

# HISTOLOGÍA GONADAL DE LA LANGOSTA *Panulirus argus*. 1. HEMBRAS

Desislava Dávila <sup>1\*</sup>, Raúl Cruz <sup>1\*</sup>, Ana Sanz <sup>2</sup>, Erick Perera <sup>1</sup> y Germán Saavedra <sup>1</sup>

(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 correspondiente: Emails: [davde1978@gmail.com](mailto:davde1978@gmail.com); [rcruz@uh.cu](mailto: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 24 gónadas de langostas con un intervalo tallas entre los 61 y 127.1 mm Lc. Las colectas de los ejemplares se realizaron en la región suroeste del Golfo de Batabanó. Los tipos celulares propuestos según la morfología y diámetro (diámetro medio e intervalo de confianza 95%) en las gónadas de las hembras son: ovogonias ( $19.70 \pm 0.63 \mu\text{m}$ ), ovocitos primarios en fase inicial del crecimiento (OI,  $54.80 \pm 1.81 \mu\text{m}$ ), ovocitos primarios en crecimiento avanzado (OII,  $95.29 \pm 3.98 \mu\text{m}$ ) y ovocitos maduros (OIII,  $427.3 \pm 28.43 \mu\text{m}$ ). Se observó que los diámetros de los OII se diferencian en dos grupos en relación con el largo del cefalotórax (Lc). Se proponen cinco estadios de desarrollo gonadal: EI (inmaduro); EII (inicio del desarrollo); EIII (desarrollo medio); EIV (desarrollo final pre-ovulatorio) y EV (regresión o fase post-desove). Se describen células atrésicas en diferentes estadios del desarrollo gonadal.

Palabras clave: reproducción; ovario; ovocitos; células atrésicas; *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 24 ovaries of females between the 61 y 127.1 Lc. The collection of the samples has been carried out in the Southwest region of the Gulf of Batabanó. The cellular types proposed according to the morphology and its diameters (average diameter and 95% confidence limits) in the ovary of the females are: Oogonium ( $19.70 \pm 0.63 \mu\text{m}$ ), Oocyte in first stage of development (OI,  $54.80 \pm 1.81 \mu\text{m}$ ), Oocyte in advanced growth (OII,  $95.29 \pm 3.98 \mu\text{m}$ ) and ripe oocyte (OIII,  $427.3 \pm 28.43 \mu\text{m}$ ). It has been observed that the diameters of the OII can be differentiate in two groups depending on the carapace length (in the present study named OIIA and OIIB); in females between 61 and 96 mm CL, the average diameter and 95% confidence limits of OIIA was  $95.29 \pm 3.98 \mu\text{m}$  and in females between 97 and 127 mm CL the average of OIIB was  $135.79 \pm 5.96 \mu\text{m}$ . We propose for the females five stages of gonadal development: Stage I: (immaturity); Stage II: (begin of the development); Stage III: (half develop); Stage IV: (final develop pre-ovulatory) and Stage V: (Regression or post-spawns phase). Atretic cells are described in different phases of gonadal development.

Key words: reproduction; ovary; oocytes; atretic cells; *Panulirus argus*.

La langosta espinosa *Panulirus argus* es la especie de la familia Palinuridae que presenta la mayor extensión geográfica en su distribución y sus zonas de agregación se localizan en una superficie de aproximadamente 472926 km<sup>2</sup> (Cruz *et al.*, 1995).

El ciclo de reproducción de las langostas espinosas se ha estudiado en detalle en muy pocas especies. La información básica sobre maduración sexual, ciclos anuales de reproducción, épocas de desove, fecundidad y potencial reproductor proviene fundamentalmente de la pesquería (Nakamura, 2000). En Cuba los estudios sobre la dinámica repro-

ductiva de la langosta (*P. argus*) provienen por lo general de muestreos aleatorios de ejemplares colectados en refugios artificiales o pesqueros (Cruz y Phillips, 2000). Las hembras alcanzan la talla de primera madurez sexual a los 81 mm Lc y en tallas mayores a los 120 mm Lc la fecundidad media es superior al millón de huevos (Cruz y León, 1991)

En las langostas hembras se han establecido estadios de madurez que incluyen caracteres sexuales primarios, como el cambio de color de las gónadas y su talla relativa (Buesa y Mota-Alves,

1970; Fielder, 1964; Cruz, 1980; Juinio, 1987; Ramírez, 1996), el índice gonadosomático (Gómez *et al.*, 1994) o la talla de los ovocitos a todo lo largo del ciclo reproductivo (Fielder, 1964; Mota y Tomé, 1965; Nakamura, 2000), y caracteres sexuales secundarios, que se apoyan en el desarrollo de las setas donde se fijan los huevos fecundados en los pleópodos (Gregory y Labisky, 1981) y en la diferencia en el crecimiento relativo de las segundas y terceras patas en ambos sexos en relación con el largo del cefalotórax (Aiken y Waddy, 1980; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006).

Para *P. argus*, se ha definido la anatomía gonadal durante el ciclo reproductivo (Buesa y Mota-Alves, 1970; Ramírez, 1996) y se describieron histológicamente los estadios de desarrollo de las gónadas por sexos a nivel microscópico (Mota y Tomé, 1965). Sin embargo, no se ha abordado la relación dinámica entre los aspectos macroscópicos y microscópicos de los ovarios en esta especie.

Por las razones expuestas, el objetivo del presente estudio es describir y comparar la estructura macroscópica y microscópica de las gónadas de las hembras de *P. argus* y la dinámica de su desarrollo durante el ciclo reproductivo y de acuerdo a esos resultados proponer una nueva clasificación de los estadios de desarrollo gonadal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y colecta de las muestras

Fueron seleccionadas tres zonas del suroeste del Golfo de Batabanó, Punta Francés, Cayo Los Indios y la Ensenada de la Siguanea (Fig. 1) para coleccionar las muestras de gónadas de langostas hembras utilizadas en el estudio histológico de la reproducción.

