

Microanatomía del testículo y espermatogénesis del anfípodo *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942

Testis microanatomy and spermatogenesis of the amphipod *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942

Bettina S. Gullo¹
bgullo@fcnym.unlp.edu.ar

María Belén Virgolini¹
belenvirgolini@gmail.com

Estela C. Lopretto^{1, 2}
lopretto@fcnym.unlp.edu.ar

Resumen

Se realizó el estudio microanatómico del testículo y la espermatogénesis del anfípodo dulceacuícola *Hyalella curvispina* SHOEMAKER 1942. Los crustáceos fueron recolectados en el Arroyo Rivera (Saldungaray, provincia de Buenos Aires, Argentina). Las células foliulares experimentan cambios durante la espermatogénesis debidos a su función secretora. En la etapa inicial presentan un núcleo oval y el citoplasma es fuertemente basófilo. A medida que progresa la espermatogénesis, los núcleos se hipertrofian, y el citoplasma adquiere aspecto espumoso debido a la presencia de vacuolas. La pared de la vesícula está formada por dos estratos: un epitelio constituido por células glandulares cúbicas y una capa externa de tejido conectivo fibroso. Las células presentan una secreción granular eosinófila y vuelcan su contenido en la luz de la vesícula. El líquido seminal está constituido por la secreción que aportan tanto las células del epitelio testicular como las células glandulares de la vesícula seminal.

Palabras clave: histología, testículo, Amphipoda, agua dulce.

Abstract

A microanatomical study of the testis and spermatogenesis of the freshwater amphipod *Hyalella curvispina* Shoemaker 1942 has been performed. The crustaceans were collected in the Arroyo Rivera (Saldungaray, Buenos Aires province, Argentina). Follicular cells undergo changes during spermatogenesis due to its secretory function. In the initial stage they present an oval nucleus and a strongly basophilic cytoplasm. As spermatogenesis progresses, nuclei hypertrophied, and the cytoplasm took on a foamy appearance due to the presence of vacuoles. The wall of the vesicle consists of two layers: an epithelium consisting of cubic glandular cells and an outer layer of fibrous connective tissue. The cells have eosinophilic granular secretion and turn their content into the lumen. Seminal fluid is constituted by secretions from cells of the testicular epithelium as well as glandular cells of the seminal vesicle.

Keywords: histology, testis, Amphipoda, freshwater.

¹ Cátedra Zoología Invertebrados I, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM). Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 122 y 60, (1900) La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, (C1033AAJ) CABA, Argentina.

Introducción

Los anfípodos del género *Hyalella* S. I. SMITH son los únicos Talitroidea de agua dulce epigeos de la región Neotropical que representan también una fracción importante en la región Neártica (Väinölä *et al.*, 2008). Debido a su gran abundancia en los ambientes acuáticos, por lo general se emplean en ensayos de laboratorio y en bioensayos *in situ* para evaluar la contaminación urbana y rural. *Hyalella azteca* (SAUSSURE 1858), el anfípodo más común en América del Norte, se utiliza extensamente para probar la toxicidad aguda y crónica de contaminantes acuáticos, especialmente en las pruebas de toxicología de sedimentos (Wang *et al.*, 2004; Doobay, 2011).

Hyalella curvispina SHOEMAKER 1942, por su parte, es una especie nativa de amplia distribución en el zoobentos de ríos y arroyos de Sudamérica austral (De los Ríos-Escalante *et al.*, 2012). Por sus roles tróficos como herbívora y detritívora, tiene un papel clave en el ciclo de nutrientes a la vez que constituye un importante eslabón en las cadenas alimentarias como presa de varios invertebrados, peces, anfibios y aves (Galassi *et al.*, 2006; Saigo *et al.*, 2009).

La comprensión de la histología básica del testículo y espermatogénesis de *Hyalella curvispina* es importante para diferenciar los estadios de desarrollo gonadal durante el ciclo reproductor e interpretar aspectos de la dinámica poblacional de esta especie. Además, es el anfípodo más utilizado en investigación a nivel regional (Somma *et al.*, 2011; Ferrari, 2015), por lo que la presente es una contribución al conocimiento de la biología de un anfípodo neotropical de uso frecuente en las evaluaciones ecotoxicológicas.

