

HISTOLOGÍA GONADAL DE LA LANGOSTA *Panulirus argus*. 2. MACHOS

Desislava Dávila ^{1*}, Ana Sanz ², Raúl Cruz ^{1*}, Erick Perera ¹ y Germán Saavedra ¹

(1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 entre I y J, Vedado, Ciudad Habana, Cuba.

(*) Autores correspondientes: Emails: davde1978@gmail.com; rcruz@uh.cu

**A la memoria de la
Dra. María Elena Ibarra Martín**

RESUMEN

La estructura macroscópica y microscópica de las gónadas de *Panulirus argus* y la dinámica de su desarrollo durante el ciclo reproductivo fue estudiada en 91 testes de langostas con un intervalo de tallas entre los 66.6 y 162 mm Lc. Las colectas de las muestras se realizaron en la región suroeste del Golfo de Batabanó. Los tipos celulares propuestos según la morfología y el diámetro (diámetro medio e intervalo de confianza 95%) de los machos son: EG ($19.45 \pm 1.02 \mu\text{m}$), ECI ($15.25 \pm 0.92 \mu\text{m}$ y $9.25 \pm 0.6 \mu\text{m}$), ECII ($10.75 \pm 1.25 \mu\text{m}$), ET ($6.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$) y EZ ($3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Los conductos deferentes en su porción media muestran espermatóforos con distinto grado de desarrollo en su interior cuyo ordenamiento define la estructura del espermatóforo colocado en el esternón de las hembras. Se proponen para los machos tres estadios de desarrollo gonadal: Estadio I (no desarrollado); Estadio II (en desarrollo); Estadio III (madurez inicial y madurez avanzada).

Palabras clave: reproducción; histología; espermatozoides; *Panulirus argus*.

ABSTRACT

The macroscopic and microscopic structure of the gonads of *Panulirus argus* and the dynamic of its development during the reproductive cycle were studied in 91 testes of males between the 66.6 and 162 mm of carapace length. The samples collection has been carried out in the Southwest region of the Gulf of Batabanó. The cellular types proposed according to the morphology and diameters (average diameter and 95% confidence limits) in the testes of the males are: EG ($19.45 \pm 1.02 \mu\text{m}$), ECI ($15.25 \pm 0.92 \mu\text{m}$ y $9.25 \pm 0.6 \mu\text{m}$), ECII ($10.75 \pm 1.25 \mu\text{m}$), ET ($6.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$) and EZ ($3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$). The vas deferens in their half portion show spermatophores with different development grade within, whose arrangement defines the structure of the spermatophores placed in the breastbone of the females. We propose for the males three stages of gonadal development: Stage I (not developed); Stage II (in development); Stage III (initial maturity and advanced maturity).

Key words: reproduction; histology; sperm; *Panulirus argus*.

La biología de la reproducción de las langostas espinosas en las regiones tropicales y subtropicales es de vital importancia para el estudio de la conectividad de las poblaciones durante el desarrollo del ciclo vital. En los machos el ciclo de reproducción ha sido estudiado en muy pocas especies. Para los machos de los géneros *Panulirus*, *Palinurus* o *Jasus* no han sido descritos índices de madurez confiables y una situación similar se presenta para la langosta *Nephrops norvegicus* (Fielder, 1964; Chittleborough, 1976; Aiken y Waddy, 1980).

En los machos del género *Panulirus* la diferencia en el crecimiento del segundo y tercer pereiópodo en relación con la talla del carapacho ha sido utilizada como indicador macroscópico de madurez sexual (Berry, 1970; Aiken y Waddy, 1980;

MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). Estas diferencias relacionan las medidas morfométricas con la actividad sexual. Se cree que en los machos, la presencia de un mayor tamaño de estas estructuras es una adaptación que les facilita sacar a las hembras de las oquedades de los refugios para el apareamiento (Aiken y Waddy, 1980; Minagawa y Higuchi, 1997; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). Se ha referido además en *Panulirus cygnus* y *Panulirus versicolor* que los cambios morfométricos relativos de los pereiópodos de los machos se corresponden igualmente con la maduración de las gónadas (Minagawa y Higuchi, 1997).

Criterios tales como el peso y la apariencia de los testículos han sido utilizados también como indicadores de maduración gonadal. A pesar de su importancia existen pocos exámenes histológicos

de los testis directamente relacionados a datos sobre crecimiento relativo (Aiken y Waddy, 1980) En este sentido Minagawa y Higuchi (1997) refieren que el examen histológico es indispensable para determinar claramente el nivel de maduración gonadal y generalmente los estudios histológicos de testis y vasos deferentes, o no se han realizado o son insuficientes.

Para *P. argus*, Mota y Tomé (1965) hacen una descripción de la espermatogénesis basada en observaciones de cortes histológicos realizados en gónadas de esta especie. Estos autores caracterizan los diferentes estadios de desarrollo de las glándulas seminales, describen el desarrollo progresivo de las células reproductivas y sugieren tres estadios de desarrollo para los machos de esta especie. Estos estadios son: Estadio I (no desarrollado), Estadio II (en desarrollo) y Estadio III (maduro) en el que aparecen entre los tipos celulares las espermátidas y los espermatozoides.

Además de la estructura gonadal como indicador de madurez, Heydorn (1969) (citado por Aiken y Waddy, 1980) desarrolló un sistema de tinciones para los vasos deferentes y los órganos de apareamiento de *Panulirus homarus* con el cual puede predecirse el principio de la madurez.