Las muestras de gónadas de 24 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 meses de muestreo se seleccionaron de modo que coincidieran con los picos de reproducción propuestos para la especie en Cuba (Cruz y Phillips, 2000).

Una vez colectados los animales se midió el largo del cefalotórax con un Pie de Rey de precisión 0.05 mm. Se anotó el sexo, el color de la gónada, la presencia o no de espermátforo (chapa) o sus restos; la presencia de masa ovígera (freza) y su color, así como el estadio de desarrollo de las setas

ovígeras de acuerdo a los criterios de Gregory y Labisky (1981). Los ejemplares capturados estuvieron en las clases de talla comprendidas entre los 61 – 127,1 mm del largo del cefalotórax (Lc).



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

Las gónadas se fijaron en líquido de Bouin por espacio de 20 horas y se sometieron a la técnica de inclusión en parafina (De la Torre, 1985). Se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m que se colorearon con Hematoxilina-Eosina según la metodología de Galigher y Kozloff (1971).

Se tomaron fotografías de los cortes histológicos con una cámara Nikon COOLPIX 995 en un microscopio Olympus BH-2. Se realizaron mediciones en un microscopio Hertel & Reuss CN-fl de todos los tipos celulares.

Se midió en cada corte histológico el diámetro de cada tipo celular y sus núcleos en diferentes fases de desarrollo gonadal. 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. Todas las mediciones que se presentan en los resultados son referencias de los valores medios  $\pm$  el valor del intervalo de confianza al 95%.

Con un microscopio estereoscópico marca Vanguard y la cámara antes mencionada, se tomaron

fotos e hicieron mediciones de ovocitos III provenientes de gónadas maduras.

**RESULTADOS**

**Descripción macroscópica de las gónadas**

En la condición inmadura los ovarios son muy delgados, pequeños y flácidos lo que los hace difíciles de localizar en algunas clases de talla; son de color blanco parejo y comienzan a tomar una tonalidad blanco-lechosa que cambia de amarillo pálido hasta color crema en la fase inicial del desarrollo gonadal. En esta fase aumenta también el grosor de las gónadas, su turgencia y el espacio que ocupan en la cavidad cefalotorácica. Con el avance de este proceso las gónadas se tornan de un color naranja claro primero (Fig. 2) y luego naranja muy intenso; se vuelven muy grandes y turgentes, los lóbulos anteriores y posteriores se expanden más profundamente en el cefalotórax y en los primeros segmentos del abdomen respectivamente. El tejido en este estado se vuelve quebradizo y expone fácilmente el contenido interno: ovocitos maduros sin fecundar, de una talla suficientemente grande como para verlos a simple vista.

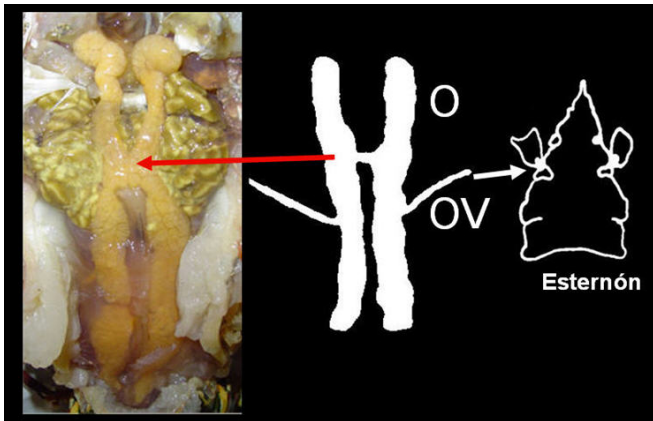


Fig. 2. Morfología del sistema reproductor femenino. Está formado por dos ovarios (O), en forma de H, unidos por una fracción estrecha y dos oviductos (OV), en la línea media del ovario, que se conectan al ginoporo ubicado en el coxopodio del 3er periópodo. La flecha roja indica la posición del ovario en la cavidad del cefalotórax en un estadio medio de desarrollo.

**Descripción microscópica de las gónadas.**

En las gónadas femeninas de hembras de cualquiera de las tallas analizadas se presentan, de acuerdo al estadio de desarrollo gonadal, todos

los tipos celulares: ovogonias, ovocitos primarios en la fase inicial del crecimiento (OI), ovocitos primarios en la fase avanzada del crecimiento (OII) y ovocitos maduros (OIII). Se observan numerosas células foliculares alrededor de los dos últimos tipos celulares antes mencionados (OII y OIII). Todos los tipos celulares se encuentran en el interior de las gónadas en estructuras llamadas pseudo-loci que son secciones formadas por septos cuyo origen es el tejido conectivo periovárico. Pueden presentarse células con diferentes grados de atresia en algunos de los estadios de desarrollo.

**Ovogonias (O)**

Las ovogonias, células iniciales del desarrollo sexual que provienen de un epitelio germinal, son células pequeñas redondas cuyo diámetro medio se encuentra entre  $19.70 \pm 0.63 \mu\text{m}$  y tienen citoplasma escaso. (Fig. 3A). El diámetro medio de los núcleos es de  $11.73 \pm 0.49 \mu\text{m}$ . Éstos muestran en su interior gránulos de cromatina y pequeños nucléolos de los cuales uno predomina en cuanto al diámetro.

