

Descripción histológica de la oogénesis y espermatogénesis del camarón de cultivo, *Litopenaeus vannamei*

Histological description of oogenesis and spermatogenesis in the cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Jorge Alfaro-Montoya¹

¹Estación de Biología Marina, Lic. Juan Bertoglia Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica. jorge.alfaro.montoya@una.cr

Abstract.- This research describes detailed stages of oogenesis and spermatogenesis at histological level in the white shrimp of the western Pacific, *Litopenaeus vannamei*. Both processes were studied in cultured organisms under reproduction conditions in the laboratory. Oogenesis was histologically analyzed from the proliferation of 9 µm oogonia and their growth into primary oocytes passing through different phases of previtellogenesis: stages of synapsis, chromatin nucleolus, early perinucleolus and late perinucleolus of 84-94 µm. Primary vitellogenesis was observed in primary oocytes of 71-112 µm, containing acidophilic globules and surrounded by a layer of thick follicle cells (12-35 µm). Secondary vitellogenesis is evident in oocytes of 165-202 µm with numerous acidophilic granules in the cytoplasm and surrounded by thin follicle cells; then cortical crypts appear, indicating the stage of prematuration and preparation for ovulation. Spermatogenesis was characterized at light microscopy from spermatogonia and their gradual maturation into primary and secondary spermatocytes, early, mid and advanced spermatids and sperm. The process is synchronous in regions of seminiferous tubules, and asynchronous in neighboring tubules, generating cells at different stages up to mid spermatids in the testicles. Advanced spermatids and spermatozoa were only observed in the vasa deferentia; this finding appears not to be universal in Penaeidae.

Key words: Penaeidae, spermatogenesis, oogenesis, *Litopenaeus vannamei*

Resumen.- Esta investigación describe las fases detalladas de la oogénesis y la espermatogénesis, a nivel histológico, del camarón blanco del Pacífico americano, *Litopenaeus vannamei*. Ambos procesos fueron estudiados en organismos cultivados y llevados a condiciones controladas de reproducción en el laboratorio. La oogénesis fue histológicamente analizada desde la proliferación de oogonios de 9 µm y su crecimiento en oocitos primarios pasando por las diversas fases de pre-vitelogénesis: estados de sinapsis, cromatina y nucléolos, peri-nuécleolos tempranos y peri-nuécleolos tardíos de 84-94 µm. La vitelogénesis primaria fue observada en oocitos primarios de 71-112 µm, conteniendo glóbulos acidofílicos y rodeados de células foliculares grandes (12-35 µm). La vitelogénesis secundaria se evidencia en oocitos de 165-202 µm con numerosos gránulos acidofílicos en el ooplasma y rodeados de células foliculares pequeñas; posteriormente aparecen las criptas corticales que señalan la fase de pre-maduración y preparación para la ovulación. La espermatogénesis fue caracterizada con microscopía de luz desde los espermatogonios y su maduración gradual de espermatocitos primarios, secundarios, espermatidas tempranas, medias, avanzadas y espermatozoides. El proceso es sincronizado en regiones del túbulo seminífero y asincrónico en túbulos vecinos, generando células en las diversas fases hasta espermatidas medias en los testículos. Espermátidas avanzadas y espermatozoides fueron observadas únicamente en los ductos deferentes, lo que parece no ser universal en Penaeidae.

Palabras clave: Penaeidae, espermatogénesis, oogénesis, *Litopenaeus vannamei*

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de camarones marinos de cultivo alcanzó cerca de 3,7 millones de toneladas métricas (tm) durante el 2010, de lo cual 2,7 millones de tm correspondió a la especie americana *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), representando el 72% del cultivo mundial siendo Asia el principal cultivador de *L. vannamei* (78%) (FAO 2012).

Los procesos gametogénicos han sido descritos en diversas especies de la familia Penaeidae, principalmente en relación a la oogénesis. De particular relevancia, por su detalle histológico, son los trabajos de Yano (1988) y Tan-Fermin & Pudadera (1989), que describen el desarrollo de los oocitos de *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888) y *Penaeus monodon*, respectivamente. Bell & Lightner

(1988) describieron aspectos básicos de la histología de ovarios y del sistema reproductor masculino de Penaeidae, representada por *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871). Las fases de la ovogénesis en *L. vannamei* fueron descritas parcialmente por Yano *et al.* (1988); posteriormente, se realizaron análisis comparativos de su histología ovárica entre hembras silvestres y de cultivo (Palacios *et al.* 1999), en relación a las escalas de evaluación, mediante diámetro de oocitos (Palacios *et al.* 2003), y región ovárica (Ceballos-Vázquez *et al.* 2003), describiendo parcialmente la histología del proceso. En *Farfantepeneaus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967), Nazari *et al.* (2007) describieron aspectos histológicos, morfométricos y bioquímicos de los oocitos en maduración inducida.

Estudios histológicos de la espermatogénesis en Penaeidae fueron reportados para *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) por King (1948), *Metapeneaus dobsoni* (Miers, 1878) por Vasudevappa (1992), *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837) por Mohamed & Diwan (1993) y *M. monoceros* (Fabricius, 1798) por Abraham *et al.* (2007). En *Parapeneaus longirostris* (Lucas, 1846) se evaluó la ultraestructura de la espermatogénesis (Medina 1994).

En el género *Litopenaeus*, los estudios reproductivos se han referido a la anatomía, con la descripción de los testículos y ductos deferentes, los cuales se subdividieron en 4 regiones: ducto deferente proximal, ducto medio ascendente y descendente, ducto distal y ámpulas terminales (King 1948, Talbot *et al.* 1989, Ro *et al.* 1990, Bauer & Cash 1991). Adicionalmente, se ha estudiado la ultraestructura parcial de la espermatogénesis (Alfaro 1994) y de los espermatozoides maduros en relación a la capacitación luego de la cópula (Alfaro *et al.* 2007) y recientemente se reportó la localización y estructura histológica de la glándula androgénica (Alfaro-Montoya & Hernández 2012), que controla las características primarias y secundarias de los machos.

