

Research Article

Descripción histológica y caracterización de los estados de madurez gonadal de hembras de *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Decapoda: Palaemonidae)

Jorge E. Moreno¹, Carlos A. Méndez¹, Jaime A. Meruane² & María C. Morales^{2,3}

¹Programa de Magíster en Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Departamento de Acuicultura Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile

²Facultad de Ciencias del Mar, Departamento de Acuicultura, Universidad Católica del Norte Coquimbo, Chile

³Programa Doctorado en Acuicultura, Universidad Católica del Norte Coquimbo, Chile

RESUMEN. La extracción indiscriminada y alteraciones del medio natural, han puesto en peligro de extinción al único Palaemónido dulceacuícola de interés comercial, presente en aguas continentales chilenas. Aun cuando esta situación, ha despertado el interés en estudios que permitan su reproducción controlada en cautiverio, actualmente es escaso el conocimiento acerca de aspectos reproductivos básicos de esta especie. Dada su importancia, este trabajo describe y caracteriza el proceso completo de maduración gonadal en hembras de *Cryphiops caementarius*, en base a cambios en la morfología externa e interna del ovario. Hembras adultas extraídas del río Limarí, fueron disectadas y sus ovarios removidos y preparados para análisis histológicos. Tejido fibromuscular divide el tejido gonadal de cada lóbulo en sacos ováricos de forma semicónica (conos de maduración), al interior del los cuales se encuentran ovocitos en diferentes estados de desarrollo de acuerdo a observaciones microscópicas de tamaño, morfología y tinción con H-E, las células reproductoras femeninas se clasificaron en seis tipos, ovogonias (Ov), ovocitos previtelogénicos tempranos (O1), ovocitos previtelogénicos tardíos (O2), ovocitos vitelogénicos tempranos (O3), ovocitos vitelogénicos tardíos (O4) y ovocitos Maduros (OM). El ciclo de madurez gonadal se dividió en cinco estados según la cantidad y tipo de ovocitos presentes. Los estados 0 y I, corresponden a desovado y previtelogénesis. Los estados II y III a vitelogénesis temprana y vitelogénesis intermedia, mientras el estado IV corresponde a madurez avanzada. La presencia de ovogonias y ovocitos previtelogénicos junto a ovocitos completamente maduros en el estado de madurez avanzada, refleja la capacidad de esta especie de realizar ciclos consecutivos de madurez en intervalos cortos de tiempo.

Palabras claves: Palaemonidae, *Cryphiops caementarius*, ciclo ovárico, madurez gonadal, ovocitos, Chile.

Histological description and characterization of the ovarian cycle of *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Decapoda: Palaemonidae)

ABSTRACT. Its indiscriminate extraction and alterations of its natural environment, has put in danger of extinction the only commercial freshwater Palemonid present in Chilean inland waters. Even though this situation has awakened interest in studies which allow its controlled reproduction in captivity, currently little is known regarding basic reproductive aspects of this species. Given its relevance, this work describes and characterizes the whole ovarian cycle of *Cryphiops caementarius*, based on changes in external and internal ovarian morphology. Adult *C. caementarius* females, obtained from Limarí River, were dissected and its ovaries removed and prepared for histological examinations. Fibromuscular tissue divides the ovarian tissue of each lobe into cone-shaped ovarian pouches (Maturation cones), each one containing various steps of oocytes according to the stages of ovarian development. Based on light microscopic observations of cells' sizes, morphology, and staining with H-E, the female germ cells could be classified into six different types, which include oogonia (Ov), early previtellogenetic oocytes (O1), late previtellogenetic oocytes (O2), early vitellogenetic oocytes (O3), late vitellogenetic oocytes (O4) and mature oocytes (OM). The ovarian cycle is divided into five stages based on the amount and types of oocytes present in each stage. Stage 0 and I are spawned and

previtellogenesis stages. Stage II and III are early and intermediate vitellogenesis stages, while stage IV is maturity advanced stage. The presence of oogonia and previtellogenic oocytes among fully mature oocytes in stage IV reflect the capacity of the ovary of *C. caementarius* females to start a new full maturity cycle in a short time period.

Keywords: Palaemonidae, *Cryphiops caementarius*, ovarian cycle, gonad development, oocyte, Chile.

Corresponding author: Jorge E. Moreno (jmr018@ucn.cl)

INTRODUCCIÓN

El camarón de río del norte *Cryphiops caementarius*, ha sido desde hace varios años el camarón dulceacuícola cultivable más importante de la costa occidental de América del Sur y uno de los principales recursos pesqueros explotables de los ríos de la región de Coquimbo, Chile (Andrade, 1999). Su distribución geográfica a nivel mundial se encuentra restringida a los ríos de la costa occidental de Perú y Chile desde los 10°S (Hartman, 1958; Bahamonde & Vila, 1971), hasta los 32°55'S (Elías, 1960; Meruane *et al.*, 2006a), siendo la única especie de la familia Palaemonidae presente en aguas continentales chilenas (Jara *et al.*, 2006; Meruane *et al.*, 2006a). No obstante, alteraciones antrópicas de su medio natural por actividades agrícolas y mineras, junto a una sobre-explotación desmedida dada su importancia económica en el área de su influencia, han puesto a esta especie en peligro de extinción en las regiones de Santiago y Valparaíso, y vulnerable en el resto de su distribución (Jara *et al.*, 2006). Este panorama desfavorable, sumado al alto valor comercial de esta especie en el mercado nacional, ha motivado el establecimiento de centros de cultivo destinados principalmente a su engorda y a la realización de estudios que permitan su reproducción controlada en cautiverio (Meruane *et al.*, 2006a).

A nivel mundial son varios los trabajos enfocados a buscar el control de la reproducción en crustáceos decápodos, mediante factores medioambientales (Daniels *et al.*, 1994; Karplus *et al.*, 2003), endocrinológicos (Vaca & Alfaro, 2000; Meeratana *et al.*, 2006) y hormonales (Chen *et al.*, 2003). No obstante, para evaluar la efectividad de cada uno de estos métodos, es necesario conocer completamente la dinámica del proceso de maduración ovárica e identificar los estados de diferenciación por los que atraviesan los ovocitos durante la gametogénesis.