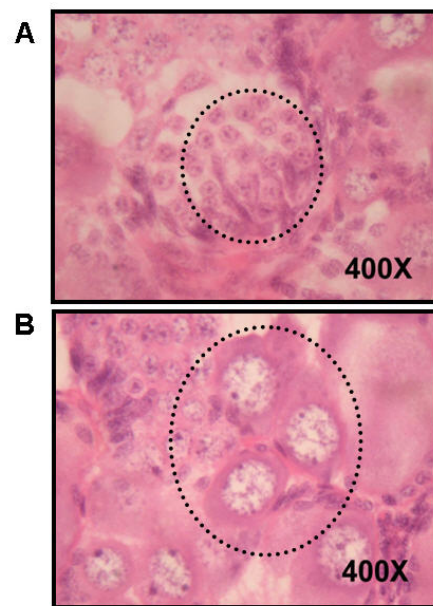


Fig. 3. Ovogonias (O) y ovocitos primarios (OI). Los círculos discontinuos destacan: A) los lechos germinales con ovogonias en su interior y B) detalles de los ovocitos primarios alrededor de un lecho germinal, se observa que el núcleo del OI es grande y con granulaciones de la cromatina alrededor del nucléolo.

Las ovogonias se presentan agrupadas en número variable, desde 6, hasta 14, en el centro de cada pseudo-locus. En estadios de desarrollo temprano

las ovogonias están rodeadas de ovocitos I fundamentalmente. En estadios preovulatorios, donde predominan los ovocitos maduros y los ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento, pueden verse también ovogonias.

### Ovocitos primarios en fase inicial del crecimiento (OI)

Las células de los ovocitos primarios (OI) pueden ser redondas o poligonales con bordes redondeados, con diámetro medio  $54.80 \pm 1.81 \mu\text{m}$ . Por lo general este tipo celular se encuentra alrededor de las ovogonias en el interior de los pseudo-loci, en grupos de número variable (Fig. 3B). El núcleo es muy grande, redondo u oval y engloba un nucléolo (que puede llegar a ser voluminoso), rodeado de granulaciones de cromatina. El diámetro medio del núcleo es de  $23.90 \pm 0.62 \mu\text{m}$ . En el citoplasma de estas células se observan granulaciones en forma de vesículas eosinófilas de un color más claro.

### Ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento (OII)

Los ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento (OII) son células redondas o poliédricas con bordes redondeados que presentan como característica más notoria la presencia de nucléolos en número variable (Fig. 4A).

En estadios más avanzados del desarrollo, el contenido nuclear en estas células es más difuso, sólo se observan vestigios de cromatina condensada y no se distinguen los nucléolos. En el citoplasmas las granulaciones eosinófilas se incrementan desde la periferia de la célula hacia núcleo (Fig. 4B).

Aunque la talla observada de este tipo celular es muy variable, los diámetros de los ovocitos secundarios (OII) tienden a diferenciarse en dos grupos en relación con la longitud del cefalotórax (Fig. 5). En las hembras entre 61 y 96 mm Lc (N=14), el diámetro medio de este tipo celular es de  $95.29 \pm 3.98 \mu\text{m}$ , mientras que en las hembras entre 97 y 127 mm Lc (N=7) el diámetro medio midió  $135.79 \pm 5.96 \mu\text{m}$ . Algunos de estos ovocitos con nucléolos accesorios en sus núcleos (lo que los caracterizaría como ovocitos secundarios OII según Mota y Tomé, 1965) pueden tener un diámetro similar al de los ovocitos primarios (OI).

Los núcleos de los ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento (OII) son redondos u ovals con diámetro medio de  $32.02 \pm 0.99 \mu\text{m}$ . Su diámetro por lo general disminuye gradualmente

con el aumento del diámetro del ovocito. No obstante existen excepciones de ovocitos más grandes cuyos núcleos son mayores que la talla media y están deformados probablemente por la acumulación de vitelo a su alrededor.

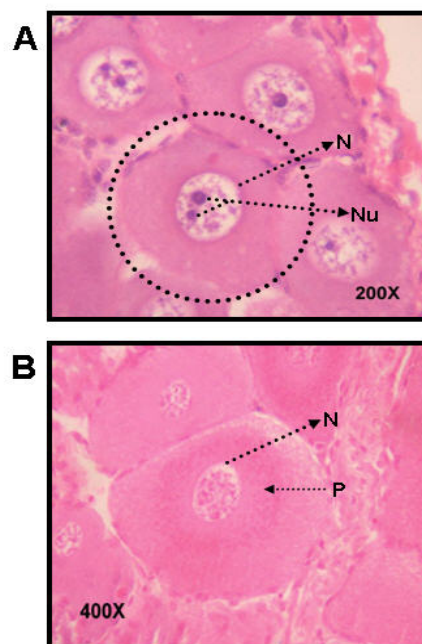


Fig. 4. Ovocitos en fase avanzada del crecimiento (OII). A) El círculo discontinuo señala una célula poliédrica, con su núcleo (N) y los nucléolos (Nu). B) Las flechas discontinuas señalan el incremento de los gránulos de vitelo desde la periferia (P) de la célula hacia el núcleo (N), donde se observa una zona de una coloración más intensa.

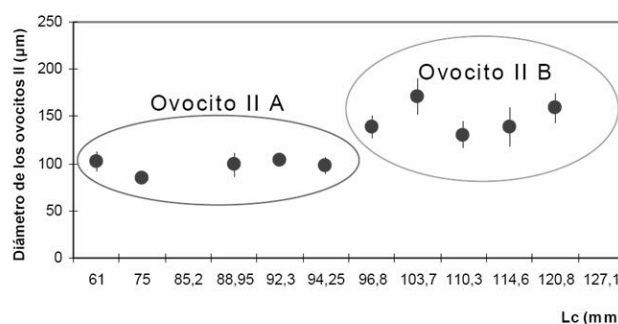


Fig. 5. Tendencia a la diferenciación por clases de talla de los individuos, respecto a al diámetro medio ( $\pm$  valor del intervalo de confianza al 95%) de los ovocitos en fase avanzada del crecimiento (OII). La denominación de OIIA (N = 14) y OIIB (N = 7), se utilizó para diferenciar los intervalos de tallas (Lc) de las hembras y N el número de OII que fueron medidos.

