

TESIS DEFENDIDA POR
Diana Judith López Peraza
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Miembro del Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Miembro del Comité

Dr. Juan Carlos Herguera García
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez
*Coordinador del programa de
posgrado en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales
Director de Estudios de Posgrado

13 de noviembre de 2009.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LOS ESTADIOS DE MADURACIÓN
GONADAL EN LOS PULPOS *Octopus bimaculoides* Y *Octopus rubescens***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

DIANA JUDITH LÓPEZ PERAZA

Ensenada, Baja California, México, noviembre de 2009.

RESUMEN de la tesis de **Diana Judith López Peraza**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en Acuicultura. Ensenada, Baja California noviembre del 2009.

**DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LOS ESTADIOS DE MADUREZ GONADAL
EN LOS PULPOS *Octopus bimaculoides* Y *Octopus rubescens***

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirector de Tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de Tesis

La pesquería de cefalópodos a nivel mundial se debe principalmente a la pesca artesanal que se realiza a lo largo de las costas, sin un control adecuado de la extracción de este recurso (Boyle y Rodhouse, 2005) y solo algunas especies se comercializan a gran escala (Kreuzer, 1984).

En los últimos años se ha incrementado el interés por estos recursos y se han obtenido avances en su biología. En los pulpos, los estudios se han enfocado en los aspectos fisiológicos y nutricionales, principalmente, y pocas especies han sido objeto de estudio.

El objetivo del presente trabajo fue, describir mediante técnicas histológicas los diferentes estadios de madurez gonadal en *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.

Se analizaron histológicamente un total de 79 organismos, 65 pertenecientes a la especie *Octopus rubescens* (35 machos y 30 hembras) y 14 ejemplares de *Octopus bimaculoides* (10 machos y 4 hembras). Los organismos fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico 2-fenoxietanol ($0.3 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$), se les extrajo el aparato reproductor completo y se fijó en una solución Davison. Luego se procesaron mediante las técnicas histológicas convencionales y se realizaron cortes en secciones de $4\mu\text{m}$, tomando dos muestras de cada aparato reproductor, una de las cuales fue teñida con Hematoxilina-Eosina y la otra con la tinción tricrómica de Arteta. Las muestras fueron analizadas y capturadas mediante un microscopio Leica, modelo DMRXA2, equipado con una cámara digital de 36-bits y 3.3 megapíxeles (Leica, modelo DC300), y con un microscopio marca Olympus modelo CKX41, equipado con una cámara Olympus modelo C-5060.

Se describió de manera general la estructura del aparato reproductor femenino y masculino de ambas especies, así como los órganos que lo integran. Histológicamente, se realizó una descripción de cada uno de los órganos que lo integran. Finalmente se estableció una escala de madurez para *O. rubescens*. En

las hembras constó de ocho estadios: 1. Inmaduro, predominan las ovogonias inmersas en el estroma ovárico; 2. Foliculogénesis inicial, predominan los ovocitos con folículo primario; 3. Foliculogénesis final, ovocitos con folículo secundario; 4. Previtelogénesis, ovocitos con folículo secundario e invaginaciones profundas; 5. Vitelogénesis inicial, citoplasma con apariencia granulosa, por la secreción del vitelo del folículo; 6. Vitelogénesis final, ovocitos con citoplasma homogéneo; 7. Maduros, óvulos con prolongaciones en el corion y 8. Desovados, predominan ovocitos en reabsorción y folículos postovulatorios. En las hembras de *O. bimaculoides*, solo se encontraron los estadios Inmaduro, Foliculogénesis final y el de Vitelogénesis final. La madurez de los machos se clasificó en cinco estadios: 1. Inmaduro, abundantes espermatogonias; 2. En maduración A, todos los tipos celulares, sin espermatozoides fuera del testículo; 3. En maduración B, con espermatozoides en ductos y en glándulas; 4. Maduro tipo 1, espermatozoides dentro y fuera del testículo, espermatóforos almacenados en el saco de Needham y 5. Maduro tipo 2, pocos espermatozoides en el testículo, se puede o no observarlos fuera de el, y hay abundantes espermatóforos en el saco de Needham. En la especie *O. bimaculoides*, solo se encontraron los estadios Inmaduro, En maduración B y Maduro tipo 2.

Palabras Clave: Pulpo, madurez, foliculogénesis, espermatóforos

ABSTRACT of the thesis presented by **Diana Judith López Peraza** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México november 2009.

HISTOLOGICAL DESCRIPTION OF THE GONADAL MATURITY STAGES IN THE OCTOPUS *Octopus bimaculoides* AND *octopus rubescens*

Worldwide, the octopus fishery is performed in an artisan way throughout the coasts, without a suitable control of the extraction (Boyle and) (Rodhouse, 2005), few species are commercialized in a large scale (Kreuzer, 1984). However, in recent years the interest for these resources has grown as well as the knowledge of their biology. The studies of their biology are limited to a few species and they have focused in the physiological and nutritional aspects. The main objective of this work was to describe the histology of female and male reproductive system and to define a gonad maturity stages classification of *Octopus bimaculoides* and *Octopus rubescens*.

A total of 79 organisms were analyzed, 65 *O. rubescens* (35 males and 30 females) and 14 *O. bimaculoides* (10 males and 4 females). The organisms were sacrificed with an overdose of 2-fenoxietanol anesthetic ($0.3 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$), the complete reproductive system was dissected and fixed in Davidson solution. Tissue samples were included in paraffin; sections of $4\mu\text{m}$ of thickness were dyed with Hematoxylin-Eosin or trichromic Arteta. The samples were analyzed in a compound microscope (Leica, DMRXA2 and Olympus CKX41) and prepared a collection of images (3.3 mega pixels of resolution) of the different reproductive organs. The structure of the female and male reproductive system in both species was described in a general way, as well as the organs comprising it. Finally, a gonad maturity scale was established for *O. rubescens*. In females, eight stages were defined. 1. Inmature, the oogonias immersed in the ovarian stroma are abundant; 2. Initial Folliculogenesis, the oocytes with primary follicle are abundant; 3. Final Folliculogenesis, oocytes have a secondary follicular envelope; 4. Previtellogenesis, oocytes with secondary follicle and deep invaginations; 5. Initial Vitellogenesis, cytoplasm with granular appearance due to secretion of follicle yolk; 6. Final Vitellogenesis, oocytes with homogeneous cytoplasm; 7. Mature, ova with extensions in the chorion and 8. Spawned, atretic oocytes predominate and postovulatory follicles. In *O. bimaculoides* females only Inmature, Final Folliculogenesis and Final Vitellogenesis stages were described. Gonad maturity in *O. rubescens* males were classified in five stages: 1. Inmature, with abundant spermatogonia; 2. Maturing A, all cells types are present, without sperm outside the testis; 3. Maturing B, sperms in ducts and glands; 4. Mature type 1, sperms within and outside of the testis and 5. Mature type 2, few sperms in the testis and there are abundant spermatophores in Needham's sac. In *O. bimaculoides* species, only Inmature, Maturing B and Mature type 2 stages were found.

Keywords: Octopus, maturity, folliculogenesis, spermatophores

Dedicatorias

A Dios por permitirme llegar hasta este momento y darme una vida maravillosa.

A mis padres, María Yaela Peraza Valdez y Federico López Tirado

Gracias por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado. Perdón madre por los días de angustia que te hice pasar al alejarme de tu lado, pero sabes muy bien que fue por mi bien y espero me sigas comprendiendo y apoyando. Los amo con todo el corazón.

A mis hermanos

María Elizabeth y Mateo

A mis sobrinos

Federico y Oyuki

A mis abuelos

Simona, Mateo, Teodora y a Pedro que en paz descanse.

A amiga Mirtha

Por tantos años de amistad. Por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesito. Te quiero loca.

A Daniel

Por tantos tiempo que compartimos. Por ser mi pilar mas fuerte, por tu apoyo incondicional y sobre todo por compartir Nuestros sueños.

Agradecimientos

A CICESE por permitirme usar las instalaciones y realizar mi trabajo de tesis.

A CONACYT por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al apoyo económico brindado por el proyecto interno: Indicadores biológicos de estrés en organismos acuáticos y su importancia en la acuicultura no. 623151.

A mis directores de tesis, la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dr. Benjamin Barón Sevilla por sus valiosas recomendaciones, por su tiempo invertido en este trabajo, y sobre todo por su confianza. Mil gracias.

A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez y el Dr. Juan Carlos Herguera García, por sus acertadas observaciones y sugerencias a lo largo de mi trabajo de tesis.

A los buzos Eugenio Díaz, Rogelio Robles y Doman Yee de la empresa Aqualap, S.A. por la extracción de los pulpos.

Al Dr. Jorge Cáceres responsable del laboratorio de Patología de CICESE, por las facilidades brindadas.

A los técnicos Francisco Valenzuela, Carlos Leñer, Lourdes Trujillo, Luis Murillo y Norberto Flores, por la ayuda brindada en la manutención de los pulpos.

A Francisco Ponce y José Olachea por el apoyo en la realización del esquema del aparato reproductor masculino de los pulpos.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería por el entrenamiento y la ayuda brindada para la elaboración de las muestras histológicas.

A las secretarias, Varuni, Cristina, Bibiana, Cecilia y Adriana por su amable orientación en los asuntos administrativos y escolares.

Al laboratorio de Ecología Pesquera, por permitirme hacer uso de sus instalaciones, en especial a la Dra. Sharon Zinah Herzka Llona y a la M. en C. María Del Carmen Bazán, por las asesorías brindadas en el manejo del programa de captura de imágenes.

A todos los investigadores con los que tuve el honor de tomar clases.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme estar en el Programa de Doctores Jóvenes en Áreas Estratégicas.

Al profe Nieves como le digo yo, gracias por su apoyo y amistad incondicional. Por la confianza depositada en mi persona, por ayudarme a tomar una de las decisiones más importantes en mi vida y jalarme las orejas cuando es necesario.

A mis verdaderos compañeros y amigos, Socorro Jiménez, Bily Aguilar, Getsemany Juárez, Marisol Simon, Fernando García, Ana Bastos, Mildred Herrera, Sergio Castillo, Marcel Martínez que hicieron que valiera la pena mi estancia en Ensenada. Gracias por su amistad, apoyo incondicional y por todos los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

A los Thudercats, a las Finísimas y a los Hijos del maíz, el primer lugar en el primer torneo playero!. En estos equipos conocí a muchas personas valiosas e hice grandes amigos.

A todas las personas que de alguna manera ayudaron en la realización de este proyecto, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xvi
I. Introducción	1
I.1 Clasificación taxonómica del genero <i>Octopus</i>	1
I.2 Características generales de los pulpos	1
I. 3. Pesquerías	5
II. Antecedentes	9
III. Objetivos	17
III.1 Objetivo general	
III.2 Objetivos específicos	
IV. Materiales y métodos	18
V. Resultados	27
V.1 Descripción del aparato reproductor en las hembras de <i>Octopus rubescens</i> y <i>Octopus bimaculoides</i>	28
V.1. 1. Descripción macroscópica	28
V.1. 2. Descripción histológica	29
V.2 Escala de madurez para las hembras de <i>Octopus rubescens</i>	32
V.3 Escala de madurez para las hembras de <i>Octopus bimaculoides</i> .	40
V.4 Descripción del aparato reproductor de los machos de <i>Octopus rubescens</i> y <i>Octopus bimaculoides</i> .	43
V.4.1 Descripción macroscópica	43
V.4.2 Descripción histológica	45
V.5 Escala de madurez para los machos de <i>Octopus rubescens</i>	51
V.6 Escala de madurez para los machos de <i>Octopus bimaculoides</i>	56
VI. Discusión	60
VII. Conclusiones	68
VIII. Recomendaciones	70

CONTENIDO (continuación)

	Página
IX. Literatura citada.....	72

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Vista Frontal (A) y lateral (B), del órgano copulador de los pulpos incirrinos; L: Ligula, RC: Ranura Copulatoria, C; Calamus y RE: Ranura espermatorfórica (Hochberg <i>et al.</i> , 2006)	4
2	Localización geográfica de la Bahía de Todos Santos.	18
3	Medidas recomendadas por la FAO (2001) para los pulpos.	19
4	Aparto reproductor en la cavidad del manto: A; Macho y B; Hembra (Tomado de Boyle, 1991).	21
5	Sistema reproductor masculino (♂) y femenino (♀) de <i>Octopus rubescens</i> y <i>Octopus bimaculoides</i> , respectivamente. AG, ancho de la gónada	22
6	Esquema general del aparato reproductor del pulpo: A; macho y B; hembras (Tomado de Boyle, 1991).	23
7	Frecuencia de los pesos de los ejemplares de <i>Octopus rubescens</i> que fueron disecados;  , Machos y  , Hembras.	27
8	Frecuencia de los pesos de los ejemplares de <i>Octopus bimaculoides</i> que fueron disecados;  , Machos y  , Hembras.	28
9	Aparato reproductor femenino de <i>Octopus bimaculoides</i> : A, ovario; B, oviducto común; C, oviducto proximal; D, glándula oviductal; E, oviducto proximal y F, abertura final del oviducto distal.	29
10	Corte transversal de la sección del ovario de una hembra de <i>Octopus bimaculoides</i> ; TC: tejido conectivo y Oc: ovocitos. Aumento de 40x. Tinción tricrómica de Arteta.	30

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
11	Oviducto distal de <i>Octopus rubescens</i> , A, corte longitudinal de la pared del oviducto, 400x. B, corte longitudinal del epitelio ciliado del oviducto. Aumento de 400x. N, núcleo; FM, fibras musculares; CC, células ciliadas; L, lumen del oviducto. Tinción tricrómica de Arteta.	31
12	Figura 12. Glándula oviductal de <i>Octopus rubescens</i> . A, Corte transversal de glándula oviductal, 100x. B, Corte longitudinal del tejido glandular periférico 400x. C, Corte transversal de la glándula, se aprecia la cavidad central tapizada por un epitelio ciliado, 400x. D, corte longitudinal de una espermateca, 400x. CC, células ciliadas; L, cavidad central; TC, tejido conectivo; EV, espacios vacíos producidos por el proceso histológico; Esc, epitelio cilíndrico ciliado; Ez, espermatozoides; Espt, espermatecas; US, unidad secretora. Tinción tricrómica de Arteta.	32
13	Corte transversal de la sección de ovario inmaduro de <i>Octopus rubescens</i> . A, sección del ovario con ovocitos inmaduros y ovogonias en el estroma ovárico, con aumento de 40x. B, Ovocitos en desarrollo, con aumento de 400x. Og; ovogonias. Oc, ovocitos, E; estroma ovárico y N, núcleo. Tinción tricrómica de Arteta.	33
14	Ovario de una hembra de <i>O. rubescens</i> en estadio de foliculogénesis inicial. A, sección del ovario con numerosos ovocitos y estroma ovárico, 100x. B, ovocitos con cubierta folicular de dos células de espesor, 400x. E, estroma ovárico; N, núcleo; n, nucléolo; FS, folículo secundario. Tinción tricrómica de Arteta.	34

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
15	Ovario de una hembra de <i>Octopus rubescens</i> en el estadio de foliculogénesis final. A, sección del ovario con numerosos ovocitos con invaginaciones, en el estroma ovárico no se observan ovogonias ni ovocitos, 100x y B, ovocitos con una sola capa de células foliculares o folículo primario 400x. Oc, Ovocito; N, núcleo; FP, folículo primario; n, nucléolo; FS, folículo secundario; Invg, invaginaciones del folículo secundario. Tinción tricrómica de Arteta.	35
16	Ovario de una hembra de <i>Octopus rubescens</i> en estadio de previtelogénesis. A, Sección del ovario con ovocitos de forma y tamaño muy variable, se observan las invaginaciones de la membrana del ovocito, aumento de 40x. B, detalle de las invaginaciones de la membrana del ovocito, se aprecian las inclusiones lipídicas en el citoplasma, 100x. IL, inclusiones lipídicas; Invg, invaginaciones de la membrana del ovocito; Oc, ovocitos; FI, foliculogénesis inicial. Tinción Hematoxilina-Eosina.	36
17	Sección del ovario de una hembra de <i>Octopus rubescens</i> en estadio de vitelogénesis. A: Ovocito con invaginaciones profundas en su folículo, aumento de 100x. B. Ampliación de la sección de un ovocito, donde se muestra la zona radiata, la cual dará origen al corion del óvulo, aumento de 400x. Vt : Vitelo, Invg: invaginaciones del folículo ovárico, Zr: zona radiata. Tinción tricrómica de Arteta.	37
18	Sección del ovario de <i>Octopus rubescens</i> en estadio de vitelogénesis final, aumento de 100x. CL, ovocitos con citoplasma liso; Invg, invaginaciones estrechas. Tinción tricrómica de Arteta.	38
19	Sección del ovario de <i>Octopus rubescens</i> en estadio maduro. A, óvulos, se aprecian las proyecciones del corion, aumento de 40x. B, Corion de dos óvulos, 400x. Ov, óvulos; PCo proyecciones del corion; Co, corion. Tinción tricrómica de Arteta.	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
20	Sección del ovario de <i>Octopus rubescens</i> en estadio desovada. OcR, ovocitos en reabsorción; FP, folículos postovulatorios, 40x. Tinción tricrómica de Arteta.	40
21	Sección del ovario de una hembra inmadura de <i>Octopus bimaculoides</i> : A; ovogonias inmersas en el estroma ovárico y ovocitos en desarrollo, 40x. B, ovocitos unidos al estroma ovárico, 400x. Og, ovogonias; Oc, ovocito; E, estroma ovárico y N: núcleo. Tinción tricrómica de Arteta.	41
22	Sección del ovario de una hembra en foliculogénesis final de <i>Octopus bimaculoides</i> : A; numerosos ovocitos con invaginaciones, 40x y B, ovocitos con folículo secundario pseudoestratificado . FP: Folículo primario, FS: folículo secundario e Invg: invaginaciones. Tinción tricrómica de Arteta.	42
23	Sección del ovocito de una hembra de <i>Octopus bimaculoides</i> . A, corte transversal, conserva el folículo y sus invaginaciones, 40x. B, Ampliación de una sección del ovocito que muestra la zona radiata que dará origen al corion, 200x. Oc, ovocito; Invg, invaginaciones del folículo; Vt, gránulos de vitelo; Zr, zona radita. Tinción tricrómica Hematoxilina-Eosina.	43
24	Esquema general de los órganos que integran el sistema reproductor masculino de los pulpos: A, testículo; B, ducto espermático; C, porción proximal de la glándula espermatorfórica; D, porción distal de la glándula espermatorfórica; E, glándula accesoria espermática; F, saco de Needham y G, ducto excurrente.	45
25	Corte transversal del testículo del pulpo <i>Octopus rubescens</i> , se observan numerosos túbulos seminíferos (TS), donde se lleva a cabo la espermatogénesis, 100x. Tinción tricrómica de Arteta.	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
26	Corte transversal de los ductos espermáticos de <i>Octopus rubescens</i> ESCuC, Epitelio simple de células cúbicas ciliadas; TC, tejido conectivo; Ez, espermatozoides, 200x. Tinción tricrómica de Arteta.	47
27	Glándula espermatorfórica de <i>Octopus rubescens</i> . A, sección de la región distal, 400x. B, región intermedia constituida por unidades secretoras, 400x. ES, Epitelio simple de células cilíndricas, con extremos globosos, G; C, cilios, L, lumen (L); US, unidades secretoras; CCC, células cilíndricas ciliadas con núcleos basales, lumen. Tinción Hematoxilina-Eosina.	48
28	Glándula accesoria espermática de un macho de <i>Octopus rubescens</i> . A; cubiertas del espermatóforo en el lumen de la glándula, 40x. B; espermatóforos en formación, 100x. Df, cubierta del espermatóforo en formación; D, cubierta del espermatóforo; L, lumen de la glándula; US, unidades secretoras; Ef, espermatóforos en formación. Tinción tricrómica de Arteta.	49
29	Saco de Needham de los machos de <i>Octopus rubescens</i> . A, sección del saco de un individuo sin espermatóforos almacenados, que muestra abundantes pliegues en el epitelio que lo constituye. 40x. B, espermatóforos almacenados en el saco, 40x. ESCC, epitelio simple cilíndrico ciliado; TC, tejido conectivo; Ef, espermatóforos almacenados. Tinción tricrómica de Arteta.	50
30	Espermatóforo fijado de un macho de <i>Octopus rubescens</i> : A; espermatóforo completo y B; hélice de espermatozoides estirada.	50