Para algunas especies de decápodos la presencia de esperma o espermatozoides en los vasos deferentes se considera como evidencia de madurez sexual en los machos (Minagawa y Higuchi, 1997). Según estos autores y Nakamura, (2000) el diámetro de los vasos deferentes intermedios cambia de acuerdo al ciclo de maduración en dependencia de la cantidad de matriz interna en que esté embebida la esperma; señalan además que el desarrollo de la parte media de los vasos deferentes se relaciona con la habilidad de copular (y por lo tanto con la madurez funcional) al ser la porción media de los vasos deferentes donde se almacena la esperma y la matriz espermatozóica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y colecta de las muestras

Fueron seleccionadas tres zonas del suroeste del Golfo de Batabanó (Fig. 1), para colectar las muestras de gónadas masculinas utilizadas en el estudio histológico de la reproducción. Las muestras de gónadas de 91 ejemplares, se colectaron en los meses de mayo, septiembre, octubre y noviembre del 2003, febrero del 2004, marzo del 2005 y abril y junio del 2006. Los ejemplares capturados

estuvieron en las clases de talla comprendidas entre los 66.6 - 162 mm del largo del cefalotórax (Lc). Los meses de muestreo se seleccionaron de modo que coincidieran con los picos de reproducción propuestos para la especie en Cuba (Cruz y Phillips, 2000). El largo del carapacho (Lc) se les midió con un Pie de Rey de 0.05 mm de precisión.

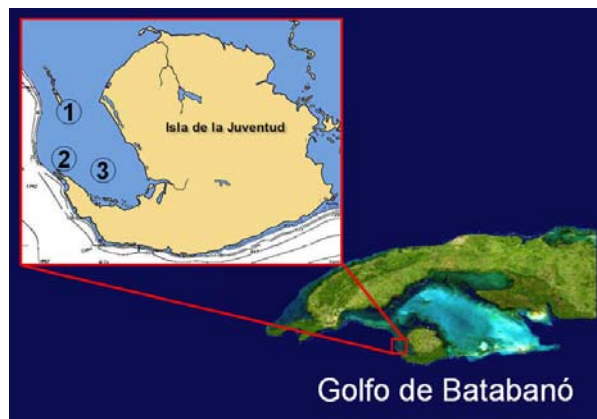


Fig. 1. Mapa del Golfo de Batabanó en el archipiélago cubano. Se presenta una ampliación del suroeste de la Isla de la Juventud, que muestra la ubicación de las zonas de muestreo de langosta (*Panulirus argus*): 1- sur de cayo Los Indios (21° 43' 48" N y 83° 09' 41" O), 2- Punta Francés (21° 39' 52" N y 83° 11' 36" O) y 3- Ensenada de la Siguanea (21° 36' 25" N y 83° 04' 48" O).

Procesamiento de las muestras

Para el procesamiento y tinción de las muestras se utilizaron las metodologías de De la Torre (1985) y Galigher y Kozloff (1971). Todas las mediciones que se presentan en los resultados son referencias de los valores medios \pm el valor del intervalo de confianza al 95%.

Se tomaron fotografías de los cortes histológicos con una cámara Nikon COOLPIX 995 en un microscopio Olympus BH-2. Las mediciones de los diferentes tipos celulares en distintas fases de desarrollo gonadal se realizaron en un microscopio Hertel & Reuss CN-fl. Se midió en cada corte histológico el diámetro de las Espermatogonias: (EG); Espermatocitos I: (ECI); Espermatocitos II: (ECII); Espermátidas: (ET), y Espermatozoides: (EZ) y de sus núcleos cuando fue posible. Se escogieron al azar 15 células de cada tipo celular por campo y se realizaron descripciones de los diferentes estadios de maduración gonadal macroscópica y microscópicamente.

Con un microscopio estereoscópico marca Vanguard con lentes objetivo de 7X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X y 45X y la misma cámara, se

tomaron fotos de secciones de conductos deferentes sólo fijados en solución de Bouin, dado que según Berry y Heydorn (1970) hay estructuras del espermatóforo en formación que se distinguen mejor antes de la tinción.

A partir de las fotos y la inclusión y corte de algunas secciones de conductos deferentes se analizó el desarrollo secuencial de los espermatóforos en la porción media del conducto deferente y se observó la estructura microscópica del mismo. Para este análisis se siguió la nomenclatura brindada por Berry y Heydorn (1970) de las diferentes estructuras del espermatóforo en formación y una vez que éste ha sido colocado.

RESULTADOS

Descripción macroscópica de las gónadas

La gónada masculina es de color blanco lechoso durante todo el desarrollo. Solo cambia de talla, grosor y consistencia en los periodos de madurez, en que crece, se hace más turgente y se desarrollan más los conductos deferentes pareados (Fig. 2).

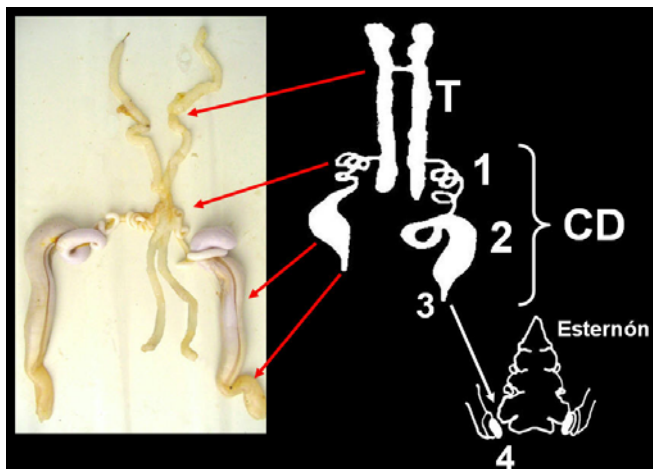


Fig. 2 Morfología del sistema reproductor masculino. Está formado por dos testículos (T) unidos por una fracción estrecha (fraccionada en la foto) y dos conductos deferentes (CD) de color blanco que se caracterizan por presentar tres partes diferentes: (1) espermaductos, túbulos muy finos y curvados; (2) vesículas seminales, porción intermedia, consta de un túbulo helicoidal, curvado hacia adelante y que aumenta su grosor cuando en su interior hay espermatóforos en formación; (3) eyaculatoria distal, semitransparente, y que se conecta con el androporo o poro genital ubicado en el coxopodio del 5to periópodo (4). En la foto de la izquierda se observa la línea hialina en las vesículas seminales.