En el caso de crustáceos en general, y particularmente en hembras, cada ciclo reproductivo se encuentra asociado a una serie de cambios morfológicos principalmente evidenciados en las gónadas, donde es posible identificar externamente modificaciones en tamaño y coloración, durante el periodo de maduración sexual (Meeratana & Sobhon,

2007). En el caso de *C. caementarius* la mayoría de los estudios realizados corresponden a descripciones de su biología y ecología en ambiente natural (Hartmann, 1958; Elías, 1960; Castro, 1966; Bahamonde & Vila, 1971; Norambuena, 1977; Viacava *et al.*, 1978; Rivera & Meruane, 1994; Cortés, 1999; Meruane *et al.*, 2006a), y a estudios específicos sobre su desarrollo y cultivo larval (Meruane *et al.*, 1996, 2006b; Morales, 1997), mientras que el ciclo de madurez gonadal, y el proceso completo de gametogénesis ha sido escasamente estudiado para individuos de ambos sexos, siendo realmente escasa la información que existe al respecto. En vista de la importancia que conlleva el conocimiento de aspectos reproductivos básicos de esta especie, con miras a efectuar un eventual control de su reproducción, tanto para fines de repoblamiento como comerciales, el presente estudio entrega una descripción detallada de los estados de desarrollo por los que atraviesan las células reproductivas femeninas durante el proceso de maduración, junto con una caracterización externa e histológica de los principales estados del ciclo de madurez gonadal en hembras adultas de *C. caementarius*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y mantención de reproductores

Hembras adultas de *C. caementarius* extraídas del río Limarí (30°39'26''S, 71°31'3''W) (Región de Coquimbo, Chile), entre septiembre 2008 y marzo 2009 (correspondientes a su estación reproductiva natural), fueron transportadas al laboratorio de crustáceos de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo. A su llegada, los animales fueron inmediatamente pesados (peso total de $10 \pm 2,56$ g), medidos (longitud cefalotorácica de $2,46 \pm 0,18$ cm), y posteriormente colocados en estanques plásticos rectangulares de 30 L con agua dulce de clorada, donde fueron mantenidos a temperatura de 20-25°C y fotoperiodo natural (14 h de luz: 10 h de oscuridad), aireación mediante piedra difusora y recambios diarios del 100% del agua. La alimentación consistió en una mezcla de pescado y mariscos frescos equivalente al

5% del peso corporal, la cual fue dividida en dos raciones y entregada cada 12 h (8 AM y 8 PM). Debido a que la talla mínima de madurez reportada por Bahamonde & Vila (1971) en el río Limarí fue de 14,3 mm de longitud cefalotorácica (LC), todas las hembras utilizadas en este estudio fueron >20 mm de LC, con la finalidad de garantizar su condición de ejemplares adultos.

Evaluación del ciclo ovárico

El proceso completo de maduración gonadal fue descrito y caracterizado en base a cambios en la morfología externa e interna del ovario. Para la evaluación de la morfología externa, se tuvieron en cuenta patrones de coloración e incrementos en el tamaño del ovario con respecto al cefalotórax, que fueron monitoreados diariamente en 350 hembras adultas por medio de la observación visual de la gónada a contraluz a través del exoesqueleto, y adicionalmente en la zona de conexión muscular entre el cefalotórax y abdomen. Una vez determinados los patrones, el ciclo de madurez ovárica fue dividido en estados tentativos, los cuales fueron posteriormente evaluados histológicamente. Para esto, 10 hembras por estado tentativo fueron sumergidas en agua con hielo para disminuir su metabolismo, y sus ovarios extraídos y fijados en solución Davison por 24 h. Posteriormente, el tejido gonadal fue deshidratado utilizando concentraciones ascendentes de etanol (70, 80, 90 y 100%) y finalmente incluido en parafina a 60°C, de acuerdo con la técnica histológica convencional.

Los cambios en la morfología interna del ovario y de las células reproductivas, fueron examinados por microscopía óptica, en cortes de tejido de 5-7 μ m teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E). Para establecer los estados de diferenciación celular de los ovocitos durante el proceso de maduración gonadal, características de tamaño, forma, acumulación de vitelo y patrones de coloración de las células reproductivas con respecto a la tinción con H-E, se evaluó un mínimo de 50 células para cada una de las 10 hembras disectadas por estado. Únicamente las células que evidenciaron núcleo esférico completamente visible y seccionado aproximadamente en su plano ecuatorial, fueron consideradas para realizar las mediciones y evaluar las características morfológicas. El tamaño de los ovocitos fue medido sobre imágenes capturadas con una cámara de 10,1 píxeles, adaptada a un microscopio óptico convencional, mediante el programa computacional AxioVision versión 4.6. Debido a la forma ovoide de los gametos, el tamaño

promedio de los ovocitos fue calculado mediante la fórmula: $(\text{Diámetro mayor} + \text{Diámetro menor})/2$.

RESULTADOS

Aspectos generales de la morfología externa e interna del ovario

El ovario es un órgano compuesto por dos lóbulos paralelos alargados, ubicados en posición dorsal por encima del hepatopáncreas y debajo del corazón, cuyos extremos anteriores se encuentran comunicados entre sí (Figs. 1a-1c). Su coloración varía desde un tono blanco traslúcido hasta un tono café claro durante su desarrollo, finalizando en un color café rojizo intenso característico de ovarios completamente maduros. De la región media de cada lóbulo, hacia el borde externo y en posición ventro-lateral, se desprende un oviducto que desemboca directamente en un gonoporo ubicado en la coxa del tercer par de pereiópodos.

