. A. Sección de un túbulo seminífero (H-E). Nótese la presencia de cistos. T: túbulo. L: lumen. Epg: espermatozonias. Epc: espermatozitos. Epd: espermátidas Epz: espermatozoides. S: célula de Sertoli. Ley: células de Leydig B. Espermatozitos primarios en diferentes fases de la profase I de la meiosis en un cisto. (azul de toluidina). Se observa una fase paquitena. Epc: espermatozitos. Pqt: paquiteno. (Fotomicrografías al Microscopio de Campo Claro).

primarios vistos al MET que se muestra en la Fig. 5. La mayoría de los espermatozitos continúan su desarrollo en los cistos, pero otros se vieron independientes en el lumen del túbulo tras la desintegración del

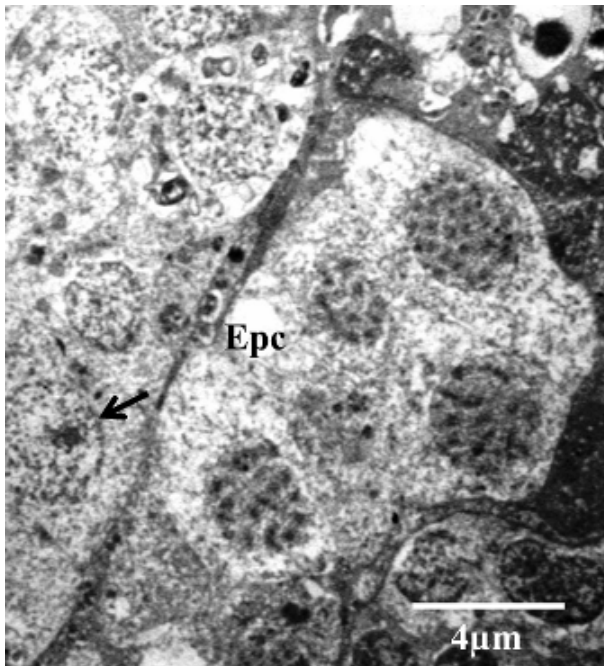


Fig. 5. Cisto de espermatozitos primarios al Microscopio Electrónico de Transmisión. La flecha indica una célula de Sertoli. Epc: Espermatozitos.

cisto, donde quedan junto con espermátidas y espermatozoides. Los espermatozitos secundarios fueron difíciles de observar y presentan características similares a los primarios, aunque se muestra el final de esta etapa ya en la telofase, en la Fig. 6.

Las espermátidas (Fig. 4A) se observaron también en cistos y en el lumen de los túbulo seminíferos con un alto grado de compactación de la cromatina nuclear.

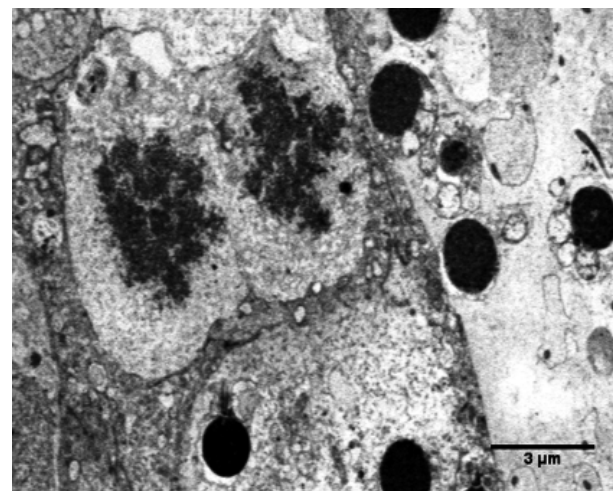


Fig. 6. Telifase de espermatozitos secundarios al Microscopio Electrónico de Transmisión.