Materiales y métodos

Las muestras provienen del Arroyo Rivera (38° 18' S 61° 47' O; elevación 213 m) sito en Saldungaray (Partido de Tornquist), que es una localidad al sudoeste de la provincia de Buenos Aires ubicada en el amplio valle entre las sierras de la Ventana y Pillahuincó. Los ejemplares fueron recolectados durante el mes de septiembre de 2012, empleando un tamiz de 0,01 mm de abertura de malla.

Para el examen microanatómico fueron fijados *in situ* y analizados 30 machos adultos utilizando Carnoy (6:3:1). La inclusión se realizó en Paraplast®. Se realizaron secciones transversales y parasagitales de 10 µm. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina de Meyer y eosina. Se obtuvieron las tallas nucleares de los elementos germinales (n=10) y de las células foliculares y glandulares de la vesícula (n=8) empleando ocular micrométrico. Los diámetros mayores se indican con (dM) y los menores con (dm).

Resultados

El sistema genital masculino de *Hyalella curvispina* se extiende dorsalmente al tubo digestivo y por debajo del sistema vascular, entre los toracómeros 2 al 7 (Figuras 1A y 1B). Está formado por un par de testículos tubulares y delgados que posteriormente se prolongan en una vesícula seminal. En el somito 6 ésta se continúa con el conducto deferente, el que desemboca en una papila peneana en el esternito 7.

La pared del testículo está formada por una delgada capa de tejido conectivo constituida por células aplanadas y un epitelio testicular formado por células foliculares (Figuras 2A y 2B). Estas células experimentan cambios durante la espermatogénesis debidos a su función secretora. En la etapa inicial presentan un núcleo oval cuya talla promedio es

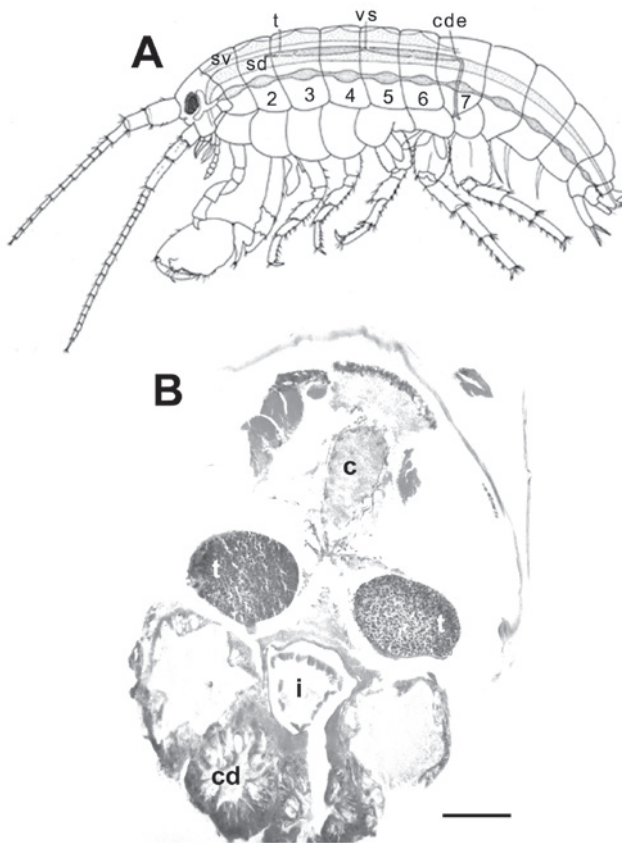


Figura 1. *Hyalella curvispina* macho. (A) Vista lateral del cuerpo (modificado de Cavalieri, 1955). (B) Sección transversal del cuerpo (escala: 100 µm). c, corazón; cd, ciego digestivo; cde, conducto deferente; i, intestino; sd, sistema digestivo; sv, sistema vascular; t, testículo; vs, vesícula seminal; los números señalan los toracómeros 2-7. **Figure 1.** Male of *Hyalella curvispina*. (A) Lateral view of the body (modified from Cavalieri, 1955). (B) Transverse section of the body (scale bar: 100 µm). c, heart; cd, digestive caecum; cde, vas deferens; i, gut; sd, digestive system; sv, vascular system; t, testis; vs, seminal vesicle; numbers indicate thoracomers 2-7.