Histológicamente, el tejido gonadal está recubierto por una membrana compuesta principalmente por tejido fibromuscular, el cual se extiende hacia el interior de cada lóbulo a manera de trabéculas, dividiendo la masa ovárica en pequeños sacos de forma semicónica denominados conos de maduración. Así mismo, recorriendo cada lóbulo a lo largo de su eje longitudinal y ubicado en posición central, se encuentra un vaso hemolinfático principal, que se ramifica hacia la periferia, irrigando completamente los conos de maduración desde la punta, donde se localizan las zonas de proliferación, de donde se presume, se desprenden las células que dan origen a las ovogonias, hasta su extremo distal, donde se encuentran los ovocitos en estado de desarrollo más avanzado (Fig. 1d).

Descripción y caracterización de los estados de desarrollo de los ovocitos

Al interior de los conos de maduración y agrupadas de forma ordenada, según su estado de desarrollo, se encuentran las células reproductoras femeninas. De acuerdo a su morfología, tamaño y tinción con H-E, se identificaron claramente seis tipos de células durante el proceso completo de maduración gonadal (Ov, O1, O2, O3, O4 y OM), que se distribuyen en orden ascendente desde la punta de los conos de maduración hacia la periferia.

Ovogonia (Ov): células ovoides con núcleo grande e irregular, que abarca casi la totalidad de la célula. Se encuentran acumuladas en la punta de los conos de

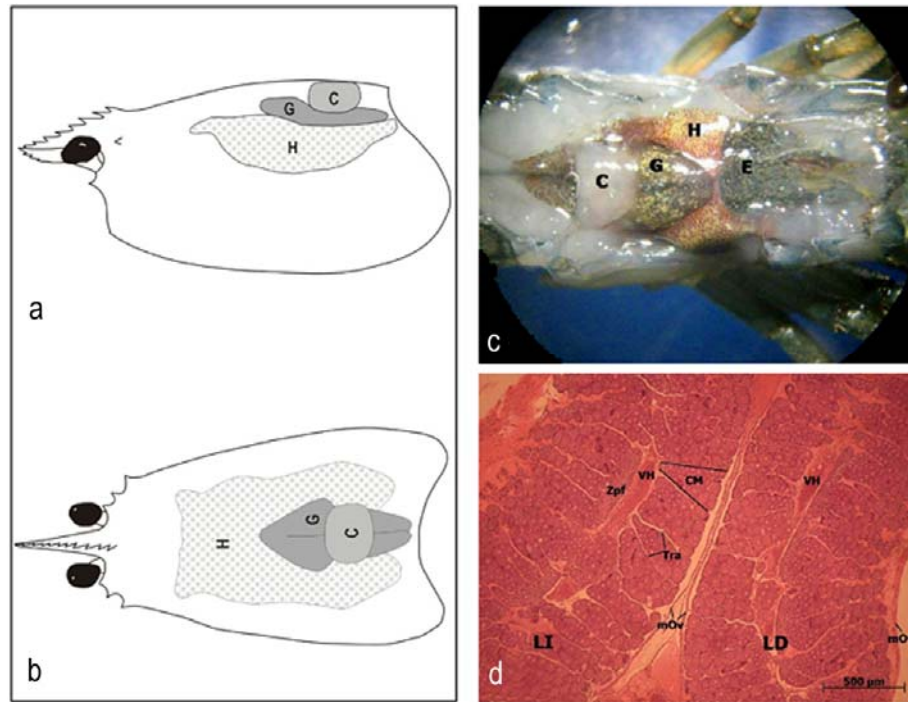


Figura 1. Ubicación y morfología externa e interna del ovario de *C. caementarius*. a) Vista lateral, b) vista dorsal, c) vista dorsal de una hembra después de remover el caparazón, d) corte longitudinal del ovario teñido con H-E. C: Corazón, G: gónada, H: hepatopáncreas, E: estómago, LI: lóbulo izquierdo del ovario, LD: lóbulo derecho del ovario, mOv: membrana ovárica, Zpf: zona de proliferación, VH: vaso hemolinfático, Tra: trabécula y CM: cono de maduración.

Figure 1. Position and external-internal morphology of *C. caementarius* ovary. a) Lateral view, b) dorsal view, c) female dorsal view after removal of the carapace, d) longitudinal section of the ovary stained with H-E. C: Heart, G: gonad, H: hepatopancreas, E: stomach, LI: left lobule of the ovary, LD: right lobule of the ovary, mOv: ovarian membrane, Zpf: Proliferation zone, VH: hemolymph vessel, Tra: trabeculae and CM: maturation cone.

maduración y su tamaño varía entre 8 y 15 μm . Su tinción con H-E es fuertemente basófila en el núcleo (azul) y más débil en el citoplasma (Fig. 2a).

Ovocito previtelogénico temprano (O1): junto a las ovogonias y ubicados hacia la periferia, se encuentran los O1. Se diferencian de las Ov, por su mayor tamaño (20-35 μm) e incremento en el volumen de citoplasma, que se tiñe azul con tinción de H-E. Poseen un núcleo central cristalino, con pequeños cúmulos de heterocromatina dispersos aleatoriamente, teñidos de color azul intenso. Algunas veces se observa la presencia de nucléolos ubicados cerca de la membrana nuclear, cuya tinción con H-E es basófila (Fig. 2a).

Ovocito previtelogénico tardío (O2): se caracteriza por un gran incremento en la cantidad de citoplasma con respecto a los O1, que se tiñe de color azul intenso con tinción de H-E. Su tamaño varía entre 40 y 60 μm y se ubican hacia la periferia después de los O1. Al igual que éstos, los O2 poseen un núcleo prominente, al

interior del cual se observan los nucléolos (Figs. 2b y 2c).

Ovocito vitelogénico temprano (O3): su característica principal es el incremento en el número de células foliculares que los recubre, junto con la presencia de pequeñas gotas de lípidos en la periferia del citoplasma, el cual comienza a perder su característica basófila, tiñéndose de color rojizo con H-E. Su núcleo es central y de forma esférica con nucléolos fácilmente diferenciados (Figs. 2c y 2d). Su diámetro promedio fluctúa entre 65 y 100 μm y se ubican hacia la periferia después de los O2.

