



# Determinación del desarrollo sexual de peces por medio de preparaciones histológicas

<b>Apellidos, nombre</b>	Pérez Igualada, Luz (mlpereig@dca.upv.es) Gallego Albiach, Víctor (vicgalal@upvnet.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Ciencia Animal
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen

En este artículo vamos a aprender a diferenciar los estados de desarrollo sexual de un pez por medio de láminas con fotografías, siempre que tengamos preparaciones histológicas de su ovario o testículo. Se describen brevemente las diferentes etapas de desarrollo sexual femenino y masculino, así como la utilidad que puede tener este conocimiento.

## 2 Objetivos

Una vez que el alumno lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- i. Diferenciar diferentes tipos celulares presentes en las gónadas de los peces
- ii. Determinar el desarrollo sexual de peces a partir de preparaciones histológicas.

## 3 Introducción

Las gónadas de los peces son los testículos en el caso de los machos y los ovarios en el caso de las hembras. Los ovarios son llamados también huevas, y son consumidas en diversos países del mundo, como Japón y varios países europeos, incluida España.

Las gónadas no siempre tienen el mismo aspecto, porque no siempre se encuentran en el mismo estado de desarrollo sexual. A lo largo del año, la gónada pasa por un estado de reposo, y después va desarrollándose poco a poco hasta llegar a la ovulación o espermiación, que se produce siempre en la misma época de puesta [\[1\]](#). El desarrollo de los ovarios y los testículos ocurre en unas semanas o unos meses, según las especies, y pasa por varias etapas que estudiaremos con preparaciones histológicas.



### ¿Para qué sirve conocer el estado de madurez sexual de un pez?

Conocer el estado de maduración sexual de los peces a través del estudio de muestras histológicas es útil para varias cosas [\[2\]](#):

- i. Cuando queremos conocer la época de puesta de una especie que no conocemos, necesitamos estudiar sus gónadas. Esto se puede usar para proteger la época de puesta de los peces, poniendo vedas en las que no se permite la pesca.
- ii. Cuando una especie de pez en cautividad necesita un tratamiento hormonal para desarrollar sus gónadas en laboratorio, podemos evaluar la efectividad del tratamiento hormonal estudiando el desarrollo de sus gónadas
- iii. En peces jóvenes sólo podemos determinar si son machos o hembras estudiando sus gónadas

## 4 Determinación del desarrollo sexual con láminas

Utilizando el microscopio óptico en campo claro observad preparaciones histológicas de ovarios y testículos de peces. Comienza siempre por el mínimo aumento (10x), realizas el enfoque de la muestra, y observas a 20x y a 40x. No es necesario en general observar las muestras a 100x.

Observando a la vez las preparaciones al microscopio y las láminas de ovarios y testículos proporcionadas en este artículo, en primer lugar, por el aspecto, debes determinar si es de un macho o de una hembra. Posteriormente debes asignarle un estado de desarrollo según el tipo de células observadas.

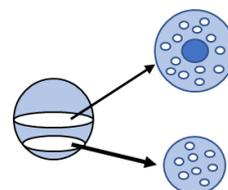
### 4.1 Muestras de hembras de teleósteos