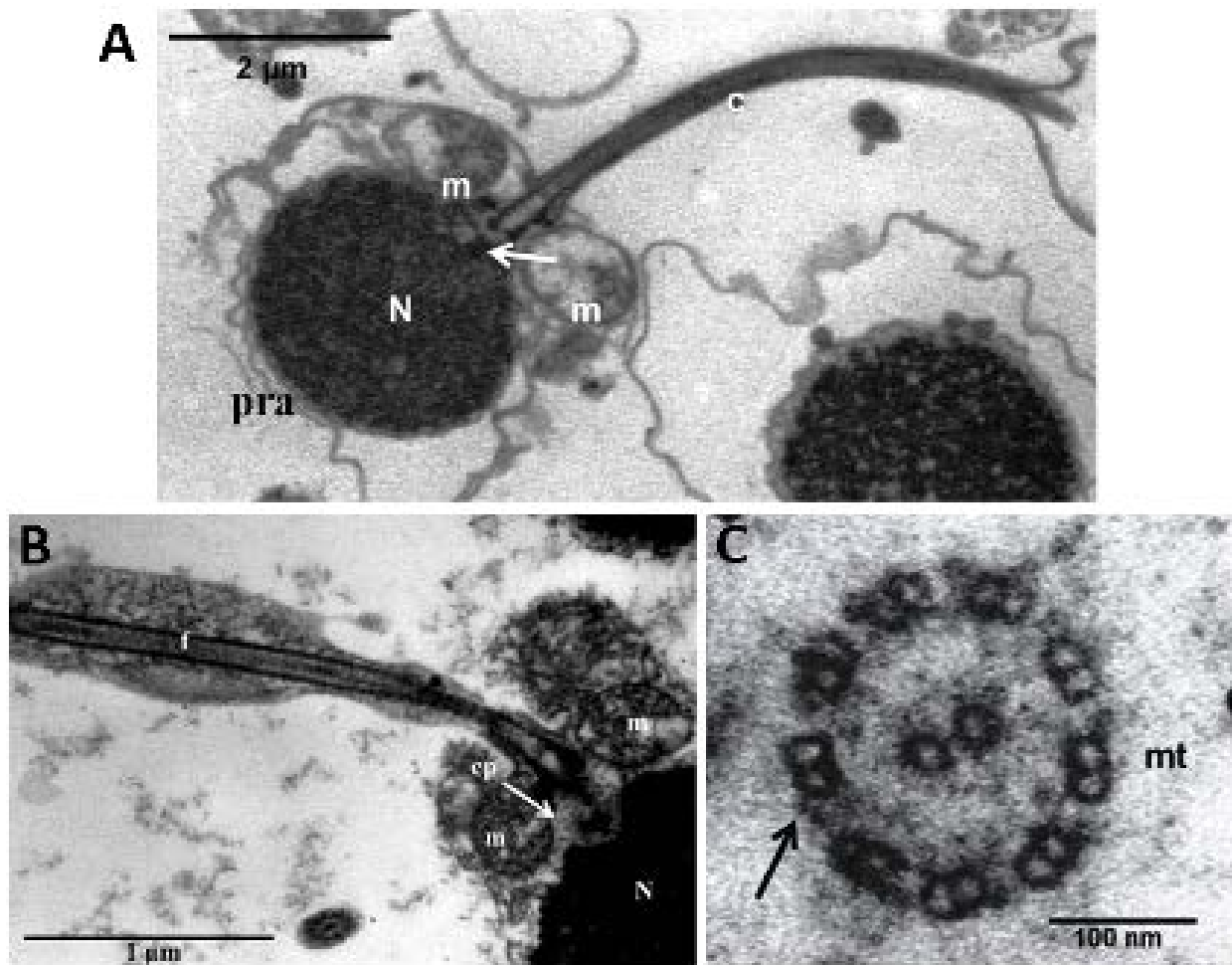


Fig.7. Microfotografía del espermatozoide de *P. volitans* al Microscopio Electrónico de Transmisión A. N: núcleo, pra: posible remanente de acrosoma. m: mitocondria. La flecha señala al centriolo proximal. B. Sección media-posterior del espermatozoide. N: núcleo, m: mitocondria, f: flagelo, cp: centriolo proximal. C. Sección transversal donde se observa el patrón microtubular del axonema de la cola del espermatozoide. mt: microtúbulos. La flecha señala los brazos de dineína.

Se observan las células de Sertoli, las cuales se ubican en el interior de los túbulos seminíferos y se caracterizan por un núcleo con un nucléolo prominente y cromatina compacta cercana a la membrana nuclear (Fig. 5). En el tejido intersticial del testículo se localizan las células de Leydig, las cuales se observan como células alargadas entre las membranas basales de los túbulos seminíferos, con un núcleo evidente (Fig. 4A). En los testículos de los machos

maduros de *P. volitans* se observó un elevado número de gametos.

En la morfología general de los espermatozoides se distinguen tres secciones: cabeza, pieza media y flagelo (Fig. 7A). La cabeza es de forma redonda e incluye el núcleo del gameto (también redondeado), el cual tiene la cromatina altamente compacta. En general, no existe acrosoma en la región anterior de la cabeza de los espermatozoides (Fig. 7A), sin embargo, en

algunos gametos en desarrollo se observó lo que podría ser un remanente de acrosoma

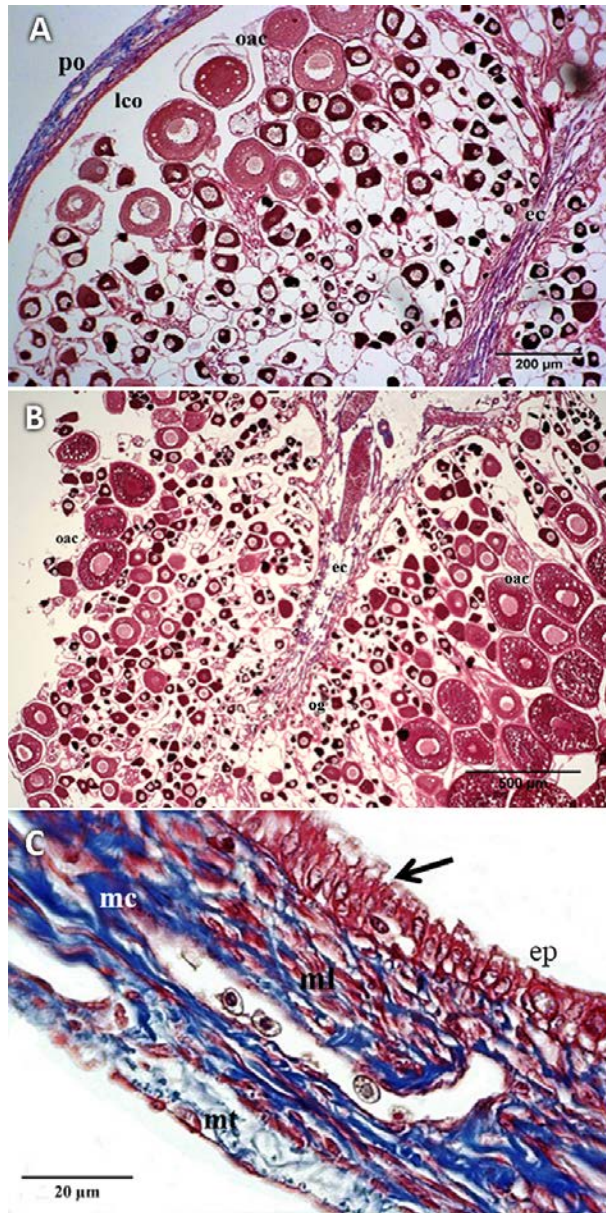


Fig. 8. A. Sección longitudinal del ovario (Masson). ec: estroma central. lco: lumen de la cavidad ovárica. po: pared del ovario. oac: ovocito en alveolo cortical. B. Se observan numerosos ovocitos en diferentes estadios de desarrollo. ec: estroma central. og: ovogonias. oac: ovocito en alveolo cortical. C. Sección longitudinal de la pared del ovario mt: mesotelio. ml: músculo longitudinal. mc: músculo circular. ep: epitelio. La flecha señala los cilios. (Fotomicrografías al Microscopio de Campo Claro).