Cada conducto deferente presenta dos bandas externas paralelas de tejido muscular por dentro del cual hay un epitelio que rodea al “typhlosole”. El “typhlosole” se origina por invaginación de los epitelios glandulares, produce la “matriz secretada” y se localiza sobre ésta. Esta invaginación es la que da origen a la “línea hialina” que se observa macroscópicamente en la porción intermedia del conducto deferente.

Descripción microscópica de las gónadas.

En los machos se observan cinco tipos celulares de acuerdo al grado de desarrollo que presente la gónada: las espermatogonias (EG), los espermatoцитos primario (ECI) y secundario (ECII), las espermatidas (ET) y los espermatozoides (EZ). Estas células se presentan con diferente grado de asociación a la membrana basal de los túbulos seminíferos. Las frecuencias de aparición de cada tipo celular dependen del estadio de desarrollo de las gónadas.

Cuando comienza el ciclo reproductivo el desarrollo ocurre en ondas, de modo que existen siempre capas de células en un mismo nivel de diferenciación, diferentes de las capas que le anteceden y preceden. Asociadas a la membrana basal se observa otro tipo celular que podrían ser células sustentaculares y desempeñar el papel que las células de Sertoli realizan en otros grupos zoológicos. Estas células son de forma irregular y muestran un núcleo muy teñido que contiene muchos gránulos de cromatina; se localizan en sitios donde el tejido conectivo se dispone a modo de septos en dirección al interior del túbulo, aunque sin llegar a dividirlo completamente y no cubren totalmente este tejido sino que aparecen de forma ocasional (Fig. 3).

Se observó que no todos los túbulos seminíferos muestran necesariamente el mismo estado de desarrollo, es decir, coexisten en una misma gónada túbulos con todos los tipos celulares presentes, y otros con sólo algunos tipos celulares, indicio éste, de comienzo del desarrollo.

Espermatogonias (EG)

Las EG son células relativamente grandes que se encuentran en la periferia de los túbulos seminíferos en contacto con la membrana basal. Son de forma redondeada, con un diámetro medio de $19.45 \pm 1.02 \mu\text{m}$ y en su interior se observa un núcleo prominente, muy teñido que muestra

granulaciones dispersas de la sustancia cromática. El núcleo presenta un diámetro medio de $12.46 \pm 0.78 \mu\text{m}$ y tienen una membrana nuclear bien definida rodeada de un citoplasma muy basófilo que contrasta con la fuerte tinción del núcleo (Fig. 3). En ocasiones el citoplasma es muy difícil de observar.



Fig. 3 Corte de una gónada masculina, con un aumento del microscopio de 400X. Detalles de células sustentaculares (CS), espermatogonias (EG), espermatoцитos primarios y secundarios (ECI y ECII) espermatidas (ET) y espermatozoides (EZ).

Espermatoцитos primarios (ECI)

Los espermatoцитos primarios son de un diámetro ligeramente mayor que las espermatogonias. Presentan un núcleo muy bien definido con la sustancia nuclear condensada en forma de gránulos, masas cromáticas y con zonas sin teñir. El citoplasma es en ocasiones difícil de observar. El diámetro medio de este tipo celular y del núcleo es de $15.25 \pm 0.92 \mu\text{m}$ y $9.25 \pm 0.6 \mu\text{m}$ respectivamente (Fig. 3). Los espermatoцитos primarios se localizan más interiormente en los túbulos seminíferos siguiendo a las espermatogonias. En algunas etapas del desarrollo gonadal pueden observarse algunos espermatoцитos primarios en división.

Espermatoцитos secundarios (ECII)

Los espermatoцитos secundarios presentan un diámetro cuyo valor medio es $10.75 \pm 1.25 \mu\text{m}$ con núcleo de $7.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$. En estadios de mayor avance en el desarrollo gonadal la cromatina aparece mucho más condensada, prácticamente no se define una membrana nuclear y el núcleo adquiere la apariencia de una mancha homogénea con bordes difusos y vestigios de masas de cromatina condensada (Fig. 3).

Espermátidas (ET)

Las espermátidas se observan muy vinculadas a los espermatozoides, forman masas de células alrededor de las zonas donde comienzan a verse los espermatozoides en determinados estadios del desarrollo.

Estas células son pequeñas, redondeadas, con citoplasma escaso muy eosinófilo en comparación con la gran tinción de carácter acidófilo que presenta el núcleo. El diámetro medio de este tipo celular es de $6.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$ y sus núcleos, que son muy compactos y no dejan ver gránulos cromáticos, miden como promedio $3.5 \pm 0.92 \mu\text{m}$ (Fig. 4).