### Ovocitos maduros (OIII)

Los ovocitos maduros (OIII) son células cuyo citoplasma es de naturaleza eosinófila y están llenos de gránulos de vitelo (Fig. 6A). Los gránulos parecen fundirse entre ellos hacia la periferia de la célula. La forma de estas células es circular aunque pueden ser también poliédricas por la tensión contra las capas de tejido conectivo de los septos que en estadios avanzados del desarrollo gonadal se hacen muy finos. Las células foliculares que rodean a este tipo celular se hacen difíciles de observar. El núcleo de los ovocitos maduros es de forma oval y aparece como una mancha, sin definición de los elementos nucleares y con una tinción homogénea (Fig. 6B); el núcleo puede también presentar ciertas granulaciones y un nucléolo excéntrico. El diámetro medio de los ovocitos maduros (OIII) y sus núcleos es de  $427.3 \pm 28.43 \mu\text{m}$  y  $42.14 \pm 3.40 \mu\text{m}$ , respectivamente.

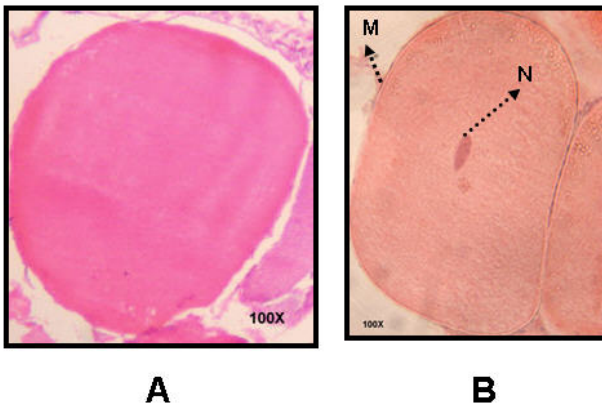


Fig. 6. Ovocitos maduros (OIII). A) El máximo diámetro de los ovocito maduro es de aproximadamente  $456 \mu\text{m}$ ; el vitelo es abundante en el citoplasma, el nucléolo decrece en talla y en ocasiones es difícil su observación. B) Se muestra el engrosamiento de la membrana vitelina (M) y el núcleo (N) de este estadio es de forma oval.

Los OIII en gónadas totalmente maduras pueden ser vistos a simple vista, presentan diámetros entre  $390.00$  y  $450.08 \mu\text{m}$  antes de ser fecundados, por lo que no existen grandes diferencias en relación con los diámetros de este tipo celular medidos al corte (Fig. 7).

### Ovocitos atrésicos (OA)

Las células atrésicas son de diferente tipo en dependencia del estadio gonadal en que ocurren, existen en este sentido ovocitos atrésicos (OA) provenientes de los restos de ovocitos primarios en

fase inicial y avanzada del crecimiento (OI y OII) en gónadas que transitan por el inicio del desarrollo (Fig. 8A, B y C) y ovocitos atrésicos (OA) originados por el proceso de reabsorción (Fig. 8D). La atresia en ovocitos que transitan por el inicio del desarrollo se presenta con un grado de degradación celular avanzado, lo que se evidencia en un citoplasma separado en muchas ocasiones de la membrana citoplasmática que también tiende a fraccionarse; el núcleo en estas células puede o no presentarse y las células foliculares se hacen más evidentes a su alrededor. El otro tipo de atresia, que se observa en hembras en estadio de reabsorción o post-desove, se caracteriza por mostrar en el interior de la célula gránulos eosinófilos que se tiñen de igual color que los gránulos de vitelo. Estos gránulos pueden observarse en ocasiones separados de la membrana citoplasmática.

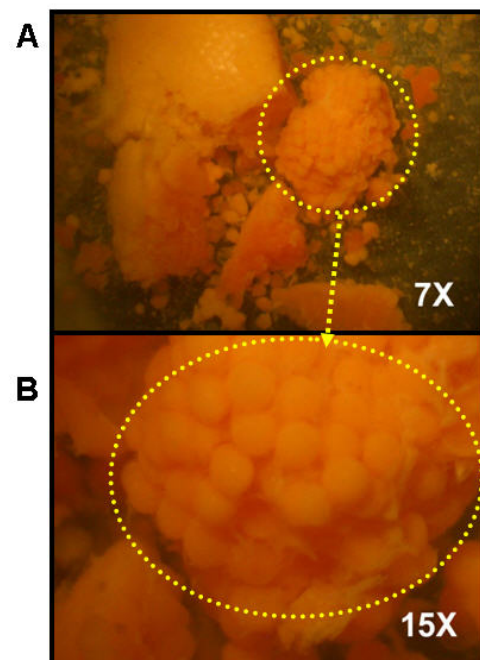


Fig. 7. Fragmento de gónada madura solo fijada de líquido Bouin. A) Con un aumento de 7x y B) 15x, se observan los detalles de un conjunto de ovocitos maduros (circulo discontinuo).

### Dinámica del proceso de desarrollo de las células sexuales

El diámetro de las células sexuales tendió a incrementarse de manera exponencial a lo largo del desarrollo (Fig. 9). Las ovogonias mostraron una mayor homogeneidad en el diámetro celular,

en relación con las variaciones que se observaron en los ovocitos OI, OII y OIII.