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
31	Ducto excurrente de un macho de <i>Octopus rubescens</i> . A, porción distal del ducto excurrente, 40x. Tinción tricrómica de Arteta. B, ampliación de una sección del ducto excurrente constituido por músculo liso, 400x. Tinción Hematoxilina-Eosina. FM, Fibras musculares; N, núcleos.	51
32	Corte longitudinal del testículo inmaduro de <i>Octopus Rubescens</i> . A, túbulos seminíferos con predominio de espermatogonias, limitados por tejido conectivo, 400x. B, túbulo seminífero con el lumen vacío y solo células germinales, 400x. TS, túbulos seminíferos; Eg, espermatogonias; TC, tejido conectivo y L, lumen. Tinción tricrómica de Arteta.	52
33	Corte longitudinal del testículo de <i>Octopus rubescens</i> . A, túbulos seminíferos con abundantes espermatozoides en el lumen, 100x. B, sección de un túbulo seminífero donde se muestran todos los tipos celulares, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermátidas y Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.	53
34	Corte longitudinal del aparato reproductor masculino de <i>Octopus rubescens</i> . A, sección del testículo con abundante producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos, 40x. B, sección del ducto espermático lleno de espermatozoides, 100x. Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta	54
35	Sección del corte longitudinal del aparato reproductor masculino de <i>Octopus rubescens</i> : A; sección de un túbulo seminífero con abundantes espermatozoides en el lumen, 400x. B; sección de un espermatóforo maduro almacenado en el saco de Needham, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermátidas; Ez, espermatozoides y Ef, espermatóforo. Tinción tricrómica de Arteta	55

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
36	Corte longitudinal del aparato reproductor masculino de <i>Octopus rubescens</i> : A; sección del testículo que muestra los túbulos seminíferos desorganizados, con un aspecto flácido, 100x. Tinción Hematoxilina-Eosina. B; sección del saco de Needham, con espermatóforos almacenados, 40x. Tinción tricrómica de Arteta	56
37	Corte longitudinal del testículo de un macho inmaduro de <i>Octopus bimaculoides</i> , 40x. TS, túbulo seminífero; Eg, espermatogonias. Tinción Hematoxilina-Eosina.	57
38	Corte longitudinal del testículo de un macho de <i>Octopus bimaculoides</i> , 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos, Ed, espermatidas; Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.	58
39	Corte longitudinal del testículo de un macho de <i>Octopus bimaculoides</i> . A, túbulos seminíferos con aspecto flácido, 40x. B, ampliación de un túbulo seminífero y sus componentes celulares, 400x Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermatidas; Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.	59

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Escalas propuestas por diferentes autores para tres especies del género <i>Eledone</i> : <i>E. moschata</i> , <i>E. cirrhosa</i> y <i>E. massaye</i> . Número de estadios y criterios.	15
II	Algunas características de las tres principales especies de pulpos que se distribuyen en la Bahía de Ensenada; <i>Octopus bimaculoides</i> , y <i>Octopus rubescens</i> .	20
III	Procedimiento para desparafinación de los tejidos	24
IV	Protocolo establecido en el laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, para la tinción Hematoxilina- Eosina de Harris.	25
V	Procedimiento para la tinción tricrómica de Arteta.	25

I. Introducción

Los cefalópodos son invertebrados marinos pertenecientes al Phylum Mollusca y a la Clase Cephalopoda, que agrupa a las especies de pulpos, calamares, sepias y nautilus. A diferencia de otros moluscos, en los cefalópodos la concha externa de calcio se ha reducido a una interna (calamares y sepias), e incluso, algunas especies como los pulpos, la han perdido por completo. La excepción a este proceso de reducción de la concha es en la Subclase Nautiloidea, que tienen una concha externa bien definida (Vaez *et al.*, 2004). También presentan ojos bien desarrollados. Estos organismos son depredadores muy activos y voraces, que se alimentan de presas vivas.

I.1 Clasificación taxonómica del genero *Octopus*

Reino	Animalia
Phylum	Mollusca
Clase	Cephalopoda
Subclase	Coleoidea
Superorden	Octobranchia
Orden	Octopoda
Suborden	Incirrina
Familia	Octopodidae
Subfamilia	Octoponidae
Género	Octopus

I.2 Características generales de los pulpos

Los pulpos son organismos de vida corta, que varía de 6 a 38 meses dependiendo de la especie. Crecen en forma acelerada, principalmente en las

primeras etapas de su vida. En condiciones de cultivo controladas (calidad del agua y alimentación adecuada), pueden alcanzar grandes tallas (Boyle y Rodhouse, 2005).

Hábitat

Los pulpos que habitan en las zonas costeras (Familia Octopodidae, Suborden Incirrina) tienen una amplia distribución latitudinal, son epibentónicos, ya que pueden encontrarse cerca o viviendo en el fondo, comúnmente en lugares rocosos que utilizan como refugios y donde hay gran cantidad de organismos que les sirven de alimento. Algunos viven en fondos arenosos o lodosos, donde se les encuentra enterrados y otros son pelágicos de aguas profundas. De los pulpos que habitan a grandes profundidades (Suborden Cirrina) es poco lo que se conoce (Boyle y Rodhouse, 2005).

Reproducción

La maduración sexual de los pulpos esta controlada mediante hormonas secretadas por las glándulas ópticas, localizadas sobre el tracto óptico, con una innervación desde el área basal del subpedúnculo dorsal al cerebro (Boyle y Thorpe, 1984 y Boyle y Rodhouse, 2005).

Las hembras poseen un solo ovario, para la producción de sus ovocitos. En el caso de los pulpos incirrininos se presentan dos oviductos conectados al ovario, mientras que en los cirrininos, solo se presenta uno (Wilbur *et al.*, 1984). En el proceso de desove, los ovocitos pasan a través de la sección alargada del oviducto proximal, luego a la glándula oviductal, donde serán fertilizados por los espermatozoides presentes en las espermatecas (Boyle y Rodhouse, 2005). Una vez que los ovocitos hayan sido fertilizados, la parte de la periferia de la glándula secretará una mucoproteína para la fijación de los huevos al sustrato. La parte central de la glándula produce un mucopolisacárido, que polimeriza a la mucoproteína, para la formación de las cubiertas finales del huevo que le servirán para su protección (Wells, 1960; Froesch y Marthy, 1975) Finalmente, los huevos

son expulsados por la abertura en la parte final del oviducto distal (Boyle y Rodhouse, 2005).

Los machos, poseen un solo testículo constituido por una gran cantidad de túbulos seminíferos en su interior, en los cuales, se lleva a cabo el proceso de espermatogénesis. Los espermatozoides maduros se encuentran en el centro del lumen de los túbulos seminíferos y son vertidos a la porción proximal de los vasos deferentes (o ducto espermático), los cuales se comunican a la glándula espermatoforica y esta a su vez con la glándula accesoria espermática, en la cual termina el proceso de la formación de los espermátóforos para ser almacenados en el saco de Needham (Arkhipkin, 1992 y Boyle y Rodhouse, 2005). Durante la copula, los espermátóforos son bombeados peristálticamente a lo largo de la porción distal de los vasos deferentes, hasta ser eyaculados por la apertura final del vaso deferente, llamado erróneamente “pene”, debido a que no funciona como un órgano intromitente (Boyle y Rodhouse, 2005).

Externamente, los pulpos son organismos que presentan dimorfismo sexual. Para llevar a cabo la fecundación, el macho extiende el tercer brazo derecho, el cual está hectocotilizado, lo inserta dentro de la cavidad de la hembra para depositar los espermátóforos (Hanlon, 1983 y Hochberg *et al.*, 2006)

El brazo donde se presenta el hectocótilo, es más corto que el brazo en posición opuesta (tercer brazo izquierdo), la punta carece de ventosas y termina formando un órgano final que consiste en la lígula y el calamus. Además la membrana a lo largo del brazo, esta modificada formando una ranura usada para la transmisión de los espermátóforos a la hembra (Figura 1). Ésta ranura espermátóforica, es formada por un pliego del músculo creando un tubo, que corre a lo largo del tercer brazo derecho desde la parte media de la membrana interbranquial, entre el tercer brazo derecho, hasta terminar en el calamus (Wodinsky, 2008). Cabe mencionar que, la forma y dimensión del brazo, en particular la de la ligula y el calamus, son una de las características que se utilizan para la identificación de las diversas especies.

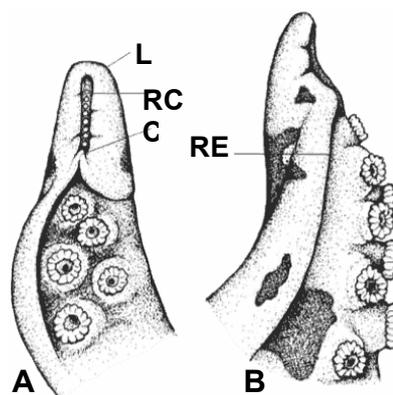


Figura 1. Vista Frontal (A) y lateral (B), del órgano copulador de los pulpos incirrinos; L: Ligula, RC: Ranura Copulatoria, C; Calamus y RE: Ranura espermatozóica (Hochberg *et al.*, 2006)

En los pulpos no se observa un comportamiento de cortejo y la copula dura de 30 a 45 min que ocasionalmente se repite (Lang y Hochberg, 1997).

La fecundidad promedio por hembra varía dependiendo de la talla y de su condición. Los huevos fertilizados pasan a través del sifón, acompañados de una sustancia gelatinosa, secretada por las glándulas oviductales y sirve para adherir los huevos al sustrato (Wilbur *et al.*, 1984). El sustrato puede ser cualquier objeto sólido y son depositados en grupos o en forma de cordones (Lang y Hochberg, 1997).

Durante el desarrollo de los huevos, la hembra, limpia con sus tentáculos armados de poderosas ventosas la superficie exterior de la envoltura de los huevos, conservándolos limpios de suciedad y vegetación. También usa el sifón de agua que le sirve para impulsarse, como una especie de manguera con la que lanza pequeños chorros entre las hileras de huevos para oxigenarlos y expulsar toda partícula minúscula de suciedad que pudiera contaminarlos. La hembra muere al poco tiempo después de que los huevos han eclosionado, debido principalmente a la falta de alimentación (Lang y Hochberg, 1997), mostrando una evidente degeneración muscular y pérdida de peso (Zamora-Covarrubias y Olivares-Paz, 2004, y Boyle y Rodhouse, 2005). Los huevos de algunas especies,

dan origen a pequeños juveniles con etapa bentónica, sin pasar por la etapa larvaria.

Alimentación y digestión

La alimentación de los pulpos comprende una variedad de especies vivas entre las cuales se encuentran, crustáceos, moluscos, gusanos y peces. En cautiverio aceptan cualquier tipo de alimento, ya sea vivo, fresco o congelado. La localización de las presas es visual (Wells, 1978), pero probablemente también estén involucradas señales químicas (Boyle, 1986; Chase y Wells, 1986). La boca esta armada de un potente pico córneo constituido por dos poderosas mandíbulas, entre las cuales se encuentra una rádula o placa con series de dientes, con los que trituran el alimento (Cifuentes *et al.*, 1995).

Los pulpos para ingerir a sus presas, utilizan la rádula y sus ventosas, al mismo tiempo, para inmovilizar a la presa, secretan saliva que contiene componentes bioactivos como proteasas digestivas y quitinasas (Grisley y Boyle, 1990; Grisley, 1993; Fiorito y Gherardi 1999). Después de ingerir a sus presas (crustáceos y moluscos), mediante movimientos delicados, rompe y remueve el exoesqueleto o concha (Wodinsky, 1969; Arnold y Arnold, 1969; Altman y Nixon, 1970). Parte de la digestión del alimento se lleva a cabo dentro del lumen del intestino, pero la mayor actividad digestiva y la absorción de nutrientes ocurren en la glándula digestiva (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987). Además, según Bustamante *et al.* (1998, 2000), este órgano juega un papel importante en la detoxificación de los metales pesados acumulados.

I. 3. Pesquerías

Algunas especies de cefalópodos constituyen un recurso económico importante para muchos países. Sin embargo, a nivel mundial, la pesquería se debe principalmente a la pesca artesanal que se realiza a lo largo de las costas, de la cual no se tiene un conocimiento preciso ni control adecuado (Boyle y Rodhouse, 2005).

Son pocas las especies de cefalópodos que se comercializan a gran escala (Kreuzer, 1984) y se estima que alrededor de 3.6 millones de toneladas son capturadas anualmente, de las cuales, el mayor porcentaje (aproximadamente el 75%) esta representado por los calamares, seguido de las sepias y pulpos (FAO, 2006).

Los principales comerciantes y consumidores de cefalópodos son los países del sur oriente de Asia como Japón, Corea, Tailandia, Taiwán y China quienes además han desarrollado métodos y técnicas especializadas para la pesquería de este recurso. También los países Europeos como Portugal, España, Italia y Grecia, consumen una gran cantidad de cefalópodos en sus dietas. En cambio en el norte de Europa, América y África, el consumo es bajo, comparado con los países antes mencionados (Boyle y Rodhouse, 2005).

En México, según la Carta Nacional Pesquera (CNP), la pesquería del pulpo ocupa el tercer lugar a nivel nacional por su alto valor comercial, superada solo por el camarón y el atún (CNP, 2000, 2006). Esta pesquería se encuentra establecida fundamentalmente en las costas del Golfo de México y Mar Caribe, con las especies de *Octopus vulgaris* y *Octopus maya* (SEMARNAP, 1999), esta última endémica de la Península de Yucatán. El 98% de la producción nacional proviene de los estados de Yucatán y Campeche (CNP 2000, 2006).

En el Océano Pacífico se captura *O. macrocopus*, *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum* (SEMARNAP, 1999), mediante el uso de embarcaciones menores, donde el principal arte de pesca utilizado es el gancho (CNP 2000, 2006). La pesquería en esta zona no ha podido desarrollarse plenamente debido a que no existen estudios biológicos ni de tecnología de captura e industrialización (Alejo-Plata *et al.*, 2002). La comercialización de este producto se ha visto afectada debido a que no puede competir con el pulpo capturado en el golfo, ya que este presenta una mayor talla y un menor precio, además de que se captura en mayores volúmenes (López, 2000).

Históricamente, los registros de capturas de pulpo en México datan a partir del año 1949, con un registro total de 50 t de la especie *Octopus maya*, en aguas

de la Península de Yucatán, siendo el Puerto de Campeche el único centro productor. La pesquería de este recurso era modulada principalmente por la demanda de la población, lo que ocasionaba que los precios fueran muy fluctuantes. Sin embargo, en el año de 1965 la empresa estatal Puerto Piloto Pesquero de Alvarado, Veracruz, inició su participación como comprador en el estado de Campeche, estabilizó el precio de playa y estimuló la explotación, adquiriendo un 30 y 39% de las 1,321 y 1,173 t capturadas en los años 1965 y 1966, respectivamente (Solís-Ramírez, 1985).

En 1970, en el estado de Campeche disminuyeron las capturas por lo que los pescadores de esa entidad incursionaron en aguas de Celestún, Yucatán en busca de la especie, marcándose prácticamente en ese año, el establecimiento de la pesca de pulpo a escala comercial en el estado de Yucatán (Solís, Ramírez, 1985).

Inicialmente la mayor parte de los pulpos capturados, se consumía en el país, a través de centros de distribución localizados en las ciudades de México, Puebla, Guadalajara, Ensenada, entre otras. Sin embargo, durante el periodo 1975-1980 las exportaciones de este recurso a los Estados Unidos de Norteamérica se incrementaron a razón del 130% anual, con un volumen total de 580 t en 1980 (Solís-Ramírez, 1985). Las embarcaciones que se utilizaban eran de flota costera o artesanal, pero a partir de 1982, las embarcaciones de flota mayor dedicadas tradicionalmente a la captura de mero y huachinango en Yucatán, se suman a la pesca de *O. maya* e incorporan una segunda especie, *O. vulgaris*. La captura de *O. maya* se realiza de agosto a noviembre a lo largo de las costas de Campeche y Yucatán, a bordo de embarcaciones menores (de 5.5 a 9 m de eslora), a profundidades entre las 0 y 15 brazas, mientras que *O. vulgaris* predomina en un 60% de noviembre a diciembre en la captura de la flota mayor (de 12 a 22 m de eslora) del estado de Yucatán, entre las 10 y 30 brazas de profundidad (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997).

En 1996 se produjo una captura record superior a las 20 000 t (28 829 t, según el Anuario Estadístico de Pesca, AEP 2003), debido a la gran demanda de

este producto por parte del mercado internacional, particularmente de Japón, Corea, España e Italia. Gracias a las ganancias obtenidas por la venta de este producto, los industriales pesqueros de la entidad contaron con los recursos económicos necesarios para cumplir con la regulación de higiene en el procesamiento de los productos pesqueros, compromiso nacional dentro del marco del Tratado de Libre Comercio, para la modernización de las plantas congeladoras, el incremento de alijos, embarcaciones menores y equipo para conservar el producto abordo (Cifuentes *et al.*, 1997).

En el Anuario Estadístico de Pesca (2003), se reporta que la producción total en peso vivo de la pesquería de pulpos en México fue de 16 757 t, de las cuales 15 713 t fueron extraídas en el Golfo y Caribe, siendo el mayor productor el estado de Yucatán (10 892 t). En el Pacífico la producción fue considerablemente menor, de 1 044 t, de las cuales, la mayor producción (292 t) fue aportada por el estado de Baja California.

Datos recientes indican que la pesquería del pulpo en Yucatán en el 2007, tuvo un decremento dramático en relación a los años anteriores, el estado solo aportó 206 t, de un total de 26 208 t capturadas en el litoral del Golfo y Caribe, siendo el estado de Veracruz el mayor centro de producción de este recurso (19 147 t). Sin embargo, la producción pesquera en el Pacífico se mantuvo estable, con una producción total de 945 t (AEP, 2007).

II. Antecedentes

La atención a la problemática de estos recursos es reciente, se han obtenido avances en el conocimiento de su biología y se conocen alrededor de 650 especies de cefalópodos (Boyle y Rodhouse, 2005), de las cuales el género *Octopus* esta representado por 200 especies aproximadamente (Vaez *et al.*, 2004).

El interés hacia el estudio de los pulpos se ha venido incrementando intensamente en los últimos años, sin embargo, los trabajos realizados se han enfocado a aspectos de nutrición y fisiología, principalmente. En relación al estudio de la biología reproductiva de estos organismos solamente unas cuantas especies, han sido objeto de estudio y es necesario ahondar en este tema para poder reproducirlos en cautiverio con éxito.

La especie *O. vulgaris*, es sin duda, la más estudiada en diversos aspectos, debido, principalmente a su amplia distribución en aguas tropicales, subtropicales y templadas del Mediterráneo, Atlántico y de los Océanos Pacífico e Índico (Lang y Hochberg, 1997). De los estudios realizados sobre la biología reproductiva de esta especie, destacan los efectuados por Wells (1960) quien señaló que la fecundación de los huevos de esta especie se lleva a cabo en las glándulas oviductales, a medida que los ovocitos pasan a través de estas glándulas. También señala que la glándula óptica es la responsable de la maduración de los pulpos mediante la secreción de hormonas que estimulan este proceso. O'Dor y Wells (1973), comprobaron mediante la inyección de un aminoácido marcado [^{14}C Leucina] en el hígado, sangre y ovario de *O. vulgaris*, que el ovario es el sitio de mayor síntesis de vitelo. En particular en el folículo ovárico, debido a que cuando fueron aislados y colocados en medios sintéticos, observaron una mayor tasa de síntesis de proteínas. Froesch y Marthy (1975) determinaron que la fecundación de los óvulos en el género *Octopus* se lleva a cabo en las glándulas oviductales,

mediante la liberación de los espermatozoides, de las espermatecas a la cavidad de la glándula. Sin embargo en *Eledone*, las glándulas oviductales carecen de espermatecas, por lo que la fecundación de los óvulos es en el ovario. Día y Goutschine (1990) hicieron una breve descripción macroscópica del sistema reproductor de *O. vulgaris*, y propusieron una escala de 4 estadios en ambos sexos. Arkhipkin (1992) analizó el sistema reproductor de 50 organismos pertenecientes a 14 especies, incluidas sepias, calamares, nautilus y pulpos (representados solo por *O. vulgaris*), y realizó una escala de madurez general para los cefalópodos con base en la observación microscópica del sistema reproductor, diferenciación y crecimiento de las gónadas y accesorios glandulares. Esta escala consta de VII estadios, divididos en tres fases; estadio 0 o periodo juvenil, con dos subestadios (estadio 0-1: pre-diferenciación y estadio 0-2: post-diferenciación), fase de madurez fisiológica con los estadios del I al IV, y la fase de maduración funcional y madurez, del estadio V al VII.

Khallahi (2001) describió histológicamente la estructura y desarrollo del ovario de *O. vulgaris*, el autor estableció tres fases de madurez y cinco etapas; fase 1 previtelogénesis con dos etapas, fase 2 vitelogénesis con dos etapas y post desove con una sola etapa. También describió la estructura del testículo en los machos maduros. Khallahi e Inejih (2002) propusieron una escala de madurez de 6 estadios para las hembras de esta especie, basada en las características macroscópicas del sistema reproductor y en la escala propuesta por Dia y Goutschine (1990). Además elaboraron una escala microscópica del ovario y establecieron 6 estadios, con base en la escala propuesta por Khallahi (2001), con el fin de correlacionar ambas escalas en cada uno de los estadios.