A pesar de la importancia comercial de *L. vannamei* y del desarrollo científico y tecnológico en diversos países de América, Europa y Asia, no existe una descripción detallada y clara a nivel histológico de las fases que experimentan las hembras y machos de *L. vannamei* para la producción de gametos, particularmente de la espermatogénesis. El objetivo de la presente investigación fue describir los procesos de gametogénesis y ofrecer una herramienta de uso práctico para evaluar la ovogénesis y espermatogénesis a nivel histológico en *L. vannamei*,

que es fundamental para estudiar el efecto de variables ambientales, químicas y hormonales sobre dichos procesos. Para la nomenclatura de las especies de Penaeidae, se utilizó la taxonomía de Pérez-Farfante & Kensley (1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Hembras y machos de *L. vannamei* (peso promedio= 20 g) fueron colectados antes de la cosecha, luego de 3 meses de cultivo semi-intensivo comercial en estanques de tierra ubicados en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, octubre, 2011. El crecimiento continuó en la Estación de Biología Marina 'Lic. Juan Bertoglia Richards' (EBM) en tanques externos sombreados, con cambio parcial diario del agua. La alimentación se basó en 3% del peso corporal de una dieta artificial suplementada con pescado congelado.

Hembras adultas (28-37 g) fueron transferidas al 'Laboratorio de Reproducción Controlada' de la EBM para inducir la maduración ovárica según protocolos convencionales, que se describen brevemente a continuación. Los tanques de maduración internos de 9 m², con 0,50 m de profundidad de agua, tuvieron recambio diario de agua de 25-30%, salinidad de 34, temperatura de 28°C, fotoperiodo natural (13 h luz: 11 h oscuridad). Ablación ocular unilateral y alimentación al 20% del peso corporal diario con calamares, gusanos poliquetos y pescado fresco congelado.

Los estados de maduración ovárica fueron registrados bajo luz intensa. Para su determinación se utilizó una escala visual basada en las descripciones de King (1948), Yano (1988), Yano *et al.* (1988), y Tinikul *et al.* (2011).

Se removieron los ovarios en diferentes estados de maduración, así como testículos y ductos espermáticos de machos adultos (24-30 g) en agua más fría (23°C), preservados en el fijador de Davidson durante 24 h y almacenados en 50% etanol, según Bell & Lightner (1988). Los tejidos fueron incluidos en parafina, seccionados en orientación transversal y teñidos con hematoxilina-eosina (por la Empresa 'Andrómeda', San José, Costa Rica). Complementariamente, para una mejor interpretación del proceso, se realizaron observaciones histológicas de ductos espermáticos de *L. stylirostris* y *Litopenaeus occidentalis* (Streets, 1871), así como de la ultraestructura de espermatozoides obtenidos desde espermatóforos de *L. vannamei*, mediante microscopía electrónica de transmisión, según protocolos previamente reportados (Alfaro *et al.* 2007).

RESULTADOS

OOGÉNESIS

Para la determinación de la madurez ovárica en forma visual se utilizó la siguiente escala:

Estado I: ovario inmaduro. El ovario es transparente sin delineamiento distinguible.

Estado II: ovario en desarrollo temprano. El ovario es visible como una línea opaca a lo largo del eje central dorsal.

Estado III: ovario en desarrollo. El ovario es visible como una banda gruesa amarilla.

Estado IV: ovario maduro. El ovario es túrgido, ancho y de color rojo oscuro a naranja. El apareamiento y desove son inminentes en este estado.

La Tabla 1 resume la información recolectada con respecto a la escala visual y las fases de la oogénesis a nivel histológico.

El desarrollo de los oocitos de *L. vannamei* se inicia con los oogonios, con un tamaño de 9 μm de diámetro y presencia de cromatina fibrilar. Estos se localizan cerca de la región ventral (zona de proliferación) de cada lóbulo ovárico y experimentan división mitótica para generar oocitos primarios que activan la meiosis hasta profase I, generando oocitos en fase de sinapsis con poco citoplasma (9-11 μm ; Fig. 1a-b).

Los oocitos primarios inician su crecimiento y pueden observarse en fase de cromatina-nucléolos con citoplasmas levemente basofílicos (21-22 μm) en la región cercana a la zona de proliferación (Fig. 1b-c); estas células carecen de células foliculares a su alrededor. En hembras inmaduras (estado I), los oocitos están en pre-vitelogénesis y las fases anteriores se complementan con numerosos oocitos primarios en fase de peri-nucléolos tempranos (30-61 μm) y peri-nucléolos tardíos (84-94 μm ; Fig. 1d), que se diferencian por el mayor volumen del citoplasma y la presencia de un estrato de células foliculares en la fase tardía. Un nucléolo central y varios periféricos se observan en ambos estadios.

Tabla 1. Relación entre el desarrollo de oocitos y la evaluación visual de la madurez ovárica de *Litopenaeus vannamei* / Relation between oocyte development and visual evaluation of ovarian maturation in *Litopenaeus vannamei*

Estado de madurez visual	Fase de oogénesis	Población principal de oocitos	Diámetro de oocitos (μm)
I	Pre-vitelogénesis	En proliferación	9
		Peri-nucléolos tempranos	30-61
		Peri-nucléolos tardíos	84-94
II	Vitelogénesis primaria	En proliferación	9
		Peri-nucléolos tempranos	30-61
		Peri-nucléolos tardíos	84-94
		Vitelogénicos primarios	71-112
III	Vitelogénesis secundaria	En proliferación	9
		Peri-nucléolos tempranos	30-61
		Vitelogénicos secundarios	165-202
IV	Pre-maduración	En proliferación	9
		Peri-nucléolos tempranos	30-61
		Pre-maduración	160-220