(Fig. 7A). Los centriolos proximal y distal están ubicados en la concavidad posterior del núcleo (Fig. 7A y Fig. 7B), A continuación de la cabeza se observa la pieza media (Fig. 7B), región relativamente corta, asimétrica, que incluye dos mitocondrias con material electrodens en su interior. Por último, el flagelo o cola del espermatozoide alcanza una longitud de aproximadamente 2-3 veces el diámetro de la cabeza. En su interior, el axonema presenta el patrón microtubular clásico (9 + 2), nueve dobletes periféricos más un par central, cuya ultraestructura se observa en la Fig. 10. En esa imagen, al Microscopio Electrónico de Transmisión (Fig. 7C) se detecta también la presencia de los brazos de dineína en los laterales de los dobletes.

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS OVARIOS

En los ovarios también se apreció en todas las muestras estudiadas una elevada organización de los tejidos, así como una gran cantidad de células sexuales en desarrollo. En la estructura interna de los ovarios (Fig. 8A) se encuentra un estroma central con abundante tejido conectivo, visible también en la Fig 11A, que se origina en el extremo anterior del ovario y se extiende longitudinalmente por el centro de la gónada libre de conexiones con la pared ovárica. Este encierra los vasos sanguíneos que irrigan al órgano y está rodeado por el epitelio germinal (Fig. 8A). En la Fig.8A y Fig.8B se observan lamelas ováricas las cuales se disponen radialmente alrededor del estroma, conectadas a este por un tronco de tejido muscular y conectivo. En esas lamelas se desarrollan las células sexuales, en las cuales los ovocitos de menor desarrollo se encuentran adyacentes al estroma central, mientras que las de desarrollo más avanzado se ubican cercanas

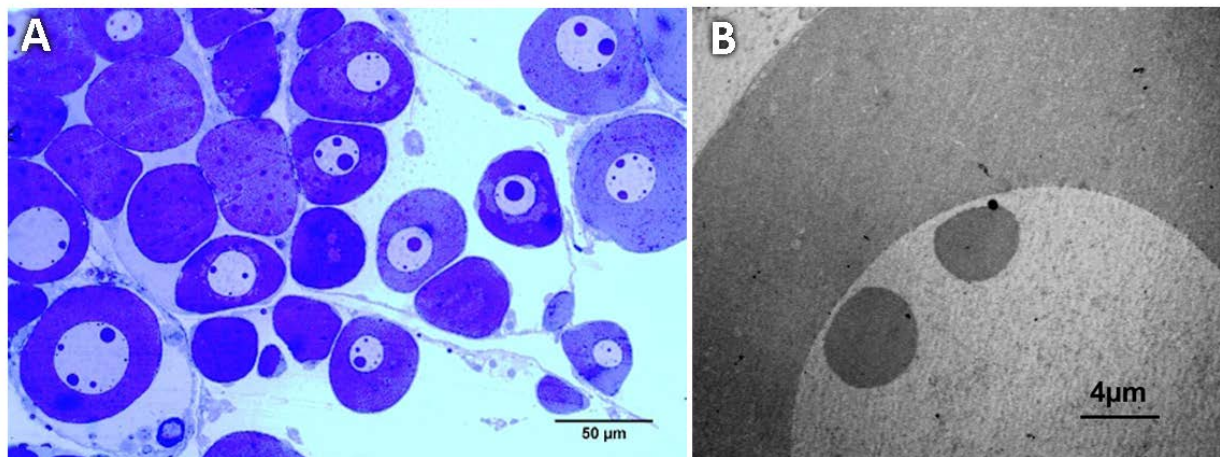


Fig.9. Ovocitos en crecimiento primario A. Microscopio de Campo Claro. Azul de toluidina. B. Microscopio Electrónico de Transmisión.

al lumen del ovario, hacia donde serán liberadas una vez culminada la ovogénesis.

La cavidad está limitada externamente por la pared del ovario (Fig.8A), la cual está compuesta internamente por tres capas de tejidos (Fig.8C). La capa más interna es un epitelio simple glandular de células cilindricas. La segunda capa es de tejido muscular liso, dividida en dos secciones: una en disposición longitudinal (más interna) y otra en disposición circular (más externa). Ambas secciones incluyen varios vasos sanguíneos, los cuales están recubiertos internamente por un endotelio simple. Por último, la capa más externa de la pared está constituida por mesotelio (Fig. 8C).

En las hembras adultas estudiadas se encontró una alta densidad de ovocitos. Cabe destacar que en ovarios maduros están presentes ovocitos en todos los estadios de desarrollo: ovogonias, (Fig.8B), ovocitos en crecimiento primario (Fig. 9A y Fig. 9B), ovocitos en etapa alveolo cortical (Fig. 8A, Fig. 8B y Fig. 10A) ovocitos vitelogénicos y ovocitos en etapa de maduración. Las ovogonias (Fig. 8B y 11A) aparecen como células pequeñas adyacentes al estroma

central con un núcleo y citoplasma muy teñidos. Los ovocitos en crecimiento primario son células también pequeñas, aunque mayores que las ovogonias, que se ubican cerca del estroma central en la vecindad de estas últimas. Se caracterizan por un citoplasma fuertemente basófilo y un núcleo grande, en el cual se observan uno o pocos nucléolos prominentes dispersos por el nucleoplasma (Fig. 9A y Fig. 9B). En los ovocitos en crecimiento primario tardío los nucléolos son más pequeños, numerosos, y adoptan una posición periférica en el núcleo (Fig. 9A).