Otero *et al.* (2004) encontraron que el 50% de las hembras de *O. vulgaris* madura por primera vez cuando tienen un peso de 1 858.6 g. Sin embargo, las hembras y machos maduros mas pequeños tuvieron un peso de 515 y 644.3 g, respectivamente. Estos autores utilizaron, para la asignación de los estadios de madurez, la escala de maduración propuesta por Inejih (2000) para la misma especie. Rodríguez-Rua *et al.* (2005), establecieron cuatro estadios de madurez

con base en las observaciones macroscópicas y microscópicas del sistema reproductor y a las escalas propuestas por Guerra (1987) y Borges *et al.* (2000) para la especie en cuestión y la de Gabr *et al.* (1998) para *Sepia pharaonis*. Además determinaron que la talla de primera madurez en los machos es cuando tiene un peso de 850 g, y en las hembras a los 1 250 g. Idrissi *et al.* (2006) estudiaron el ciclo sexual de esta especie y establecieron 4 estadios de madurez, con base en las características macroscópicas del aparato reproductor de los organismos. Además describieron microscópicamente la estructura y desarrollo de los componentes celulares del testículo y del ovario. Jiménez-Badillo *et al.* (2008) analizaron la madurez gonádica tanto macroscópica como microscópicamente en *O. vulgaris*. Establecieron una escala de madurez microscópica, con base a la escala propuesta por Quetglas *et al.* (1998) para esta misma especie y mediante el cálculo de diversos índices. Microscópicamente, describieron la estructura del ovario y del testículo, y establecieron 4 fases de desarrollo en ambos sexos, con base en las escalas propuestas por Olivares-Paz *et al.* (2003) para machos de *O. mimus* y por Rodríguez-Rúa *et al.* (2005) para hembras de *O. vulgaris*. Además encontraron que la talla de mínima madurez sexual fue de 248 g

O. vulgaris es la especie de pulpo más estudiada en el mundo, sin embargo, aun no se ha logrado cerrar exitosamente el ciclo de cultivo de esta especie, debido a las altas mortalidades larvarias que se presentan en las primeras semanas de vida, ocasionadas por la falta de tecnología de cultivo y alimento adecuado, principalmente. Por lo tanto, el cultivo a nivel comercial de ésta y el resto de las especies de pulpos, se ha limitado a la captura de juveniles en el medio natural, para su engorde y comercialización (Iglesias *et al.*, 2004, Iglesias y Sánchez, 2007).

Otra de las especies del género *Octopus*, sobre la que se han obtenido mayores avances en el conocimiento de su biología reproductiva es *O. mimus*, en la cual se observó que mantenida en condiciones de penumbra (20% de luz) se promueve la maduración (Zúñiga-Romero *et al.*, 1995). Ishiyama *et al.* (1999) encontraron que no todas las hembras de esta especie mueren después de cuidar

los huevos hasta el final de la eclosión, debido a que se observaron algunas hembras con ovocitos maduros en lisis y con ovogénesis avanzada en un nuevo ciclo. También definieron una escala de madurez gonadal de 8 estadios con base en las observaciones morfológicas e histológicas de las gónadas y el índice gonadosomático. Olivares-Paz *et al.* (2001) estudiaron la ovogénesis y establecieron una escala de maduración. Además Olivares-Paz *et al.* (2003) describieron las variaciones del funcionamiento testicular en organismos adultos. Zamora-Covarrubias y Olivares-Paz (2004), encontraron que después del desove, la hembra no tiene células germinales, y que la glándula digestiva y el músculo presentan atrofia.

Recientemente, en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se comenzó a trabajar con la especie *Octopus maya* para estudiar la posibilidad de criarla en cautiverio con fines de producción comercial (Morales, 2007), enfocándose en aspectos nutricionales y fisiológicos, principalmente. En el 2006, Rosas *et al.* elaboraron un manual preliminar para el cultivo de esta especie. Cázares-Simental (2006), estudió la fisiología y morfología del desarrollo embrionario de los primeros días de vida de *O. maya*, además encontró que el tipo de alimento influye en la cantidad de huevos desovados y que el mejor alimento es una combinación de jaiba-mejillón. Ávila-Poveda *et al.* (2009), realizaron el primer estudio del desarrollo gonadal en etapas tempranas para *O. maya*. Los autores establecieron cuatro estadios de madurez con base en las escalas propuestas para *O. vulgaris*, *Loligo gahi* y *O. maya* (Khallahi, 2001, Laptikhovsky y Arkhipkin, 2001, Santos-Valencia y Re-Regis, 2003, Rodríguez-Rua *et al.*, 2005, Idrissi *et al.*, 2006), además encontraron dos fases (gran producción de ovogonias y ovocitogénesis) y solamente el estadio inmaduro en hembras. En los machos, observaron que éstos maduran antes que las hembras (aproximadamente a los 8 g).

En cuanto a las especies de interés en el presente estudio, las investigaciones realizadas son nulas, en el caso de *O. rubescens*, y muy pocas para *O. bimaculoides*.

Price (1959) describió la organización general del sistema reproductor en *O. bimaculoides*, sin profundizar en la descripción histológica del ovario y el testículo, ni en su grado de desarrollo durante el proceso de maduración. En esta misma especie, Forsythe y Nalón (1988) encontraron que una temperatura de 23 °C acelera la maduración sexual y acorta la vida hasta un 20%.

Existen diversas especies del género *Octopus* que no se distribuyen en el país, de las cuales se ha obtenido información valiosa acerca de su biología reproductiva, tal es el caso de *Octopus maorum*, en la cual se estudio la madurez sexual (Grubert y Wadley, 2001). El estado de desarrollo de las hembras lo establecieron, con base en la escala de maduración propuesta por Lewis (1991) para *Idiosepius pygmaeus*. Los machos fueron clasificados en tres estadios, de acuerdo a las características microscópicas del sistema reproductor y al índice de madurez.

En *Octopus tehuelchus*, una especie de 20 cm de longitud máxima y un peso promedio de 60 g (FAO, 2002), Kalich *et al.* (2006) observaron que los organismos inmaduros (peso menor a 18 g, en machos y menos de 34 g en hembras) expuestos a 15 °C tuvieron una mayor tasa de crecimiento instantáneo y tasa de alimentación diaria que los expuestos a 10°C, mientras que los organismos maduros expuestos a 10 °C mostraron una mayor eficiencia en el crecimiento bruto, resultando el valor más alto (52%) registrado en la literatura. Además encontraron que el sexo, no influyó en la respuesta de ninguno de los tratamientos.

Leporati *et al.* (2008) mencionan que la maduración en el pulpo Australiano *Octopus pallidus* depende principalmente de la talla y no tanto de la edad. El estudio de la determinación de la madurez de los organismos, se basó en las escalas propuestas por Álvarez-Perez y Haimiovici (1991) y Smith *et al.* (2006).

Otro de los géneros de pulpos que más se han estudiado, en diferentes aspectos, es *Eledone*, en particular las especies *E. moschata* y *E. cirrhosa*. La talla de madurez promedio en *E. moschata* es de 11 y 9 cm de longitud del manto, en hembras y machos respectivamente (Ezzeddine-Najai, 1997). Silva *et al.* (2004)

encontraron que la maduración promedio ocurre cuando los organismos tienen una longitud del manto y peso total de 7.8 cm y 97 g en machos y de 12.2 cm y 274 g en hembras, respectivamente. Akyol *et al.* (2007) realizaron un estudio sobre la biología reproductiva y clasificaron la madurez de esta especie con base en la escala descrita por Arhipkin (1992) para cefalópodos.

En *Eledone cirrhosa*, se han descrito los cambios en la talla del ovario, las glándulas oviductales y los ovocitos (Boyle y Knobloch, 1983). En los machos, el aparato reproductor, fue descrito de manera general con una relación lineal del peso de la gónada con respecto al peso total del organismo (Boyle y Knobloch, 1984). Además, los organismos maduran a partir de los 200 g, sin embargo, animales de mayor peso tienden a almacenar más espermatozoides en cada espermátforo.

Selmi (1996) determinó que los espermatozoides de *Eledone cirrhosa* y *Eledone moschata* son muy similares estructuralmente, sin embargo, los espermatozoides de *E. moschata* son mas pequeños en longitud (280 μm) que los de *E. cirrhosa* (600 μm). Además la forma del acrosoma de los espermatozoides de estas especies, es similar a la de las especies del género *Octopus*.

Tabla I. Escalas propuestas por diferentes autores para tres especies del genero *Eledone*: *E. moschata*, *E. cirrhosa* y *E. massaye*. Número de estadios y criterios.

Referencia	Escala	Criterios
<i>Eledone moschata</i>		
Ezzdedine-Najai (1997)	4 estadios	<ul style="list-style-type: none"> - Características morfológicas de las gónadas - Tamaño de los ovocitos - Espermátóforos en el saco de Needham - Índice gonadosomático e Índice de madurez
<i>Eledone cirrhosa</i>		
Boyle y Knobloch (1983)	3 estadios	<ul style="list-style-type: none"> - Características microscópicas y microscópicas del ovario, las glándulas oviductales y los oviductos. - Tamaño de los ovocitos - Índice ovárico
Moriyasu (1988)	3 estadios	<ul style="list-style-type: none"> - Características morfológicas del ovario y el testículo - Diversos índices - Huevos en el ovario - Espermátóforos en el saco de Needham - Espermatecas en las glándulas oviductales
<i>Eledone massaye</i>		
Álvarez-Perez y Haimovici (1991)	4 estadios	<ul style="list-style-type: none"> - Grosor de la pared del ovario - Posición y color de las glándulas oviductales - Diámetro promedio de los ovocitos - Aspecto y talla del testículo y del sistema reproductor - Espermatozoides en los vasos deferentes proximales - Índice gonadosomático e Índice de madurez

Respecto a los pulpos incirrinos que habitan en aguas profundas, Barratt *et al.* (2007) estudiaron la fecundidad y la estrategia reproductiva de 9 especies de pulpos incirrinos: tres especies pertenecientes al género *Benthoctopus*, cinco al *Bathypolypus* y una a *Granelodene*. El grado de madurez para los individuos se estableció con base en las características macroscópicas y métricas de la gónada y la glándula oviductal, así como al tamaño de los huevos, considerando como hembras maduras aquellas cuyos huevos median más de 1 mm de longitud.

Los pulpos tienen un alto potencial económico y de cultivo, debido a que son organismos de vida corta y por consiguiente presentan altas tasas de crecimiento (Iglesias y Sánchez, 2007). Además, son una fuente importante de alimento para consumo humano directo por sus altos niveles de proteína (75 a 85% en peso seco), aproximadamente 20 % mas en comparación a los peces (Lee, 1994).

Los pulpos son un recurso de gran importancia y su constante sobre-explotación en el medio natural, representa una seria amenaza ya que podría provocar la disminución de la población, debido a que no se tiene un control estricto sobre la extracción de estos organismos semelparos. Además, de que el conocimiento existente de su biología es insuficiente e incluso nulo en algunas especies, por lo que se considera de fundamental importancia realizar estudios de los aspectos biológicos básicos que permitan manejar adecuadamente el recurso y emprender la búsqueda de nuevas alternativas de producción con la finalidad de satisfacer la gran demanda de la población. Por estos motivos, en el norte del país se pretende incursionar en el cultivo de los pulpos que se distribuyen en la región, bajo condiciones de laboratorio, por lo que es necesario estudiar los aspectos de la biología básica de los organismos, que permitan conocer como responden al cautiverio.

En este trabajo se realizó una descripción del sistema reproductor, así como de los diferentes estadios de madurez que se presentan en los pulpos *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*, con la finalidad de sentar las bases para posteriores investigaciones y cultivos experimentales.

III. OBJETIVOS

III.1 *Objetivo general*

Describir mediante técnicas histológicas los diferentes estadios de madurez gonadal en *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.

III.2 *Objetivos específicos*

- Describir la anatomía general del sistema reproductor de *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.
- Describir las características histológicas de los diferentes órganos que integran el sistema reproductor de los machos y las hembras de *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.
- Describir los diferentes estadios de madurez de las gónadas de *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.
- Elaborar una escala de madurez gonadal para *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*.

IV. Materiales y métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C.

Los ejemplares de *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens* fueron colectados por los trabajadores de la empresa Aqualab S.A., dentro del área de cultivo de mejillones, en la Bahía de Todos Santos, B. C., localizada entre los paralelos 31° 45' - 31° 59' N y los meridianos 116° 36' - 116° 45' O (Figura 1), dentro del Municipio de Ensenada, B.C. a 110 km de la frontera de México y Estados Unidos (Secretaría de Marina, 1974).

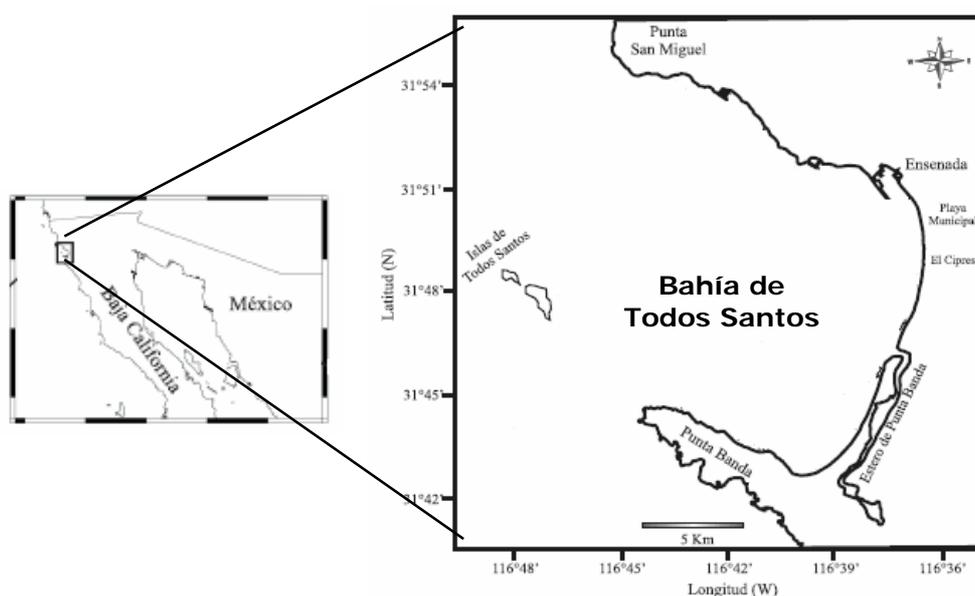


Figura 2. Localización geográfica de la Bahía de Todos Santos (Modificado de Sánchez *et al.* 2009).

En el laboratorio se identificaron las especies con base en las características señaladas en la tabla II. De las cuales 65 fueron *Octopus rubescens* y solamente 14 *Octopus bimaculoides*. Posteriormente los organismos fueron pesados en una

balanza granataría OHAUS (Modelo Adventurer Pro AV2101) con una precisión de 0.1 g y un peso máximo de 2100 g. La medida de los organismos se realizó con base en los criterios de la FAO (2001) (Figura 3), para lo cual se utilizó un ictiometro (AQUATIC, ECO-SYSTEM) de 60 cm. Inmediatamente después los pulpos fueron agrupados en clases de tallas, de acuerdo a su peso corporal, de un intervalo de 3.3 a 54.2 g, en *O. rubescens*, y de 6.1 a 86.6 g en *O. bimaculoides*.

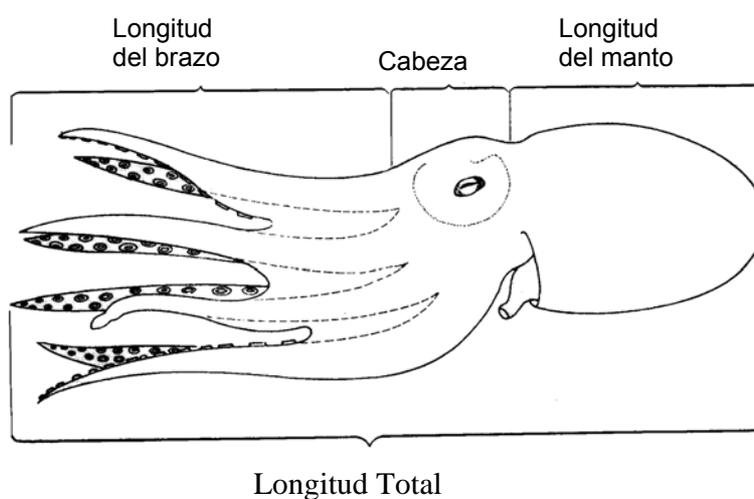


Figura 3. Medidas recomendadas por la FAO (2001) para los pulpos.

Con la finalidad de realizar un muestro de prospección, se seleccionó una muestra representativa de cada clase.

Tabla II. Algunas características de las dos principales especies de pulpos que se distribuyen en la Bahía de Ensenada; *O. bimaculoides* y *O. rubescens*.

<i>O. bimaculoides</i>	<i>O. rubescens</i>
<p>Talla mediana</p> <p>Presenta un Ocelo en la base del tentáculo II y III, en el lado derecho e izquierdo.</p> <p>Los ocelos constan de un gran anillo exterior de cromatóforos oscuro, un anillo interior delgado de irodoforos azul, y un centro oscuro.</p> <p>El ocelo, a su vez esta rodeado por un anillo delgado pálido que sirve para delinear y resaltar la oscuridad del ocelo.</p> <p>El anillo azul iridiscente esta bien definido por un patrón de enlace-cadena.</p> <p>Se distribuye en California y México; Islas de California, en Bahía de los Ángeles, en la laguna de Agua Hedionda, Bahía Misión, Bahía San Quintín</p> <p>Desova durante todo el año (febrero y mayo).</p> <p>De 200 a 800 huevos (9 a 18 mm).</p>	<p>Color rojizo a café rojizo mezclado con manchas blancas</p> <p>Talla mediana; sólo la mitad del peso de <i>O. Californicus</i></p> <p>Los machos con una o dos ventosas alargadas sobre los brazos I-III en unión con la red y el brazo</p> <p>Un triangulo de manchas blancas en la parte frontal de la cabeza y de la red y dos manchas blancas en la región media dorsal del manto</p> <p>El brazo hectocotilizado es ligeramente más corto que el tercer brazo del lado izquierdo.</p> <p>Se distribuye desde la parte más baja del Golfo de California, México subiendo hasta el Golfo de Alaska</p> <p>Habita a 300m de profundidad</p> <p>Los huevos mide de 3 - 4 mm de longitud</p> <p>Presenta etapa platónica</p> <p>Las branquias tienen de 11 a 13 lamelas</p> <p>Tina café rojiza</p> <p>Presenta papilas conspicuas</p> <p>Etapla planctónica</p> <p>Pone de 20,000 a 50,000 huevos</p>

Los organismos fueron sacrificados con una sobredosis del anestésico 2-fenoxietanol ($0.3 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$), posteriormente se quito el manto para dejar expuesto el aparato reproductor, las gónadas fueron localizadas en la porción posterior de la cavidad del manto y los ductos (oviductos en hembras y pene en machos) extendidos hacia la parte anterior (Figura 4). Una vez extraído los órganos, se midió el ancho de la gónada en las hembras y en los machos el ancho del aparato reproductor con un vernier digital electrónico marca Fowler & NSK, calibración máxima de 152.4 mm (Figura 5). Después se fijó en una solución de Davison (Shaw y Batle, 1957), en una relación muestra-fijador de 1:5, durante un periodo

de 24 h. Transcurrido el tiempo de fijación, se hizo un corte longitudinal del sistema reproductor, resultando dos secciones, las cuales se colocaron en un cartucho de plástico (Tissue-Tec Fisher), y se colocaron en una solución Davison conservante hasta que fueron procesadas histológicamente. En los organismos muy pequeños (peso menor a los 7 g), no se realizó ningún corte, se colocó el aparato reproductor completo en el cartucho de plástico. Posteriormente, se inició el proceso de deshidratación con un procesador de tejidos Histokinette (Leica modelo TP1040). Al término de este proceso, las muestras fueron incluidas en parafina, mediante un incluidor Leica modelo EG1160.