Ovocito vitelogénico tardío (O4): presenta un incremento en el número y tamaño de las gotas de lípidos, que se ubican en todo el citoplasma, compuesto en su mayoría, por placas de vitelo proteínico que se tiñen de color rojo con H-E. Se ubican más hacia la periferia, justamente al lado de los O3 y son característicos de ovarios en estado de

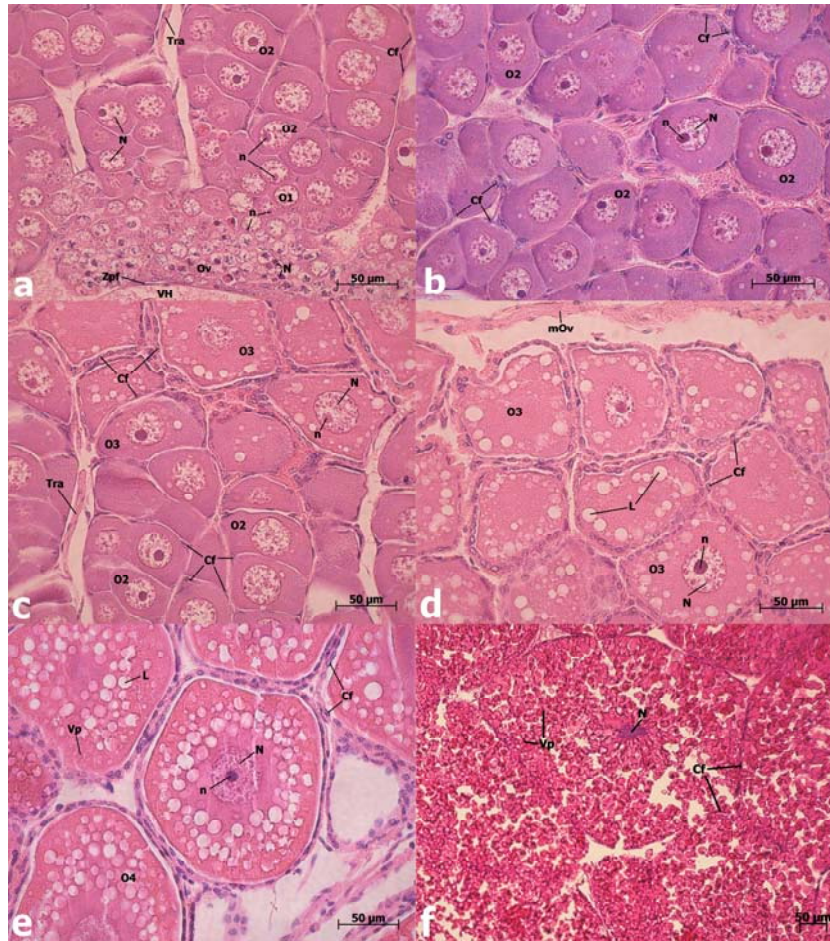


Figura 2. Estados de diferenciación de los ovocitos durante el proceso de maduración ovárica. a) y b) Ovogonias y ovocitos previtelogénicos, c) transición de ovocitos previtelogénicos a vitelogénicos, d) y e) ovocitos vitelogénicos, f) ovocito maduro, Ov: Ovogonia, O1: ovocito previtelogénico temprano, O2: ovocito previtelogénico tardío, O3: ovocito vitelogénico temprano, O4: ovocito vitelogénico tardío, Tra: trabécula, Cf: células foliculares, VH: vaso hemolinfático, Zpf: zona de proliferación, N: núcleo, n: nucléolo, mOv: membrana ovárica, L: gota de lípido y Vp: vitelo proteínico.

Figura 2. Steps of oocyte differentiation during ovarian cycle. a) and b) oogonia and previtellogenic oocytes, c) transition from previtellogenic oocyte to vitellogenic oocyte, d) and e) vitellogenic oocyte, f) mature oocyte. Ov: Oogonia, O1: early previtellogenic oocyte, O2: late previtellogenic oocyte, O3: early vitellogenic oocyte, O4: late vitellogenic oocyte, Tra: trabeculae, Cf: follicular cells, VH: hemolymph vessel, Zpf: proliferation zone, N: oocyte nucleus, n: nucleolus, mOv: ovarian membrane, L: lipid droplet and Vp: proteinaceous yolk.

vitelogénesis intermedia. Su diámetro promedio es de 101 a 200 μm y están recubiertos por numerosas células foliculares (Fig. 2e).

Ovocito maduro (OM): son de gran tamaño respecto a cualquiera de los ovocitos anteriormente mencionados y de forma hexagonal. Son característicos de ovarios en estado de madurez avanzada y su diámetro promedio es de 230 a 520 μm . Se localizan hacia la periferia cerca de la membrana del ovario y están recubiertos por células foliculares alargadas. Su citoplasma es fuertemente acidófilo y está compuesto

por grandes gotas de lípidos y numerosas placas de vitelo proteínico, que se tiñen de color rojo intenso con H-E. En este punto, el núcleo pierde su forma esférica y la membrana nuclear es difícil de observar (Fig. 2f).

Descripción y caracterización del ciclo de madurez ovárica

En base a cambios de tamaño y coloración del ovario, asociados a modificaciones en la morfología interna de la gónada, el ciclo de madurez gonadal de *C. caementarius* se puede dividir en cinco estados:

Estado desovado (0): entre las 24 y 48 h post-desove, externamente la gónada se aprecia translúcida y de color amarillo claro, lo que hace posible en algunos casos identificar ovocitos maduros residuales en su interior. Adicionalmente, a simple vista los lóbulos se ven flácidos y retraídos, dificultando su diferenciación en la mayoría de los casos. Histológicamente el ovario se observa desorganizado y con numerosos folículos ováricos (FO) vacíos y colapsados hacia la periferia, además de una gran cantidad de células foliculares y restos de ovocitos maduros que no lograron ser expulsados. Hacia la parte central, grupos de ovogonias O1, O2 y algunos O3 permanecen organizadamente dentro de los conos de maduración, listos para iniciar un nuevo ciclo de maduración en caso de ser necesario (Fig. 3a).