En la etapa de alveolo cortical, los ovocitos se encuentran alejados del estroma central en dirección al lumen de la cavidad ovárica. Además del significativo aumento de tamaño, estas células también se caracterizan por presentar varios nucléolos adyacentes a la cara interna de la membrana nuclear, y por la aparición de alveolos corticales en el citoplasma (Fig. 10A, Fig.10B y Fig.10C). Estos últimos son vesículas de naturaleza granular que se observan al microscopio como gránulos blancos, que inicialmente se ubican rodeando el núcleo y

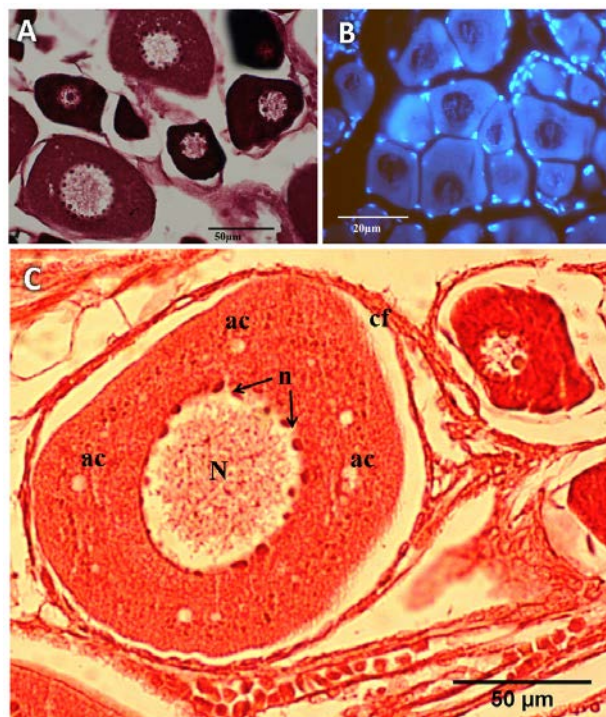


Fig. 10. Ovocitos en etapa alveolo cortical. A. Tinción Hematoxilina Eosina (HE). B. Marcados con DAPI. Observe las células foliculares con el núcleo azul brillante lo que denota actividad transcripcional de la célula. C. Un ovocito. (HE). N: núcleo, n: nucléolo, ac: alveolo cortical, cf: célula folicular.

posteriormente se alejan en el citoplasma. En esta etapa de desarrollo se aprecian muy bien rodeando al ovocito un conjunto de células foliculares (Fig. 10C) con elevada actividad transcripcional (Fig.10B).

Los ovocitos vitelogénicos se encuentran cercanos al lumen de la cavidad ovárica, pero algunos se mantienen unidos al estroma central mediante un pedúnculo vascularizado (Fig. 11A y Fig. 11B), cuya longitud aumenta a medida que avanza la vitelogénesis. En el núcleo de estos ovocitos se observan varios nucléolos periféricos. En la periferia del ovoplasma surgen gránulos de vitelo que posteriormente continúan hasta ocuparlo completamente. Simultáneamente con la acumulación de los gránulos de vitelo ocurre la deposición de las gotas lipídicas, que se observan al microscopio como espacios vacíos debido al procesamiento histológico (Fig. 11B). La capa de células foliculares y de la teca está más desarrollada que en la etapa anterior. En la etapa de maduración el núcleo

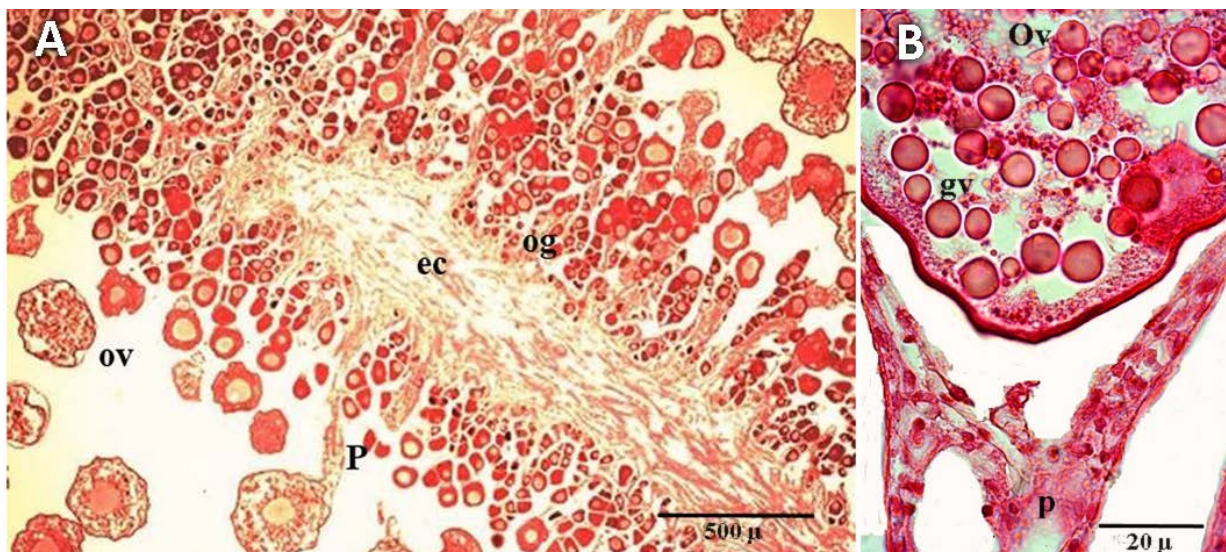


Fig. 11. A. Sección longitudinal del ovario (HE). Observe ovocitos vitelogénicos cercanos al lumen de la cavidad ovárica, alguno unido aun al estroma central mediante un pedúnculo vascularizado. ov: ovocito vitelogénico, p: pedúnculo, og: ovogonias, ec: estroma central. B. Ovocito vitelogénico temprano (Masson). Ov: ovocito vitelogénico, p: pedúnculo, gv: gránulo de vitelo.

de los ovocitos se desintegra. Los gránulos de vitelo se fusionan y aumentan de tamaño hasta ocupar completamente todo el ovoplasma. Las gotas lipídicas también coalescen y aumentan de tamaño.