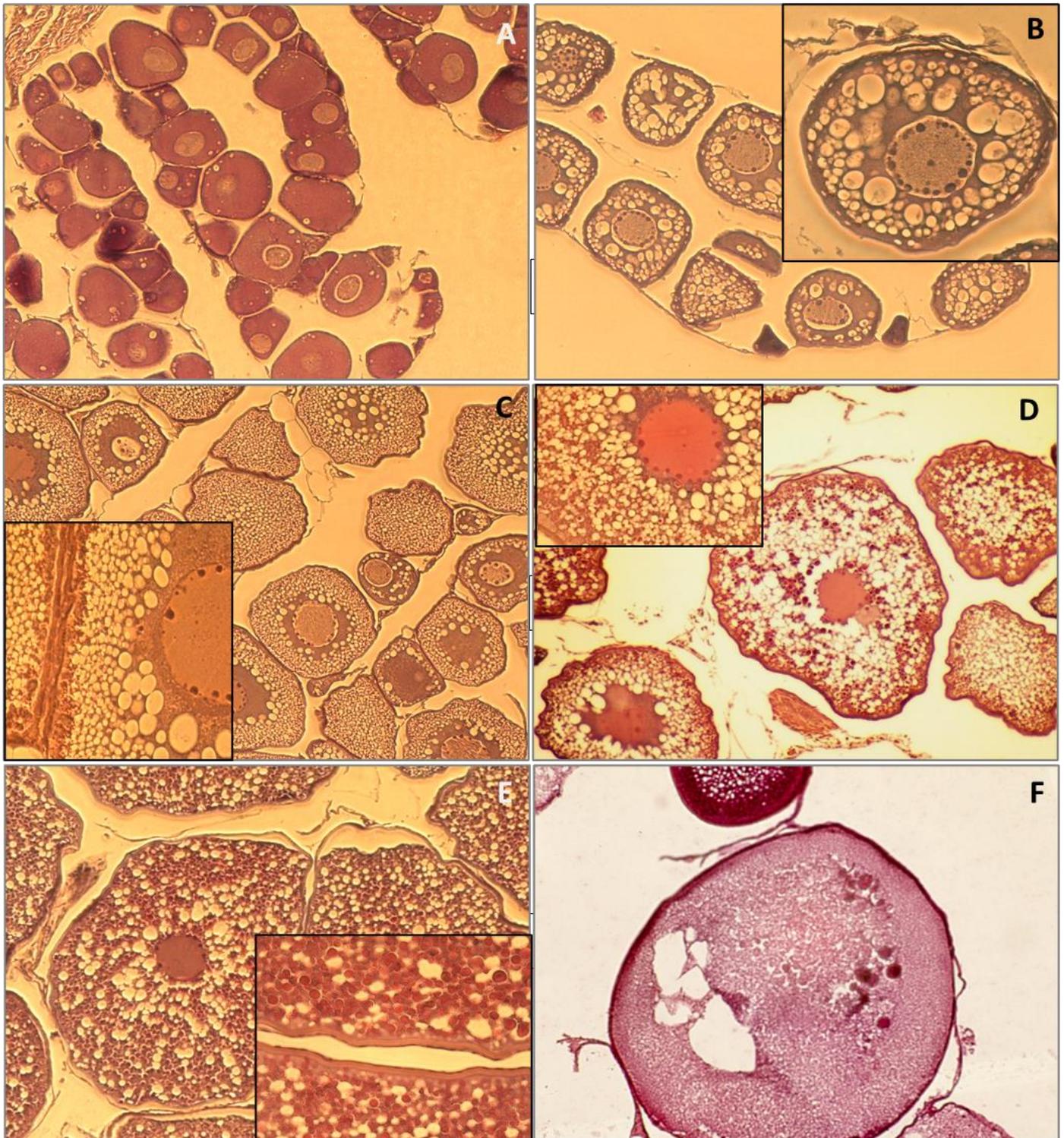
En el caso de los ovarios, hay que fijarse, utilizando la lámina de histología como guía, en:

- La existencia de inclusiones en el citoplasma de las células. (gránulos de varios tipos) Cuando aún no hay inclusiones, se trata de un **oocito previtelogénico: fase nucleolar** (Figura 1A)
- El color de los gránulos que hay en el citoplasma: blanco o rojo. El color blanco corresponde a gotas de grasa, y el color rojo corresponde a gránulos de vitelo. Cuando hay gránulos blancos, pero no hay gránulos rojos es un **oocito previtelogénico en fase de gotas lipídicas/alvéolos corticales** (Figura 1B)
- La proporción de los gránulos rojos (vitelo) respecto a la de los gránulos blancos (Gotas lipídicas). Cuando hay muy pocos gránulos rojos, y están sólo en la periferia del oocito, éste está en **fase de vitelogénesis inicial** (Figura 1C). Cuando los gránulos rojos ya aparecen cerca del núcleo, pero aún son dominantes las gotas lipídicas, llamamos **vitelogénesis media** (Figura 1D); cuando los gránulos de vitelo son más abundantes que las gotas lipídicas, estamos en fase de **vitelogénesis final** (Figura 1E)

Después de la vitelogénesis final, el oocito entra en **fase de maduración**, que se produce en pocos días y donde se producen muchos cambios rápidos en el oocito: el núcleo se desplaza hacia la periferia (Migración nuclear, Figura 1F) y al final desaparece la membrana nuclear; el vitelo se fusiona en gránulos muy grandes y finalmente todo el vitelo queda fusionado [3]. Aún se produce otro proceso, la hidratación del huevo, y ya finalmente la ovulación. Los oocitos son muy grandes, de unas 1000  $\mu\text{m}$  en anguila (*Anguilla anguilla*), dorada (*Sparus aurata*) o lubina (*Dicentrarchus labrax*), o hasta 4500  $\mu\text{m}$  en la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) [4].

Es importante destacar que los cortes histológicos son sólo una rebanada finísima de un objeto que a veces es muy grande. Por ejemplo, es común que al cortar oocitos grandes, en fase de maduración, no aparezca el núcleo, porque hemos cortado en una zona lateral al núcleo (ver imagen inferior). Esto nos puede llevar a un error de medición, por ejemplo. Por ello, hay que observar sólo los oocitos que contengan el núcleo completo.