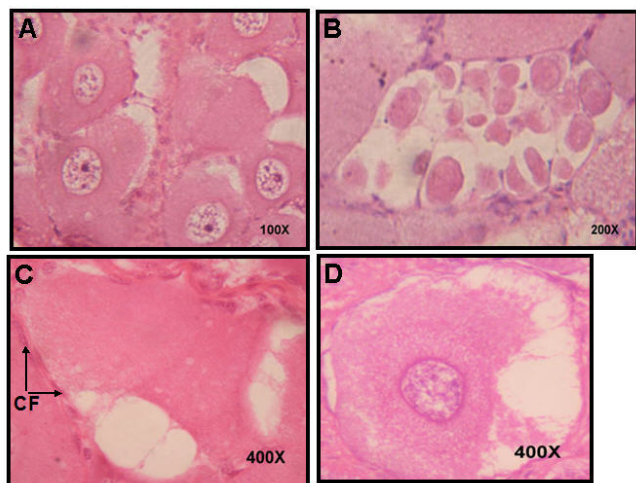


Fig. 8. Ovocitos atrésicos. A) OI atrésicos en estadio de inicio del desarrollo B) OII atrésico en estadio de inicio del desarrollo C) OII atrésico en estadio de inicio del desarrollo, se observan células foliculares (CF) rodeando a la célula, no se observa el núcleo. D) Detalle de la atresia durante la reabsorción (estadio post-ovulatorio)

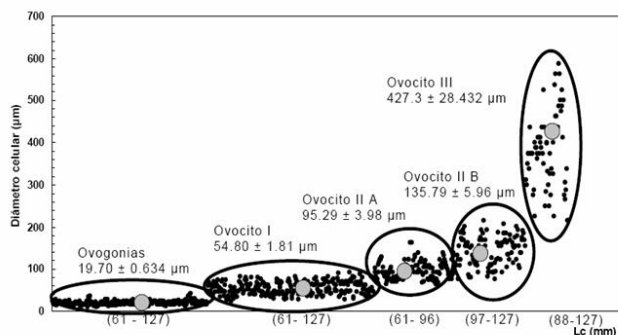


Fig. 9. Dinámica del proceso de desarrollo gonadal femenino. Se muestran los valores puntuales de cada célula que se midió (círculo oscuro). Se identificaron cinco grupos (puntos agrupados en un ovalo oscuro), se plotearon sus diámetros medios (círculo claro) de los diferentes tipos de células presentes en las gónadas femeninas analizadas (N=24) en relación con el largo del cefalotórax y se ofrecen los valores medios ± el intervalo de confianza al 95%

### Propuesta de estadios de desarrollo gonadal

De acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas descritas para la especie en este

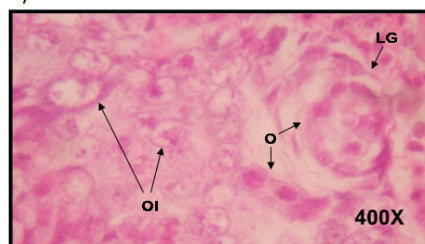
trabajo se proponen cinco estadios de desarrollo gonadal para las hembras.

#### Estadio I (EI): Inmadurez

Las gónadas son de color blanquecino, flácidas y pequeñas; al corte, las células se disponen en el interior de pseudo-loci, éstos están formados por septos de tejido conectivo que son gruesos y que muestran zonas con senos hemolinfáticos. El ordenamiento del centro a la periferia, es el siguiente: al centro las ovogonias en lechos germinales, rodeadas de grupos de entre 6 a 9 ovocitos primarios (OI) no muy avanzados en el desarrollo (Fig. 10A).

Fig. 10. Estadios de desarrollo gonadal de las hembras de langosta (*Panulirus argus*). Se muestran los cortes histológicos y un esquema del aspecto macroscópico de los ovarios en cada estadio de desarrollo. A) Estadio I: Ovario inmaduro, las gónadas son flácidas, pequeñas y de color blanquecino; al corte se observan lechos germinales (LG) de ovogonias (O) y ovocitos primarios no muy desarrollados (OI). B) Estadio II: Inicio del desarrollo, las gónadas son de color blanco a crema; al corte se observan O, OI y OII dentro de los pseudo-loci (pl). Imagen superior: disposición de los pseudo-loci en las gónadas. Imagen inferior, detalle de la organización dentro de los pseudo-loci, de los tipos celulares. C) Estadio III: Desarrollo medio, las gónadas son de color naranja-pálido, al corte la estructura interna es homogénea y predominan los OII en los pseudo-loci (pl). A los OII cercanos a los septos (s) no se les ve el núcleo. D) Estadio IV: Desarrollo preovulatorio, las gónadas de color naranja-rojo intenso y ocupan casi la totalidad del cefalotórax, al corte predominan los OIII a los que en su mayoría no se les ve el núcleo. E) Estadio V: Regresión o fase post-desove, gónadas turgentes de color entre naranja fuerte y crema, al corte se observan OI, OII, OIII (no liberados) y lechos de O y ovocitos atrésicos (OA)

A) Estadio I

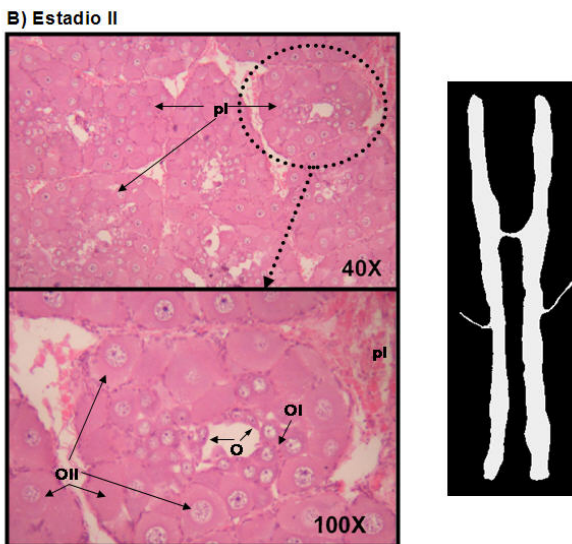


#### Estadio II (EII): Inicio del desarrollo

Las gónadas pueden ser de color blanquecino y variar hasta crema; son flácidas aunque el

diámetro de los lóbulos es ligeramente mayor que en el estadio anterior. Microscópicamente se observan ovogonias (O), ovocitos primarios en fase inicial y avanzada del crecimiento (OI y OII), cuyo ordenamiento en el interior de los pseudo-loci es muy homogéneo y del centro a la periferia, coincide con el estadio anterior. Aparecen como elementos nuevos en este estadio los ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento (OII) más en contacto con los septos de tejido conectivo.