Hacia la ovulación, los ovocitos se desprenden del pedúnculo y son liberados hacia el lumen ovárico (Fig. 11A). No se observaron ovocitos hidratados u ovocitos atrésicos. Se encontró una correspondencia entre el desarrollo de la gónada y el grado de diferenciación de los ovocitos: los ovarios en el comienzo de la ovogénesis presentan ovocitos en crecimiento primario; cuando los ovocitos en etapa alveolo cortical son los más avanzados los ovarios se encuentran en otro estadio reproductivo; mientras que en los ovarios maduros ya se observan ovocitos en diferentes grados de vitelogénesis.

DISCUSION

En la población de *P. volitans* en estudio existe dimorfismo sexual en cuanto a la LT y PT, significativamente mayores en los machos que en las hembras. La presencia de individuos maduros de ambos sexos y las características morfológicas de sus gónadas maduras durante todos los períodos de muestreo, sugiere que el pez león está activo reproductivamente durante todo el año. Esto coincide con los resultados expuestos por Morris (2009) y Gardner *et al.* (2016) en la costa este de EE.UU., Bahamas e Islas Caimán.

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS TESTÍCULOS

La espermatogénesis ocurre en el interior de los túbulos seminíferos, en los cuales las células germinales se agrupan en cistos. Estos pueden desintegrarse y liberar las células sexuales antes de que estas culminen su desarrollo, fenómeno definido por Muñoz *et al.* (2002a) como

espermatogénesis semicística. Según estos autores, este tipo de espermatogénesis solo se observó en unas pocas especies de peces de las familias Gobiesocidae, Bleniidae, Opistognathidae, Ophidiidae, y en *Scorpaena notata* (Scorpaenidae). Estos teleósteos presentan determinadas características relacionadas con el desove que permiten el estudio de un posible patrón evolutivo, como la liberación de huevos envueltos en secreciones y que forman grandes masas. Ambas características están presentes en *P. volitans*, quien libera los huevos envueltos en dos grandes bolsas gelatinosas (Morris, 2009), por lo que se puede considerar que la espermatogénesis semicística pudo haber evolucionado paralelamente con la secreción de sustancias gelatinosas en el desove (Muñoz *et al.*, 2002a). Además, estos autores proponen como otro elemento de apoyo a este planteamiento, que en el suborden Ophidioidea existen especies ovíparas, vivíparas y especies que combinan ambas formas de reproducción, como también ocurre en la familia Scorpaenidae.

Se observó que los espermatocitos I alcanzan una mayor dimensión que las espermatogonias, lo cual está en concordancia con lo planteado por otros autores (Petrini & Zaccanti, 1998, Paniagua, 2007), quienes expresan que los espermatocitos I son las células más grandes observadas durante el proceso de espermatogénesis. La observación de espermatocitos II resultó difícil, lo cual puede estar debido a que la segunda división meiótica ocurre muy rápido, según plantea Schatten y Constantinescu (2007).

Las espermátidas resultantes de la división de los espermatocitos II se observaron en el lumen de los túbulos seminíferos con un significativo grado de compactación de la cromatina nuclear, y el subsecuente

silenciamiento de la transcripción en el núcleo, proceso que ocurre tempranamente en esta etapa de conversión hacia espermatozoides denominada espermiogénesis (Barresi y Gilbert, 2020). A pesar de que un cambio en la forma del núcleo de redondeado hacia alargado es otro evento característico de la espermiogénesis, el núcleo de las espermátidas de *P. volitans* mantiene su forma redonda, lo que resulta en un espermatozoide con cabeza de la misma forma. Esto parece tener tanto implicaciones en el modo interno de fertilización, como filogenéticas entre peces de la Familia Scorpaenidae y así lo informan Pavlov y Emel'yanova, (2018).

El alto número de espermatozoides encontrado en el interior de los testículos durante todo el tiempo de estudio de *P. volitans* solo incrementa aún más su potencialidad para considerarlo invasor. Lo anterior, unido al mecanismo ya descrito por Fishelson (1978) y Morris *et al.* (2011) para garantizar la fertilización de los huevos durante el apareamiento, es evidencia del gran éxito reproductivo que ha alcanzado esta especie, lo que posiblemente le ha permitido dispersarse satisfactoriamente por la costa oeste del Atlántico como afirman Rojas-Vélez *et al.*, (2019).

La espermatogénesis semicística descrita en esta especie también podría constituir una adaptación a la producción de un gran número de espermatozoides, ya que al abrirse los cistos antes de que las células sexuales completen su desarrollo, y estas pasar al lumen del túbulo seminífero tempranamente, nuevas espermatogonias pudieran reclutarse para comenzar la espermatogénesis y así producir una mayor cantidad de espermatozoides en el menor tiempo posible.

El espermatozoide de *P. volitans* cumple con la regla general de una división en tres

regiones fundamentales acorde con Luo *et al.*, (2011) y Pavlov y Emel'yanova, (2018), cabeza, pieza media y flagelo. Estos gametos pueden clasificarse como espermatozoides anacrosomales uniflagelados, los cuales son característicos de peces con fertilización externa (Maricchiolo *et al.*, 2010).

El espermatozoide de *P. volitans* coincide con la descripción anacrosomal Tipo I, patrón que comparte con otras especies de la familia Scorpaenidae por ejemplo, *Scorpaena notata* (Muñoz *et al.*, 2002a) y *Helicolenus dactylopterus* (Vila *et al.*, 2007). De acuerdo con Medina *et al.* (2000), este patrón morfológico de los espermatozoides es uno de los esquemas más ampliamente representados entre los peces modernos, y constituye una condición plesiomórfica en los animales; por lo tanto, se considera como un tipo de espermatozoide primitivo. Sin embargo, la presencia de este carácter primitivo en estos teleósteos actuales no necesariamente implica que se conservó a partir de un antepasado común a través de diversos linajes evolutivos, sino que la condición plesiomórfica pudo adquirirse secundariamente como adaptación a la biología de la fertilización.