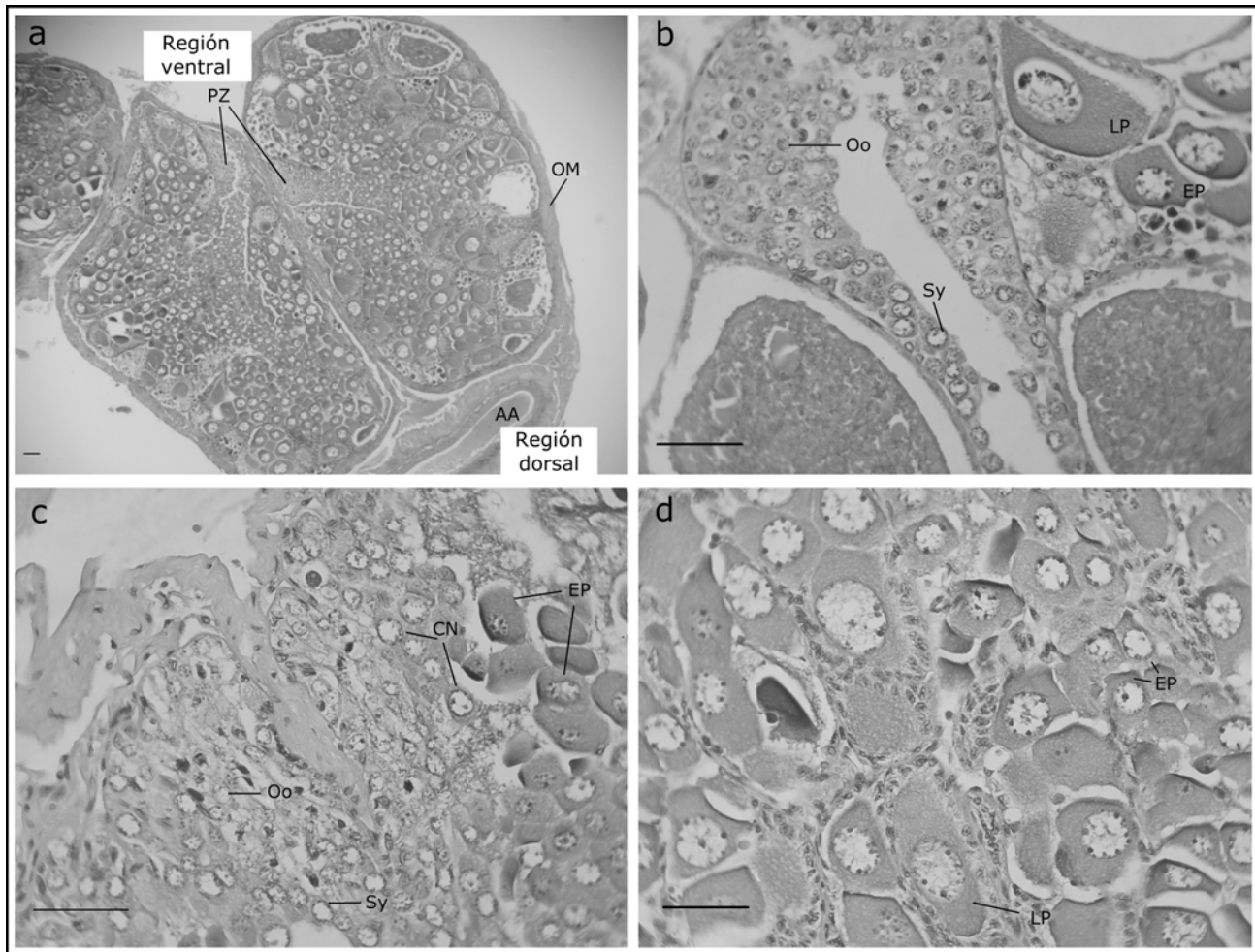


Figura 1. Fases tempranas de la oogénesis de *Litopenaeus vannamei*. a) Vista panorámica del lóbulo ovárico, b-c) Zona de proliferación de oogonios y oocitos en pre-vitelogénesis temprana, d) Oocitos en pre-vitelogénesis avanzada. AA= aorta abdominal, CN= oocito en cromatina y nucléolos, EP= oocito en peri-nucléolos temprano, LP= oocito en peri-nucléolos tardío, Oo= oogonio, OM= membrana ovárica, PZ= zona de proliferación, Sy= oocito en sinapsis. Barra de escala= 50 μ m / Early phases of oogenesis in *Litopenaeus vannamei*. a) Panoramic view of the ovarian lobe, b-c) Proliferation zone of oogonia and oocytes in early previtellogenesis, d) Oocytes in advanced previtellogenesis. AA= abdominal aorta, CN= oocyte in chromatin nucleolus, EP= oocyte in early perinucleolus, LP= oocyte in late perinucleolus, Oo= oogonia, OM= ovary membrane, PZ= proliferation zone, Sy= oocyte in synapsis. Scale bar= 50 μ m

La vitelogénesis primaria, concuerda con el estado II de madurez ovárica, y además de las fases anteriores, los oocitos primarios (71-112 μ m) están rodeados de células foliculares grandes (12-35 μ m). Los núcleos son difíciles de observar por su pequeño tamaño y el citoplasma es basofílico con glóbulos acidofílicos, de variado tamaño (2,5-10 μ m; Fig. 2a).

La vitelogénesis secundaria se asocia con los estados III y IV de madurez (Fig. 2b-c). En los lóbulos ováricos aparecen numerosos oocitos primarios (165-202 μ m) con gránulos de vitelo acidofílicos de pequeño tamaño (2,5-4

μ m). Al inicio de esta fase, los oocitos presentan núcleos levemente basofílicos, con pocos gránulos acidofílicos en el citoplasma basofílico. Eventualmente, los gránulos proliferan en todo el citoplasma y se concentran en la periferia, dando una apariencia más acidofílica, con núcleos irregulares y fuertemente basofílicos. Los oocitos presentan un estrato periférico de células foliculares pequeñas (2,0-2,5 μ m).