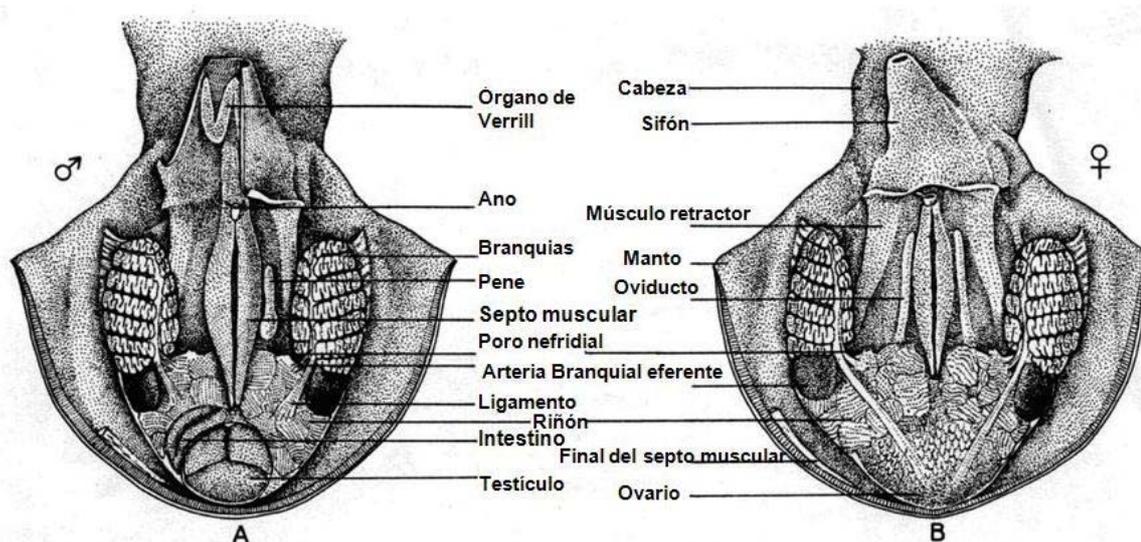


Figura 4. Aparato reproductor en la cavidad del manto: A; Macho y B; Hembra (Tomado de Boyle, 1991).

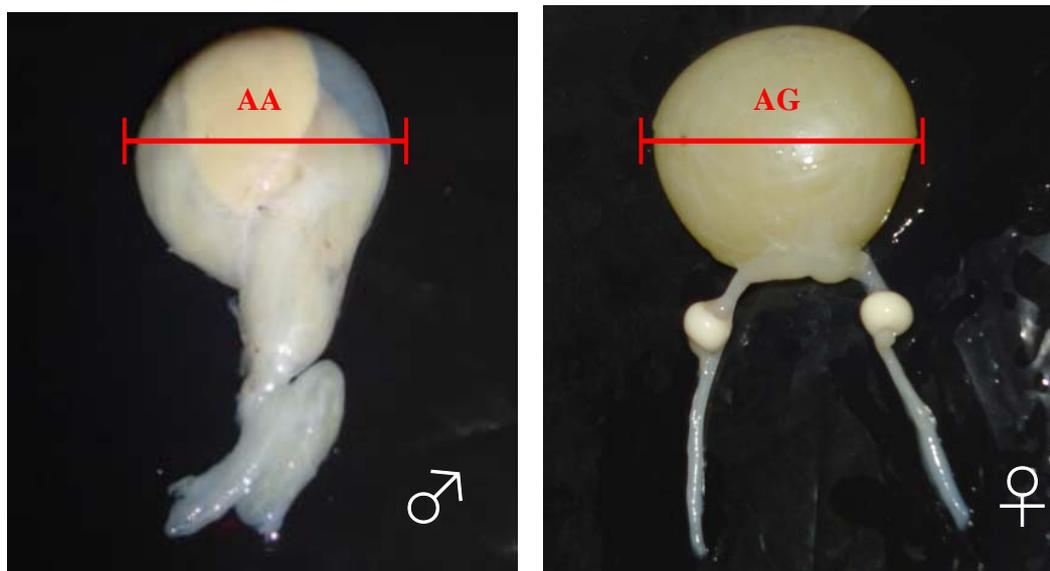


Figura 5. Sistema reproductor masculino (♂) y femenino (♀) de *O. rubescens* y *O. bimaculoides*, respectivamente. AA, ancho del aparato reproductor y AG, ancho de la gónada.

Una vez formados los bloques de parafina, se realizaron cortes en secciones de $4\mu\text{m}$ con la ayuda de un microtomo rotatorio American Optical modelo Spencer-820-320, tomando dos muestras de cada aparato reproductor, para analizar cada una de las partes que lo integran (Figura 6).

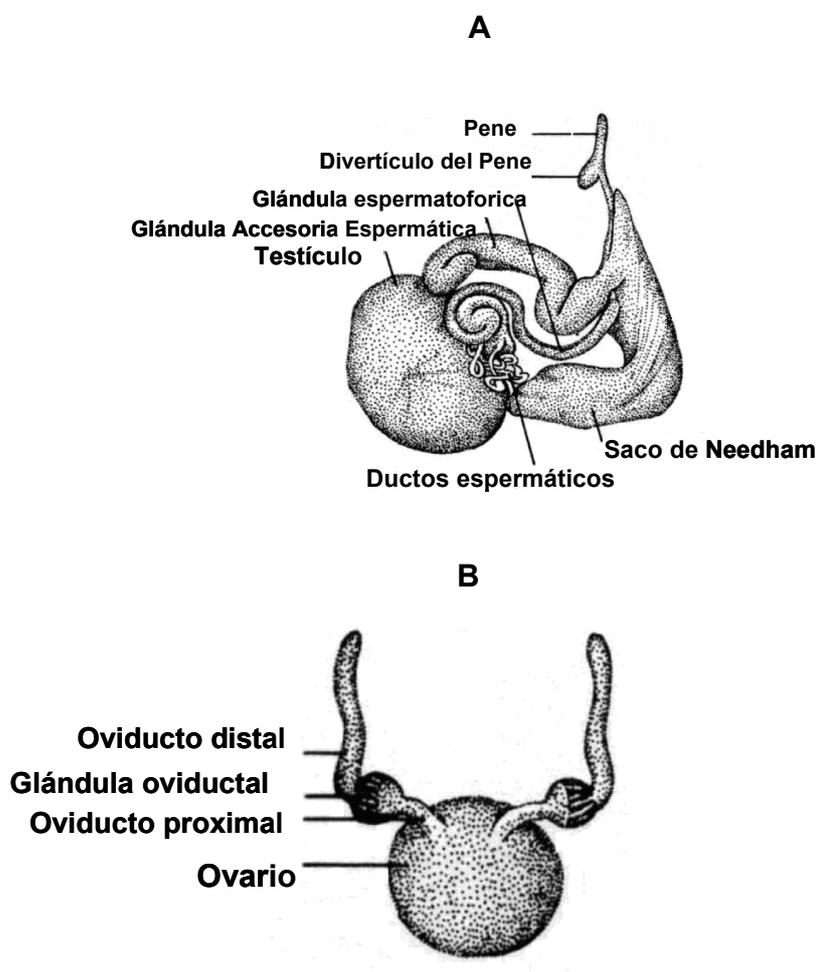


Figura 6. Esquema general del aparato reproductor del pulpo: A; macho y B; hembras (Tomado de Boyle, 1991).

Los cortes histológicos se suspendieron en baño maría a 40°C con agregado de gelatina grado reactivo para su mejor fijación al portaobjeto, este último debidamente rotulado. Luego se desparafinaron para que el colorante pudiera penetrar los tejidos correctamente. El desparafinado se realizó mediante 3 baños consecutivos de xileno, enseguida se rehidrataron con cuatro baños de alcohol a diferente concentración y agua destilada, tal y como se muestra en la tabla III.

Tabla III. Procedimiento para desparafinación de los tejidos

Paso	Reactivo	Duración (min)
1	Xileno I	4
2	Xileno II	4
3	Xileno III	4
4	Alcohol al 100 %	1
5	Alcohol al 100 %	1
6	Alcohol al 96 %	1
7	Alcohol al 10 %	1
8	Agua destilada	5

De las dos muestras tomadas de cada aparato reproductor, una se tiñó con hematoxilina-eosina de Harris, siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE (Tabla IV), y la otra con la tinción tricrómica de Arteta (Valderrama *et al.*, 2004) (Tabla V). El montaje de los cubreobjetos se realizó con resina sintética (Cytoseal 60 marca Richar-Allan Scientific).

Una vez preparadas las laminillas se observaron en un microscopio Leica, modelo DMRXA2, equipado con una cámara digital de 36-bits y 3.3 megapíxeles (Leica, modelo DC300), y con un microscopio marca Olympus modelo CKX41, equipado con una cámara Olympus modelo C-5060, donde se identificaron las estructuras del sistema reproductor y los tejidos que las integran (Price, 1959). La etapa de desarrollo en la que se encontraron los organismos, se identificó de acuerdo con los criterios de Rodríguez-Rúa *et al.* (2005) en *O. vulgaris* y a Olivares-Paz *et al.* (2001 y 2003) en *O. mimus*.

Tabla IV. Protocolo establecido en el laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, para la tinción Hematoxilina- Eosina de Harris.

Paso	Reactivo	Duración
1	Hematoxilina	5 min
2	Agua de la llave	Enjuagar
3	Alcohol ácido	10 inmersiones
4	Agua de la llave	Enjuagar
5	Agua carbonatada	1 min
6	Agua de la llave	Enjuagar
7	Alcohol al 96%	1 min
8	Eosina	1 min
9	Alcohol al 96 %	1 min
10	Alcohol al 96 %	1 min
11	Alcohol al 100 %	1 min
12	Alcohol al 100 %	1 min
11	Xileno I	3 min
12	Xileno II	3 min

Tabla V. Procedimiento para la tinción tricrómica de Arteta.

Paso	Reactivo	Duración
1	Hematoxilina	5 min
2	Agua de la llave	Enjuagar
3	Alcohol ácido	10 inmersiones
4	Agua de la llave	Enjuagar
5	Agua carbonatada	1 min
6	Eritrosina B al 0.5% + Naranja G al 5%	30 min
7	Agua destilada	Enjuagar
8	Ácido fosfotungstico	10 min
9	Agua destilada	Enjuagar
10	Azul de Anilina al 1%	75 s
11	Etanol I al 95%	1 min
12	Etanol II al 95%	1 min
11	Etanol II al 95%	3 min
12	Etanol I al 100%	3 min
11	Etanol II al 100%	3 min
12	Etanol III al 100%	3 min

Con el muestro de prospección, se conoció el grado de madurez en el que se encontraban los organismos acorde a su talla, con lo cual se decidió realizar una serie de muestreos en el medio natural con la finalidad de incrementar el número de muestra y tener todas las etapas representativas del ciclo reproductivo de estos organismos.

Se obtuvieron y analizaron histológicamente un total de 79 organismos, de los cuales 65 eran de la especie *O. rubescens* y 14 de *O. bimaculoides*.

Las muestras obtenidas del sistema reproductor de ambas especies fueron capturadas en diferentes aumentos (40, 100, 400 y 1000x), con la finalidad de analizar las diversas estructuras, tipos celulares y tejidos que lo constituyen.

Finalmente se realizó una descripción histológica de la estructura y composición celular del aparato reproductor de ambos sexos y se estableció la escala de maduración para cada especie con base en las escalas de madurez propuestas por Rodríguez-Rua *et al.* (2005) en *O. vulgaris* y Olivares-Paz *et al.* (2001 y 2003) en *O. mimus*.

V. Resultados

Se analizaron histológicamente un total de 79 organismos de los cuales, 65 pertenecen a la especie *Octopus rubescens* (35 machos y 30 hembras) y 14 ejemplares de *Octopus bimaculoides* (10 machos y 4 hembras).

Los pesos de los ejemplares disecados de *O. rubescens* estuvieron en el intervalo de 9.4 a 87.7 g para la hembras y de 7.2 a 543.4 g para los machos. Solo siete machos del total de organismos disecados tuvieron un peso mayor a los 100 g (Figura 6).

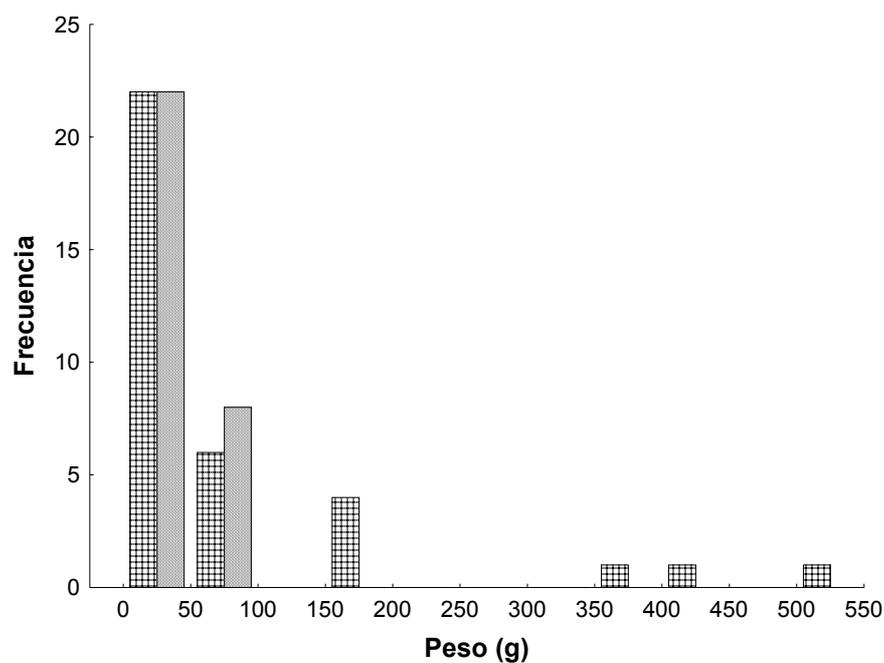


Figura 7. Frecuencia de los pesos de los ejemplares de *Octopus rubescens* que fueron disecados; , Machos y , Hembras.

En los ejemplares de *O. bimaculoides* el peso varió de 7.8 a 404.2 g en las hembras y de 6.1 a 86.6 g en los machos. Todos los ejemplares, excepto la hembra de mayor peso, tuvieron un peso inferior a los 100 g (Figura 8).

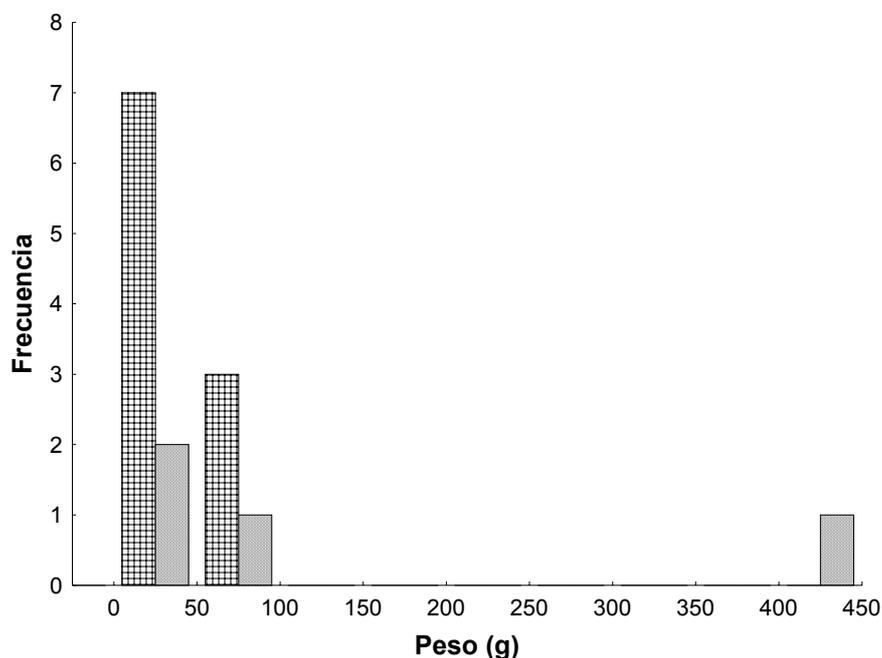


Figura 8. Frecuencia de los pesos de los ejemplares de *Octopus bimaculoides* que fueron disecados; , Machos y , Hembras.

Una vez procesadas las muestras histológicamente, se analizaron y se hicieron las descripciones correspondientes.

V.1 Descripción del aparato reproductor en las hembras de *Octopus rubescens* y *Octopus bimaculoides*

V.1.1. Descripción macroscópica

El aparato reproductor de las hembras de *O. rubescens* y *O. bimaculoides* es similar y se localiza en la parte posterior de la cavidad del manto. Estos organismos tienen un solo ovario rodeado por la túnica albugínea.

El ovario inmaduro tiene un color blanco lechoso y a medida que aumenta el grado de madurez se torna amarillento, con óvulos visibles a simple vista.

En la región ventral del ovario, se presenta una abertura que forma una especie de embudo que desemboca en un oviducto común, a partir de este punto,

el oviducto se bifurca, dando origen a los oviductos proximales (Figura 9), que corren paralelos entre si, sobre la glándula digestiva, hacia la parte anterior de la cavidad del manto. En la porción final, el oviducto distal está abierto, el cual permite la entrada a los espermátóforos depositados por los machos. Los espermatozoides son liberados del espermátóforos por algún mecanismo y son almacenados en las espermatecas presentes en las glándulas oviductales, hasta que la hembra este lista para desovar. Los óvulos son fecundados al pasar por estas glándulas y continúan su paso a través del oviducto distal hasta ser desovados a través de la abertura final de éste conducto.

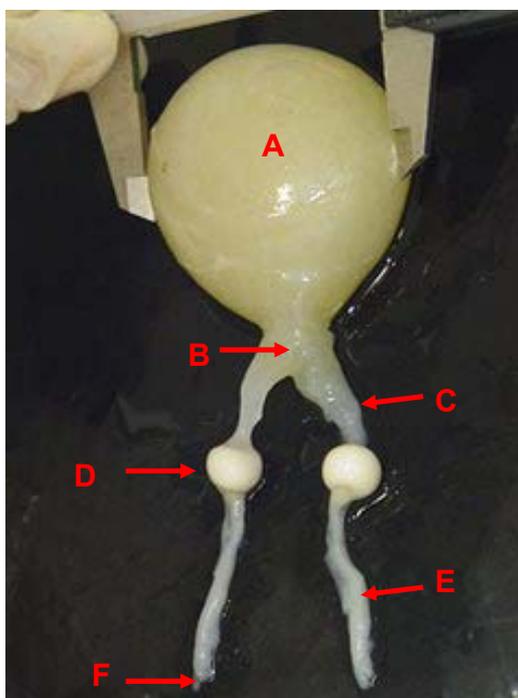


Figura 9. Aparato reproductor femenino de *Octopus bimaculoides*: A, ovario; B, oviducto común; C, oviducto proximal; D, glándula oviductal; E, oviducto proximal y F, abertura final del oviducto distal.

V.1. 2. Descripción histológica

La membrana que envuelve al ovario esta constituida por tejido fibroso, principalmente de colágeno. La pared del ovario esta delimitada por tejido fibroso,

constituido principalmente por fibras de colágeno. De la pared emergen proyecciones al interior del ovario o trabéculas del tejido fibroso, en forma de ramificaciones, donde se encuentran las células germinales y ovocitos en desarrollo, formando lo que se conoce como el estroma ovárico (Figura 10).

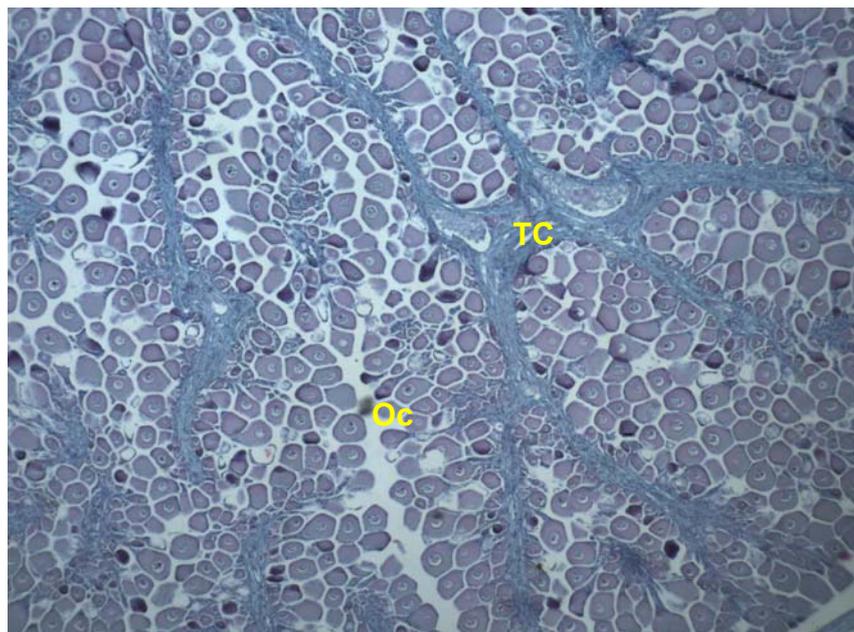


Figura 10. Corte transversal de la sección del ovario de una hembra de *Octopus bimaculoides*; TC: tejido conectivo y Oc: ovocitos. Aumento de 40x. Tinción tricrómica de Arteta.