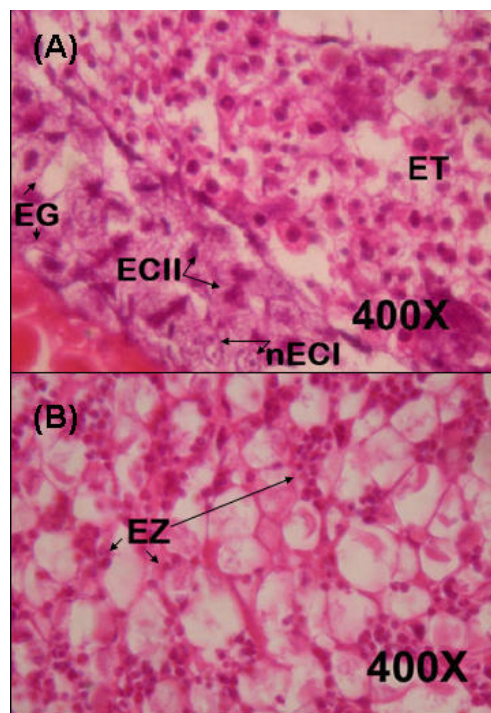


Fig. 4 Cortes (A) y (B) de una gónada masculina, con un aumento del microscopio de 400X. A: Las espermátidas (ET) son células pequeñas y con un núcleo muy compacto; se observan espermatoцитos secundarios (ECII) en estado avanzado de desarrollo y dos núcleos de espermatoцитos primarios (nECI). B: Los espermatozoides (EZ) se observan en una estructura en forma de enrejado.

Las espermátidas se presentan en el lumen o próximo a éste en una estructura similar a un enrejado, muy vinculados a los grupos de espermatozoides.

Espermatozoides (EZ)

Los espermatozoides son células muy pequeñas, con diámetro medio de $3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$, que presentan una mayor compactación del núcleo, cuyo diámetro es muy similar a la de los núcleos de las espermatidas y varía entre $2.25 \pm 0.3 \mu\text{m}$ como promedio. Son espermatozoides muy característicos, no presentan cola, por lo que son fáciles de confundir con las espermatidas. Difieren de éstas en el mayor grado de compactación del núcleo, en tener un citoplasma más escaso y en que se presentan en el lumen de los túbulos en masas muy compactas de células, que dificultan su medición.

Los grupos de espermatozoides se asocian unos con otros en la estructura en forma de enrejado (Fig. 4) que en los estadios más avanzados de desarrollo desaparece por completo. Las masas de espermatozoides se encuentran en contacto con espermatogonias y espermatocitos primarios que permanecen unidos a la membrana basal para garantizar el desarrollo celular en el siguiente ciclo de reproducción.

Descripción del espermatóforo

En la secuencia de fotos (Fig. 5) de cortes de espermatóforos sin teñir se observa la formación de las diferentes capas del espermatóforo en la porción media de los conductos deferentes. Aun en gónadas que según su grosor y consistencia pueden clasificarse como no desarrolladas, se presentan los primeros esbozos de formación del espermatóforo.

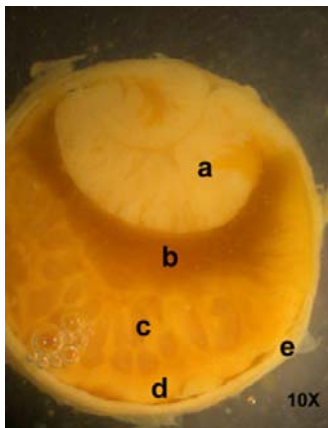


Fig. 5 Corte en la porción media de los conductos deferentes con distinto grado de desarrollo, con un aumento del microscopio de 10X. Typhlosole (a), matriz secretada (b), matriz espermatóforica (c), epitelio secretor (d) y tejido muscular (e).

En el interior de la matriz espermatóforica están embebidos los espermatóforos propiamente dichos que contienen en su interior, en los ejemplares maduros, los espermatozoides. Los espermatóforos se disponen en el interior de la matriz secretada a manera de cordones muy espiralados en estadios avanzados del desarrollo. Este ordenamiento se debe a que los espermatóforos son presionados por la matriz secretada hacia el extremo ventral del conducto deferente. La matriz secretada es una sustancia blanca de consistencia pegajosa que se produce durante el desarrollo a partir de las células del typhlosole. En ejemplares en estadio inmaduro los conductos deferentes son finos y en su interior, en la porción media, los espermatóforos son muy pequeños, menos espiralados y no contienen espermatozoides.

En la estructura de “typhlosole” se observan microscópicamente túbulos con lúmenes vacíos o con gránulos de matriz secretada, recubiertos de vellosidades en las que se observan núcleos cuyo diámetro medio es $9.25 \pm 0.6 \mu\text{m}$; es probable que sean los encargados de la síntesis de la matriz secretada que es de naturaleza eosinófila granular ante la tinción con hematoxilina-eosina. La Fig. 6 muestra la estructura microscópica de las distintas capas en formación en el interior del conducto deferente.

La mayor diferencia observada entre los conductos deferentes procedentes de machos en diferentes estadios de desarrollo, además del diámetro, fue la presencia o no de todas las estructuras mencionadas anteriormente, así como el grosor de la matriz secretada por el “typhlosole”. En estadios inmaduros el grosor de la matriz secretada es ínfimo, mientras que forma una amplia capa en los estadios en desarrollo y maduro. El diámetro de estos conductos deferentes varió desde 4.5 mm en el estadio inmaduro, hasta 13.5 mm en los conductos deferentes de machos en madurez avanzada.

En un corte al espermatóforo, una vez que éste ha sido colocado en el esternón de la hembra, se puede observar la disposición de sus elementos en tres capas, la matriz protectora, una capa más interna denominada matriz espermatóforica y la matriz adhesiva basal (Fig. 7).