Los septos en este estadio no son tan gruesos. En los OII presentes no se observaron grandes variaciones en el diámetro respecto a los OI, éstos sólo se diferencian por la presencia o no de nucléolos accesorios y granulaciones en la periferia del citoplasma. Algunos ovocitos en este estadio sufren atresia con diferente grado de descomposición celular y disminuyen en número los lechos germinales en la gónada. (Fig. 10 B).

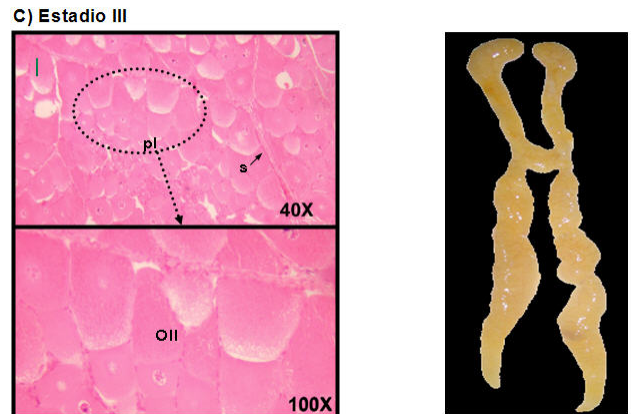


**Estadio III (EIII): Desarrollo medio**

Las gónadas son de colores naranja pálido, más turgentes y voluminosos que las anteriores y ocupan casi toda o toda la cavidad cefalotorácica. La estructura interna de las gónadas es más homogénea y muestra predominantemente ovocitos primarios en fase avanzada de crecimiento (OII) de una talla superior a los observados en estadios anteriores. La forma de éstos es redondeada, en ocasiones hexagonales y presentan numerosas granulaciones en su interior.

En este estadio en que las gónadas presentan un grosor intermedio, a los ovocitos más cercanos a

los septos, en ocasiones no puede observárseles el núcleo, y de presentarse éste, tienen uno o dos nucléolos accesorios y masas compactas de cromatina. Este estadio puede definirse como próximo a la madurez. Se observan numerosas células foliculares muy aplanadas rodeando a los OII. No se observan lechos germinales y son muy escasas las Ovogonias y los ovocitos primarios en fase inicial del crecimiento (OI). No se distingue aun en este estadio un lumen en la gónada (Fig. 10 C).



**Estadio IV (EIV): Desarrollo final preovulatorio.**

Las gónadas son de color naranja cuando están totalmente maduras; muestran en su interior fundamentalmente ovocitos maduros (OIII) y entre éstos en ocasiones se encuentran sitios con ovogonias muy pequeñas y algunos ovocitos primarios (OI y OII) de diámetros similares. En este estadio las gónadas son más voluminosas y llegan a ocupar, además de la cavidad cefalotorácica, parte de los primeros segmentos abdominales.

En los ovocitos maduros (OIII) de este estadio no se observó el núcleo. El citoplasma es granuloso, con vesículas de vitelo que forman por fusión grandes masas en los bordes de la célula. En este estadio ya se distingue un lumen que se origina en los sitios donde confluyen los septos que atraviesan la gónada. Los septos se hacen más finos en su interior y se dificulta la observación de los senos hemolinfáticos (Fig. 10 D).

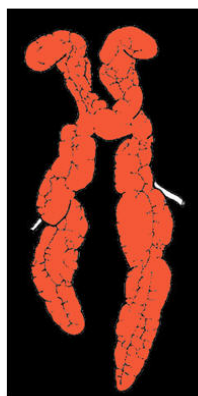
**Estadio V (EV): Regresión o fase post-desove.**

Las gónadas en este estadio son turgentes, de tamaño considerable y ocupan gran parte de la cavidad cefalotorácica. Presentan un color que varís desde naranja fuerte hasta crema. Los

ejemplares en este estadio tienen freza de reciente colocación de color naranja brillante y en ocasiones restos de espermatóforo. En su interior la gónada muestra numerosos ovocitos primarios y maduros (OI y OII, OIII) no liberados, algunos lechos germinales con ovogonias (O) y se observan ovocitos atrésicos (OA) con granulaciones y tinción similar al vitelo. Estas gónadas se clasificaron en regresión dado el proceso de reabsorción que sufren y la condición de la gónada en conjunto con los datos macroscópicos de colecta (Fig. 10 E).

Desde el punto de vista de la vitelogénesis, el estadio I y el V son no vitelogénicos, el estadio II podría estar relacionado con la vitelogénesis primaria y los estadios III y IV con la vitelogénesis secundaria.

D) Estadio IV



E) Estadio V



## DISCUSIÓN

En la literatura existe mucho desacuerdo en cuanto a cuáles criterios seguir para clasificar los estadios reproductivos de una especie determinada. Para las diferentes especies existen estadios de desarrollo definidos por la apariencia macroscópica de la gónada, su talla así como el diámetro de los ovocitos observados con diferentes técnicas de microscopía y tinción (Nakamura, 2000). De este modo se definen estadios y subestadios de

desarrollo que dificultan la comparación de unas especies con otras, como por ejemplo la clasificación planteada por Nakamura (2000) para *P. japonicus*, basado en el proceso de vitelogénesis y el diámetro medio del ovocito.

En *P. argus* este problema es también evidente; existen varias clasificaciones macroscópicas y microscópicas no homologadas unas con otras y que no coinciden totalmente con los resultados antes expuestos para esta especie en Cuba.