Los oviductos distal y proximal están constituidos por músculo liso. Las fibras musculares que componen estos oviductos son alargadas y paralelas entre sí, con núcleo central y alargado. El lumen de los oviductos está constituido por un epitelio de células largas y ciliadas (Figura 11). Es posible que estos cilios faciliten el transporte de los ovocitos desde el ovario hasta la abertura final del oviducto distal al momento de ser desovados.

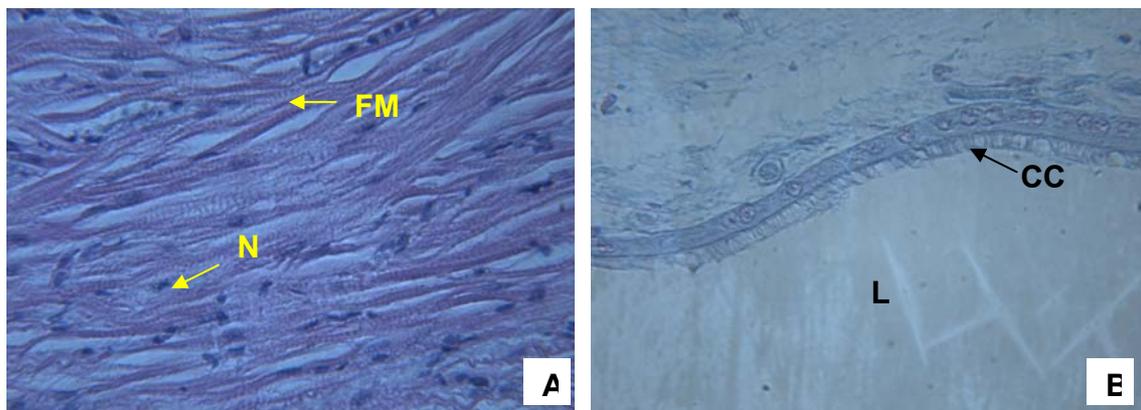


Figura 11. Oviducto distal de *Octopus rubescens*, A, corte longitudinal de la pared del oviducto, 400x. B, corte longitudinal del epitelio ciliado del oviducto. Aumento de 400x. N, núcleo; FM, fibras musculares; CC, células ciliadas; L, lumen del oviducto. Tinción tricrómica de Arteta.

El epitelio interno de las glándulas oviductales está constituido por unidades secretoras muy plegadas, compuestas de células cilíndricas con núcleos basales. Entre cada unidad se encuentra tejido conectivo de fibras de colágeno principalmente (Figura 12A y B). En el tejido glandular periférico se pueden observar algunos espacios vacíos, que pueden ser el resultado del lavado de algunos lípidos por los solventes utilizados en el proceso histológico (Figura 12A). En la figura 12B se aprecia claramente los dos tejidos glandulares de la glándula oviductal, el tejido glandular central es hialino y en los bordes se torna de un color rojo intenso, probablemente debido al tipo de sustancia que secreta cada parte de la glándula. De acuerdo a los principios de la tinción tricrómica de Arteta, en la sección periférica es muy probable que se secreten sustancias mucosas con un pH básico, debido a la tonalidad que adopto el tejido.

La cavidad central de la glándula está tapizada por células cilíndricas ciliadas que posiblemente sirvan para el transporte de los ovocitos (Figura 12C), además se encuentra rodeado de una capa gruesa de tejido conectivo.

Cuando una hembra es inseminada, puede almacenar los espermatozoides en las espermatecas ubicadas muy cerca del lumen de la glándula oviductal. En un corte transversal, las espermatecas son de forma ovoide y están constituidas

por un epitelio cilíndrico ciliado, con núcleos esféricos ubicados hacia el borde extremo (Figura 12D).

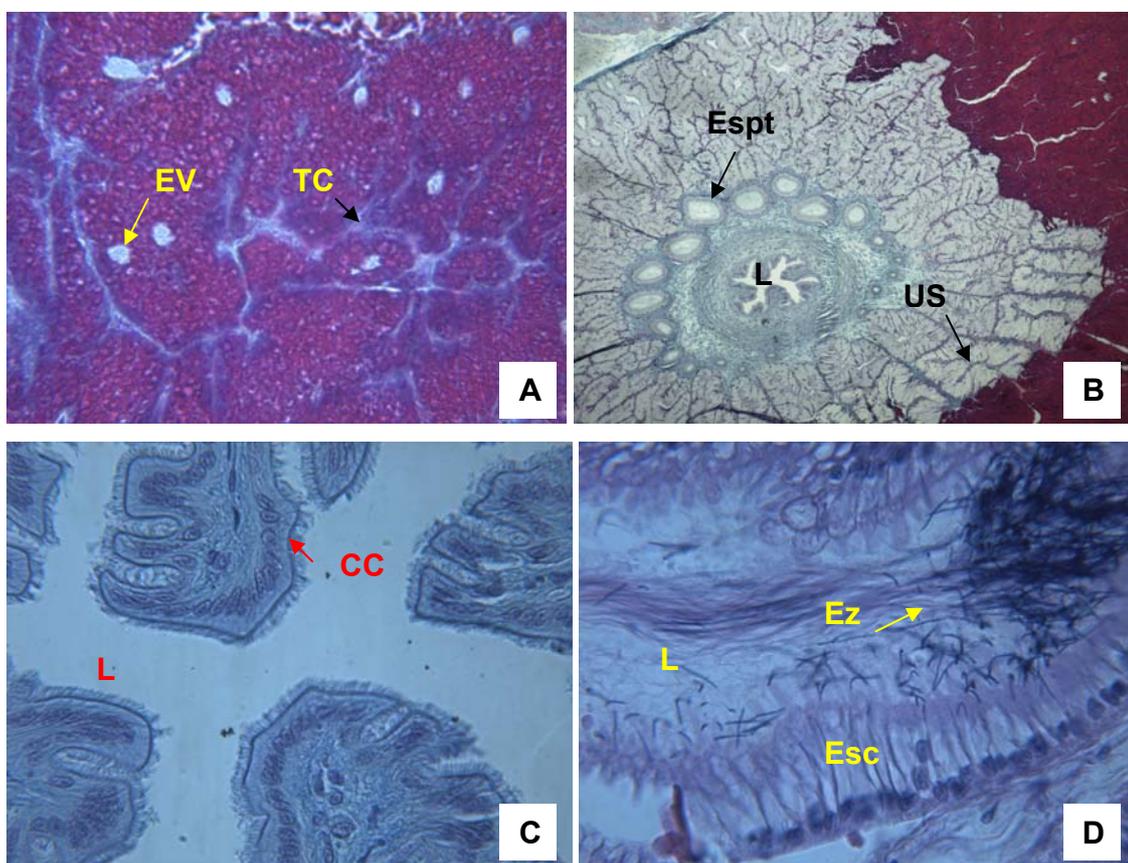


Figura 12. Glándula oviductal de *Octopus rubescens*. A, Corte transversal de glándula oviductal, 100x. B, Corte longitudinal del tejido glandular periférico 400x. C, Corte transversal de la glándula, se aprecia la cavidad central tapizada por un epitelio ciliado, 400x. D, corte longitudinal de una espermateca, 400x. CC, células ciliadas; L, cavidad central; TC, tejido conectivo; EV, espacios vacíos producidos por el proceso histológico; Esc, epitelio cilíndrico ciliado; Ez, espermatozoides; Espt, espermatecas; US, unidad secretora. Tinción tricrómica de Arteta.

IV.2 Escala de madurez para las hembras de *Octopus rubescens*

Los criterios microscópicos que se consideraron para la asignación del estadio de madurez sexual de las hembras, incluyeron los tipos celulares y sus proporciones, la abundancia del estroma ovárico, el espesor de las capas foliculares de los ovocitos, la presencia de inclusiones lipídicas en el citoplasma,

las invaginaciones del folículo, la presencia y el espesor del corion y la presencia de folículos postovulatorios y ovocitos en reabsorción. Además, se consideró la condición de los tejidos de las glándulas oviductales, la presencia de espermatozoides en las espermatecas y la presencia de huevos en las glándulas oviductales.

Con base en estas características se establecieron los siguientes ocho estadios:

Estadio 1. Inmaduro

Solo se encontró a un ejemplar en este estadio, su peso corporal fue de 26 g y el ancho del ovario de 18.8 mm. En este estadio predominan las ovogonias unidas al estroma ovárico, pero también se pueden observar los ovocitos en desarrollo. Las ovogonias tienen forma esférica y carecen de células foliculares (Fig. 13B).

Los oviductos y las glándulas oviductales tienen poco desarrollo y macroscópicamente son difíciles de identificar.

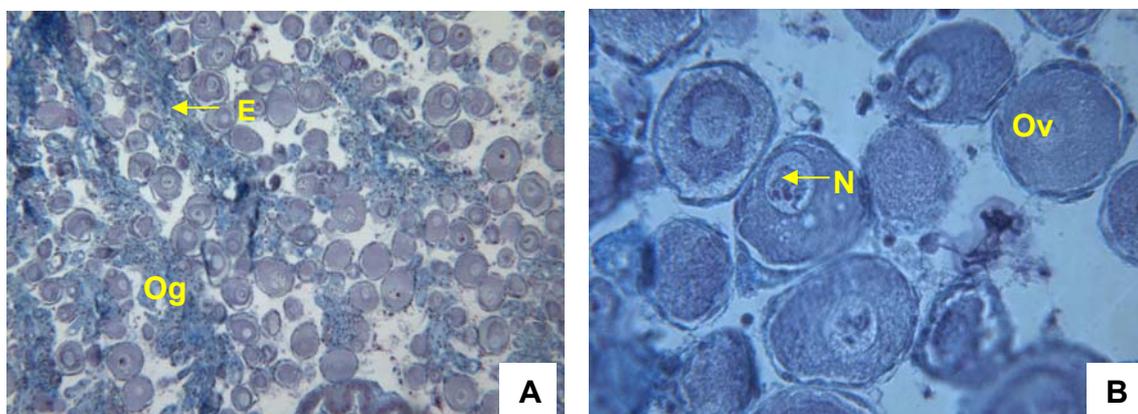


Figura 13. Corte transversal del ovario inmaduro de *Octopus rubescens*. A, sección del ovario con ovocitos inmaduros y ovogonias en el estroma ovárico, con aumento de 40x. B, Ovocitos en desarrollo, con aumento de 400x. Og; ovogonias. Oc, ovocitos, E; estroma ovárico y N, núcleo. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 2. Folliculogénesis inicial

Se aprecia una evidente disminución del estroma ovárico, y por tanto las ovogonias son menos abundantes que en el estadio anterior. Los ovocitos han adquirido un mayor tamaño y ocupan un mayor espacio en la cavidad del ovario (Figura 14).

En la mayoría de los ovocitos ha comenzado el proceso de formación del epitelio folicular pseudoestratificado de células planas o folículo secundario (Figura 14B). Algunos ovocitos tienen formas poliédricas, con las paredes aplanadas.

Siete de las hembras analizadas se encontraban en este estadio de madurez. El peso corporal de éstas hembras varió de 13.5 a 66.6 g, mientras que el ancho de la gónada fue de 5.43 a 9.95 mm. Cabe mencionar que la hembra de menor peso no fue la que presentó la gónada de menor tamaño.

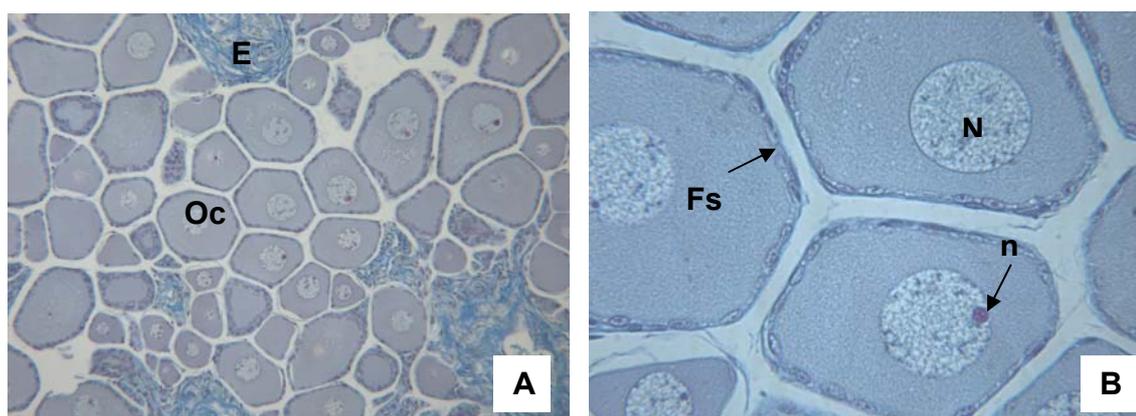


Figura 14. Ovario de una hembra de *O. rubescens* en estadio de folliculogénesis inicial. A, sección del ovario con numerosos ovocitos y estroma ovárico, 100x. B, ovocitos con cubierta folicular de dos células de espesor, 400x. E, estroma ovárico; N, núcleo; n, nucléolo; FS, folículo secundario. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 3. Folliculogénesis final

El proceso de formación de la doble capa de células foliculares en el ovocito ha terminado e inició el proceso de invaginación de la membrana del ovocito y de las células foliculares que lo tapizan, aunque es posible observar

algunos ovocitos con una sola capa de células foliculares. En un corte histológico, los ovocitos tienen formas irregulares, a consecuencia de las invaginaciones y del alargamiento del ovocito en un eje longitudinal, cuyos extremos están ubicados en la región donde el ovocito se sujeta al estroma y en el extremo opuesto del ovocito. El estroma ovárico se circunscribe a la región cortical del ovario y es difícil observar las ovogonias y los ovocitos, debido al gran crecimiento de los ovocitos. (Figura 15).

Se encontraron cinco ejemplares en este estadio, los cuales tuvieron un peso corporal de 9.4 a 54.7 g, y de 5.4 a 9.82 mm de ancho gonadal. La hembra de mayor peso no fue la que tuvo la gónada de mayor tamaño.

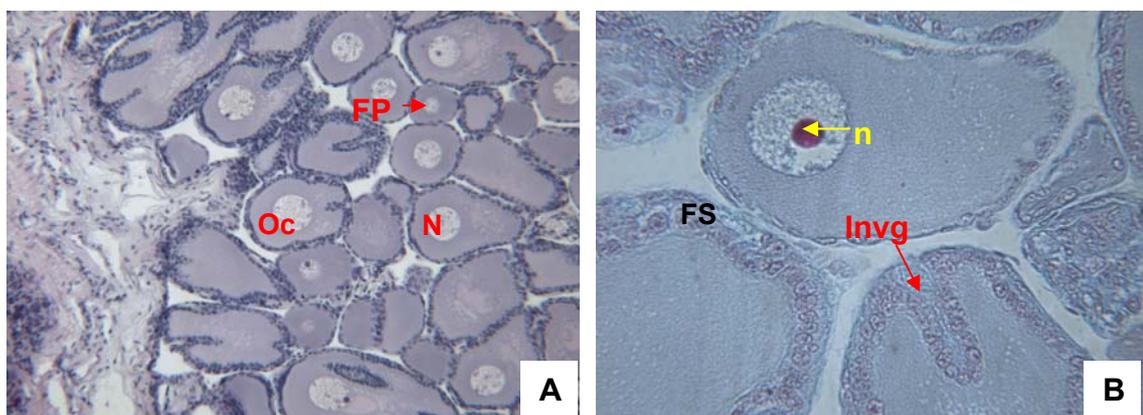


Figura 15. Ovario de una hembra de *Octopus rubescens* en el estadio de foliculogénesis final. A, sección del ovario con numerosos ovocitos con invaginaciones, en el estroma ovárico no se observan ovogonias ni ovocitos, 100x. B, ovocitos con una sola capa de células foliculares o folículo primario 400x. Oc, Ovocito; N, núcleo; FP, folículo primario; n, nucléolo; FS, folículo secundario; Invg, invaginaciones del folículo secundario. Tinción tricrómica de Arteta

Estadio 4. Previtelogénesis

En este estadio los ovocitos han completado el desarrollo de las capas foliculares (folículo secundario), las invaginaciones de la membrana del ovocito son profundas y forman un amplio espacio que es ocupado por células foliculares, la forma y el tamaño de los ovocitos son muy irregulares.

En algunos ovocitos se pueden observar inclusiones de lípidos secretados por los folículos. Los núcleos de los ovocitos no se observan con facilidad, debido a que el volumen del citoplasma se ha incrementado considerablemente, haciendo poco evidente el núcleo (Figura 16).

Se encontraron cinco ejemplares en este estadio, con un peso corporal de 9.9 a 52 g y ancho del ovario de 6.63 a 13.95 mm, la gónada de menor y mayor tamaño corresponde a los organismos de menor y mayor peso, respectivamente.

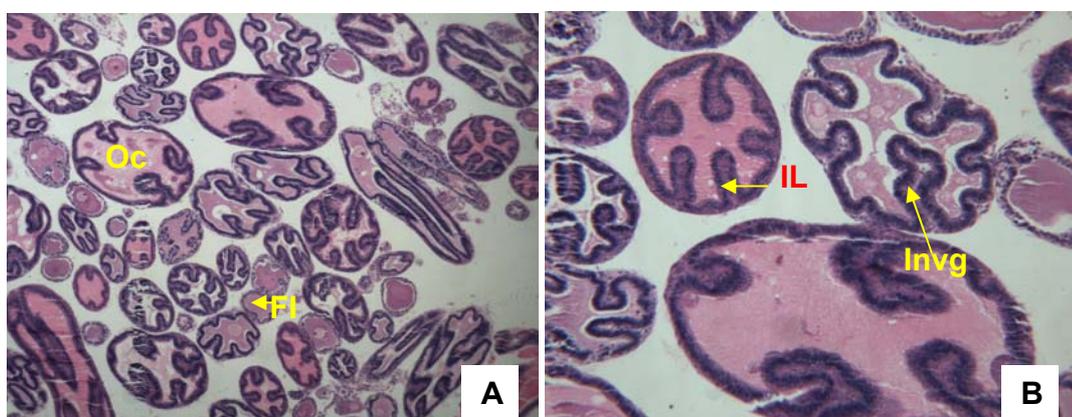


Figura 16. Ovario de una hembra de *Octopus rubescens* en estadio de previtelogénesis. A, Sección del ovario con ovocitos de forma y tamaño muy variable, se observan las invaginaciones de la membrana del ovocito, aumento de 40x. B, detalle de las invaginaciones de la membrana del ovocito, se aprecian las inclusiones lipídicas en el citoplasma, 100x. IL, inclusiones lipídicas; Invg, invaginaciones de la membrana del ovocito; Oc, ovocitos; FI, foliculogénesis inicial. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Estadio 5. Vitelogénesis inicial

Es posible apreciar los gránulos de vitelo en el interior de los ovocitos y su tamaño se incrementó considerablemente. Permanecen las invaginaciones profundas en los folículos y las formas no son tan irregulares como en el estadio de previtelogénesis, su forma se asemeja más a un óvalo (Figura 17A).

En algunos ovocitos se observa, entre las células foliculares y el citoplasma, la zona radiata, similar a la observada en peces. Esta zona radiata es la que posteriormente dará origen al corion del óvulo (Figura 17B) y aunque en este

estadio predominan los ovocitos en vitelogénesis, se pueden encontrar algunos en estado previtelogénico e incluso en foliculogénesis final.

Se encontraron cuatro ejemplares en este estadio, los cuales tuvieron un peso de 41 a 48.2 g, y un ancho ovárico de 13.47 a 28.27 mm. El organismo más pequeño no fue el que tuvo la gónada de menor tamaño.

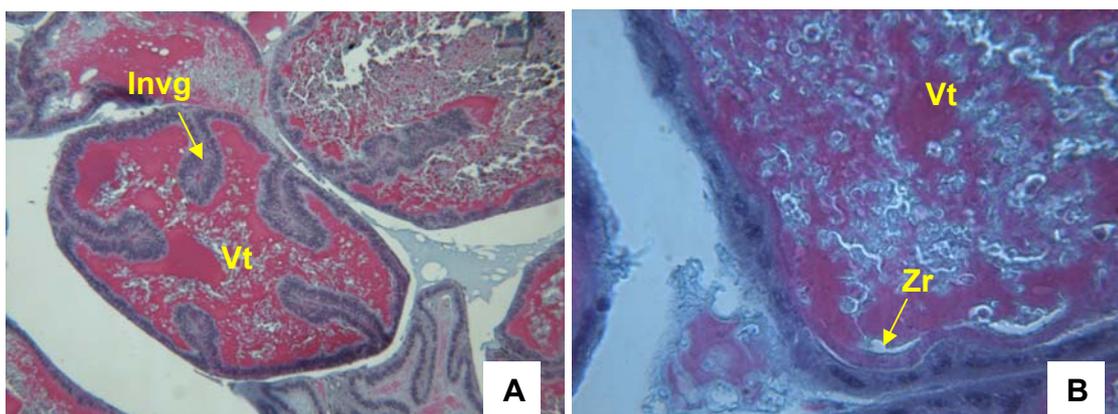


Figura 17. Sección del ovario de una hembra de *Octopus rubescens* en estadio de vitelogénesis. A: Ovocito con invaginaciones profundas en el folículo, aumento de 100x. B. Ampliación de la sección de un ovocito, donde se muestra la zona radiata, la cual dará origen al corion del óvulo, aumento de 400x. Vt : Vitelo, Invg: invaginaciones del folículo ovárico, Zr: zona radiata. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 6. Vitelogénesis final

El vitelo ya no se observa en forma granular, la apariencia es homogénea. Las invaginaciones del folículo de estos ovocitos no son tan profundas y son muy estrechas entre si (Figura 18). Se pueden presentar ovocitos en vitelogénesis inicial.