La carencia de acrosoma indica que estos espermatozoides no presentan la batería enzimática necesaria para penetrar las membranas ovulares (Schatten y Constantinescu, 2007). Medina *et al.* (2000) plantearon que la ausencia de acrosoma se interpreta como una clara apomorfía de los teleósteos actuales, ya que se cree que la pérdida de esta estructura ha sido el resultado de la coevolución con el desarrollo del micrópilo en el corion del huevo. El micrópilo se define como un canal en el polo animal del ovocito que brinda acceso a los espermatozoides anacrosomales hacia la superficie ovoplásmica (Dinesh

& Mema, 2012). Debido a su difícil detección, el micrópilo de los huevos de *P. volitans* no se encontró en el presente estudio. En algunos espermatozoides en desarrollo del pez león se observó una estructura similar a un pequeño acrosoma. Medina *et al.* (2000) y Muñoz (2010) plantearon que en varias especies de teleósteos con estos espermatozoides anacrosomales pueden observarse reminiscencias de estructuras con forma de acrosoma.

Los centriolos proximal y distal del espermatozoide de *P. volitans* se localizan en la concavidad nuclear posterior, lo cual es característico de los espermatozoides anacrosomales Tipo I (Luo *et al.*, 2011); en el Tipo II se ubican fuera de la concavidad. También en esta especie los centriolos se encuentran orientados perpendicularmente uno con respecto al otro. Ambas características (localización y orientación) se consideran plesiomórficas en los peces modernos (Medina *et al.*, 2000), y el pez león las comparte con otros teleósteos como *Lota lota* (Gadidae) y muchas especies de las familias Merlucciidae, Moridae (Medina *et al.*, 2003) y Sparidae (Maricchiolo *et al.*, 2010).

En la pieza media del espermatozoide de *P. volitans* solo existen dos mitocondrias esféricas. La presencia de pocas mitocondrias sugiere que estos espermatozoides tienen poca movilidad; por lo tanto, las características de las masas de huevos gelatinosas y del desove deben ser suficientes para garantizar la llegada de los gametos masculinos a la vecindad de los ovocitos, cuya distancia a recorrer acorde al tipo de espermatozoide debe ser corta. Según Medina *et al.* (2003), el número de mitocondrias en la pieza media es una característica de amplia variación interespecífica entre los peces. Mientras que en el pez león solo hay

dos mitocondrias, en otras especies como *Laemonema laureysi*, *Merluccius polli* y *Merluccius merluccius* hay varios de estos organelos (Medina *et al.*, 2003); otras como *Pagellus bogaraveo*, *Diplodus puntazzo* y *Sparus aurata* solo tienen una mitocondria (Maricchiolo *et al.*, 2010). Las mitocondrias son responsables de la producción de ATP, la principal fuente de energía para el movimiento flagelar y en la pieza media entre los dobletes de microtúbulos está la dineína, proteína con actividad ATPásica.

Las células de Sertoli a quienes se asocian las células sexuales masculinas del macho durante todo su desarrollo, se encontraron alrededor de las células sexuales en diferenciación. Estas células somáticas cumplen funciones vitales durante este proceso, como nutrición de las células espermáticas en desarrollo (Barresi y Gilbert, 2020), actúan como barreras hemato-testiculares contra respuestas autoinmunes mediante uniones estrechas, regulan el flujo de metabolitos hacia las células germinales por su proximidad con estas (Muñoz *et al.*, 2002a), etc. Estos últimos autores plantearon que en los peces con espermatogénesis semicística, como es el caso de *P. volitans*, la transferencia de metabolitos ocurre a través del lumen de los túbulos seminíferos ya que no existen conexiones entre Sertoli y las células germinales durante las etapas finales del desarrollo.

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS OVARIOS

La estructura ovárica presentada para *P. volitans*, en la cual un estroma central está rodeado por el epitelio germinal y a continuación la cavidad ovárica, recibe el nombre de estructura cistovariana Tipo II-3, según la describe Takano (1989) y la confirman Priyadharsini *et al.*, (2013). El pez león comparte este patrón morfológico con

otros escorpénidos como *Scorpaena notata*, *Scorpaena porcus*, *Sebastolobus alascanus*, *Sebastolobus macrochir*, *Helicolenus hilgendorfi*, *Helicolenus dactylopterus* (Muñoz *et al.*, 2002b), *Setarches longimanu*, *Scorpaenopsis diabolus*, *Trachyscorpia cristulata* y *Hozukius embremarius* (Koya & Muñoz, 2007).

Los ovarios del pez león son los más avanzados de los morfotipos cistováricos (tipo II-3) descritos por Koya y Muñoz (2007). Este tipo de ovario se describió para especies que liberan masas de huevos gelatinosas (Muñoz *et al.*, 2002b), como es el caso del pez león. Entre las características morfológicas del ovario que permiten la producción de dichas masas está la presencia de células secretoras ciliadas en la pared ovárica, las cuales producen la sustancia gelatinosa que envuelve y protege los huevos (Morris *et al.*, 2011). La presencia también de una gruesa capa muscular en la pared del ovario indica que probablemente este expulsa la masa gelatinosa durante el desove mediante contracciones musculares fuertes. De acuerdo con Muñoz *et al.* (2002b), se le atribuyen muchas funciones a la sustancia gelatinosa secretada por los ovarios, como preservar la fertilidad de los huevos, inhibir o promover la motilidad de los espermatozoides, facilitar la expulsión de los ovocitos durante el desove, formar las masas de huevos, hacer estas masas indeseables para los depredadores, y además, nutrir a los embriones que se desarrollan dentro del lumen ovárico (en el caso de las especies vivíparas). Estos autores también plantean que en *Scorpaena notata* esta matriz podría representar un mecanismo de flotación para los huevos desovados. La mayoría de estas funciones pueden aplicarse también para *P. volitans*, sin embargo, son necesarios estudios más

específicos para verificar la veracidad de estos planteamientos.