El estado IV de madurez presenta una población de oocitos en avanzado estado de vitelogénesis secundaria y pre-maduración, caracterizada por la presencia de criptas

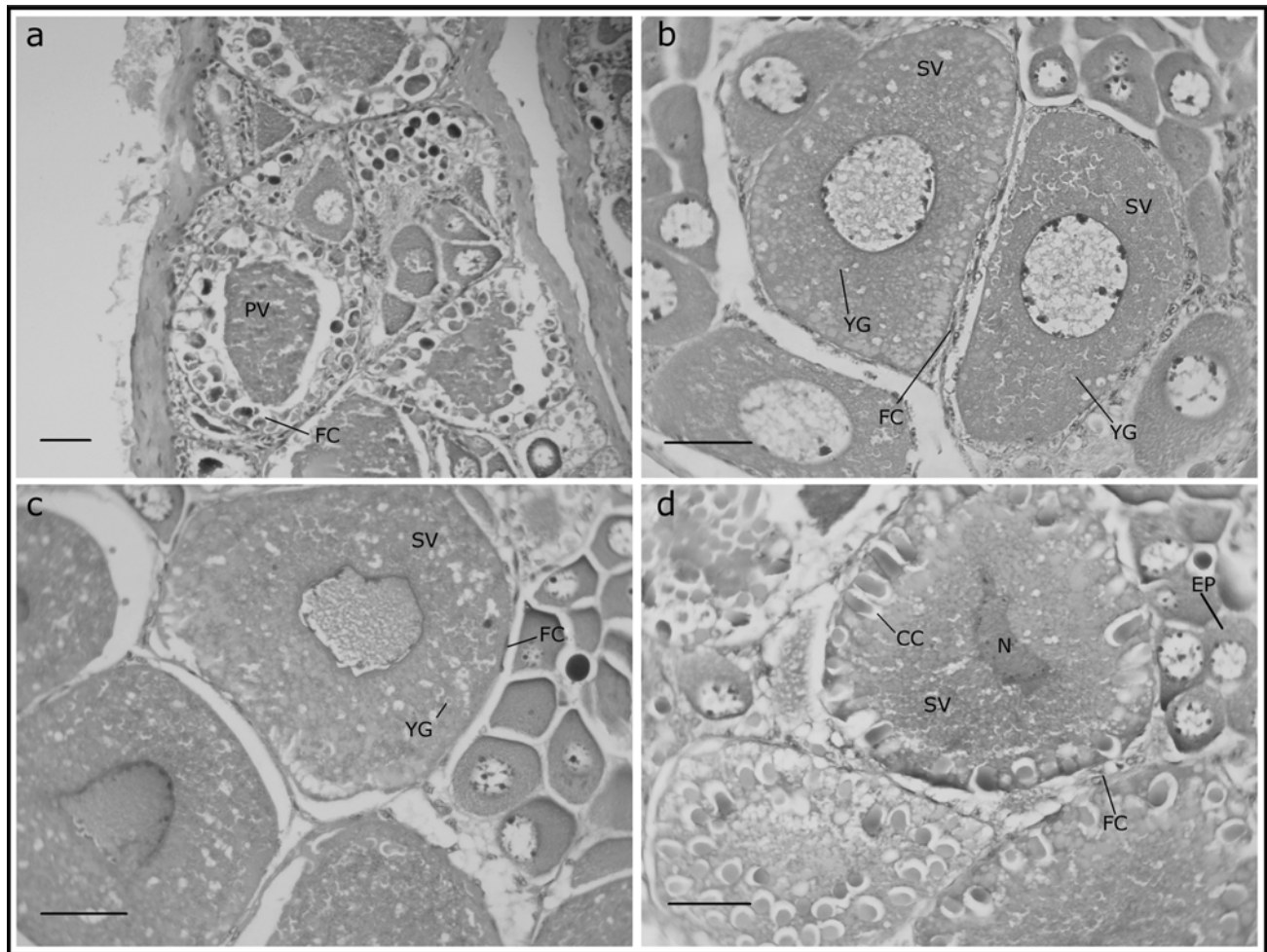


Figura 2. Fases avanzadas de la oogénesis de *Litopenaeus vannamei*. a) Oocitos en vitelogénesis primaria, b-c) Oocitos en vitelogénesis secundaria, d) Oocitos en pre-maduración. CC= criptas corticales, EP= oocito en peri-nucléolos temprano, FC= célula folicular, N= núcleo, PV= oocito en vitelogénesis primaria, SV= oocito en vitelogénesis secundaria, YG= gránulos de vitelo. Barra de escala= 50 μm / Advanced stages of oogenesis in *Litopenaeus vannamei*. a) Oocytes in primary vitellogenesis, b-c) Oocytes in secondary vitellogenesis, d) Oocytes in pre-maturation. CC= cortical crypts, EP= oocyte in early perinucleolus, FC= follicular cell, N= nucleus, PV= oocyte in primary vitellogenesis, SV= oocyte in secondary vitellogenesis, YG= yolk granules. Scale bar= 50 μm

corticales de 7 μm de diámetro, en la periferia de los oocitos (160-220 μm). Las células foliculares son muy delgadas (1,2-2,5 μm). La población de oocitos en vitelogénesis secundaria se acompaña de oocitos pre-vitelogénicos en fase de peri-nucléolos tempranos.

ESPERMATOGÉNESIS

La estructura testicular de *L. vannamei* consiste de lóbulos compuestos por túbulos seminíferos plegados. Cada macho de *L. vannamei* presenta un desarrollo asincrónico de la espermatogénesis, de tal forma que el desarrollo de

los estadios es sincrónico en una misma región del túbulo seminífero, pero las diversas fases del proceso aparecen en túbulos vecinos. Los espermatogonios se localizan en una subregión del lóbulo testicular y pueden ser observados en lóbulos con diferentes fases de espermatogénesis; su diámetro es 10-11 μm y el núcleo 7,5 μm (Fig. 3a). Los grupos de espermatogonios están rodeados por células nodrizas con núcleos elongados.