Se encontraron tres ejemplares en este estadio, los cuales tuvieron un peso corporal de 23.7 a 58.8 g, y un ancho gonadal 10.75 y 24.1 mm. La gónada de menor y mayor tamaño corresponde a los organismos de menor y mayor peso, respectivamente.

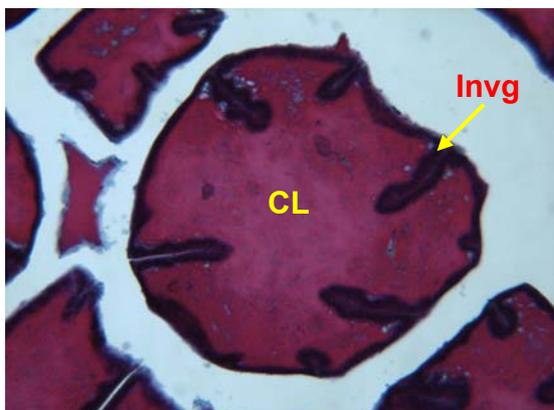


Figura 18. Sección del ovario de *Octopus rubescens* en estadio de vitelogénesis final, aumento de 100x. CL, ovocitos con citoplasma liso; Invg, invaginaciones estrechas. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 7. Maduras

Los ovocitos han ovulado de su folículo ovárico (Figura 19A). El folículo ovárico fue sustituido por el corion (Figura 19B) y esta listo para ser fertilizado y desovado. Es posible encontrar ovocitos en vitelogénesis final. Se encontraron cuatro organismos en este estadio, con un peso de 22.8 a 87 g y un ancho gonadal de 10.22 a 28.77 mm. Cabe señalar que el organismo de menor peso fue el que tuvo la gónada más chica y el organismo de mayor peso no fue el que presentó la gónada de mayor tamaño.

En uno de los ejemplares se encontró un ovocito en el lumen de la glándula, lo cual puede indicar que el organismo se encontraba en proceso de desove.

En este estadio, las glándulas oviductales están bien desarrolladas, al igual que los oviductos. Las aberturas finales de los oviductos se encontraron muy próximas a la apertura del sifón del organismo.

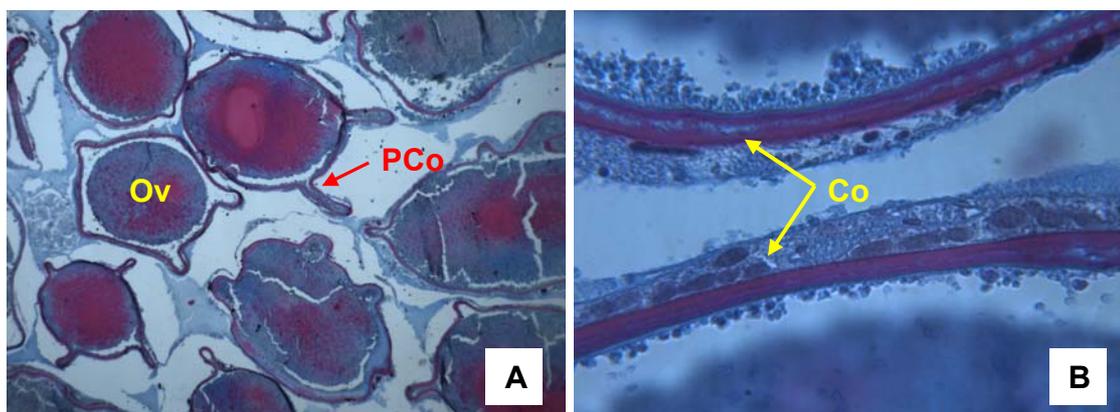


Figura 19. Sección del ovario de *Octopus rubescens* en estadio maduro. A, óvulos, se aprecian las proyecciones del corion, aumento de 40x. B, Corion de dos óvulos, 400x. Ov, óvulos; PCo proyecciones del corion; Co, corion. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 8. Desovadas

En una revisión macroscópica, la apariencia general del ovario es flácida, de coloración opaca, producto del vaciado de los óvulos. En un corte histológico se observa el predominio de folículos postovulatorios y los ovocitos en reabsorción (Figura 20). Ya no se encuentran las células de los estadios anteriores. Este estadio de madurez se encontró en un ejemplar que tuvo un peso corporal de 33.2 g y un ancho gonadal de 18.4 mm.

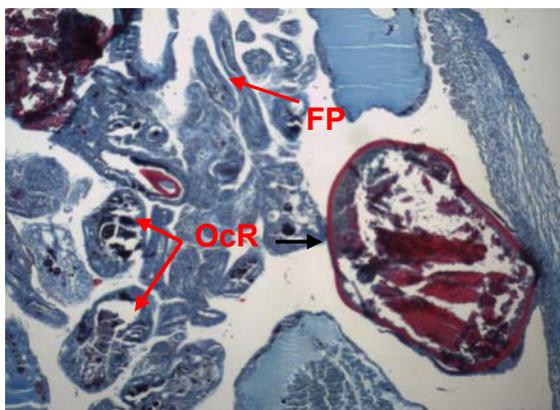


Figura 20. Sección del ovario de *Octopus rubescens* en estadio desovada. OcR, ovocitos en reabsorción; FP, folículos postovulatorios, 40x. Tinción tricrómica de Arteta.

V.3 Escala de madurez para las hembras de *Octopus bimaculoides*.

De igual manera que en las hembras de *O. rubescens*, para la asignación de los estadios de madurez de las hembras de *O. bimaculoides* se tomaron en cuenta los tipos celulares y sus proporciones, la abundancia del estroma ovárico, capas foliculares, inclusiones lipídicas en el citoplasma, invaginaciones del folículo, formación del corion, presencia de folículos postovulatorios y ovocitos en reabsorción. Además de la presencia de espermatozoides en las espermatecas y/o de huevos en las glándulas oviductales, entre otras.

En este caso, se analizaron un total de cuatro hembras, de las cuales, dos se catalogaron en el estadio Inmaduro, una en foliculogénesis final y otra en vitelogénesis final.

Estadio 1. Inmaduras

Se observa abundante estroma ovárico y predominan las ovogonias rodeadas de una sola capa de células planas foliculares con núcleos muy visibles, también se pueden observar algunos ovocitos en desarrollo (Figura 21).

Los pesos de los ejemplares en este estadio fueron de 28.2 y 60.8 g, con un ancho de la gónada de 5.81 y 7.02 mm, respectivamente. Las glándulas oviductales y los oviductos no se observan macroscópicamente.

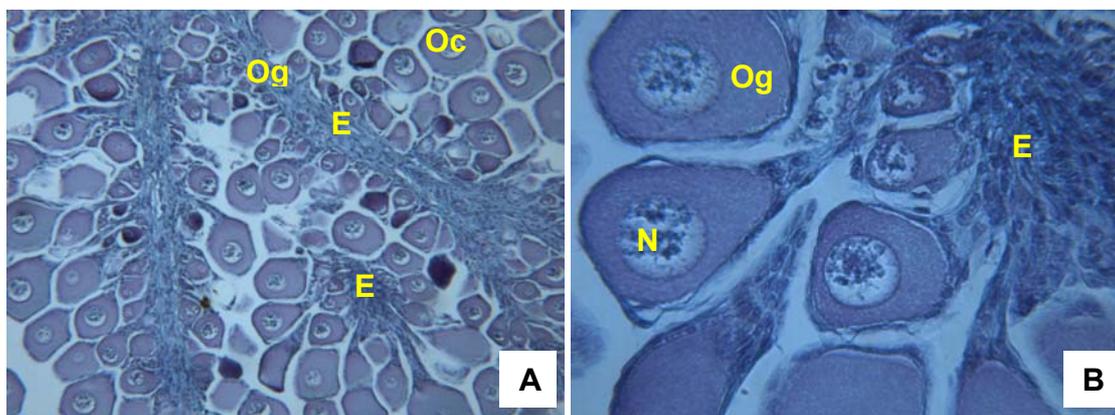


Figura 21. Sección del ovario de una hembra inmadura de *Octopus bimaculoides*: A; ovogonias inmersas en el estroma ovárico y ovocitos en desarrollo, 40x. B, ovocitos unidos al estroma ovárico, 400x. Og, ovogonias; Oc, ovocito; E, estroma ovárico y N: núcleo. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 3. Folliculogénesis final

Predominan los ovocitos con la doble capa de células foliculares planas, se observan algunas invaginaciones de la membrana del ovocito, poco profundas (Figura 22). No se observan ovogonias, pero los ovocitos con una sola capa de células foliculares son frecuentes.

El ejemplar encontrado en este estadio tuvo un peso de 7.8 g y una gónada de 2.38 mm de ancho.

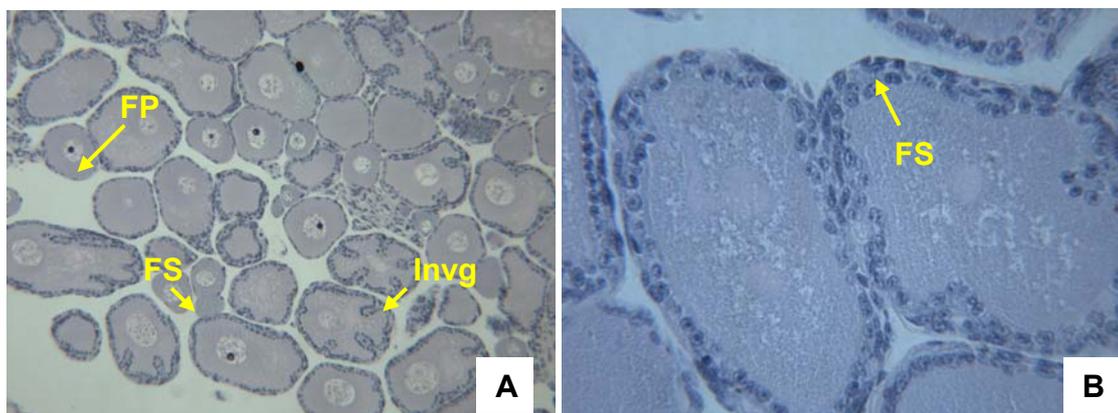


Figura 22. Sección del ovario de una hembra en foliculogénesis final de *Octopus bimaculoides*: A; numerosos ovocitos con invaginaciones, 100x y B, ovocitos con folículo secundario pseudoestratificado, 400x . FP: Folículo primario, FS: folículo secundario e Invg: invaginaciones. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 6. Vitelogénesis final

Culminó la síntesis del vitelo, en un corte histológico, la apariencia del citoplasma es homogénea, no se observan gránulos de vitelo. Los ovocitos son de gran tamaño (aproximadamente 17.5 mm de longitud promedio).

Las invaginaciones del folículo de estos ovocitos no son tan profundas, pero si muy estrechas entre si y se observan a lo largo de todo el ovocito (Figura 23). Se aprecia la zona radiata en la parte interna del ovocito, entre el citoplasma y el folículo.

El ejemplar encontrado en este estadio de madurez tuvo un peso de 404.2 g y el ancho de su gónada fue de 61.01 mm.

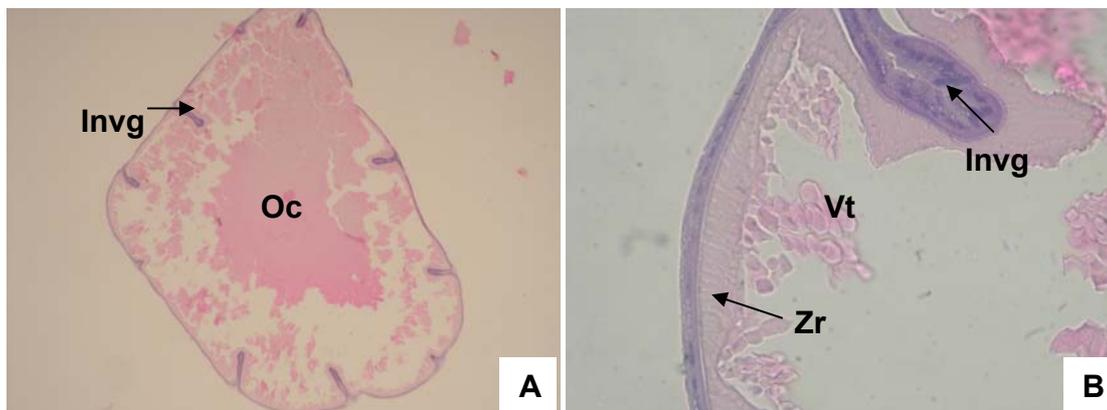


Figura 23. Sección del ovocito de una hembra de *Octopus bimaculoides*. A, corte transversal, conserva el folículo y sus invaginaciones, 40x. B, Ampliación de una sección del ovocito que muestra la zona radiata que dará origen al corion, 200x. Oc, ovocito; Invg, invaginaciones del folículo; Vt, gránulos de vitelo; Zr, zona radiata. Tinción tricrómica Hematoxilina-Eosina.

V.4 Descripción del aparato reproductor de los machos de *Octopus rubescens* y *Octopus bimaculoides*.

V.4.1 Descripción macroscópica

El aparato reproductor de los machos está localizado al igual que en las hembras, en la parte posterior de la cavidad del manto extendiéndose hacia la parte anterior, sobre la glándula digestiva y termina muy cerca del sifón en los organismos adultos.

La gónada en un estado inmaduro es de color blanco-amarillento, cuando aumenta su grado de maduración se torna de un color blanquecino.

El testículo, junto con el resto de los órganos sexuales (ducto espermático, glándula accesoria espermática, glándula espermatozóica y el saco de Needham,) excepto el ducto excurrente, se encuentran envueltos por una membrana delgada, que dificulta su identificación individual a simple vista. Estos órganos guardan una relación estrecha entre sí, y cada uno interviene de alguna manera en el proceso de formación del espermatozóico.

Con el propósito de comprender la estructura de los órganos que constituyen el aparato reproductor masculino de los pulpos, así como el proceso de formación de los espermatozoides y del espermatóforo, se removió la delgada membrana que envuelve a todo el complejo y se hicieron observaciones sobre la morfología del aparato así como de las relaciones entre los diferentes órganos (Figura 24), también se hizo un análisis histológico de los diferentes órganos y conductos que lo integran.

El testículo tiene una forma oval (Figura 24A) y esta constituido por numerosos túbulos seminíferos, donde se lleva a cabo la espermatogénesis. Los espermatozoides son vertidos desde el lumen de los túbulos seminíferos al ducto espermático, donde posiblemente se conglomeren antes de ser incluidos en el espermatóforo. Este ducto es muy delgado, mide menos de 1.5 mm de diámetro y esta muy enrollado y compactado, pero al extenderlo, su longitud es muy semejante a la longitud total del organismo. La longitud de este órgano puede estar relacionada con la función de almacén temporal y el arreglo de los espermatozoides que se observa en un espermatóforo maduro (24, B)

El ducto espermático se comunica con la glándula espermatófórica (Figura 24, C y D). En el segmento proximal de esta glándula se observa un ensanchamiento, luego disminuye su anchura y adopta un grosor uniforme a lo largo de toda la glándula. Inmediatamente después del ensanchamiento, se observa un enrollamiento en la estructura de este órgano, luego se extiende hasta comunicarse con la glándula accesoria espermática.

Los espermatozoides pasan a través de toda la longitud de la glándula espermatófórica, la cual secreta algunas sustancias mucosa, para que los espermatozoides permanezcan en cúmulos y no se dispersen. Posteriormente los cúmulos de espermatozoides siguen su trayectoria a través de la glándula accesoria espermática, aparentemente, solo pasan su sección proximal (Figura 24, E), que probablemente sea la responsable de secretar la cubierta final del espermatóforo.

Una vez que el espermátforo esta formado, se almacena en el saco de Needham (Figura 24, F). Este órgano tiene una comunicación directa con el ducto excurrente (Figura 24, G), el cual tiene una abertura en la porción final, por donde los espermátforos serán expulsados.

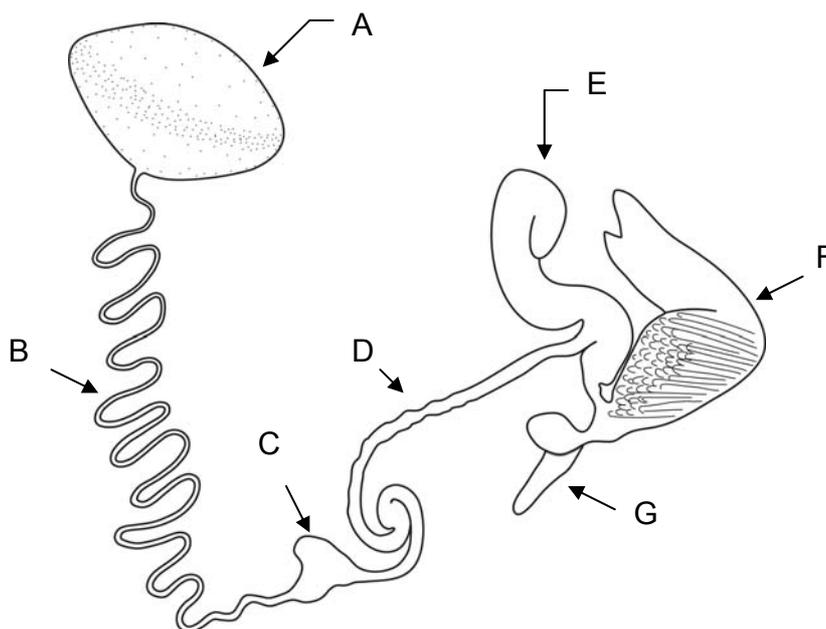


Figura 24. Esquema general de los órganos que integran el sistema reproductor masculino de los pulpos: A, testículo; B, ducto espermático; C, porción proximal de la glándula espermatóforica; D, porción distal de la glándula espermatóforica; E, glándula accesoria espermática; F, saco de Needham y G, ducto excurrente.

V.4.2 Descripción histológica

El testículo está envuelto en una túnica albugínea de tejido conectivo y está constituido por numerosos túbulos seminíferos. Las espermatogonias se observan en la pared del túbulo seminífero, estas se dividen mitóticamente hacia el centro del túbulo, donde se lleva a cabo la espermiación (Figura 25). Los espermatozoides son vertidos al ducto espermático.

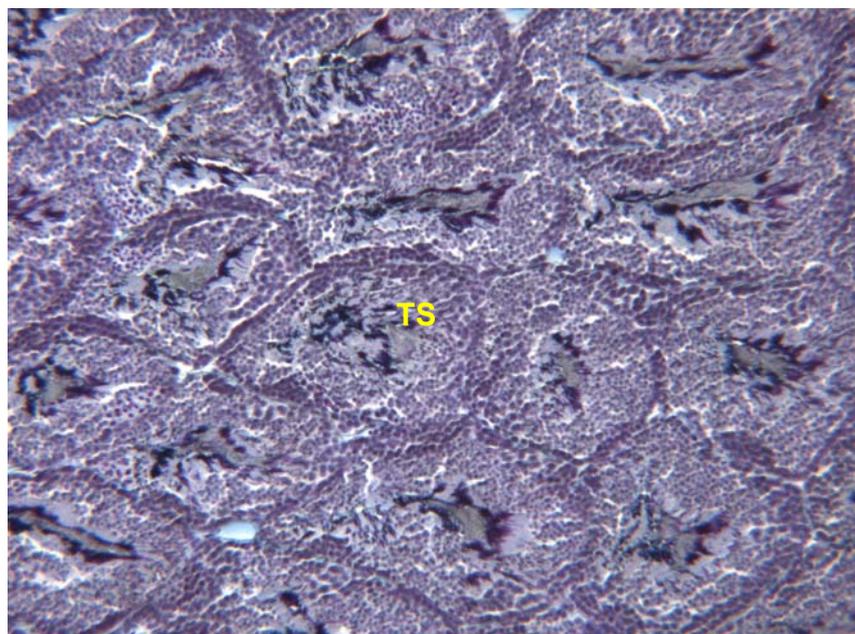


Figura 25. Corte transversal del testículo del pulpo *Octopus rubescens*, se observan numerosos túbulos seminíferos (TS), donde se lleva a cabo la espermatogénesis, 100x. Tinción tricrómica de Arteta.