Morris *et al.* (2011) y Paz Rodríguez (2016) plantearon que la presencia de ovocitos en todos los estadios de desarrollo en las hembras maduras es una evidencia de que esta especie es un desovador asincrónico, lo cual podría permitir una producción continua de huevos que explicaría su extraordinaria reproducción.

El alto número de ovocitos encontrado en las hembras apoya la potencialidad del pez león como una especie invasora, y los amplios espacios observados entre los tejidos pudieran constituir una adaptación para la acumulación de tan alto número de células sexuales.

Los ovocitos en crecimiento primario estudiados presentan uno o varios nucléolos prominentes, los cuales al avanzar el desarrollo, pasan a ser más numerosos, pequeños y adoptan una posición periférica en el núcleo. Según Browder *et al.* (1993), estos gránulos aportan los componentes de RNA ribosomal (rRNA) necesarios para la intensa síntesis proteica que se activa al inicio del desarrollo del embrión y que aporta el citoplasma del ovocito. La presencia de alveolos corticales en los ovocitos se ha relacionado anteriormente con el endurecimiento del corion, lo que brinda protección al embrión en desarrollo (Muñoz *et al.*, 2002b). Sin embargo, se ha observado una tendencia a la reducción en el número y tamaño de los alveolos corticales en peces con modos de reproducción especializados. En el caso del pez león, esta tendencia pudiera estar relacionada con la protección adicional que brindan las masas gelatinosas, como ocurre de forma similar en *Scorpaena notata* según estos autores.

La presencia de células foliculares y de la teca alrededor del ovocito constituye

una evidencia de la relación morfofuncional entre células somáticas y germinales en los tejidos gonadales. Entre el ovocito y las células foliculares se establecen conexiones, dadas por las microvellosidades del primero y las prolongaciones citoplasmáticas de las segundas, a través de las cuales las células somáticas envían al ovoplasma la vitelogenina, precursora del vitelo que constituye el alimento del futuro embrión (Barresi y Gilbert, 2020). El marcaje azul brillante en el núcleo de las células foliculares muestra que son células activas desde el punto de vista transcripcional, lo que refuerza lo anterior. La utilización de esta técnica constituye otra novedad del presente trabajo.

El pedúnculo ovárico es otra de las características de la gónada femenina que se cree favorece la producción de la matriz gelatinosa (Muñoz *et al.*, 2002b). Morris *et al.* (2011) plantearon que este también se encuentra en otros peces vivíparos, y sugieren que entre sus funciones están: impedir el apilamiento de los huevos, entregar los nutrientes directamente al ovocito y facilitar la fecundación interna. Sin embargo, solo un detallado estudio bioquímico de esta estructura podría apoyar alguna de estas funciones, o incluso sugerir una nueva.

CONCLUSIONES

Se confirma a nivel histológico y ultraestructural la organización cistovariana Tipo II-3 de los ovarios del pez león, con características propias de un modo de reproducción especializado que permite producir un gran número de ovocitos, además de garantizar la protección y fertilización de estos.

El patrón morfológico de los espermatozoides de *Pterois volitans*, anacrosomal Tipo I, constituye uno de los esquemas

ampliamente representado en los peces actuales, donde destaca su división en tres regiones (cabeza, pieza media y flagelo). Su ultraestructura revela ausencia de acrosoma y pocas mitocondrias.

REFERENCIAS

- ALBINS, M.A. (2017). Behaviours of Pacific Lionfish Facilitate Invasion of the Atlantic. En J.S. Weis and D. Sol (Eds.) *Biological Invasions and Animal Behaviour* (pp. 309-323). Published by Cambridge University Press.
- BARRESI, M. & GILBERT, S. (2020). *Developmental Biology*. 12th Edition. New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press.
- BROWDER, L., ERICKSON, C. & JEFFERY, W. (1993). *Developmental Biology*. Saunders College Publishing,
- CHEVALIER P.O., GUTIÉRREZ, E., IBARZABAL, D., ROMERO, S., ISLA, V., CALDERÍN, J. Y HERNÁNDEZ, E. (2008). Primer registro de *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) para aguas cubanas. *Solenodon*, 7, 37-40.
- DINESH, K. & MEMA, W. (2012). Ultra structure study of egg membrane in *Osteobrama belangeri* Val. *IOSR J. Agricult. Vet. Sci.* 1(4), 49-51.
- FISHELSON, L. (1978). Oogenesis and spawn formation in the pigmy lionfish *Dendrochirus brachypterus* Pteroidae. *Mar. Biol.*, 46: 341-348.
- GARDNER, P.G., FRAZER, T.K., JACOBY, C.A. & YANONG, R.P.E. (2016). Reproductive biology of invasive lionfish (*Pterois* spp.). *Front. Mar. Sci.* 2,7. doi: 10.3389/fmars.2016.00007.
- GREEN, S.J., AKINS, J.L. & MORRIS, J.A. JR. (2012). *Lionfish dissection: Techniques and applications*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 139, 24 pp.