Descripción de los estadios de desarrollo

Los machos no mostraron cambios de coloración distinguible en las gónadas en los tres estadios de desarrollo. Solo cambió su tamaño y grosor así

como la presencia o no en la porción media de los conductos deferentes de las capas del espermatóforo. A diferencia de las hembras, en los machos la gónada no ocupa mucho espacio del cefalotórax aun en estado de completa madurez. Por el contrario, los conductos deferentes a lo largo del proceso de desarrollo gonadal, cambian de grosor y se localizan en una gran parte de la zona del cefalotórax anterior a los segmentos abdominales.

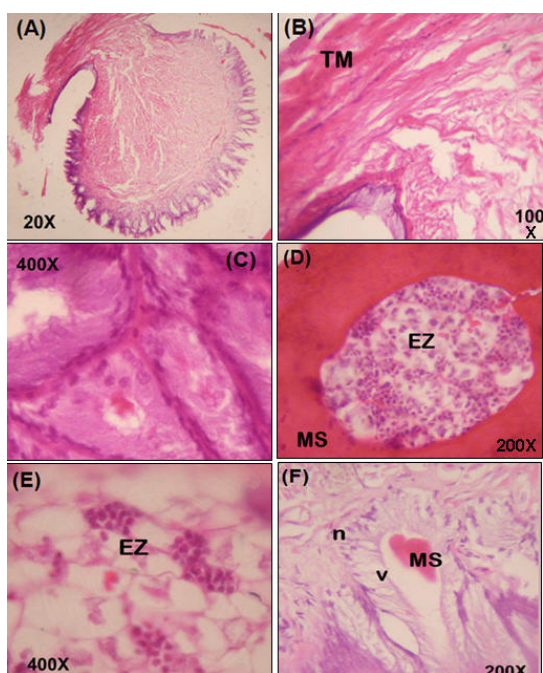


Fig. 6 Estructura microscópica de los diferentes tejidos presentes en los conductos deferentes durante la formación del espermatóforo. Con diferentes aumentos del microscopio se muestran las estructuras siguientes: A) typhlosole. B) tejido muscular (TM) que bordea el conducto deferente encargado de las contracciones para la expulsión del espermatóforo. C) túbulos secretores del typhlosole. D) corte transversal del espermatóforo conteniendo espermatozoides (EZ) embebido en la matriz secretada (MS) de naturaleza eosinófila. E) detalle de los espermatozoides (EZ) en el interior del espermatóforo. F) detalle de las vellosidades (v) de los túbulos presentes en el typhlosole y de los núcleos de dichas células (n)

Para los machos se sigue la clasificación de tres estadios de desarrollo de la gónada propuesta por Mota y Tomé (1965): el Estadio I, no desarrollado; el Estadio II, en desarrollo y el Estadio III, maduro. No obstante, de acuerdo a las características microscópicas y macroscópicas de las gónadas y conductos deferentes observadas en este trabajo se propone una subdivisión del Estadio III en madurez inicial y madurez avanzada.

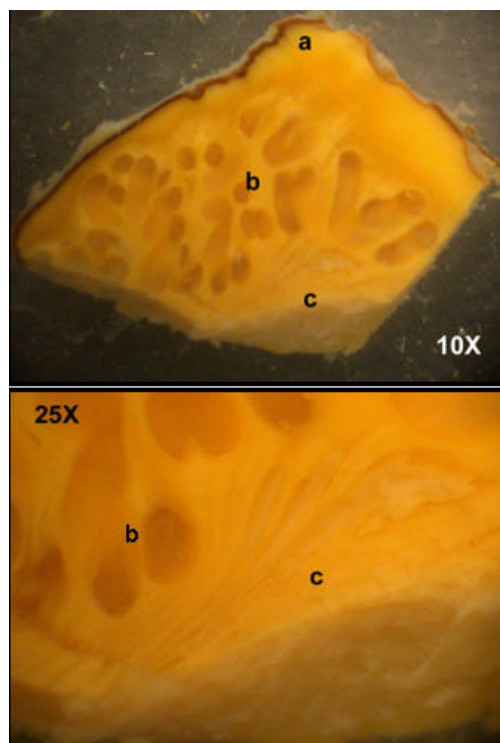


Fig. 7. Disposición de las diferentes capas en el espermatóforo colocado en el esternón de la hembra. Con diferentes aumentos del microscopio se muestran las estructuras siguientes: (a) matriz protectora externa originada a partir de la matriz secretada, por oxidación ante el contacto con el agua de mar se torna primero de color rosa y posteriormente de color negro, (b) matriz espermatofórica conteniendo los espermatozoides. (c) matriz adhesiva basal originada a partir del epitelio secretor.

Estadio I: inmaduro.

Se caracteriza macroscópicamente porque la gónada es totalmente flácida, los lóbulos pueden o no alargarse en el interior del cefalotórax, pero por lo general son de fino diámetro (inferior a los 4 mm). Microscópicamente se observan sólo espermatogonias: en la gónada se observa una disposición muy homogénea de estas células que rellenan por completo los túbulos seminíferos y no se observa lumen (Fig. 8A).

En el conducto deferente puede observarse el comienzo del desarrollo de algunas de las capas del espermatóforo que será depositado en el esternón de la hembra una vez concluido el proceso de maduración sexual. Por dentro del tejido conectivo muy fino que rodea al conducto deferente, se observan estructuras en formas de vellosidades en

cuyo seno se disponen núcleos con la cromatina granulada cuyo diámetro es menor que el de los núcleos de los espermatozoides primarios. Estos núcleos se disponen a manera de una hilera compacta. No se observan espermatozoides en los túbulos espermatofóricos presentes en la matriz secretada.