**Figura 1.** Estados de desarrollo de oocitos de anguila europea (*Anguilla anguilla*). A: Fase nucleolar con oocitos previtelogénicos; B: Fase de alveolos corticales; C: Fase de vitelogénesis inicial; D: Fase de vitelogénesis media; E: Fase de vitelogénesis final; F: Fase de migración nucleolar. *Imágenes propias obtenidas a través del microscopio óptico.*

## 4.2 Muestras de machos de teleósteos

En los machos de anguila, al igual que en la mayor parte de los teleósteos, los testículos son de tipo lobular. En este tipo de testículo el tejido conectivo se extiende desde la cápsula testicular para formar estructuras lobulares irregulares delimitadas por un epitelio que contiene células germinales denominadas espermatogonias. Durante la espermatogénesis, los cistes de células germinales se van a desplazar ligeramente hacia el centro del lóbulo y, tras completarse la espermiogénesis, la pared del ciste se abrirá para liberar los espermatozoides [5].

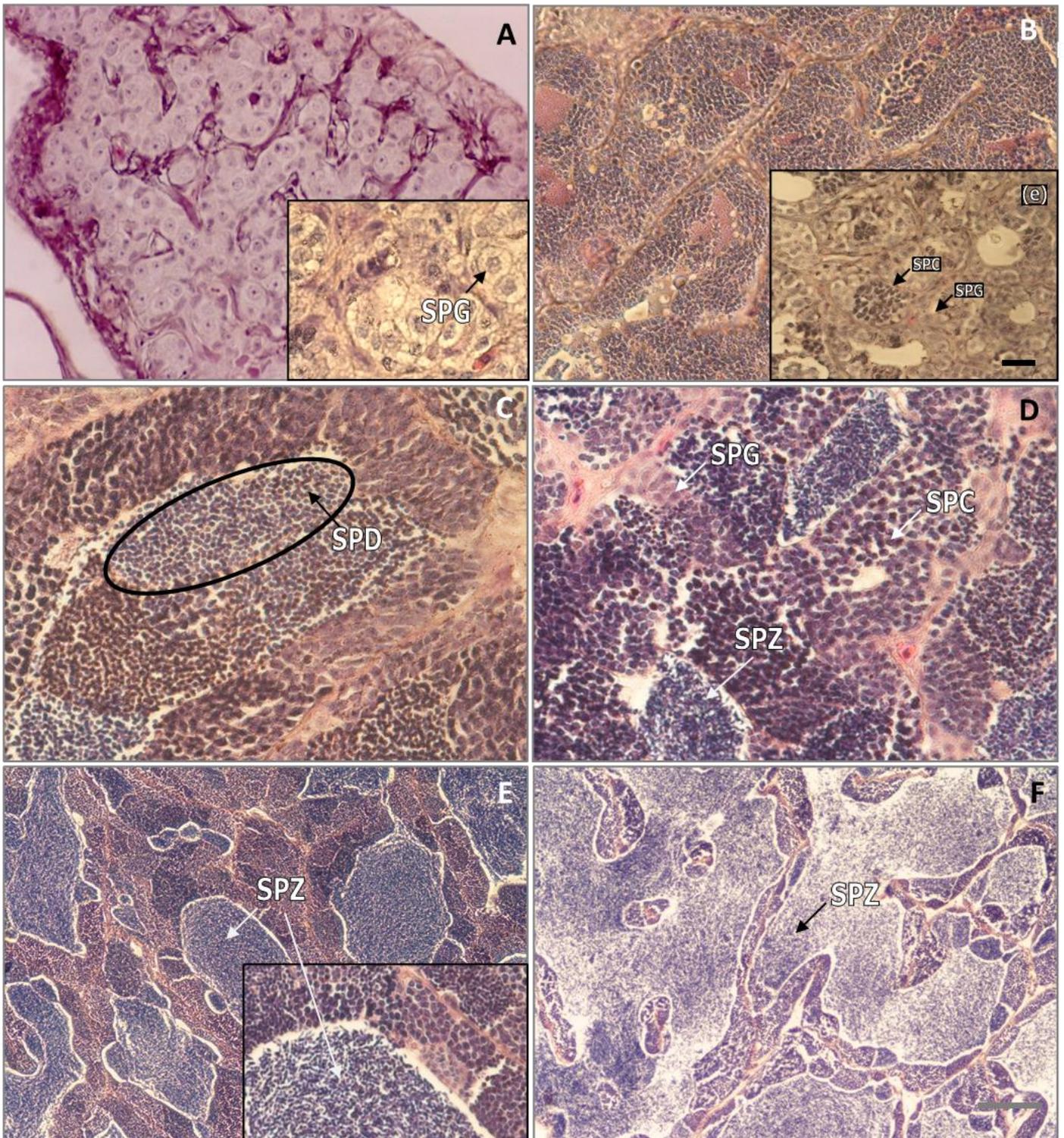
La espermatogénesis en teleósteos tiene lugar en estructuras císticas del testículo delimitadas por las células de Sertoli. Cada ciste contiene células que se originan por divisiones meióticas a partir de una misma espermatogonia y avanzan en su desarrollo de forma sincrónica. Después de experimentar una serie de divisiones mitóticas, las espermatogonias empiezan la división meiótica y se transforman en espermatocitos. Existen distintas generaciones de espermatocitos, que se diferencian según su tamaño, apariencia general y aspecto nuclear. Tras la segunda división meiótica, los espermatocitos se transforman en espermátidas, que posteriormente madurarán hasta espermatozoides por un proceso conocido como espermiogénesis. Los espermatozoides, que experimentan una serie de transformaciones morfológicas, salen a la luz del lóbulo testicular por donde viajan hacia el conducto eferente, por el que son expulsados al exterior [6].