Los espermatozoides primarios (Fig. 3a) son evidentes por su gran tamaño (10-12 μm ; núcleo= 7,5-10 μm) y tinción basofílica (azul-violeta) de la cromatina. Estas células se

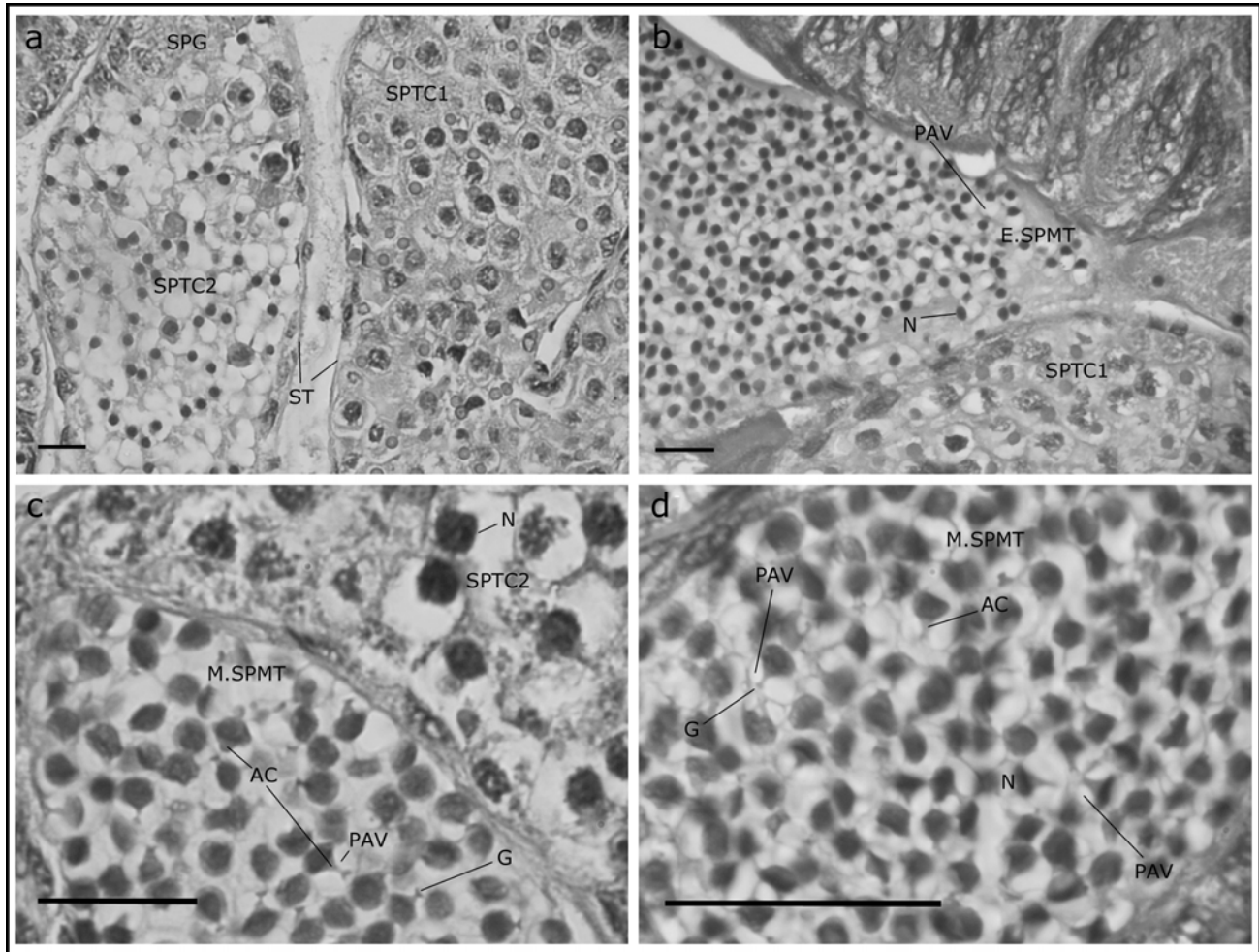


Figura 3. Fases de la espermatogénesis en testículos de *Litopenaeus vannamei*. a) Túbulos seminíferos con espermatocitos primarios y secundarios, b) Espermátidas tempranas, c-d) Espermátidas intermedias. AC= acrosoma, E.SPMT= espermátida temprana, G= gránulo acrosomal, M.SPMT= espermátida intermedia, N= núcleo, PAV= vesícula pro-acrosomal, SPG= espermatogonio, SPCT1= espermatocito primario, SPCT2= espermatocito secundario, ST= túbulo seminífero. Barra de escala= 20 μm / Stages of spermatogenesis in testicles of *Litopenaeus vannamei*. a) Seminiferous tubules with primary and secondary spermatocytes, b) Early spermatids, c-d) Mid spermatids. AC= acrosome, E.SPMT= early spermatid, G= acrosomal granule, M.SPMT= mid spermatid, N= nucleus, PAV= proacrosomal vesicle, SPG= spermatogonia, SPCT1= primary spermatocytes, SPCT2= secondary spermatocytes, ST= seminiferous tubule. Scale bar= 20 μm

encuentran en diversas fases de meiosis I y su división produce los espermatocitos secundarios, que se caracterizan por un menor tamaño celular (7,5-11 μm) y núcleos (5 μm) más compactos y basofílicos (Fig. 3a).

Los espermatocitos secundarios completan la meiosis II generando espermátidas de menor tamaño celular (5-7,5 μm) y núcleos homogéneos azul-violeta (2,5 μm). La maduración gradual de las espermátidas se inicia en los testículos, donde se pueden reconocer claramente 2 fases de espermátidas. Las espermátidas tempranas con núcleos esféricos, vesícula pro-acrosomal y carentes de

acrosoma (Fig. 3b); las espermátidas intermedias presentan núcleo más compacto y desarrollo del acrosoma, de color rosa (acidofílico; Fig. 3c-d). Las espermátidas son colectadas en ductos seminíferos pequeños, que gradualmente se integran en el ducto deferente; las espermátidas intermedias de los ductos seminíferos muestran desarrollo del acrosoma, similar a las espermátidas intermedias del testículo (Fig. 4a).