$27,73 \pm 0,92 \mu\text{m}$ (dM) y $13,08 \pm 0,92 \mu\text{m}$ (dm). El citoplasma es fuertemente basófilo aunque no es aún visible la secreción. A medida que progresa la espermatogénesis, los núcleos se hipertrofian, y el citoplasma adquiere aspecto espumoso debido a la presencia de vacuolas (Figuras 2C y 2D).

Durante la espermatogénesis los elementos germinales experimentan una reducción progresiva de su talla y una condensación de la cromatina. Las células de mayor tamaño son las espermatogonias, seguidas de espermatocitos, espermátides y espermatozoides (Figuras 2, A-D).

Las espermatogonias son células de núcleo oval, con cromatina de disposición perinuclear y nucléolo prominente (Figura 3A). El citoplasma es muy delgado y ligeramente acidófilo. La talla nuclear promedio es de $13,18 \pm 1,21 \mu\text{m}$ (dM) y $9,94 \pm 2,08 \mu\text{m}$ (dm). Durante la etapa de proliferación las espermatogonias se dividen mitóticamente y se observan células en metafase y anafase (Figura 3A).

Los espermatocitos primarios, luego de varias divisiones de maduración, experimentan la profase de la primera división meiótica. En la etapa de zigotene o de paquitene los espermatocitos tienen una talla nuclear promedio de $9,94 \pm 1,24 \mu\text{m}$ (dm), pierden el nucléolo, la cromatina nuclear se condensa y el núcleo se torna muy basófilo (Figuras 3B y 3C).

Las espermátides tienen un diámetro nuclear promedio de $5,68 \pm 0,55 \mu\text{m}$ (dm). En la etapa de diferenciación la cromatina se condensa y adopta una forma de media luna manteniendo una marcada basofilia (Figura 3D).

Los espermatozoides presentan una talla nuclear media de $2,85 \pm 0,67 \mu\text{m}$ (dm) y como resultado del proceso de espermiogénesis se forma el flagelo. Los espermatozoides presentes en la cavidad testicular se acumulan en la vesícula seminal (Figura 4A).

La pared de dicha vesícula está formada por dos capas: una externa de tejido conectivo fibroso y una interna cons-