Estadio II: en desarrollo.

La gónada puede ser de tamaño y consistencia variables. Se observan túbulos seminíferos que pueden presentar los cinco tipos celulares, pero hay predominio de túbulos con espermatozoides primarios, secundarios y espermatogonias. Son escasas las espermátidas y los espermatozoides y en los túbulos en que se observan, son más numerosas las primeras, que coexisten con pequeños grupos de espermatozoides agrupados de manera muy compacta (Fig. 8B).

En la porción media de los conductos deferentes, se observa un mayor número de capas del espermatóforo; en ellos se distingue la zona de la matriz secretada de naturaleza eosinófila en que se encuentran dispuestos los túbulos espermatofóricos con espermatozoides en su interior. Por encima de la matriz secretada se observa el “typhlosole” con sus túbulos y células formando las vellosidades características antes descritas.

Estadio III: madurez inicial.

Los túbulos seminíferos presentan un predominio de los tipos celulares espermátidas y espermatozoides y son estos últimos más abundantes y más compactos. Pueden observarse remanentes de células menos desarrolladas e incluso espermatogonias en las gónadas. Las gónadas en este estadio son turgentes y voluminosas macroscópicamente. Para esta fase de la madurez se propone la clasificación de inicial (Fig. 8C).

Estadio III: madurez avanzada.

Muchos de los túbulos seminíferos se observaron vacíos, sólo con un epitelio que bordea el túbulo interiormente de manera similar a lo que se observa en el “typhlosole” (Fig. 8D). Los conductos deferentes al corte mostraron los espermatozoides dentro de los túbulos espermatofóricos ubicados en el margen inferior de la matriz secretada.

Las gónadas en cuanto al tamaño y consistencia son similares a los estadios anteriores, mientras que en los conductos deferentes muestran un gran engrosamiento por la presencia del espermatóforo

y de mayor cantidad de matriz secretada. El “typhlosole” se presenta de menor tamaño, replegado en posición dorsal, probablemente por acción de la matriz por él secretada.

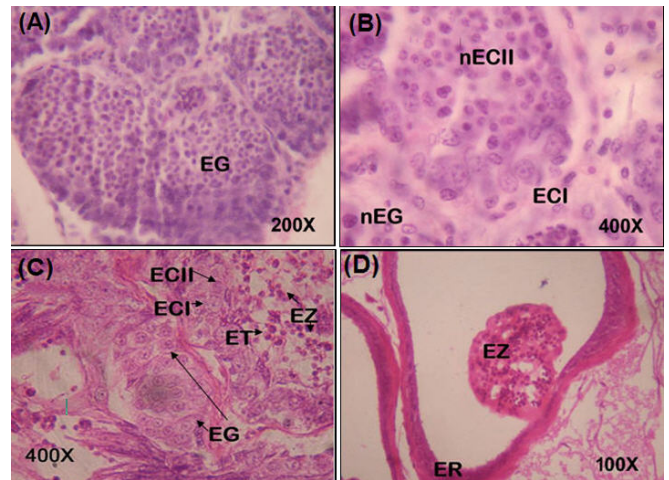


Fig. 8. Estadios de desarrollo de las gónadas en los machos. Con diferentes aumentos del microscopio se muestran las estructuras siguientes: A) Estadio I: no desarrollado con predominio de las espermatogonias (EG) y ausencia de lumen. B) Estadio II: en desarrollo, se observan espermatozoides primarios (ECI) y núcleos de espermatogonias (nEG) y espermatozoides secundarios (nECII). C) Estadio III: madurez inicial, aparecen las espermátidas (ET) y espermatozoides (EZ) y se observan aun espermatogonias (EG) y espermatozoides primarios (ECI) y secundarios (ECII). D) Estadio III: madurez avanzada, el lumen contiene solo espermatozoides (EZ) y los túbulos seminíferos están bordeados interiormente por in epitelio de revestimiento (ER).

Consideraciones generales

Del total de 91 gónadas masculinas analizadas se observaron 10 en EI (inmaduro), correspondientes a los meses de septiembre, noviembre, febrero y marzo; de estas ocho estaban entre los 60-89 mm Lc y solo dos eran mayores de 100 mm Lc.

En EII (en desarrollo) se procesaron 21 gónadas, colectadas en los meses de septiembre, noviembre, febrero, marzo, abril y junio que estaban entre 60-89 mm Lc (de las cuales las colectadas en los meses de febrero y marzo, fueron las de menores tallas). El resto estuvo comprendido entre 90-129 mm Lc. Es notable que en los meses de abril, junio y septiembre se colectaran los animales de mayor talla.

Se encontraron 60 gónadas en EIII de completa madurez colectados en febrero, marzo, abril, mayo,

junio septiembre y noviembre, de éstas hubo siete en madurez avanzada. De las gónadas maduras nueve pertenecían a ejemplares cuyo tamaño estaba entre 70-89 mm Lc, el resto estaban entre 90-162 mm Lc. El mes de abril mostró en las colectas machos maduros superiores a los 100 mm Lc que incluyó al macho de mayor talla colectado.

DISCUSIÓN

Estadios de desarrollo gonadal

En los machos se observan diámetros menores a los propuestos para las espermatogonias y las espermatidas de la especie en Brasil (Mota y Tomé, 1965) aunque el resto de los tipos celulares se incluyen en los intervalos que esos autores refieren.