El análisis histológico de las espermátidas avanzadas en el ducto deferente medio ascendente y descendente permitió reconocer la presencia de la cápsula semiesférica

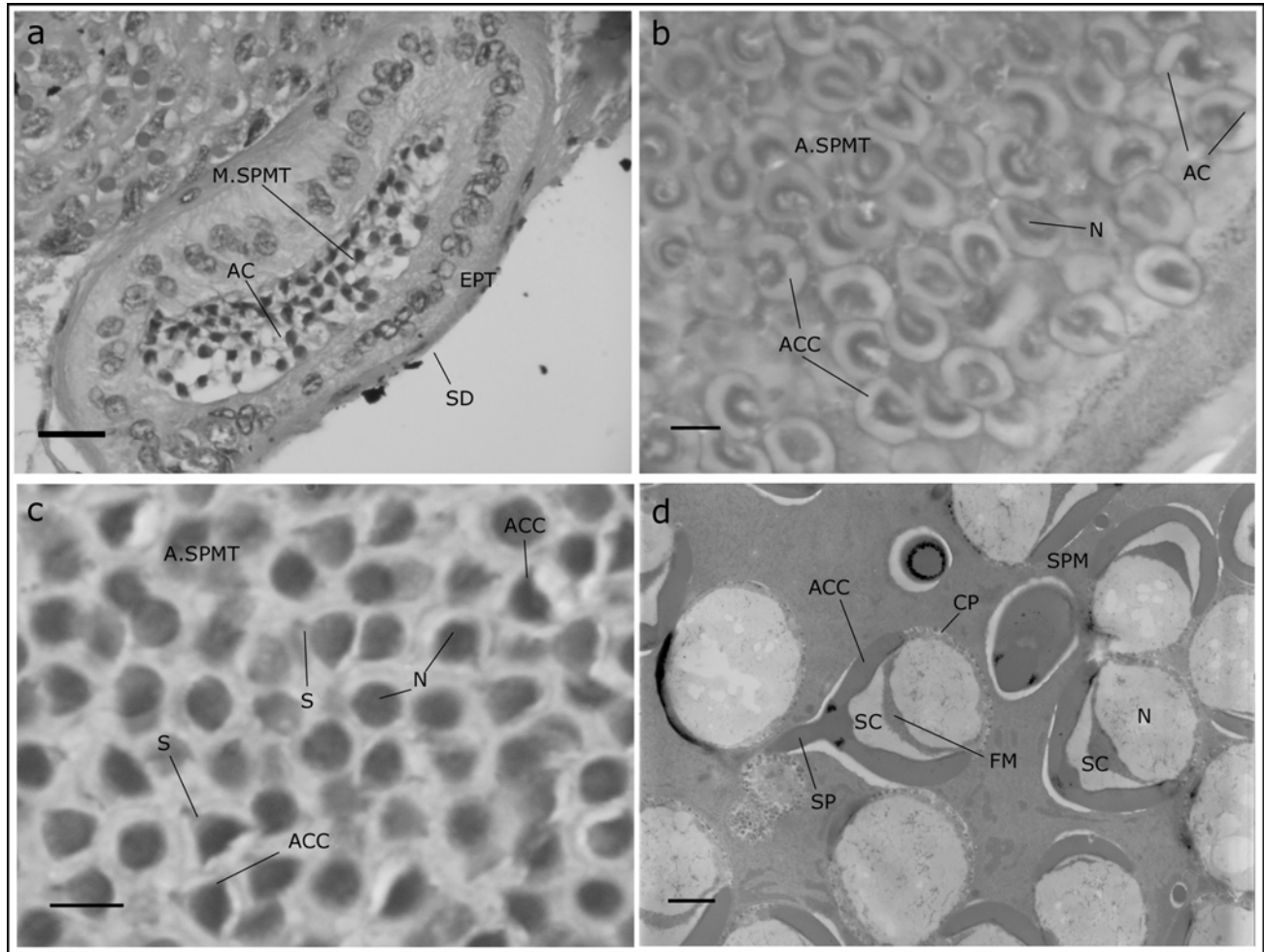


Figura 4. Espermiogénesis en ductos seminíferos y deferentes de *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. a) Espermátidas intermedias en ductos seminíferos colectores de testículos; barra de escala= 20 μ m, b) Espermátidas avanzadas en ductos deferentes de *L. stylirostris*; barra de escala= 5 μ m, c) Espermátidas avanzadas en el ducto deferente ascendente de *L. vannamei*; barra de escala= 5 μ m, d) Ultraestructura de espermatozoides de espermatóforos; barra de escala= 1 μ m. AC= acrosoma, ACC= cápsula acrosomal, A.SPMT= espermátida avanzada, CP= partículas citoplasmáticas, EPT= epitelio, FM= malla fibrilar, M.SPMT= espermátida intermedia, N= núcleo, SC= sub-acrosoma, SD= ducto seminífero, SP= espina; SPM= espermatozoide / Spermiogenesis in seminiferous ducts and vasa deferentia of *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris*. a) Mid spermatids in seminiferous ducts from testicles; scale bar= 20 μ m, b) Advanced spermatids in vas deferens of *L. stylirostris*, scale bar= 5 μ m, c) Advanced spermatids in ascending vas deferens of *L. vannamei*; scale bar= 5 μ m, d) Sperm ultrastructure from spermatophores; scale bar= 1 μ m. AC= acrosome, ACC= acrosomal capsule, A.SPMT= advanced spermatid, CP= cytoplasmic particles, EPT= epithelial lining, FM= filamentous meshwork, M.SPMT= mid spermatid, N= nucleus, SC= subacrosome, SD= seminiferous duct, SP= spike, SPM= spermatozoon

o acrosomal, y la compactación del núcleo en la región posterior de la espermátida (Fig. 4b-c-d). La polimerización de la espina en la región anterior de la espermátida se inicia en el ducto deferente medio ascendente y se reconoce por la estructura típica y su tinción rosa (Fig. 4c); los espermatozoides aparecen completamente formados en los espermatóforos. La cápsula acrosomal de *L. vannamei* tiñe de manera similar al núcleo (basofílico)

y es menos evidente por el menor tamaño de la célula (3-4 μ m), en comparación con la cápsula de *L. stylirostris* (6,5 μ m; Fig. 4b). La microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides obtenidos de espermatóforos (Fig. 4d) revela la ultraestructura de las 3 regiones: acrosoma (espina y cápsula acrosomal), subacrosoma (malla fibrilar) y núcleo, de la fase final del proceso en los machos de *L. vannamei*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se describe el proceso gradual de la ovogénesis, desde la proliferación de oogonios y el crecimiento de los oocitos primarios. El desarrollo de oocitos es un proceso continuo, que en gran medida se puede correlacionar con la escala de madurez visual; sin embargo, la histología permite definir con mayor precisión el estado de desarrollo de la población de oocitos primarios. La escala visual puede generar sobreposición entre estados vitelogénicos, de forma tal que aparentes estados I: inmaduros, pueden presentar oocitos en vitelogénesis I; ovarios en estado II: vitelogénesis I, pueden presentar oocitos en vitelogénesis II; y ovarios en estado III: vitelogénesis secundaria, pueden presentar algunos oocitos en vitelogénesis primaria.