El ducto está constituido por un epitelio simple de células cúbicas ciliadas, rodeado por tejido conectivo, de fibras de colágeno principalmente. En un corte transversal del ducto espermático (Figura 26) se observan varias secciones, esta apariencia es producto del plano del corte, ya que este ducto está enrollado y compactado.

Los espermatozoides son transportados desde el testículo hacia la glándula espermatofórica a través del ducto espermático, en esta glándula se secretarán las sustancias que servirán para la formación de las cubiertas de los espermatóforos.

El ducto espermático se comunica con la glándula espermatofórica. Los espermatozoides son transportados desde el testículo hacia la glándula espermatofórica mediante el ducto espermático para la segregación de algunas sustancias que servirán para la formación de los espermatóforos.

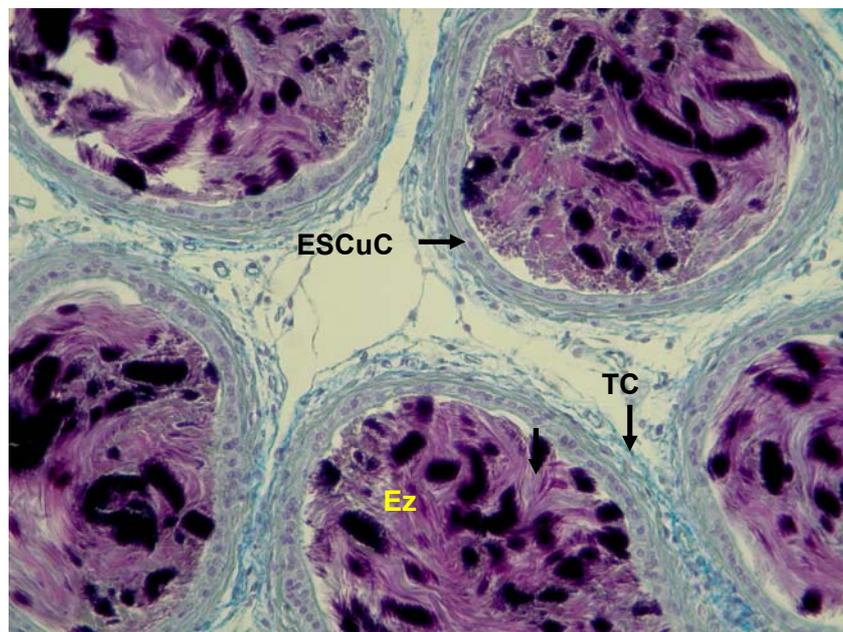


Figura 26. Corte transversal de los ductos espermáticos de *Octopus rubescens*. ESCuC, Epitelio simple de células cúbicas ciliadas; TC, tejido conectivo; Ez, espermatozoides, 200x. Tinción tricrómica de Arteta.

La glándula espermatóforica tiene forma tubular, con pliegues en su interior. La composición estructural de esta glándula varía en diferentes secciones, dependiendo de la función o del tipo de sustancia que sintetice para la formación de los espermátóforos. La región proximal y distal de la glándula esta constituida por un epitelio simple plegado formado por células cilíndricas ciliadas. Estas células son muy alargadas y globosas hacia el lumen, que probablemente, por su apariencia sean las encargadas de secretar algún tipo de mucus (Fig. 27A).

La sección intermedia de la glándula esta constituida por una serie de unidades secretoras formadas por células cilíndricas ciliadas con núcleo basal (Fig. 27B).

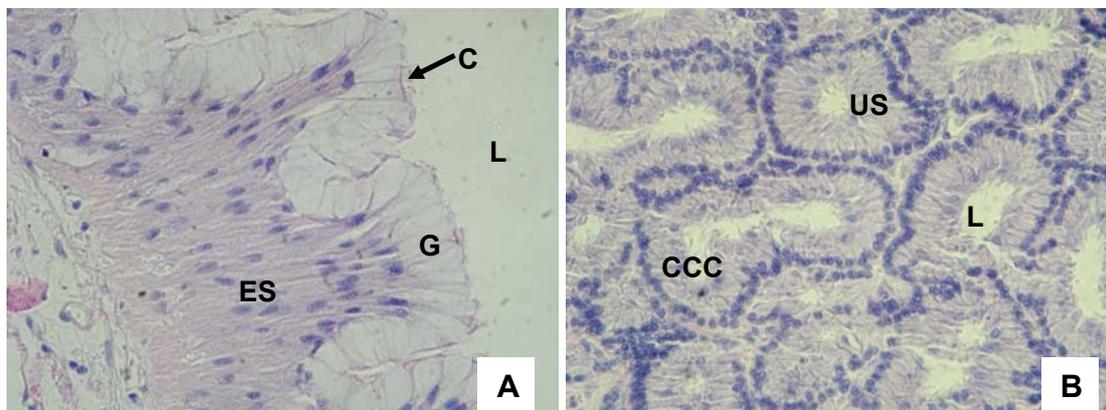


Figura 27. Glándula espermatozóica de *Octopus rubescens*. A, sección de la región distal, 400x. B, región intermedia constituida por unidades secretoras, 400x. ES, Epitelio simple de células cilíndricas, con extremos globosos, G; C, cilios, L, lumen (L); US, unidades secretoras; CCC, células cilíndricas ciliadas con núcleos basales, lumen. Tinción Hematoxilina-Eosina

Posteriormente, los espermatozóicos en formación pasan, aparentemente, por la porción proximal de la glándula accesoria espermática. Esta glándula está compuesta por unidades secretoras, constituidas por células cilíndricas ciliadas con núcleos basales. Entre las unidades secretoras se puede observar tejido conjuntivo compuesto principalmente por colágeno. El lumen de la glándula es ciliado y contiene una estructura que se tiñe de color rosa intenso y aparentemente forma parte de la cubierta exterior de los espermatozóicos, y que por la tonalidad que adquiere con la tinción, indica que se trata de una estructura con pH básico (Figura 28).

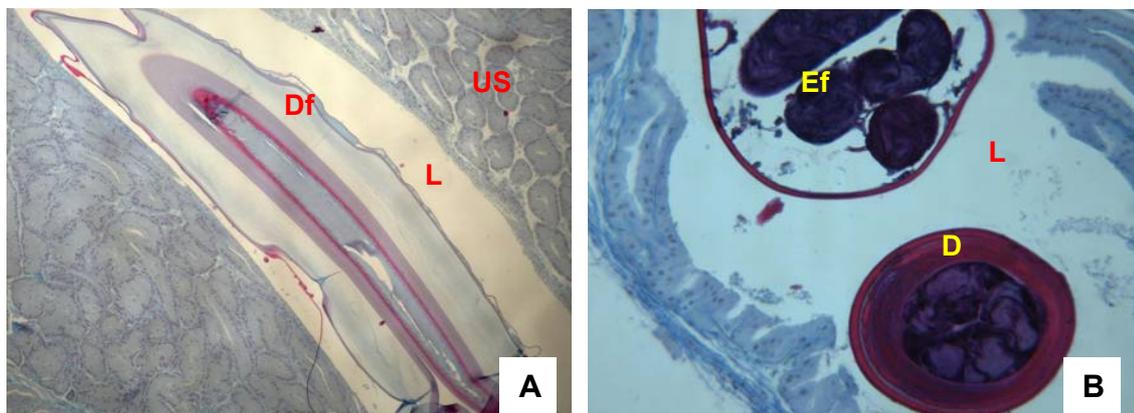


Figura 28. Glándula accesoria espermática de un macho de *Octopus rubescens*. A; cubiertas del espermátforo en el lumen de la glándula, 40x. B; espermátforos en formación, 100x. Df, cubierta del espermátforo en formación; D, cubierta del espermátforo; L, lumen de la glándula; US, unidades secretoras; Ef, espermátforos en formación. Tinción tricrómica de Arteta.

Los espermátforos una vez formados, son depositados y almacenados en el saco de Needham. Este órgano esta constituido por epitelio simple cilíndrico ciliado con abundantes pliegues a lo largo de su estructura rodeados por tejido conjuntivo compuesto por colágeno principalmente (Figura 29A). Cuando los organismos están maduros, los espermátforos son almacenados en este órgano en posición paralela entre si (Figura 29B).

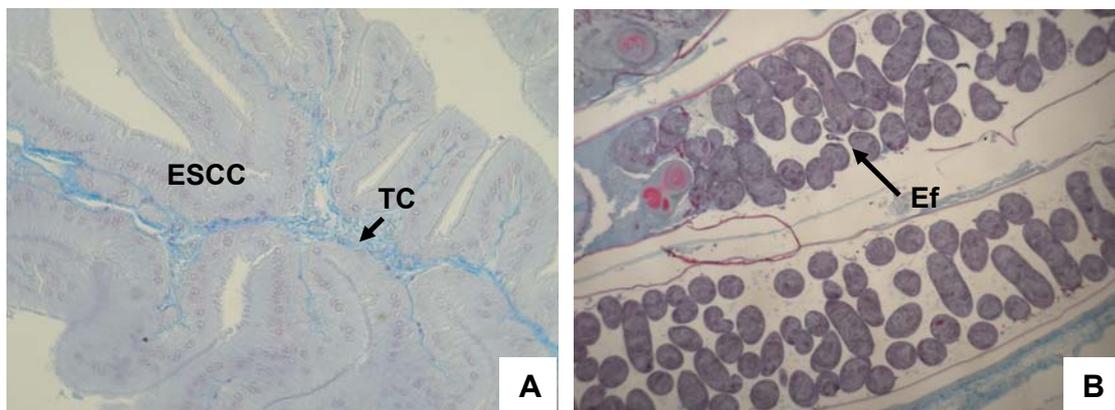


Figura 29. Saco de Needham de los machos de *Octopus rubescens*. A, sección del saco de un individuo sin espermatozoides almacenados, que muestra abundantes pliegues en el epitelio que lo constituye. 40x. B, espermatozoides almacenados en el saco, 40x. ESCC, epitelio simple cilíndrico ciliado; TC, tejido conectivo; Ef, espermatozoides almacenados. Tinción tricrómica de Arteta.

Los espermatozoides tienen forma cilíndrica (Figura 30A), en su interior se encuentran un cúmulo de espermatozoides muy compactados y arreglados en forma de hélice (Figura 30B), seguido de una sección de menor grosor, en la cual no se observan espermatozoides, pero sí otras estructuras. Todo el espermatozoides está envuelto por una misma cubierta.

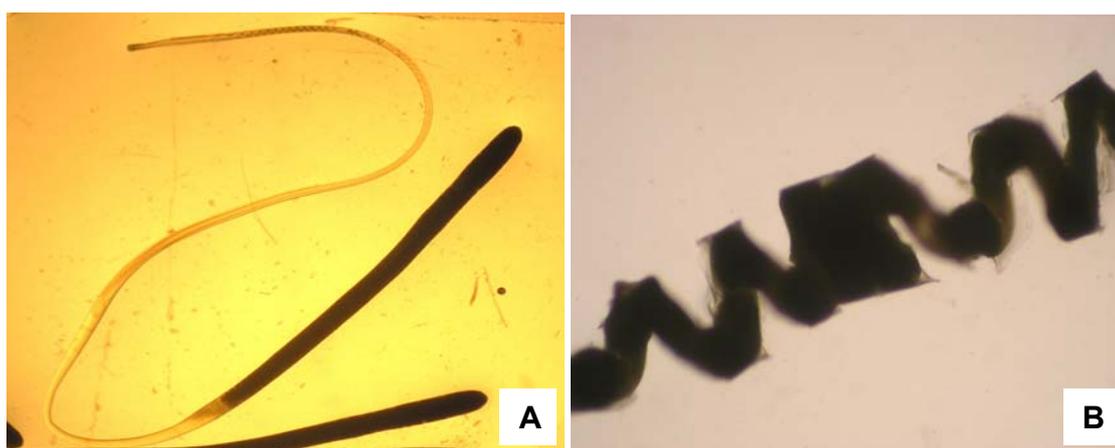


Figura 30. Espermatozoides fijados de un macho de *Octopus rubescens*: A; espermatozoides completos y B; hélice de espermatozoides estirada.

Finalmente, los espermátóforos pasan a lo largo del ducto excurrente, cuyo lumen es ciliado, para ser expulsados a través de la apertura final de éste órgano. Este conducto está constituido por músculo liso. Las fibras que lo componen son paralelas entre sí y poseen núcleos grandes y centrales (Figura 31).

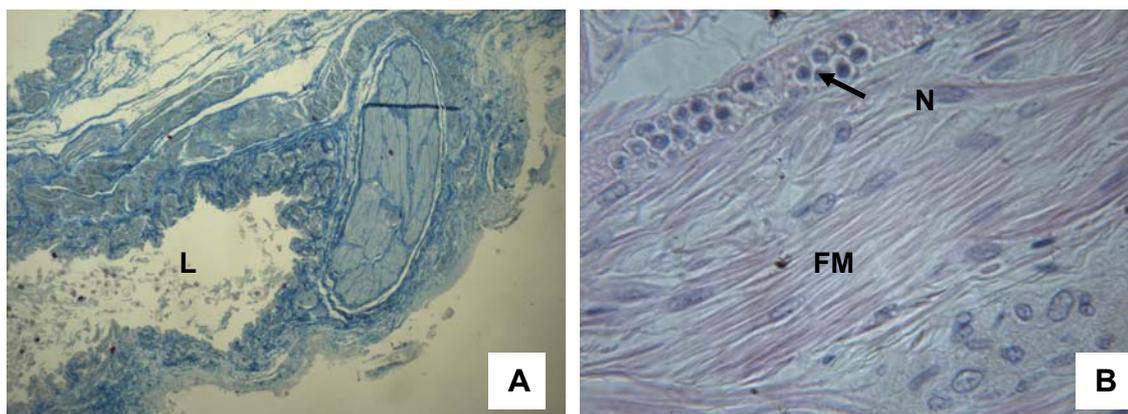


Figura 31. Ducto excurrente de un macho de *Octopus rubescens*. A, porción distal del ducto excurrente, 40x. Tinción tricrómica de Arteta. B, ampliación de una sección del ducto excurrente constituido por músculo liso, 400x. Tinción Hematoxilina-Eosina. FM, Fibras musculares; N, núcleos.

V.5 Escala de madurez para los machos de *Octopus rubescens*

Entre los criterios microscópicos tomados en consideración para la asignación del estadio de madurez sexual de los machos de *O. rubescens*, se encuentran los tipos celulares y sus proporciones, el tejido conectivo presente, la presencia de espermatozoides en el ducto espermático, los espermátóforos en formación en las glándulas espermatóforica y la accesoria espermática, espermátóforos maduros en el saco de Needham y espermátóforos en el ducto excurrente. De acuerdo a estos criterios se establecieron los siguientes cuatro estadios de madurez para los machos de *O. rubescens*:

Estadio 1. Inmaduros

Los túbulos seminíferos son pequeños pero bien definidos. Predominan las espermatogonias, también se encuentran unos cuantos espermatocitos al centro

del túbulo. Entre los túbulos se puede observar tejido conectivo principalmente compuesto por colágeno (Figura 32).

Se encontraron cinco ejemplares en esta condición, en los que el peso corporal varió de 9.4 a 43.5 g y el ancho del aparato reproductor fue de 4.39 a 20.09 mm. El individuo de menor peso, no fue el que presentó el aparato reproductor más pequeño, sin embargo, el de mayor peso tuvo el aparato reproductor de mayor tamaño.

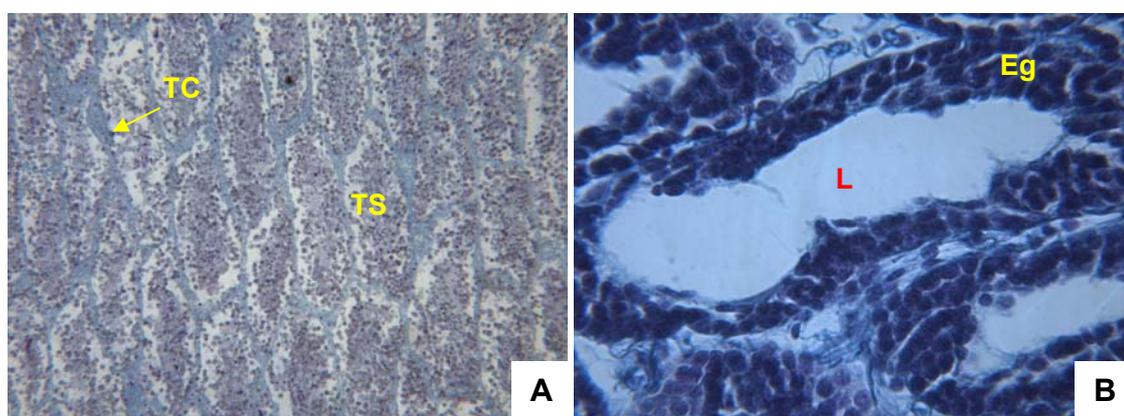


Figura 32. Corte longitudinal del testículo de *Octopus rubescens*. A, túbulos seminíferos con predominio de espermatogonias, limitados por tejido conectivo, 400x. B, túbulo seminífero con el lumen vacío y solo células germinales, 400x. TS, túbulos seminíferos; Eg, espermatogonias; TC, tejido conectivo y L, lumen. Tinción tricrómica de Arteta

Estadio 2. En maduración A

Los túbulos seminíferos aparentemente incrementaron su tamaño, debido a la producción de nuevas células, y el tejido conectivo no es tan evidente. Se observan espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y abundantes espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos. Pero todavía no se aprecian espermatozoides fuera del testículo (Figura 33).

Se observaron siete individuos en este estadio, con un peso corporal de 7.2 a 25.9 g, el ancho del aparato reproductor varió de 7.6 a 11.88 mm, estas medidas no corresponden al individuo de menor y mayor peso, respectivamente.

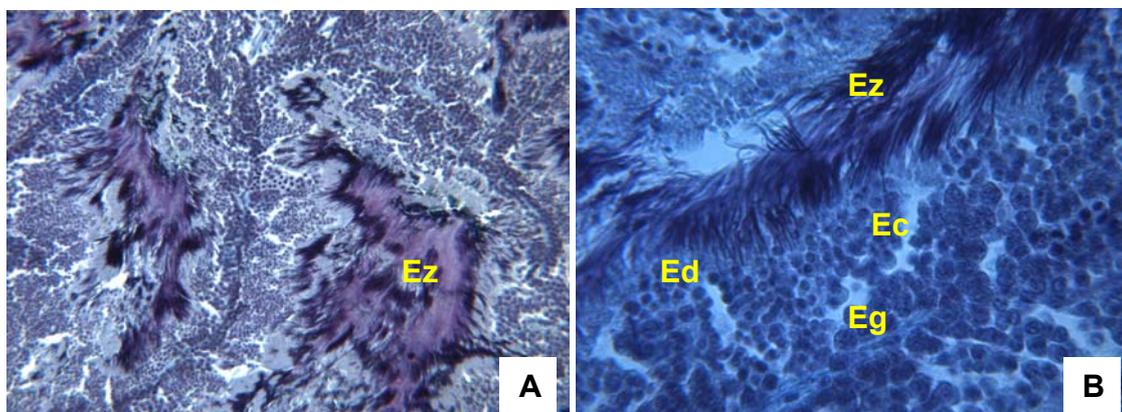


Figura 33. Corte longitudinal del testículo de *Octopus rubescens*. A, túbulos seminíferos con abundantes espermatozoides en el lumen, 100x. B, sección de un túbulo seminífero donde se muestran todos los tipos celulares, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermátidas y Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 3. En maduración B

Se encuentran todos los tipos celulares, con una gran cantidad de espermatozoides al centro de los túbulos (Figura 34A). Los espermatozoides han sido vertidos al ducto espermático, donde serán conglomerados (Figura 34B). También se pueden encontrar espermatóforos en formación en las glándulas espermatóforica y la accesoria espermática. Sin embargo, aun no se presentan espermatóforos en el saco de Needham.

Se identificaron siete individuos en este estadio con un peso corporal de 6.7 a 64.4 g con un ancho del aparato reproductor de 6.01 y 18.36 mm. El aparato reproductor de menor anchura perteneció al pulpo de menor peso, de igual manera el organismo con mayor peso presentó el aparato reproductor más grande.