En el caso de los machos, vamos a clasificar las gónadas según los tipos celulares que aparezcan; el **Estadio I**, en que sólo aparecen espermatogonias A (SPG A y B, Figura 2A); el **Estadio II**, en que aparecen espermatogonias B y espermatocitos (SPC, Figura 2B), y por primera vez, lúmenes de tubos seminíferos; el **Estadio III**, en que aparecen espermátidas (Figura 2C), y los **Estadios IV, V y VI** donde aparecen espermatozoides (SPZ) en diferentes porcentajes junto a los otros tipos celulares anteriormente descritos (Figura 2 D,E y F). Así pues, la secuencia temporal de aparición de células es la siguiente:



Para distinguir los distintos tipos celulares, nos fijaremos en el tamaño y color de las células:

- ▶ Las espermatogonias A (SPG-A) son grandes, de 10-20  $\mu\text{m}$ , y tienen un color claro, tanto el núcleo como el citoplasma.
- ▶ Las espermatogonias B (SPG-B) tienen menor tamaño, y la cromatina del núcleo está muy condensada, por lo que tienen color oscuro. Estas células no son redondeadas, sino que parecen apretarse unas contra otras, y los espacios entre células tienen una coloración rosada.
- ▶ Los espermatocitos (SPC) tienen un tamaño algo superior a las SPG-B, un núcleo más claro y son más redondeados; aparecen en grupos mayores que las SPG-B. Los SPC son células meióticas y son indicadoras de meiosis, señal inequívoca de que la gónada llegará a su maduración. Los testículos en reposo generalmente solo contienen SPG-A y SPG-B, por lo que la aparición de SPC es señal de que la gónada ha entrado en desarrollo.
- ▶ Las espermátidas (SPD) son células muy pequeñas y redondas, que aparecen en grupos grandes.
- ▶ Los espermatozoides (SPZ) derivan de las espermátidas, y tienen cola, y aparecen en grupos más o menos grandes.



**Figura 2.** Estados de desarrollo del testículo de anguila europea (*A. anguilla*): Estado I (A), presencia de espermatogonias (SPG); Estado II (B), presencia de espermatogonias y espermatocitos (SPC); Estado III (C), aparición de espermátidas (SPD). Los estados IV, V y VI dependen de la abundancia de espermatozoides: cuando hay pocos espermatozoides es estado IV (D); cuando los espermatozoides son abundantes el testículo está en estado V (E); y cuando los lúmenes de los tubos seminíferos se han fusionado entre sí, y la mayor parte de las células que hay en el testículo son espermatozoides, el testículo estaría en estado VI (F).



## 5 Conclusiones

Ahora ya sabes como clasificar el estado de desarrollo de las gónadas de peces a partir de preparaciones histológicas. Puedes determinar si el pez de que procedían las muestras era macho o hembra, y si estaba mas o menos maduro. Esto te puede servir para planificar la reproducción de una especie en el laboratorio, que es de mucha utilidad en acuicultura.

## 6 Bibliografía

- [1] Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70
- [2] Nakamura, M. (2013). Morphological and physiological studies on gonadal sex differentiation in teleost fish. Terrapub..
- [3] Izumi, H., Hagihara, S., Kurogi, H., Chow, S., Tsukamoto, K., Kagawa, H., ... & Adachi, S. (2015). Histological characteristics of the oocyte chorion in wild post-spawning and artificially matured Japanese eels *Anguilla japonica*. *Fisheries science*, 81(2), 321-329.
- [4] Muchlisin, Z. A. (2014). A general overview on some aspects of fish reproduction. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 3(1), 43-52.
- [5] Leal, MC, Cardoso ER, Nóbrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, França LR, et al. 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction* 81: 177-87.
- [6] Uribe, M. C., Grier, H. J., & Mejía-Roa, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3), e983400.