A través de la histología se detectaron diferencias fundamentales entre las distintas fases de desarrollo de los oocitos en relación a la escala visual. El tamaño de los oogonios (9 μm) es similar al reportado para *Penaeus japonicus* (10 μm , Yano 1988), pero inferior al reportado para *Farfantepenaeus paulensis*, de alrededor de 41-51 μm (Nazari *et al.* 2007). Las diferencias entre oogonios y oocitos primarios en fase de sinapsis y cromatina nucléolos, según Yano (1988), se evidencia en los cambios basofílicos y el incremento de tamaño del oocito (Fig. 1a-b).

Palacios *et al.* (2003) establecieron una clasificación histológica basada en 3 estados: pre-vitelogénico, vitelogénico y cortical. Sin embargo, en la presente descripción histológica se definieron más fases de desarrollo de la ovogénesis. Con base en la escala HS (Palacios *et al.* 2003), el ovario pre-vitelogénico de *L. vannamei* presenta 65% de oocitos pre-vitelogénicos y 35% de oocitos en vitelogénesis temprana; el tamaño máximo promedio de oocitos es de 70 μm . En el presente estudio, el rango de diámetro de oocitos pre-vitelogénicos en peri-nucléolos tardíos osciló entre 84 y 94 μm , similar al rango de tallas de oocitos pre-vitelogénicos reportados para *F. paulensis* (82-96 μm) por Nazari *et al.* (2007). Tan-Fermin & Pudadera (1989) reportaron para *P. monodon* una talla de 55 μm como límite inferior para oocitos peri-nucléolos con células foliculares (tardíos); dicha talla corresponde a oocitos en peri-nucléolos tempranos sin estrato de células foliculares en *M. japonicus* (30-80 μm ; Yano 1988) y *L. vannamei* (30-61 μm).

Los oocitos en vitelogénesis temprana se distinguen por el estrato de células foliculares de enorme tamaño y la acumulación de glóbulos acidofílicos en el ooplasma.

Los oocitos vitelogénicos se distribuyen inicialmente hacia la periferia de los lóbulos ováricos y gradualmente llenan el lumen de los lóbulos, acompañados de oocitos pre-vitelogénicos principalmente en fase de peri-nucléolos tempranos. Los oocitos en vitelogénesis primaria de *L. vannamei* presentan una talla de 71-112 μm , que se incrementa marcadamente durante la vitelogénesis secundaria (165-202 μm); comparativamente, en *F. paulensis*, el diámetro promedio de oocitos vitelogénicos oscila entre 216-224 μm (Nazari *et al.* 2007). En *M. japonicus*, los oocitos en vitelogénesis primaria oscilan entre 80 y 146 μm (Yano 1988).

El desarrollo de las criptas corticales marca la etapa de pre-maduración de los oocitos, que presentan tallas entre 160 y 220 μm en *L. vannamei* y 200-264 μm en *M. japonicus* (Yano 1988); en *P. monodon*, 30% de la población de oocitos corresponden a oocitos con criptas corticales mayores de 200 μm (Tan-Fermin & Pudadera 1989). En un estudio previo (Rojas & Alfaro 2007), se determinó que la ovulación ocurre en hembras estado IV, al momento del desove en *L. occidentalis* y los oocitos de hembras en estado IV en fases previas al desove, no son capaces de liberar las criptas corticales al contacto con el agua marina. Además, la fusión entre la espina del espermatozoide y la envoltura vitelina de los oocitos no ocurre debido a la presencia del estrato de células foliculares. El diámetro promedio de huevos recién desovados de *Litopenaeus* es de 280 μm (Rojas & Alfaro 2007).

El análisis histológico de la espermatogénesis con tinción hematoxilina-eosina permite analizar las fases que experimentan los gametos masculinos desde el estadio de espermatogonio. A pesar que la microscopía electrónica de transmisión permite evaluaciones más detalladas de la ultraestructura, la microscopía de luz convencional revela adecuadamente las diversas fases del proceso, permitiendo evaluaciones espermatogénicas de esta importante especie de cultivo, con clara definición de espermatogonios, espermatocitos primarios y secundarios, espermátidas tempranas, intermedias y avanzadas. La distinción entre espermátidas avanzadas y espermatozoides requiere de la microscopía electrónica para identificar el subacrosoma. El análisis histológico comparativo de las 3 especies de *Litopenaeus* del Pacífico americano: *L. vannamei*, *L. stylirostris*, y *L. occidentalis*, indica que la cápsula acrosomal se define claramente en el ducto medio y las espinas muestran elongación completa en espermias de las ámpulas terminales.

En un estudio previo con microscopía electrónica de barrido se demostró que la polimerización de la espina ocurre gradualmente en los ductos deferentes medios de *L. stylirostris* (Alfaro 1994); en esta especie, las espermátidas del ducto medio ascendente no presentan elongación de la espina, que comienza a desarrollarse en los ductos medios descendentes. En *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *L. occidentalis*, los espermatozoides de las ámpulas terminales muestran elongación completa de las espinas, observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, los espermatozoides de estas especies continúan su maduración y capacitación en el tético de las hembras (Alfaro *et al.* 2007). Recientemente, otro estudio analizó cambios morfológicos y bioquímicos en espermatozoides de *L. vannamei*, confirmando que la capacitación ocurre luego de la cópula (Aungsuchawan *et al.* 2011).

La estructura de lóbulos con túbulos seminíferos es similar en *L. setiferus*, *L. vannamei*, *P. indicus*, *P. longirostris* y *M. monoceros* (Chow *et al.* 1991, Mohamed & Diwan 1993, Medina 1994, Abraham *et al.* 2007). Sin embargo, los estudios de Medina (1994), Abraham *et al.* (2007) y Kang *et al.* (2008) refieren el desarrollo de espermatozoides con espinas completas en los túbulos del testículo de *P. longirostris*, *M. monoceros* y *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765), respectivamente. Las observaciones del presente estudio para *L. vannamei*, claramente indican que las espermátidas que salen del testículo están inmaduras y continúan su desarrollo en los ductos deferentes, completando la formación de la cápsula acrosomal y la espina, de manera similar a la maduración de espermátidas de *L. setiferus* (King 1948) y *Sicyonia ingentis* (Sicyoniidae, Shigekawa & Clark 1986).