Estado de previtelogénesis (I): externamente la gónada puede presentar coloraciones que varían entre el blanco lechoso y crema. Los lóbulos recuperan su firmeza y empiezan a hacerse visibles a través del caparazón, sobresaliendo algunas veces unos pocos milímetros por delante del corazón. Histológicamente el ovario se encuentra ocupado casi en su totalidad por ovogonias y ovocitos previtelogénicos (O1 y O2), y entre 10 y 20% por ovocitos vitelogénicos tempranos (O3). La membrana ovárica, junto con las trabéculas, son fácilmente diferenciadas haciendo posible la identificación de los conos de maduración. Por otra parte, las células foliculares son escasas y se encuentran principalmente entre las células reproductivas (Fig. 3b).

Estado de vitelogénesis temprana (II): externamente la gónada es de color amarillo-verdoso a naranja claro y se extiende varios milímetros por delante del corazón. Los lóbulos se aprecian ligeramente engrosados y son fácilmente diferenciados al interior del cefalotórax. Histológicamente, este estado se caracteriza por la abundante presencia de ovocitos iniciando el proceso de vitelogénesis, lo que permite distinguir al interior del ovario dos zonas de desarrollo: una zona previtelogénica (ZP) compuesta por ovogonias (Ov) y ovocitos en estado O1 y O2, y una zona vitelogénica (ZV) compuesta principalmente por ovocitos en estado O3 y algunos O4. A este nivel, la ZV ocupa entre 30 y 40% del área total de la gónada. Así mismo, es evidente el incremento en el número de células foliculares, las cuales comienzan a rodear los ovocitos vitelogénicos. La membrana del ovario junto con las trabéculas, comienzan a elongarse producto del ensanchamiento de los lóbulos, observándose ligeramente más delgadas que en el estado anterior (Fig. 3c).

Estado de vitelogénesis intermedia (III): externamente la gónada se torna de color naranja intenso a café claro y presenta lóbulos bastante engrosados. La porción anterior del ovario sobrepasa por mucho el corazón, llegando a ocupar casi la mitad del espacio existente entre su borde anterior y la primera espina rostral. Histológicamente se caracteriza por que la ZV, que ocupa entre 50 y 70% del área de la gónada, está compuesta fundamentalmente por ovocitos en vitelogénesis tardía (O4), salvo por la esporádica presencia de algunos O3, mientras que la ZP se encuentra bastante reducida y formada por unas pocas ovogonias y ovocitos previtelogénicos (O1 y O2) (Fig. 3d).

Estado de madurez avanzada (IV): externamente el ovario presenta una coloración que varía desde café oscuro hasta morado intenso. Los lóbulos en su parte posterior se encuentran completamente engrosados extendiéndose hasta el primer segmento abdominal, mientras que en la parte anterior alcanzan la base de la primera espina rostral, ocupando casi en su totalidad la porción media dorsal anterior del cefalotórax. Histológicamente, entre 80 y 90% del tejido gonadal está constituido por ovocitos maduros, mientras que solamente una pequeña porción de ovogonias, ovocitos previtelogénicos (O1 y O2) y algunos O3 permanecen ocupando la región central de cada lóbulo. Por último, las trabéculas que delimitan los conos de maduración son prácticamente imperceptibles, los O4 se encuentran completamente ausentes y la gónada totalmente madura, está lista para expulsar al exterior las células reproductoras femeninas (Figs. 3e y 3f).

DISCUSIÓN

Diversos estudios realizados en crustáceos decápodos con respecto a la estructura interna del ovario y a su desarrollo durante el ciclo de madurez gonadal, han revelado un alto grado de diferenciación, en cuanto a formas, procesos y estructuras. En el caso de *C. caementarius*, la forma bilobulada del ovario a manera de sacos paralelos alargados, se asemeja a la reportada para el Palaemónido *Macrobrachium rosenbergii* (Meeratana & Sobhon, 2007), pero difiere considerablemente de las formas en “Y”, reportadas para los Astácidos *Procambarus clarkii* (Ando & Makioka, 1998) y *Cherax quadricarinatus* (Vazquez *et al.*, 2008), y a la forma en H, reportada para la langosta *Jasus frontalis* (Elorza & Dupré, 2000).

La presencia de tejido muscular asociado a la membrana que recubre el ovario de *C. caementarius*, es una característica compartida con *J. frontalis*