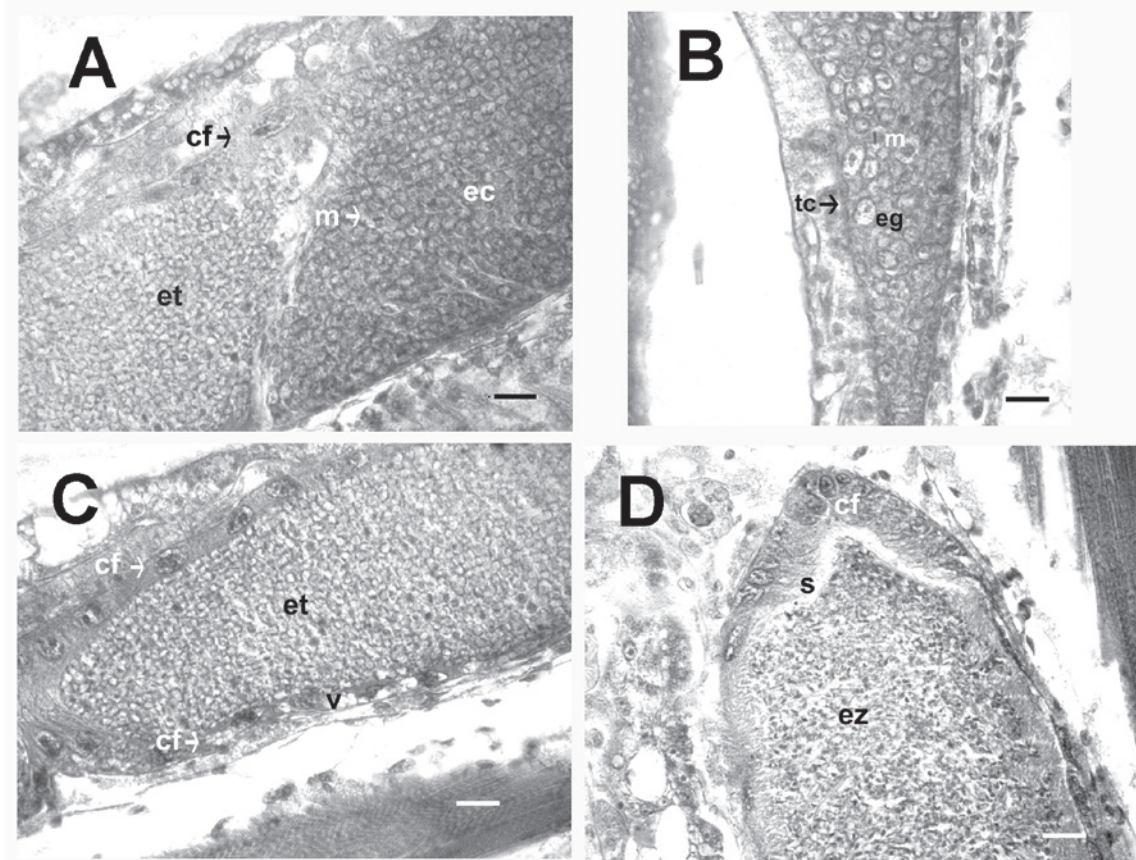


Figura 2. Secciones sagitales del testículo de *Hyalella curvispina*. (A) Células foliculares y germinales. (B) Multiplicación de células germinales. (C) Hipertrofia de las células foliculares. (D) Secreción de las células foliculares y espermatozoides. cf, células foliculares; ec, espermatocitos; eg, espermatogonias; et, espermátides; ez, espermatozoides; m, mitosis; s, secreción; tc, tejido conectivo; v, vacuola de secreción. Escalas: 20 μm .

Figure 2. Sagittal sections of testis of *Hyalella curvispina*. (A) Follicular and germinal cells. (B) Germinal cells multiplication. (C) Follicular cells hypertrophy. (D) Follicular cells secretion. cf, follicular cells; ec, spermatocytes; eg, spermatogonia; et, spermatids; ez, spermatozoa; m, mitosis; s, secretion; tc, connective tissue; v, secretion vacuole. Scale bars: 20 μm .