No se observaron cambios notables en el color de la gónada masculina, solo su consistencia y el desarrollo de la porción media de los conductos deferentes es notorio como indicador macroscópico del estado de maduración.

Los estadios propuestos por Mota y Tomé (1965) para los machos son válidos para la especie en Cuba, con la salvedad del análisis de los conductos deferentes para la inclusión en estadios de desarrollo y la subdivisión que el presente estudio brinda al último estadio referido por estos autores. Esto se debe a que se hallaron gónadas en estadios avanzados de maduración cuyo aspecto macroscópico fue similar al estadio de inmadurez o de inicio del desarrollo. Presentaban sin embargo en la porción media del conducto deferente espermatóforos listos para ser colocados, lo cual corrobora junto a las características microscópicas de la gónada, la madurez en que se encuentra el ejemplar.

Descripción del espermátóforo

La porción media del conducto deferente de *P. argus* muestra un ordenamiento en las capas del espermátóforo en formación muy similar a la estructura observada por Berry y Heydorn (1970) en *P. homarus*.

La formación de estas capas parece ser casi constante a todo lo largo del ciclo reproductivo; incluso en los machos cuyo estadio gonadal era inmaduro, se observaron esbozos de la formación de esta estructura. No obstante, en este estadio no hay gran cantidad de matriz secretada y los conductos espermatofoéricos no contienen esperma-

tozoides en su interior, a diferencia de lo que ocurre en machos ya maduros en que la banda de matriz secretada llega a ser mas ancha incluso que el "typhlosole" que le da origen.

Es razonable que esto ocurra por cuanto en los estadios inmaduros en las gónadas sólo se presentan agrupaciones de espermatogonias sin desarrollar y en estadios en comienzo del desarrollo la evolución de las células llega hasta espermatocitos secundarios. Únicamente en los estadios maduros aparecen en la gónada las espermatidas y espermatozoides que pueden entonces ser acumulados en la porción media del conducto deferente, dentro de los espermatofoeros.

Las bandas paralelas de tejido muscular deben ser las responsables de la colocación por parte del macho del espermátóforo en el esternón de la hembra. MacDiarmid y Butler (1999) plantean que el número de contracciones de la pared de los conductos deferentes determina el volumen del eyaculado.

Al igual que lo descrito por Berry y Heydorn (1970) para *P. homarus*, en esta especie se puede observar la pared del espermátóforo y la matriz secretada por la capa de epitelio secretor periférico. La matriz secretada por el epitelio secretor perisférico presenta una coloración diferente a la matriz secretada por el "typhlosole", por lo que es fácil distinguirlo de éste. Microscópicamente esta diferencia de color se manifiesta por el diferente tamaño de los gránulos en las capas.

Una vez colocado el espermátóforo a la hembra, éste sigue la misma disposición observada por los autores antes mencionados en *P. homarus*, con la matriz protectora originada a partir de la matriz secretada del "typhlosole", la matriz espermatofoérica en la cual se observan los conductos espermatofoéricos con espermatozoides en el interior y la matriz adhesiva basal cuyo origen es la matriz secretada por el epitelio periférico.

En el corte del espermátóforo ya colocado, la pared de los túbulos espermatofoéricos es más conspicua, quizás debido a los cambios que sufre la matriz protectora al entrar en contacto con el agua de mar, que provoca su endurecimiento y cambio de color.

En los machos de mayor talla el grosor de los conductos deferentes maduros fue mayor que en los machos más pequeños. No puede asegurarse a través del análisis histológico que durante el

apareamiento se libere o no todo el contenido del espermátforo. No obstante, en los experimentos en cautividad se observó a un macho aparearse en el mismo día con dos hembras (Dávila *et al.*, 2007), por lo que en los conductos deferentes el macho almacena suficiente cantidad de espermatozoides para fertilizar exitosamente a varias hembras o para aparearse varias veces.

Teniendo en cuenta los meses consignados como picos reproductivos para la especie en Cuba (Cruz y Phillips, 2000), es interesante analizar como se distribuyeron las colectas por meses y por talla de los individuos. De las 91 muestras analizadas histológicamente, 10 animales capturados en los meses de pausa reproductiva estaban en Estadio I y eran en su mayoría de talla pequeña. Esto es de esperar dado que el sistema de apareamiento en las langostas es poligino, lo cual significa que el macho dominante es quien realiza el mayor número de cópulas seleccionando primeramente las hembras de mayor talla (Lipcius *et al.*, 1983; Lipcius, 1985; MacDiarmid y Kittaka, 2000; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006). Los machos pequeños por este motivo no toman parte activa de la reproducción sino que tienden a efectuar mudas.

En Estadio II hubo 21 animales tanto de tallas pequeñas como grandes. Las colectas de talla más grande se concentraron en los meses del primer pico reproductivo y en septiembre, donde por lo general comienza el segundo pico.

El mayor número de muestras colectadas estaban en Estado III. Del total de 60 muestras maduras solo 9 eran animales pequeños, lo cual apoya el hecho de que las tallas mayores son las que llevan a cabo activamente la reproducción. Los animales de mayor talla en este estadio se colectaron en el mes de abril, justo cuando comienza el mayor pico reproductivo del año. No obstante, aun en meses en que supuestamente está declinando el segundo pico reproductivo, se encontraron machos de tallas grandes aptos para la reproducción.

Los resultados del estudio histológico de las gónadas aquí mostrados en conjunto con el análisis del momento del año en que fueron colectadas las mismas, muestran que solo individuos en Estadio III son aptos, fisiológica y funcionalmente para la cópula, aun cuando en estadios de menor desarrollo reproductivo existan esbozos de la formación de las estructuras reproductivas y se compruebe la presencia de espermatozoides.