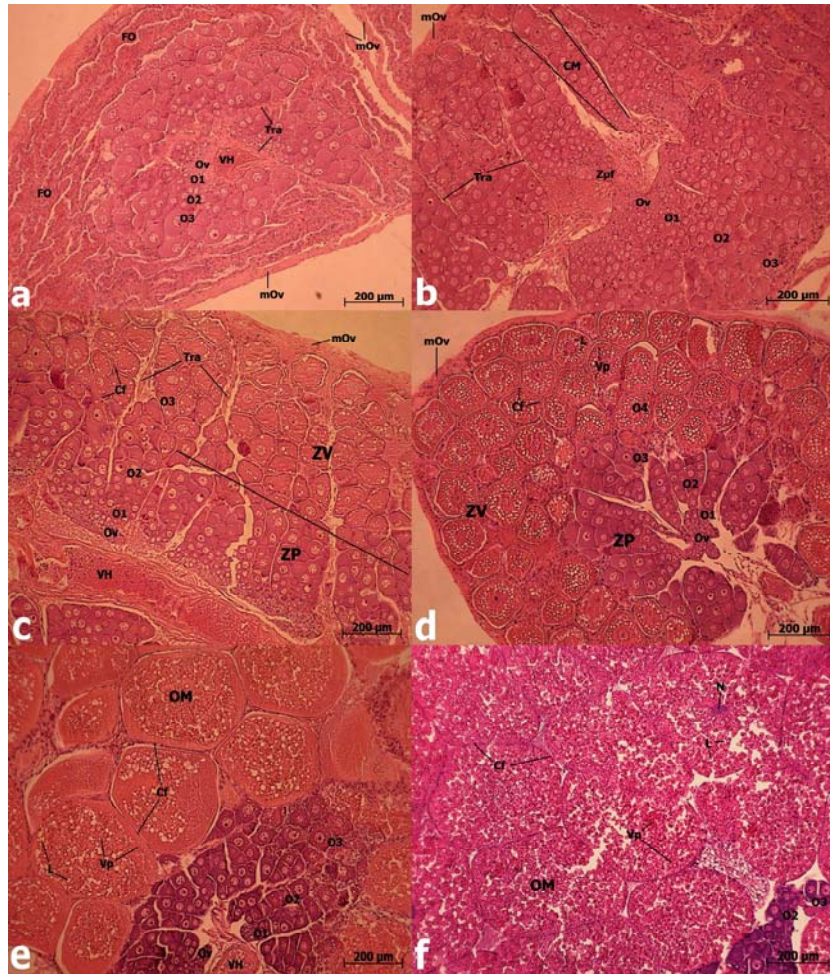


Figura 3. Cortes de ovarios teñidos con H-E. a) Ovario desovado con presencia de numerosos folículos postovulatorios (FO), b) ovario en previtelogénesis con numerosa presencia de ovogonias (Ov), ovocitos previtelogénicos tempranos (O1) y ovocitos previtelogénicos tardíos (O2), c) ovario en estado II, ovocitos vitelogénicos tempranos (O3); diferenciación entre zona previtelogénica (ZP) y vitelogénica (ZV), d) ovario en estado III, ovocitos vitelogénicos tardíos (O4) recubiertos por células foliculares (Cf), e) ovario en estado IV, ovocitos maduros (OM) en gran proporción, recubiertos por numerosas células foliculares, f) ovario en estado IV posterior a la muda pre apareamiento y previo al desove, solo una porción pequeña de ovocitos previtelogénicos permanece en el centro del ovario. Tra: trabéculas, CM: conos de maduración, VH: vaso hemolinfático, N: núcleo de los ovocitos, n: nucléolo, mOv: membrana del ovario, L: gotas de lípidos, Vp: Vitelo proteico y Zpf: zona de proliferación.

Figure 3. Ovarian sections stained with H-E. a) Spawned ovary, presence of several spent ovarian pouch (FO), b) Ovary at previtellogenesis stage, large number of oogonia (Ov), early previtellogenetic oocytes (O1) and late previtellogenetic oocytes (O2), c) ovary II, early vitellogenic oocytes (O3), differentiation between previtellogenetic zone (ZV) and vitellogenic zone (ZV), d) ovary III, late vitellogenic oocytes (O4) surrounding by follicular cells (Cf), e) ovary IV, large number of mature oocytes (OM), surrounding by many follicular cells, f) ovary IV after pre mating molt and before egg laying, only a small portion of previtellogenetic oocytes remain in the center of the ovary. Tra: trabeculae, CM: maturation cone, VH: hemolymph vessel, N: oocyte nucleus, n: nucleolus, mOv: ovarian membrane, L: lipid droplet, Vp: proteinaceous yolk and Zpf: proliferation zone.

(Elorza & Dupré, 2000) y con crustáceos de agua dulce como *P. clarkii*, *M. rosenbergii* y *C. quadricarinatus* (Ando & Makioka, 1998; Meeratana & Sobhon, 2007; Vazquez *et al.*, 2008). No obstante, la

división del tejido gonadal en estructuras a manera de conos de maduración, por parte de extensiones fibromusculares de la membrana ovárica, y la ubicación de las zonas de proliferación en la punta de dichas

estructuras, solo es compartida por *M. rosenbergii* (Meeratana & Sobhon, 2007).

Seis estados de diferenciación celular en base al tamaño, morfología y patrones de distribución y tinción con H-E del vitelo, fueron identificados para las células germinales de *C. caementarius*, durante la madurez ovárica. La particular organización de estas células de acuerdo a características morfológicas similares, al interior de los conos de maduración, ha sido previamente reportada por Meeratana & Sobhon (2007) para *M. rosenbergii*, sugiriendo una maduración sincrónica de los gametos, que progresa a medida que los ovocitos se alejan del centro del ovario. Esta sincronía en la maduración ocurre de igual manera en otros crustáceos (Bell & Lighthner, 1988; Abdu *et al.*, 2000; Elorza & Dupré, 2000; Lucic *et al.*, 2006; Vazquez *et al.*, 2008), encontrándose dominancia de ovocitos previtelogénicos o vitelogénicos de acuerdo al estado de desarrollo de la gónada. Por otro lado, la identificación de estados de desarrollo de los ovocitos mediante características histológicas, histoquímicas y patrones de acumulación de vitelo ha sido previamente utilizada por otros autores. En el caso de *C. quadricarinatus*, se sugirieron ocho estados de desarrollo por Abdu *et al.* (2000), mientras que para *M. rosenbergii*, ovogonias y seis estados de desarrollo son parte del proceso de maduración de los gametos (Meeratana & Sobhon, 2007).

Con respecto al ciclo ovárico, cinco estados de madurez gonadal (desovado, previtelogénesis, vitelogénesis temprana, vitelogénesis intermedia y madurez avanzada) se reconocen para *C. caementarius* en este estudio. Al igual que en el caso de *Stenopus hispidus* (Gregati *et al.*, 2010), para *C. caementarius* se encontró que los cambios de coloración observados a simple vista en el ovario están estrechamente relacionados a modificaciones en tamaño, frecuencia de estados de desarrollo y organización de los ovocitos al interior del mismo (Tabla 1). En base a esto y a la reconocida maduración sincrónica de las células, el estado de maduración de los gametos de *C. caementarius* puede ser exactamente determinado mediante la observación externa del ovario, lo que facilita el manejo de reproductores en terreno principalmente para experiencias de apareamiento donde la unión de hembras próximas a desovar, junto con machos reproductores activos, es la clave en el éxito de esta actividad.