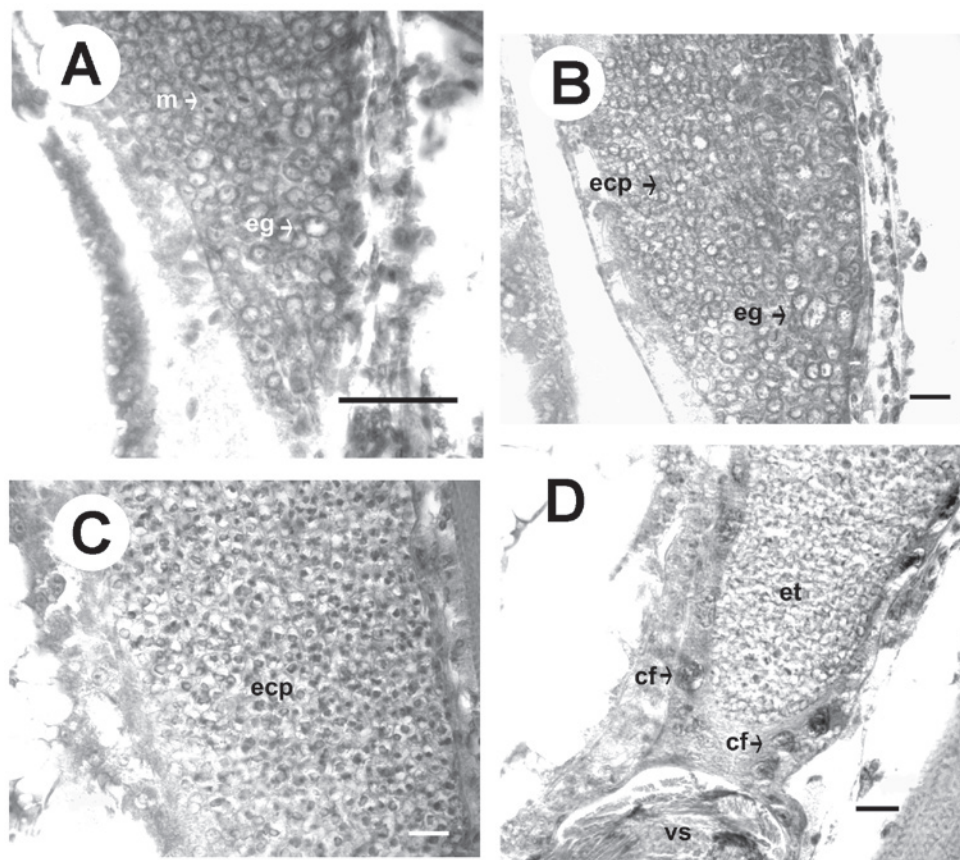


Figura 3. Espermatogénesis de *Hyaella curvispina*. (A) Etapa de proliferación con presencia de espermatogonias y figuras de mitosis. (B) Etapa de proliferación donde se observan espermatocitos primarios y espermatogonias. (C) Meiosis con espermatocitos primarios en zigotene/paquitene. D: Etapa de diferenciación. cf, células foliculares; ecp, espermatocitos primarios; eg, espermatogonias; et, espermátides; m, mitosis; vs, vesícula seminal. Escalas: 50 μ m (A), 20 μ m (B, C, D).

Figure 3. Spermatogenesis stages. (A) Proliferation stages: spermatogonia and mitosis. (B) Proliferation stage: primary spermatocytes and spermatogonia. (C) Meiosis: primary spermatocytes in zygotene/pachytene. (D) Differentiation stage. cf, follicular cells; ecp, primary spermatocytes; eg, spermatogonia; et, spermatids; m, mitosis; vs, seminal vesicle. Scale bars: 50 μ m (A), 20 μ m (B, C, D).

tituida por células glandulares cúbicas cuyos núcleos poseen una talla de $13,53 \pm 0,92 \mu\text{m}$ (dM) y $7,54 \pm 0,82 \mu\text{m}$ (dm). Éstas presentan una secreción granular eosinófila y vuelcan su contenido a la luz de la vesícula (Figura 4B).

En el caso del conducto deferente no se pudo constatar su naturaleza glandular.

Discusión

La histología de la gónada en crustáceos anfípodos ha sido estudiada en contadas especies de gammáridos: *Gammarus pulex* (LINNAEUS 1758) (Koster, 1910), *G. duebeni* LILLJEBORG 1852 (Le Roux, 1933), *G. lacustris* SARS 1864 (Schmitz, 1967) y en el talítrido *Orchestia gammarellus* (PALLAS 1766) (Charniaux-Cotton, 1957; Meusy, 1963, 1968). Nuestros resultados son los primeros aportes al conocimiento de la microanatomía testicular y espermatogénesis de una especie de *Hyaella*.

Meusy (1963) describe en *Orchestia gammarellus* dos tipos de espermatogonias (I y II) y reconoce diferencias entre ellas. Las primeras tienen cromatina laxa y un nucléolo mientras que las segundas tienen cromatina de disposición periférica con dos nucléolos. Las tallas nucleares de ambos tipos son similares (dm 8 μm ; dM 10 μm). En *Hyaella curvispina* sólo hemos observado espermatogonias I caracterizadas por ser de mayor talla (dm 9 μm ; dM 13 μm), por la disposición perinuclear de la cromatina y la presencia de un solo nucléolo.