- HAMNER, R.M., FRESHWATER, D.W. & WHITFIELD, P.E. (2007). Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. *J. Fish. Bio.* 71, 214–222.
- HARRIS, H.E., FOGG, A.Q., ALLEN, M. S., AHRENS, R. & PATTERSON III, W. (2020). Precipitous Declines in Northern Gulf of Mexico Invasive Lionfish Populations Following the Emergence of an Ulcerative Skin Disease. *Sci. Rep.* 10, 1934. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58886-8>.
- KOYA, Y. & MUÑOZ, M. (2007). Comparative study on ovarian structures in scorpaenids: possible evolutionary process of reproductive mode. *Ichthyol. Res.*, 54, 221-230.
- LUO, D., SUN, J., LU, X., LIU, L., CHEN, S. & LI, G. (2011). Comparative sperm ultrastructure of three species in Siniperca (Teleostei: Perciformes: Sinipercaidae). *Micron* 42(2011), 884-891.
- MARICCHIOLO, G., LAURÀ, R., GENOVESE, L., GUERRERA, M., C., MICALE, V. & MUGLIA, U. (2010). Fine structure of spermatozoa in the blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) with some considerations about the centriolar complex. *Tissue Cell*, 42(2010), 88-96.
- MEDINA, A., MEGINA, C., ABASCAL, F.J. & CALZADA, A. (2000). The spermatozoon morphology of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (Teleostei, Pleuronectiformes). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32(4), 645-650.
- MEDINA, A., MEGINA, C., ABASCAL, F.J. & CALZADA, A. (2003). The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei, Gadiformes), phylogenetic considerations. *Acta Zool.*, 84, 131-137.
- MEISTER, H.S., WYANSKI, D.M., LOEFER, J. K., ROSS, S.W., QUATTRINI, A.M. & SULAK, K.J. (2005). Further evidence for the invasion and establishment of the *Pterois volitans* (Teleostei: Scorpaenidae) along the Atlantic coast of the United States. *Southeast. Nat.*, 4, 193-206.
- MORRIS, J. A., JR. (2009). *The Biology and Ecology of Invasive Indo-Pacific Lionfish*. Ph.D. Dissertation. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina USA.
- MORRIS, J.A., SULLIVAN C.V., GOVONI, J.J. (2011). Oogenesis and spawn formation in the invasive lionfish, *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Sci. Mar.*, 75(1), 147-154.
- MUÑOZ, M. (2010). Reproduction in Scorpaeniformes. En K. S. Cole (ed.), *Reproduction and Sexuality in Marine Fishes: Patterns and Processes* (pp. 65-98). University of California Press, EE.UU.
- MUÑOZ, M., CASADEVALL, M. & BONET, S. (2002a). Testicular structure and semicyclic spermatogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zool.*, 83, 213-219.
- MUÑOZ, M., CASADEVALL, M. & BONET, S. (2002b). The ovarian morphology of *Scorpaena notata* shows a specialized mode of oviparity. *J. Fish Biol.*, 61, 877-887.
- PANIAGUA R. (2007). *Citología e Histología Vegetal y Animal*. McGraw-Hill, Interamericana de España. Ilust. ISBN 10: 8448155939 ISBN 13.
- PAVLOV, D. & EMEL'YANOVA, N. (2018). Comparative Analysis of Spermatozoa Morphology in Three Fish Species from the Suborder Scorpaenoidei. *J. Ichthyol.*, 58(2), 226-238.
- PAZ RODRÍGUEZ, B. (2016). *Biología Reproductiva del Pez león (Pterois volitans Linnaeus, 1758) (Scorpaenidae) en el*

- sector oeste de la Reserva de Biosfera, Baconao, Cuba. (Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos), Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S., México.
- PETRINI, S. & ZACCANTI, F. (1998). The effects of aromatase and 5-reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on Bidder's organs development and gonadal differentiation in *Bufo bufo* tadpoles. *J. Exp. Zool.*, 280, 245-259.
- PRIYADHARSINI, S., J. MANOHARAN, D. VARADHARAJAN & A. SUBRAMANIYAN (2013), Reproductive Biology and Histological Study of Red Lionfish *Pterois volitans* from Cuddalore, South East Coast of India. *J. Aquac. Res. Development*, 4, 201-209.
- RODRÍGUEZ, Y. (2008). *Morfología de las gónadas de cuatro especies del género Eleutherodactylus (Anura: Leptodactylidae)*. (Tesis de Doctorado Conjunto en Ciencias Biológicas), UNAM-UH, México-Cuba.
- ROJAS-VÉLEZ, S., TAVERA, J. & ACERO, A. (2019). Unraveling lionfish invasion: is *Pterois volitans* truly a morphologically novel predator in the Caribbean? *Biol. Invasions* 21, 1921-1931.
- RUIZ-CARUS, R., MATHESON, R.E., ROBERTS, D.E. & WHITFIELD, P.E. (2006). The western Pacific red lionfish, *Pterois volitans* (Scorpaenidae), in Florida: evidence for reproduction and parasitism in the first exotic marine fish established in state waters. *Biol. Conserv.*, 128, 384-390.
- SCHATTEN, H. & CONSTANTINESCU, G. (2007). *Comparative Reproductive Biology*. Blackwell Publishing. ISBN 13 987-0-8138-1554-1
- TAKANO, K. (1989). Ovarian structure and gametogenesis. En: F. Takashima & I. Hanyu (eds.), *Reproductive Biology of Fish and Shellfish* (pp. 3-34). Midorishobo, Tokyo, Japón.
- VÁZQUEZ-NIN, G.H. & ECHEVERRÍA, O.M. (2000). *Introducción a la microscopía aplicada a las ciencias biológicas*, UNAM, Fondo de Cultura Económica, México D.F.
- WHITFIELD, P.E., GARDNER, T., VIVES, S.P., GILLIGAN, M.R., COURTENAY, W.R., RAY, G.C. & HARE, J.A. (2002). Biological invasion of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* along the Atlantic coast of North America. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Series 235, 289-297.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Cruz López, C., Sanz Ochotorena, A., Rodríguez Gómez, Y., Lara Martínez, R., Segura Valdéz, M. de L. y Jiménez García, L.F. (2020). Morfología de las gónadas maduras del pez león (*Pterois volitans*: Pisces, Scorpaenidae) en el litoral oeste de La Habana. *Rev. Invest. Mar.*, 40 (2), 26-42.