El cambio de tamaño en los ovocitos se debe principalmente a la rápida incorporación de vitelo proteínico y gotas de lípidos, las cuales aparecen en primera instancia hacia la periferia del citoplasma (Abdu *et al.*, 2000; Lucic *et al.*, 2006; Meeratana &

Sobhon, 2007), marcando en algunos casos como en este, la etapa final del estado de previtelogénesis y el inicio de la vitelogénesis temprana. En algunas especies como *C. quadricarinatus*, donde el ciclo de madurez fue dividido en dos grandes etapas (vitelogénesis primaria y secundaria), la aparición de estas gotas de lípidos señala el final de la vitelogénesis primaria (Abdu *et al.*, 2000). La importancia en la descripción de los tamaños promedio de las células germinales durante el proceso de madurez gonadal en crustáceos, radica en la posibilidad que tienen hembras con crecimiento retrasado de ciertas especies producidas en cautiverio, de manifestar el mismo patrón de maduración gonadal en cuanto a coloración, distribución de las células al interior del ovario y sincronía de ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y maduros, que el encontrado en ejemplares normales, pero no el mismo tamaño en las células reproductivas, presentando ovocitos más pequeños para todos los estados de desarrollo y en consecuencia, larvas más pequeñas y de menor calidad (Paulraj *et al.*, 2008).

Según las observaciones realizadas en cautiverio durante esta investigación y en concordancia con lo reportado por Viacava *et al.* (1978), el desove de *C. caementarius* ocurre en un periodo máximo de 24 h después de una muda pre-apareamiento. Los cortes histológicos de ovarios en hembras recién mudadas próximas a desovar, sugieren que, al igual que en *P. clarkii* y *J. frontalis* (Ando & Makioka, 1998; Elorza & Dupré, 2000), la ovulación y desove ocurriría de manera casi simultánea, ya que no se encontraron ovocitos maduros fuera de sus folículos. Asimismo, la comparación histológica entre ovarios completamente maduros y 24 h post-desove permiten afirmar que *C. caementarius* realiza desoves totales. Por otra parte, a diferencia de algunos peneidos donde el desove ocurriría por contracciones en la musculatura del tórax y del abdomen (Bell & Lighthner, 1988), la presencia de fibras musculares tanto en la membrana del ovario como en las trabéculas que forman los conos de maduración en *C. caementarius*, sugieren su participación activa durante el desove, mediante contracciones sucesivas y sincrónicas, ocasionando la ruptura de los folículos ováricos y la liberación de los ovocitos maduros hacia el espacio subcapsular del ovario, que comunica directamente con los oviductos.

La presencia de ovogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos junto con ovocitos maduros en el estado IV del desarrollo gonadal de *C. caementarius*, sugiere que al igual que en *Cherax quadricarinatus*, a medida que avanza el proceso de maduración algunos ovocitos crecen rápidamente mientras que otros permanecen inactivos (Rodríguez-González *et al.*, 2006). Esta condición que refleja la

Tabla 1. Tabla resumen del ciclo de madurez gonadal en hembras de *Cryphiops caementarius*.**Table 1.** Summary table of the ovarian cycle of *Cryphyops caementarius*.

Estado	Morfología externa	Morfología interna
0	Color amarillo claro translucido Lóbulos flácidos y retraídos En algunos casos se observan OM residuales en su interior	Ovario desorganizado con numerosos folículos ováricos vacíos Células foliculares abundantes Presencia de ovogonias, O1, O2, O3 y OM residuales.
I	Color blanco lechoso a crema Lóbulos firmes y delgados visibles a contra luz	Membrana ovárica y trabéculas fácilmente diferenciadas Identificación de los conos de maduración Presencia de ovogonias, O1, O2 y O3.
II	Color amarillo verdoso a naranja claro Lóbulos ligeramente engrosados y claramente visibles a contraluz	Inicio de vitelogénesis Distinción de zona previtelogénica con presencia de Ov, O1 y O2 y zona vitelogénica con presencia de O3 y algunos O4.
III	Color naranja intenso a café claro Lóbulos bastante engrosados.	Zona previtelogénica muy reducida con presencia de Ov, O1 y O2 Zona vitelogénica ocupando entre el 50-70% del área de la gónada y compuesta principalmente por O4 y algunos O3.
IV	Color café oscuro a morado intenso Lóbulos completamente engrosados extendiéndose desde la primera espina rostral hasta el primer segmento abdominal	Tejido gonadal compuesto casi en su totalidad por Ovocitos maduros, ausencia de O4 Hacia la región central permanecen pocas Ov, O1, O2 y algunos O3.

capacidad de *C. caementarius* para realizar rápidamente eventos sucesivos de maduración y desove durante su periodo reproductivo natural, y que fue observada en cautiverio a lo largo de esta investigación y reportada previamente por Viacava *et al.* (1978) y Cortés (1999), es una característica propia de especies desovadoras múltiples, que *C. caementarius* comparte con otras especies de Palaemónidos como *Palaemon xiphias* (Guerao *et al.*, 1994), *Exopalaemon modestus* (Oh *et al.*, 2002), *Macrobrachium olfersi* (Mossolin & Bueno, 2002) y *M. rosenbergii* (Meeratana & Sobhon, 2007), en las que se ha observado que hembras portadoras de embriones próximos a eclosionar, presentan ovarios en estado de madurez avanzada, lo que indica que el desarrollo gonadal en estas especies es usualmente concomitante con el desarrollo de los embriones, indicando desoves consecutivos durante sus respectivas épocas reproductivas. El ciclo de madurez gonadal descrito en este estudio y los estados de madurez ovárica propuestos para *C. caementarius*, se asemejan a los descritos por Viacava *et al.* (1978), en hembras de la misma especie en el Perú. Sin embargo, esta es la primera

caracterización de estos estados, basada en cambios de tamaño y coloración del ovario, contrastados con modificaciones en la morfología interna de la gónada, y la primera descripción en base a parámetros de tamaño y acumulación de vitelo, de los diferentes estados de desarrollo que tienen los ovocitos durante su maduración.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Magister en Acuicultura de la Universidad Católica del Norte. Al profesor Armando Mujica por su colaboración en la revisión de este manuscrito y al personal del laboratorio de histopatología de la UCN, encabezado por su directora Dra. Karin Lohrmann y en especial, a la señorita Ana Valdivia por su ayuda en la elaboración de las placas histológicas.