En *O. gammarellus* se describen dos tipos de espermatocitos (I y II). La profase de la primera división meiótica es más larga y sincrónica, mientras que el fin de la profase I y la meiosis II (ecuacional) es muy rápido y asincrónico (Meusy, 1963). Durante la espermatogénesis de *H. curvispina* sólo se han podido observar espermatocitos I en profase de meiosis. Las divisiones de los espermatocitos I son sincrónicas tal como ocurre en *O. gammarellus*, pero

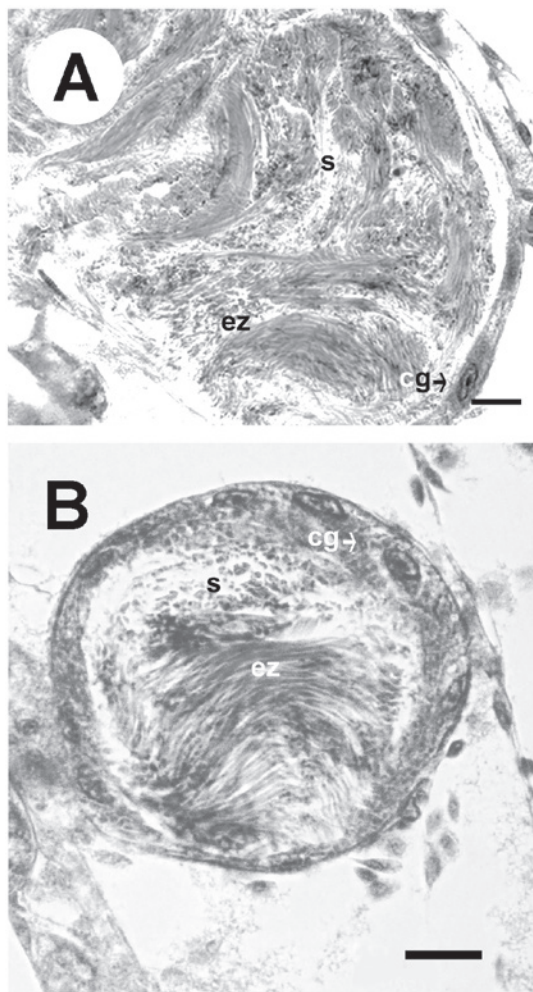


Figura 4. Vesícula seminal de *Hyalella curvispina*. (A) Sección sagital. (B) Sección transversal. cg, células glandulares; ez, espermatozoides; s, secreción. Escalas: 20 μ m.

Figure 4. Seminal vesicle of *Hyalella curvispina*. Sagittal (A) and transverse (B) sections. cg, glandular cells; ez, spermatozoa; s, secretion. Scale bars: 20 μ m.

dado que las divisiones de maduración de los espermatozoides II son muy rápidas no se han podido observar con las técnicas empleadas.

La hipertrofia de las células foliculares es propia de las células glandulares y ha sido descrita para otros crustáceos anfípodos (Charniaux-Cotton, 1957; Schmitz, 1967, 1992; Meusy, 1968) e isópodos (Balesdent, 1965). En *H. curvispina* las células del epitelio testicular (foliculares) presentan un citoplasma basófilo y los núcleos, como en otros anfípodos, se hipertrofian a medida que transcurre la espermatogénesis. En el citoplasma se observan vacuolas que vuelcan su secreción a la luz testicular.

El líquido seminal en crustáceos es producido o por células glandulares de los vasos deferentes y glándulas anexas, incluyendo la vesícula seminal (Kaestner, 1970),

o por las células foliculares del epitelio testicular (Charniaux-Cotton, 1957; Meusy, 1963, 1968), siendo su composición mixta de proteínas y carbohidratos (Adiyodi y Anilkumar, 1988). En *H. curvispina* las células del epitelio testicular y de la vesícula seminal son glandulares. El líquido seminal está constituido por la secreción que aportan las células del epitelio testicular y las células glandulares de la vesícula seminal. Dada la marcada eosinofilia de la secreción de las células de la vesícula seminal posiblemente se trate de mucosustancias neutras, ya sean mucopolisacáridos o glucoproteínas.

Agradecimientos

Desearíamos expresar nuestro agradecimiento a los dos revisores por sus valiosas sugerencias. Este trabajo fue subsidiado por el Proyecto 11/N675-2012-2015 acreditado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, Argentina).