La primera clasificación propuesta para *P. argus* fue la de Buesa y Mota-Alves, (1970) quienes de acuerdo con el color de la gónada femenina propusieron una escala de colores implementada desde el año 1965 en Cuba y desde 1966 en Brasil. Aunque en términos generales esta clasificación es muy útil en el trabajo de campo, puede ofrecer dudas al observarse en el medio natural gónadas en estado de regresión cuyo color es semejante a gónadas recién desovadas o en estadio de desarrollo medio. La misma problemática se presenta en el Estadio de inmadurez con relación al Estadio de inicio del desarrollo, en cuyo caso es más compleja la identificación si se realiza sólo por caracteres macroscópicos.

Algunos autores como Aiken y Waddy (1980) señalan que el color como criterio de selección debe tomarse con reserva, ya que al determinarse visualmente se introduce un sesgo en el punto de cambio de un estadio a otro. Las diferencias entre estos estadios no deben analizarse solamente a través de la coloración, sino también por otros caracteres externos macroscópicos (como la presencia o no de freza y restos de espermatóforo) o procederse al análisis histológico para con certeza determinar el estadio.

Mota y Tomé (1965) realizaron la descripción histológica de las gónadas masculinas y femeninas y proponen tres y cinco estadios de desarrollo respectivamente, pero no homologan estos estadios con la descripción macroscópica de la gónada ni lo relacionan con la talla o el mes de colecta. En ese estudio también se presenta la dificultad de que las células se clasifican en ovogonias, ovocitos primarios, ovocitos secundarios y óvulos de acuerdo con criterios como el diámetro celular y la presencia en el núcleo de uno o más nucléolos.

Si bien es cierto que los ovocitos secundarios en la definición de Mota y Tomé (1965) muestran como caracteres de selección la presencia de nucléolos accesorios y el diámetro celular, también hay que

tener en cuenta que el ovocito secundario propiamente dicho es el producido por la primera división meiótica en que se reduce a la mitad el número de cromosomas; este proceso en las hembras ocurre una vez finalizada la fase de crecimiento del ovocito primario (Balinsky, 1970; Gilbert, 2003; Paniagua *et al.*, 2002).

El ovocito secundario no muestra un incremento considerable del diámetro sino que, prácticamente con una talla idéntica a la adquirida en la fase de crecimiento, se divide por segunda vez para separar cromátidas duplicadas dando lugar al óvulo y un segundo corpúsculo polar (Paniagua *et al.*, 2002; Aleaga, 2006).

En el presente trabajo, aunque se siguen los criterios de clasificación utilizados por estos autores, se propone otra nomenclatura para los tipos celulares de modo que los llamados por Mota y Tomé (1965) ovocitos secundarios (OII), son fases avanzadas en el desarrollo de los ovocitos primarios (OI) en su proceso de crecimiento (proceso que es más marcado luego de comenzada la vitelogénesis secundaria) y los óvulos son ovocitos maduros (OIII). No se analizó a través de técnicas histoquímicas el contenido del núcleo ni se observaron los cromosomas con facilidad, por lo que no puede aseverarse que el ovocito (OII) propuesto en este trabajo tenga realmente el número haploide de cromosomas que lo incluiría en la clasificación como ovocito secundario.

De acuerdo a lo antes expuesto, los ovocitos primarios y los ovocitos en crecimiento avanzado podrían entonces definirse mejor si se considera el tipo de proceso de vitelogénesis que tiene lugar: el primario, en que los precursores del vitelo se forman dentro del ovocito con la intensa síntesis que dirige el núcleo en esta fase, o el secundario, en que los precursores del vitelo vienen a través de la hemolinfa desde otros sitios de síntesis, presumiblemente desde el hepatopáncreas (Aiken y Waddy, 1980; Nelson *et al.*, 1983; Paniagua *et al.*, 2002).

Los diámetros de los tipos celulares encontrados en este trabajo, aunque coinciden con algunos de los valores de intervalos observados por Mota y Tomé (1965) en *P. argus* de Brasil, fueron por lo general menores a los referidos por estos autores. La única excepción fueron las ovogonias, que en este trabajo presentaron mayor diámetro que el observado en la misma especie en Brasil (Tabla 1)

Tabla 1. Valores de diámetro de los diferentes tipos celulares observados en *Panulirus argus* en Brasil (Tomado de Mota y Tomé, 1965)

TIPOS DE CELULAS	DIAMETRO
Ovogonias	15.6 – 23.4
Ovocitos primarios	42.9 – 69.0
Ovocitos secundarios	78.9 – 174.0
Ovulos	355.3 – 701.7

No existen referencias en otras especies sobre la tendencia a la diferenciación en dos grupos de los ovocitos primarios en fase avanzada del crecimiento (OII) en relación con el tamaño de la hembra. El origen de la diferenciación en dos grupos (OIIA y OIIB) en relación a la longitud del cefalotórax podría pensarse que se debe a la técnica de inclusión en parafina. Ésta puede ofrecer sesgos, por cuanto las células durante el proceso de inclusión, en dependencia del contenido de vitelo (que depende a su vez del grado de desarrollo gonadal), absorben con mayor o menor dificultad esta sustancia. Sin embargo las mediciones de ovocitos maduros visibles macroscópicamente (OIII) solamente fijados y conservados en alcohol 70%, no mostraron grandes diferencias en relación con las mediciones hechas de este tipo celular en los cortes histológicos, por lo que se puede asegurar que no hubo grandes errores en las mediciones por causa de la técnica.

Al corte, los ovocitos maduros con mayor contenido de vitelo mostraron una mayor tendencia a presentar deformaciones de las células. Para minimizar el efecto de estas deformaciones sobre las mediciones, se midieron las células de forma redonda o con tendencia a presentar diámetros mayor y menor similares.

Sin embargo, se hace necesario analizar un mayor número de muestras de gónadas provenientes de ejemplares de diferentes tallas para verificar si esto está relacionado con la habilidad de las hembras de tallas más grandes de incorporarse al stock reproductivo antes que las hembras más jóvenes, y con el hecho de que las hembras de mayor talla pueden aparearse más de una vez en una misma estación de reproducción sin realizar una muda previa (Lipcius, 1985; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006).