MacDiarmid y Sainte-Marie (2006) refieren que en los machos, la reducción en su número y talla por efecto de la pesca, también disminuye los suplementos espermáticos, aunque hasta ahora no se haya tomado este criterio como un factor limitante en las poblaciones. Estos autores señalan además que las poblaciones de langostas pueden responder a la explotación pesquera y al aumento de la mortalidad a través de cambios fenotípicos compensatorios de los caracteres reproductivos: las poblaciones que comienzan a ser explotadas pueden a través de mecanismos compensatorios iniciales aumentar la talla de primera maduración (SOM: Size at the Onset of Maturity); sin embargo al ser sometidas a una intensa pesquería las poblaciones exhiben un decremento en el valor del SOM como resultado de la extracción de los individuos de mas rápido crecimiento lo cual puede estar acompañado de cambios compensatorios en las características reproductivas de las hembras.

Aunque el valor de SOM se consigna para las hembras, sería interesante estudiar en los machos de poblaciones sometidas a una intensa explotación pesquera, qué efecto tiene la extracción de los individuos de mayor talla sobre la talla a la que los machos comienzan a ser aptos para la reproducción. El estudio histológico de gónadas masculinas es el primer paso a dar en este análisis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto titulado: "Estudio biológico de la langosta (*Panulirus argus*) en condiciones controladas de laboratorio: reproducción, reclutamiento y alimentación", el cual fue financiado por el Ministerio de Educación Superior (MES-Cuba). Agradecemos la valiosa colaboración de Marina Torres Rodríguez del Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología (Inhem); Centro de Investigaciones Pesqueras; así como a los laboratorios de Anatomía Patológica de los hospitales Calixto García, González Coro, el policlínico Clodomiro Acosta y la Escuela de Ciencias Médicas Girón. Este trabajo no podría haberse realizado sin la ayuda de la tripulación del barco de investigaciones "Felipe Poey" y es además el sencillo homenaje de sus autores a la Dra. Maria Elena Ibarra Martín, por su incansable labor como formadora de muchas generaciones de biólogos marinos cubanos.

REFERENCIAS

Aiken, D.E. and S.L. Waddy (1980): Reproductive Biology. In: *The Biology and Management of*

Lobsters (J.S. Cobb and B.F. Phillips, eds.), vol I: Physiology and Behavior, Cap. 4, pp: 215-268.

Berry, P.F. (1970): Mating Behavior, Oviposition and Fertilization in the Spiny Lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus). *S. Afr. Assoc. Mar. Biol. Res. Invest. Rep.* 24: 1-16.

Berry, P.F. and A.E.F. Heydorn (1970): A comparison of the spermatophoric masses and mechanism of fertilization in southern african spiny lobsters (Palinuridae). *S. Afr. Assoc. Mar. Biol. Res. Invest. Rep.* 25: 1-18.

Chittleborough, R.G. (1976): Breeding of *Panulirus longipes cygnus* George Under Natural and Controlled Conditions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 27: 499-516.

Cruz, R. y B.F. Phillips (2000): The artificial shelters (pesqueros) used for the spiny lobster (*Panulirus argus*) fisheries in Cuba. In: *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture* (B.F. Phillips B.F. and J. Kittaka, eds.), 2nd Ed., Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, pp: 400-419.

Dávila, D., R. Cruz, E. Perera y G. Saavedra (2007): Apareamiento y desove de la langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804) en cautiverio en Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 28(1):29-41.

De la Torre Callejas, S.L. (1985): *Manual básico de microtecnia biológica*. Ed. Científico-Técnica, 150 pp.

Fielder, D.R. (1964): The spiny lobster, *Jasus lalandei* (H. Milne-Edwards), in South Australia. II. Reproduction. *Aus. J. Mar. Freshwater. Res.* 15: 133-144.

Galigher, A.E. and E.N. Kozloff (1971) *Essentials of Practical Microtechniques* (Lea and Febiger, eds.) Philadelphia Press, P.A.

Lipcius, R.N., M.L. Edwards, W.F. Herrnkind and S.A. Waterman (1983): In situ mating behavior of the spiny lobster *Panulirus argus*. *J. Crustac. Biol.* 3(2): 217-222.

Lipcius, R.N. (1985): Size-dependent reproduction and molting in spiny lobsters and other long-lived decapods. In: *Crustacean Issues 3. Factors in adult growth* (A.M. Wenner, ed.) Balkema, Rotterdam, pp: 129-148.

MacDiarmid, A.B. and M.J. Butler (1999): Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46: 14-24.

MacDiarmid, A.B. and J. Kittaka (2000): Breeding. In: *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture* (B.F. Phillips and J. Kittaka, eds.), 2nd Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, pp: 485-507.

MacDiarmid, A.B. and B. Sainte-Marie (2006): Reproduction. In: *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries*. (B.F. Phillips, ed.), Cap. 2, Blackwell Publishing Ltd, pp: 45-77.

Minagawa, M. and S. Higuchi (1997): Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *J. Crust. Biol.* 17(1): 70-80.

Mota, M.I. and G.S. Tomé (1965): On the histological structure of the gonads of *Panulirus argus* (Latreille). *Arq. Estaç. Biol. Mar. Univ. Feder. Ceará* 5:15-26.

Nakamura, K. (2000): Maturation. In: *Spiny lobsters: fisheries and culture* (B.F. Phillips and J. Kittaka), 2nd Ed., Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, pp.474-84.

Aceptado: 4 de enero del 2010