La producción y maduración de gametos masculinos en *Litopenaeus* sigue el modelo propuesto por Alfaro-Montoya (2010), que plantea 3 niveles de desarrollo: espermatogénesis en testículos, maduración de espermatozoides en ductos deferentes y producción de espermátidos; un nivel adicional ocurre en las hembras: maduración final y capacitación de espermatozoides. En los espermátidos, la cantidad y proporción de espermatozoides normales con espinas bien formadas, es un aspecto de enorme importancia práctica como indicador de calidad reproductiva en la propagación controlada de camarones.

Los resultados obtenidos permitieron evaluar la gametogénesis de *L. vannamei*, con la descripción histológica de los cambios graduales que experimentan

las células germinales en ovarios y testículos, incluyendo los ductos deferentes masculinos y contrario a otras especies de la familia Penaeidae, la formación de espermatozoides de *L. vannamei* ocurre en los ductos deferentes.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la colaboración en el laboratorio del M.Sc. Luís Hernández y la revisión del manuscrito por el M.Sc. Rodolfo Umaña. Se agradecen los comentarios enriquecedores de los evaluadores. La investigación se realizó gracias al apoyo económico de la Ley de Pesca del Gobierno de Costa Rica.

LITERATURA CITADA

- Abraham J, MK Manisseri & NK Sanil. 2007.** Spermatogenesis and spermatozoal ultrastructure in *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798). *Indian Journal of Fisheries* 54(1): 1-9.
- Alfaro J. 1994.** Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical* 42(2): 121-129.
- Alfaro-Montoya J. 2010.** The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps). A review. *Aquaculture* 300: 1-9.
- Alfaro-Montoya J & L Hernández. 2012.** The histological structure of the androgenic gland and cellular cord of the male reproductive system of adult *Litopenaeus* and *Rimapenaeus byrdi*. *Journal of Crustacean Biology* 32(3): 351-357.
- Alfaro J, K Ulate & M Vargas. 2007.** Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture* 270: 436-442.
- Aungsuchawan S, C Browdy & C Withyachumnarnkul. 2011.** Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 42: 188-195.
- Bauer RT & CE Cash. 1991.** Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Transactions of the American Microscopical Society* 110(2): 144-162.
- Bell TA & DV Lightner. 1988.** A handbook of normal penaeid shrimp histology, 114 pp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Ceballos-Vázquez BP, IS Racotta & JF Elorduy-Garay. 2003.** Qualitative and quantitative analysis of the ovarian maturation process of *Penaeus vannamei* after a production cycle. *Invertebrate Reproduction and Development* 43(1): 9-18.

- Chow S, WJ Dougherty & PA Sandifer. 1991.** Unusual testicular lobe system in the white shrimps, *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1761) and *P. vannamei* Boone, 1931 (Decapoda, Penaeidae); a new character for Dendrobranchiata? *Crustaceana* 60: 304-318.
- FAO. 2012.** The state of world fisheries and aquaculture 2012, 209 pp. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Kang X, S Ge, M Guo, G Liu & S Mu. 2008.** A transmission electron microscopy investigation: the membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology* 56: 113-121.
- King JE. 1948.** A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (L.) *The Biological Bulletin* 94: 244-262.
- Medina A. 1994.** Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Marine Biology* 119: 449-460.
- Mohamed KS & AD Diwan. 1993.** Spermatogenesis and spermatophore formation in the Indian white prawn *Penaeus indicus*. *Journal of the Marine Biological Association of India* 35(1-2): 180-192.
- Nazari EM, AC Dias, D Ammar & YM Rauh. 2007.** Ovarian staging in eyestalk ablated females of *Farfantepenaeus paulensis*: a histologic, morphometric, and biochemical analysis. *Journal of Crustacean Biology* 27(2): 296-303.
- Palacios E, IS Racotta & M Villalejo. 2003.** Assessment of ovarian development and its relation to mating in wild and pond-reared *Litopenaeus vannamei* shrimp in a commercial hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society* 34(4): 466-477.
- Palacios E, C Rodríguez-Jaramillo & IS Racotta. 1999.** Comparison of ovary histology between different-sized wild and pond-reared shrimp *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*). *Invertebrate Reproduction and Development* 35(3): 251-259.
- Pérez-Farfante I & B Kensley. 1997.** Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world (keys and diagnoses for the families and genera). *Memoires du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris* 175: 1-233.
- Ro S, P Talbot, J Leung-Trujillo & AL Lawrence. 1990.** Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. *Journal of Crustacean Biology* 10: 455-468.
- Rojas E & J Alfaro. 2007.** *In vitro* manipulation of egg activation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus*. *Aquaculture* 264: 469-474.
- Shigekawa K & WH Clark Jr. 1986.** Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Development Growth & Differentiation* 28(2): 95-112.
- Talbot P, D Howard, J Leung-Trujillo, TW Lee, WY Li, H Ro & AL Lawrence. 1989.** Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture* 78: 365-377.
- Tan-Fermin JD & RA Pudadera. 1989.** Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 77: 229-242.
- Tinikul Y, J Poljaroen, N Kornthong, C Chotwiwatthanakun, P Anuracpreeda, T Poomtong, PJ Hanna & P Sobhon. 2011.** Distribution and changes of serotonin and dopamine levels in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during ovarian maturation cycle. *Cell and Tissue Research* 345: 103-124.
- Vasudevappa C. 1992.** Growth and reproduction of the penaeid prawn *Metapenaeus dobsoni* (Miers) in brackishwater environment. Ph.D Thesis, Cochin University of Science and Technology, Kerala, 316 pp.
- Yano I. 1988.** Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology* 99: 547-553.
- Yano I, B Tsukimura, JN Sweeney & JA Wyban. 1988.** Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. *Journal of the World Aquaculture Society* 19(4): 204-209.

Recibido el 19 de febrero de 2013 y aceptado el 24 de junio de 2013

Editor: Claudia Bustos