Durante la escritura de este manuscrito María C. Morales fue parcialmente financiada por beca del programa de capital humano avanzado de CONICYT y por el proyecto FONDEF DO8I1104.

REFERENCIAS

- Abdu, U., G. Yehezkel & A. Sagi. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 37(1): 75-83.
- Andrade, C. 1999. Caracterización de la actividad de recolección de camarón de río del norte en la III y IV Regiones. Informe final, Proyecto FIP/IT 97-43: 200 pp.
- Ando, H. & T. Makioka. 1998. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zool. Sci.*, 15: 893-901.
- Bahamonde, N. & I. Vila. 1971. Sinopsis sobre la biología del camarón del río del norte. *Biol. Pesq. Chile*, 5: 3-60.
- Bell, T. & D. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Allen Press, Kansas, 87 pp.
- Castro, C. 1966. El camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Molina). *Estud. Oceanol.*, 2: 11-19.
- Chen, Y., H. Fanm, S. Hsiehm & C. Kuom. 2003. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 228: 383-395.
- Cortés, S. 1999. Consideraciones sobre la biología poblacional del camarón de río del norte (*Cryphiops caementarius* Molina 1782) durante épocas de mediana pluviosidad y de sequía extrema en el río Choapa IV Región. Tesis de Biología Marina, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 68 pp.
- Daniels, W.H., L.R. D'Abramo & K.F. Graves. 1994. Ovarian development of female red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. *J. Crust. Biol.*, 14(3): 530-537.
- Elías, J. 1960. Contribución al comportamiento del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina) Decapoda: Palaemonidae. Pesca y Caza, Lima, 10: 84-106.
- Elorza, A. & E. Dupré. 2000. Arquitectura del ovario de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis*. *Invest. Mar., Valparaíso*, 28: 175-194.
- Gregati, R., V. Fransozo, L. Lopez-Greco & M. Negreiros-Fransozo. 2010. Reproductive cycle and ovarian development of the marine ornamental shrimp *Stenopus hispidus* in captivity. *Aquaculture*, 306: 185-190.
- Guerao, C., J. Pérez-Baquera & C. Rivera. 1994. Growth and reproductive biology of *Palaemon xiphias* Risso 1816 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). *J. Crust. Biol.*, 14(2): 280-288.
- Hartmann, G. 1958. Apuntes sobre la biología del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina) Palaemonidae, Decapoda. Pesca y Caza, Lima, 8: 17-28.
- Jara, C.G., E.H. Rudolph & E.R. González. 2006. Estado de conocimiento de los malacostráceos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, 70(1): 40-49.
- Karplus, I., H. Gideon & A. Barki. 2003. Shifting the natural spring-summer breeding season of the Australian freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* into the winter by environmental manipulations. *Aquaculture*, 220: 277-286.
- Lucić, A., R. Erben & G. Lacković. 2006. Morphological changes in *Astacus astacus* gonads during the reproductive cycle. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 380-381: 1183-1196.
- Meeratana, P. & P. Sobhon. 2007. Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, 270: 249-258.
- Meeratana, P., B. Withyachumnarnkul, P. Damrongphol, K. Wongprasert, A. Suseangtham & P. Sobhon. 2006. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, 260: 315-325.
- Meruane, J., M. Rivera, M. Morales & C. Galleguillos. 1996. Desarrollo de una tecnología para la producción de larvas y postlarvas del camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) en hatchery. In: A. Silva & G. Merino (eds.). Acuicultura en Latinoamérica, IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, pp. 158-163.
- Meruane, J.A., M.C. Morales, C.A. Galleguillos, M.A. Rivera & H. Hosokawa. 2006a. Experiencias y resultados de investigaciones sobre el camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Decapoda: Palaemonidae): historia natural y cultivo. *Gayana*, 70(2): 280-292.
- Meruane, J., M. Rivera, C. Morales, C. Galleguillos & H. Hosokawa. 2006b. Juvenile production of the freshwater prawn *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) under laboratory conditions in Coquimbo-Chile. *Gayana*, 70(2): 56-64.
- Morales, M.C. 1997. Desarrollo larval del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea: Decapoda) en laboratorio. Tesis Ingeniería en Acuicultura, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 114 pp.
- Mossolin, E.C & S.L.S. Bueno. 2002. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda:

- Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. *J. Crust. Biol.*, 22(2): 367-376.
- Norambuena, R. 1977. Antecedentes biológicos de *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) en el estero "El Culebrón" (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Biol. Pesq.*, 9: 7-19.
- Oh, C.W., H.L. Suh, K.Y. Park, C.W. Ma & H.S. Lim. 2002. Growth and reproductive biology of the freshwater shrimp *Exopalaemon modestus* (Decapoda: Palaemonidae) in a lake of Korea. *J. Crust. Biol.*, 22(2): 357-366.
- Paulraj, A., S. Peixoto, C. Vasumathi & K. Altuff. 2008. Ovarian histology of stunted pond-reared *Macrobrachium rosenbergii* females. *Aquacult. Res.*, 39: 64-69.
- Rivera, M. & J. Meruane. 1994. Evaluación y manejo de las poblaciones de camarón de río en la IV Región. Informe Final, Proyecto CORFO-FONTEC, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 55 pp.
- Rodríguez-González, H., A. Hernández-Llamas, H. Villarreal, P. Sauced, M. García-Ulloa & C. Rodríguez-Jaramillo. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the gonadosomatic index at first maturation. *Aquaculture*, 254: 637-645.
- Vaca, A. & J. Alfaro. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*, 182: 373-385.
- Vazquez, F., C. Tropea & L. López-Greco. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Invertebr. Biol.*, 127(4): 433-443.
- Viacava, M., R. Aitken & J. Llanos. 1978. Estudio del camarón de río en el Perú 1975-1976. *Bol. Inst. Mar Perú*, 3(5): 161-232.

Received: 22 March 2011; Accepted: 31 May 2012