Referencias

- ADIYODI, K.G.; ANILKUMAR, G. 1988. Arthropoda-Crustacea. In: K.G. ADIYODI; R.G. ADIYODI (eds.), *Reproductive biology of invertebrates. Vol. 3: Accessory sex glands*. London, John Wiley & Sons, p. 261-318.
- BALESDENT, M.L. 1965. Recherches sur la sexualité et le déterminisme des caractères sexuels d'*Asellus aquaticus* Linné (Crustacé Isopode). *Bulletin de l'Académie et de la Société Lorraine des Sciences*, **5**(2):1-231.
- CAVALIERI, F. 1955. *Anfípodos de agua dulce de la República Argentina*. La Plata, Argentina. Tesis Doctoral n° 229. Universidad Nacional de La Plata, 78 p.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1957. Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* (Pallas) (Crustacé Amphipode). *Annales des Sciences Naturelles*, **19**:411-559.
- DE LOS RÍOS-ESCALANTE, P.; MORRONE, J.J.; RIVERA, R. 2012. Distributional patterns of the South American species of *Hyalella* (Amphipoda: Hyalellidae). *Gayana*, **76**(2):153-161. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-65382012000300008>
- DOOBAY, S. 2011. *The utilization of the freshwater invertebrates Hyalella azteca and Daphnia magna for use in assessing potential endocrine disruption in aquatic systems*. Toronto, Canada. Master of Science Thesis. Ryerson University, 161 p.
- FERRARI, L. 2015. La ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: el caso del río Reconquista. *Ciencia e Investigación*, **65**(2):17-35.
- GALASSI, M.E.; FRANCESCHINI, M.C.; NEIFF, A.P. 2006. Population estimates of *Hyalella curvispina* Shoemaker (Amphipoda) in aquatic vegetation of north-eastern Argentinian ponds. *Acta Limnologica Brasiliensis*, **18**(1):101-106.
- KAESTNER, A. 1970. Order Amphipoda. In: A. KAESTNER, *Invertebrate Zoology. Vol. 3. Crustacea*. New York, Wiley-Interscience, p. 470-502.
- KOSTER, H. 1910. Morphologie und Genese der Spermatozoen von *Gammarus pulex*. *Zoologischer Anzeiger*, **35**:490-496.
- LE ROUX, M.L. 1933. Recherches sur la sexualité des gammariens: croissance, reproduction, déterminisme des caractères secondaires. *Bulletin Biologique de France et de Belgique, Supplément* **16**:1-139.
- MEUSY, J.J. 1963. La gamétogénese d'*Orchestia gammarella* Pallas, Crustacea Amphipoda. *Bulletin Société Zoologique de France*, **88**(2-3):197-221.

- MEUSY, J.J. 1968. Ultrastructure de la zone germinative et des gonies du testicule et de l'ovaire d'*Orchestia gammarella* P. (Crustacé Amphipode). *Annales des Sciences Naturelles Zoologie Paris*, 12^e Série, **10**:102-116.
- SAIGO, M.; MARCHESE, M.; MONTALTO, L. 2009. Hábitos alimentarios de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda: Gammariidae) en ambientes leníticos de la llanura aluvial del río Paraná Medio. *Natura Neotropicalis*, **40**:43-59.
<http://dx.doi.org/10.14409/natura.v1i40.3876>
- SCHMITZ, E.H. 1967. Visceral anatomy of *Gammarus lacustris lacustris* Sars (Crustacea Amphipoda). *American Midland Naturalist*, **78**:1-54.
<http://dx.doi.org/10.2307/2423369>
- SCHMITZ, E.H. 1992. Amphipoda. In: W.H. FREDERICK; A.G. HUMES (eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 9. Crustacea*. New York, John Wiley & Sons, p. 443-528.
- SOMMA, A.; GIUSTO, A.; FERRARI, L. 2011. *Manual de producción de Hyalella curvispina en laboratorio*. Ushuaia, Editorial Utopias, 25 p.
- VÄINÖLÄ, R.; WITT, J.D.S.; GRABOWSKI, M.; BRADBURY, J.H.; JADZEWSKI, K.; SKET, B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in fresh water. *Hydrobiologia*, **595**:241-255.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-9020-6>
- WANG, F.; GOULET, R.R.; CHAPMAN, P.M. 2004. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: The gap between laboratory and nature. *Chemosphere*, **57**:1713-1724.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.050>

Submitted on December 29, 2015

Accepted on April 18, 2016