Se plantea además que con el aumento del tamaño de la hembra es mayor el número de larvas que eclosionan exitosamente en *Panulirus interruptus*

(Randall, 1840) (Báez-Hidalgo *et al.*, 2004). Esto podría deberse a un proceso de desarrollo gonadal más maduro en hembras de mayor talla, que origine huevos con más contenido de vitelo, lo cual garantiza el éxito en la eclosión de una mayor cantidad de larvas y que podría traducirse en la presencia de ovocitos de mas grandes en estas clases de talla.

En este sentido MacDiarmid y Sainte-Marie, (2006) refieren que los huevos de mayor talla tienden a tener un mayor contenido de lípidos y dan origen a larvas de mayor tamaño que pueden tener mejores caracteres de supervivencia que las larvas eclosionadas de huevos mas pequeños. En *P. argus* los índices de fecundidad son mayores en hembras más grandes (Cruz, 1980; Bertelsen y Matthews, 2001), lo que también podría estar relacionado con estas diferencias.

La elevada fecundidad en hembras de mayor edad pudiera también estar relacionada con la selección que hace el macho de las hembras de tallas más grandes y aptas para aparearse. En este proceso de selección el macho coloca espermatozoides de mayor tamaño a hembras grandes que son capaces de liberar un número mayor de huevos que las más pequeñas (MacDiarmid y Butler, 1999; MacDiarmid y Kittaka, 2000; MacDiarmid y Sainte-Marie, 2006).

Aguilar *et al.*, (2007) refiere la presencia de de glóbulos de vitelo fusionados en uno de los estadios de la atresia en peces. Estos glóbulos fueron tambien observados en *P. argus* en la fase de reabsorción. Puesto que la atresia en peces se considera como un indicador de contaminación ambiental. En este sentido se hace necesario un estudio más profundo de este proceso en cada estadio de desarrollo de *P. argus* y su posible relación con factores ambientales.

## AGRADECIMIENTOS

El resultado del presente estudio forma parte del proyecto de investigación 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 la MSc. 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, 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.

Aguilar, C., G. González-Sansón, I. Hernández, D.L. MacLachy and K.R. Munkittrick (2007): Application of an effects-based assessment protocol in a tropical coastal system: status of bicolor damselfish (*Stegastes partitus*) on the north shore of Cuba. *Ecotox. Environ. Safety* 67: 459-471.

Aleaga, L. (2006): Desarrollo de las gónadas de *Isostichopus badiionotus* (Echinodermata: Holothuridae) en la región sur-oriental de Cuba. Universidad de La Habana, *Tesis de Maestría*, 80 pp.

Báez-Hidalgo, M., E. Díaz-Iglesias y E. Perera-Bravet (2004): Number of larvae hatched vs female size in the red lobster. *The Lobster Newsletter*, 17(1): 10-12.

Balinsky, B.I. (1970): *An Introduction to Embryology*. Ed. Revolucionaria Instituto Cubano del Libro. 3ra. Edición, 725 pp.

Bertelsen, R.D., and T.R. Matthews (2001): Fecundity dynamics of female spiny lobster (*Panulirus argus*) in a south Florida fishery and Dry Tortugas National Park Sanctuary. *Mar. Freshw. Res.* 52:1559-1565.

Buesa, R.J. y M.I. Mota Alves (1970): Escala de colores para el estudio del ciclo reproductor de la langosta *Panulirus argus* (Latreille) en el área del Mar Caribe. *FAO. Fish. Rep.* 71, 2: 9-12.

Cruz, R. (1980): Fecundidad y madurez sexual en la langosta comercial *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Crustacea: Palinuridae) en Cuba. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 5(1):1-27.

- Cruz, R. y M.E. de León (1991): Dinámica reproductiva de la langosta (*Panulirus argus*) en el archipiélago cubano. *Rev. Invest. Mar.* 12(1-3): 234-245.
- Cruz, R., J. González, M.E. de León y R. Puga (1995): La pesquería de la langosta espinosa (*Panulirus argus*) en el Gran Caribe. Evaluación y pronóstico. *Rev. Cub. Invest. Pesq.* 19(2): 63 - 76.
- 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 and J. Kittaka, eds.) Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, pp. 400-419.
- 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.
- Gilbert, S.F. (2003) The saga of the germ line. In: *Developmental biology* (S.R. Singer, ed.), vol. III, 7 Ed., pp:183-220.
- Gómez, E.D., M.A.R. Juinio and N.A. Bermas (1994): Reproduction of *Panulirus longipes longipes* in Calatagan, Batangas, Philippines. *Crustaceana* 67(1): 110-20.
- Gregory, D.R.Jr. and R.F. Labisky (1981): Ovigerous setae as an indicator of reproductive maturity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille). *Northeast Gulf Science* 4(2): 109-113.
- Juinio, M.A.R. (1987): Some aspects of the reproduction of *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae). *Bull. Mar. Sci.* 41(2): 242-52.
- 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 IV (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.), Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, 2<sup>nd</sup> Ed., 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.
- 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, eds.) Fishing News Books, Blackwell Science: Oxford, pp: 474-84.
- Nelson, K., D. Hedgecock and W. Borgeson (1983): Photoperiodic and ecdysial control of vitellogenesis in lobsters (*Homarus*) (Decapoda: Nephropidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40(7): 940-947.
- Paniagua, R., M. Nistal, P. Sesma, M. Álvarez-Uría, B. Fraile, R. Anadón y F.J. Sáez (2002): Gametogénesis y Fecundación. En: *Citología e Histología Vegetal y Animal*, Cap. 8, 3ra Ed., McGraw-Hill. Interamericana, pp: 371-408.
- Ramírez, A. (1996): Reproducción de la langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreille, 1804) en la costa Noreste de Quintana Roo. Universidad Nacional Autónoma de México, *Tesis de Maestría*, 85 pp.

Aceptado: 4 de enero del 2010