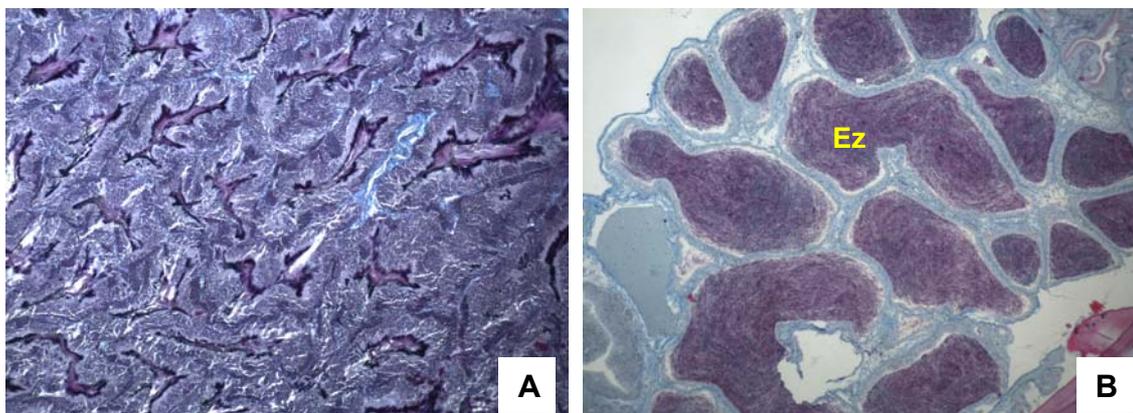


Figura 34. Corte longitudinal del aparato reproductor masculino de *Octopus rubescens*. A, sección del testículo con abundante producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos, 40x. B, sección del ducto espermático lleno de espermatozoides, 100x. Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta

Estadio 4. Maduro tipo 1

En este estadio se pueden encontrar todos los tipos celulares, aunque los espermatozoides son los más abundantes (Figura 35A). Se encuentran con frecuencia espermatozoides en el ducto espermático y espermatóforos en formación en las glándulas espermática y la accesoria espermática. Se observan abundantes espermatóforos maduros almacenados en el saco de Needham (Figura 35B). En este estadio se encontraron siete individuos, con un peso corporal que va de 33.5 a 188.6 g, y un ancho del aparato reproductor de 13.03 y 24 mm, el aparato reproductor de mayor tamaño corresponde al organismo de mayor peso.

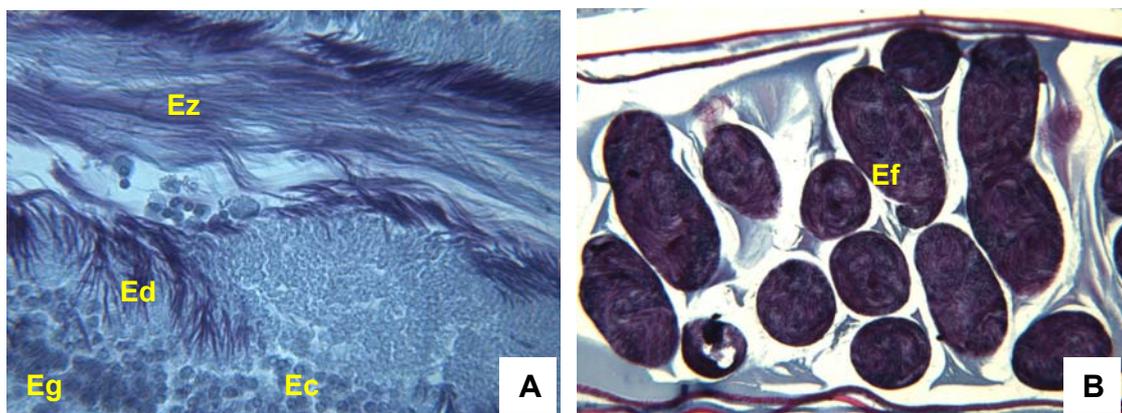


Figura 35. Sección del corte longitudinal del aparato reproductor masculino de *Octopus rubescens*: A; sección de un túbulo seminífero con abundantes espermatozoides en el lumen, 400x. B; sección de un espermátido maduro almacenado en el saco de Needham, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermátidas; Ez, espermatozoides y Ef, espermátido. Tinción tricrómica de Arteta

Estadio 5. Maduro tipo 2

Los túbulos seminíferos tienen un aspecto flácido y deteriorado. Se observan escasas espermatogonias, incluso en algunos organismos parecen estar ausentes. También se observan espermatocitos y espermátidas. Los espermatozoides, aunque pocos, en comparación con el Estadio 4, son los que predominan en este estadio (Figura 36A). Sin embargo, en el saco de Needham se observan abundantes espermátidos (Figura 36B).

Se encontraron nueve individuos en este estadio, los cuales tuvieron un peso corporal de 24.2 a 543.4 g, mientras que el ancho del aparato reproductor fue de 6.08 a 27.36 mm. El aparato reproductor más pequeño corresponde al individuo de menor tamaño.

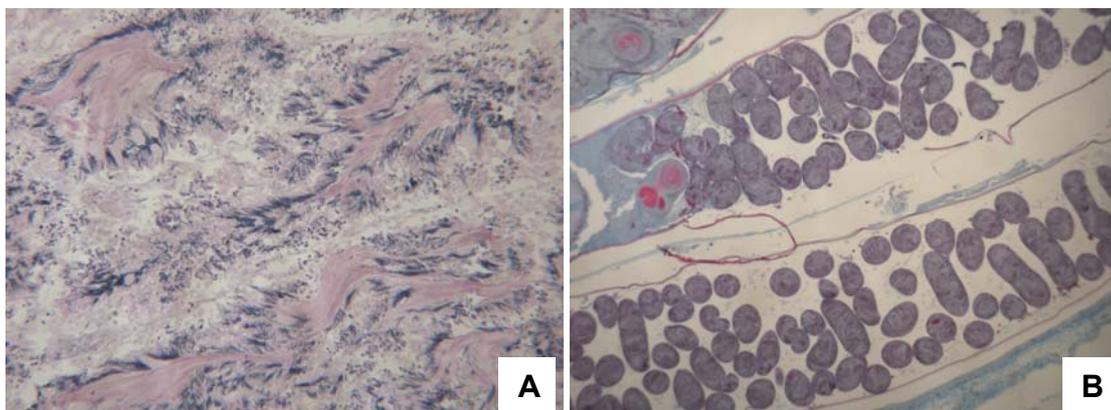


Figura 36. Corte longitudinal del aparato reproductor masculino de *Octopus rubescens*: A; sección del testículo que muestra los túbulos seminíferos desorganizados, con un aspecto flácido, 100x. Tinción Hematoxilina-Eosina. B; sección del saco de Needham, con espermatozoides almacenados, 40x. Tinción tricrómica de Arteta

V.6 Escala de madurez para los machos de *Octopus bimaculoides*

Para la asignación de los estadios de madurez de los machos de *O. bimaculoides* se tomaron en consideración los mismos criterios que para *O. rubescens*, entre los cuales se encuentran los tipos celulares y sus proporciones, presencia de espermatozoides en el ducto espermático, los espermatozoides en formación en las glándulas y los espermatozoides maduros almacenados en el saco de Needham.

Con base en lo anterior, se pudieron establecer tres estadios para los 10 machos analizados en este estudio, de los cuales, siete ejemplares estaban en el estadio Inmaduro, 2 En maduración B y solo 1 en Maduro tipo 1.

Estadio 1. Inmaduro

Los túbulos seminíferos están bien definidos. Predominan las espermatogonias y en algunos casos se pueden observar espermatozoides al centro del folículo (Figura 37). El resto de los órganos del aparato reproductor tienen poco desarrollo. Se encontraron siete ejemplares en esta condición, en los que el

peso corporal varió de 6.1 a 86.6 g y el ancho del aparato reproductor fue de 2.03 a 17.22 mm. El ejemplar de mayor peso tuvo el aparato reproductor más grande.

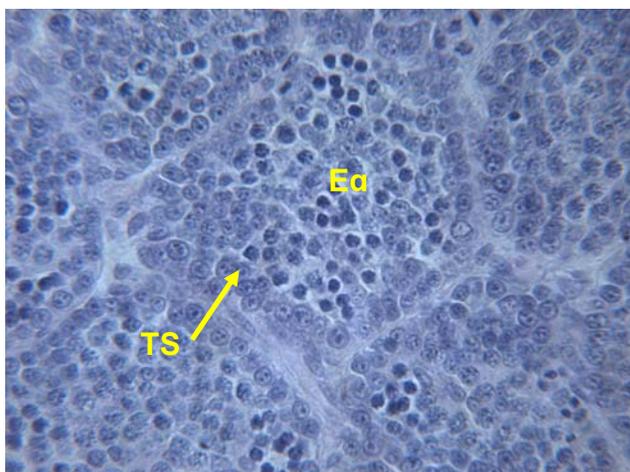


Figura 37. Corte longitudinal del testículo de un macho de *Octopus bimaculoides*, 40x. TS, túbulo seminífero; Eg, espermatogonias. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Estadio 3. En maduración B

Se observan todos los tipos celulares, espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides, siendo estos últimos los más abundantes en el lumen del túbulo seminífero (Figura 38). En este estadio, los espermatozoides no solo se encuentran en el testículo, sino también fuera de él, en el ducto espermático e incluso se pueden observar espermátóforos en formación en las glándulas espermátóforica y la accesoria espermática. Pero aun no se observan espermátóforos maduros almacenados en el saco de Needham. El peso de los dos organismos identificados en este estadio fue de 57.8 y 64.1 g, con un ancho del aparato reproductor de 19.18 y 12.62 mm, respectivamente.

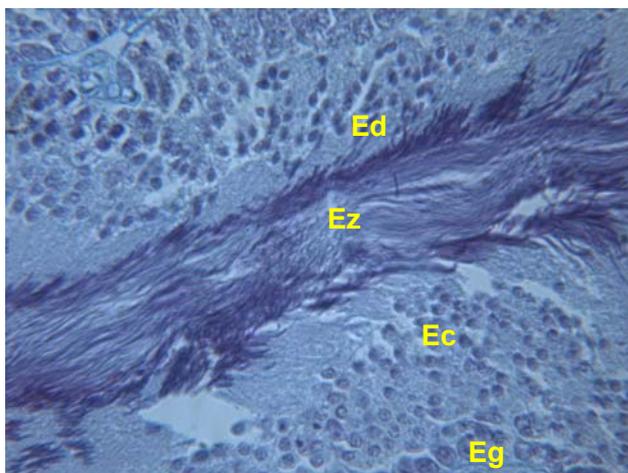


Figura 38. Corte longitudinal del testículo de un macho de *Octopus bimaculoides*, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos, Ed, espermátidas; Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.

Estadio 4. Maduro tipo 2

Los túbulos seminíferos tienen un aspecto flácido. Se pueden observar espermatozoides en el ducto espermático y espermátóforos en formación en las glándulas espermáticas y la accesoria espermática (Figura 39). En el saco de Needham se observan abundantes espermátóforos almacenados.

El organismo analizado en este estadio tuvo un peso de 33.6 g y el ancho gonadal fue de 10.89 mm.

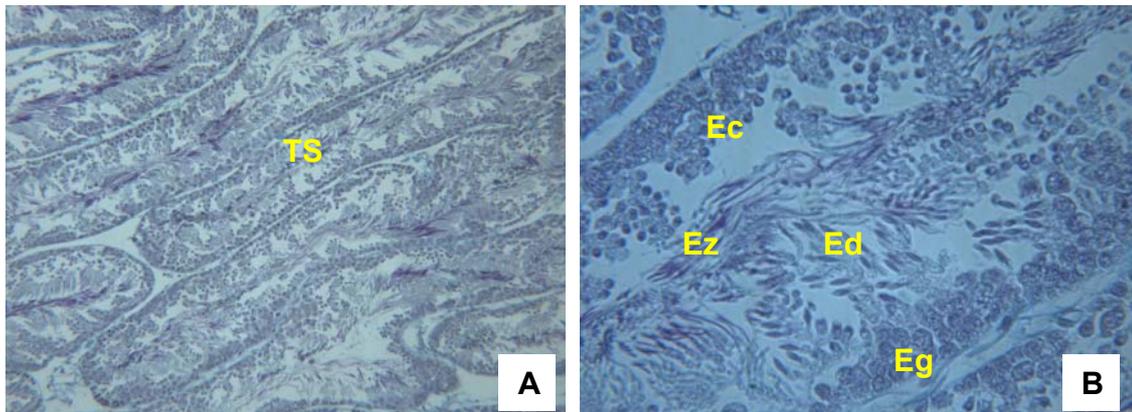


Figura 39. Corte longitudinal del testículo de un macho de *Octopus bimaculoides*. A, túbulos seminíferos con aspecto flácido, 40x. B, ampliación de un túbulo seminífero y sus componentes celulares, 400x. Eg, espermatogonias; Ec, espermatocitos; Ed, espermátidas Ez, espermatozoides. Tinción tricrómica de Arteta.

VI. Discusión

Se han realizado diversos estudios acerca de la biología reproductiva de los pulpos. Sin embargo, la información existente no es suficiente para cerrar exitosamente su ciclo de vida en condiciones de laboratorio, además son muy pocas las especies que han sido objeto de estudio.

Este trabajo resulta novedoso en el sentido de que no se cuenta con la información biológica básica suficiente de las principales especies que se distribuyen en la región de Ensenada e incluso no existe ningún estudio a cerca de la biología reproductiva sobre la especie *O. rubescens*. Por lo tanto es de suma importancia sentar las bases biológicas para conocer a las especies y comprender como pueden responder a condiciones de cautiverio, para futuras investigaciones y cultivos experimentales.

De acuerdo con el primer objetivo planteado, se logró describir de manera general el aparato reproductor de las hembras y los machos de ambas especies. En las hembras consta de un ovario en forma oval envuelto por una túnica albugínea. En la pared ventral del ovario se observa una abertura que da origen a un oviducto en común, lo cual coincide con la descripción de Olivares-Paz *et al.* (2003) en *O. mimus*. Contrariamente Price (1959) observó en *O. bimaculoides* que el oviducto común emerge desde el interior del ovario. El oviducto común se bifurca para formar un par de oviductos, en los cuales se observan las glándulas oviductales, en un arreglo similar al de *O. vulgaris* (Wells, 1977), *O. mimus* (Olivares-Paz, 2001) y *E. cirrhosa* (Álvarez-Pérez y Haimovici, 1991). Sin embargo el sistema reproductor femenino de las diferentes especies de cefalópodos no tiene la misma estructura. En los calamares myopsidos al igual que en las sepias y en los pulpos cirrinos, el aparato reproductor consta de un ovario y un solo oviducto con una glándula oviductal (Budelmann, 1997 y Boyle y Rodhouse, 2005).

En los calamares el ovario es cónico, y en las especies del Suborden Myosida solo se desarrolla un oviducto y tres tipos de accesorios glandulares; glándulas oviductales, glándulas nidamentales y accesorios nidamentales. Mientras que en el resto (Suborden Oegopsida) se desarrollan dos oviductos y las glándulas oviductales y nidamentales (Arkhipkin, 1992).

El aparato reproductor de las sepias es mas complejo que el de los pulpos, las glándulas oviductales se encuentran en la parte final del ducto distal, además tienen glándulas nidamentales y accesorios de las glándulas nidamentales (Arkhipkin, 1992).

Las glándulas oviductales de *O. rubescens* y *O. bimaculoides* tiene forma esférica y aplanada en los polos. No se observó ningún ensanchamiento aparente en la comunicación del oviducto proximal y distal con esta glándula, descrito anteriormente por Price (1959) en *O. bimaculoides*, tampoco el ensanchamiento en la porción media-distal del oviducto distal, que menciona este autor. El oviducto distal conservó una anchura aproximadamente uniforme a lo largo de toda su estructura.

El análisis histológico de los órganos que integran el aparato reproductor de los pulpos, provee una adecuada definición del proceso de maduración y permite la adquisición de conocimiento básico de la biología reproductiva de estas especies, además de una mayor precisión para determinar el estadio de madurez en el que se encuentra el organismo.

La observación histológica del ovario en los pulpos *O. rubescens* y *O. bimaculoides*, coincide con lo descrito por Price (1959) e Ishiyama (2001) para *O. bimaculoides*, *O. mimus*, respectivamente, y por Khallahi (2001) y Jiménez-Badillo *et al.* (2008) para *O. vulgaris*. De acuerdo con estos autores la membrana que rodea al ovario esta compuesta por tejido conjuntivo con proyecciones hacia el centro del ovario, en las cuales se alojan las células germinales y se desarrollan los ovocitos. Estos autores también detallan la presencia de tejido ricamente vascularizado, como vasos hemolinfáticos y leucocitos. Además Olivares (2003) menciona que internamente el ovario está tapizado por un epitelio simple

prismático con microvellosidades. Estas características no se lograron observar en este estudio lo que probablemente se deba al plano en el que se hizo el corte y a que las técnicas empleadas no permitieron su observación.

Las tinciones empleadas resaltaron una evidente diferencia entre los tejidos periférico y central de la glándula oviductal, debido al tipo de sustancias que secreta cada sección, sin embargo, estas técnicas no permiten identificar el tipo de sustancia que se trata, ya que para ello se requieren técnicas específicas que permitan la detección de estos compuestos. Wells (1960), Froesch y Marthy (1975) y Grubert y Wadley (2000) lograron identificar mediante técnicas histoquímicas convencionales, que la periferia de la glándula oviductal se secreta una mucoproteína, que sirve para fijación de los huevos al sustrato (Boyle y Rodhouse, 2005), mientras que el centro se secreta un mucopolisacárido que polimeriza la mucoproteína (Boyle y Rodhouse, 2005).

Price (1959) menciona que las láminas que forman el epitelio glandular de la glándula oviductal están formadas por hojas de un epitelio alto pseudo estratificado simple o ciliado, rodeadas de tejido conectivo. La descripción de este autor difiere con lo observado en las muestras de tejido de *O. rubescen* y *O. bimaculoides*, debido a que las laminas del epitelio glandular o unidades secretoras están formadas por unidades secretoras de células ciliadas cilíndricas y no por un epitelio pseudoestratificado. Incluso González *et al.* (2008) mencionan que el tejido esta vascularizado, lo cual no se observó en este estudio, pero sí se observó el tejido muscular que rodea el lumen de esta glándula.

Se confirmó la presencia de espermatecas en las glándulas oviductales, tal como la han señalado otros autores (Froesch y Marthy, 1975, Rodríguez-Rua 2001 y Grubert y Wadley, 2000) y en algunos ejemplares, se observaron espermatozoides almacenados en las espermatecas. Cabe aclarar que no todos los cefalópodos comparten esta estrategia reproductiva. Las especies del género *Eledone* carecen de espermatecas, los espermatozoides se observan en la cavidad del ovario, que es el sitio de fecundación de los óvulos (Froesch y Marthy, 1975, Budelmann, 1997 y Boyle y Rodhouse, 2005). En la especie *Vulcanuptopus*

hidrotermales se desconoce el proceso de fecundación de los óvulos debido a que las hembras no tiene espermatecas en las glándulas oviductales ni se han observado espermatozoides en la cavidad ovárica (González *et al.* 2008). Sin embargo, en las sepias, los loliginidos y en algunos calamares oegopsidos se pueden observar los espermatozoides almacenados bajo la boca, mientras que los calamares sepiolidos los almacenan en la cavidad del manto (Budelmann, 1997).

Se confirmó la presencia de células ciliadas a lo largo del lumen del oviducto proximal y distal, así como la composición muscular de estos órganos, tal como lo describió Price (1959).

El proceso de maduración de los ovocitos es muy similar en las hembras de los cefalópodos. Las células germinales se originan en el estroma ovárico, donde se desarrollan y maduran. La característica distintiva y peculiar en la ovogénesis en los cefalópodos, en particular de los pulpos, es la formación de una segunda capa de células foliculares y la invaginación folicular, donde se efectúa la secreción del vitelo (Well, 1960). Por lo tanto, aunque hay mucha discrepancia en el número de estadios establecidos y en la nomenclatura asignada, la mayoría coinciden en establecer un estadio para la formación del folículo secundario, el cual, en estadios posteriores es desplazado por el corion del óvulo (Boyle y Knobloch, 1983, Arkhipkin, 1992, Ishiyama *et al.*, 1999, Khallahi, 2001, Olivares *et al.*, 2001, Rodríguez-Rua *et al.*, 2005, Boyle y Rodhouse, 2005, Idrissi *et al.*, 2006, Jiménez-Badillo *et al.*, 2008, Gabr, 1998)

Cabe señalar que este trabajo se realizó con organismos muy pequeños, la mayoría de ellos con un peso húmedo menor a los 100g, sin embargo, se observó un número importante de organismos maduros o con un alto grado de madurez. La hembra madura de *O. rubescens* más pequeña tuvo un peso de 22.8 g, incluso se observó una hembra desovada cuyo peso fue de 33.2 g. La mayor parte de los autores (Cortez *et al.*, 1995; Rodríguez-Rua *et al.*, 2005; Leporati *et al.*, 2008; Jiménez-Badillo *et al.*, 2008) que han estudiado la madurez en especies como *O. vulgaris* y *O. mimus*, lo han observado en las hembras maduras con un peso superior a los 200 g, sin embargo estas especies alcanzan un peso promedio

mayor de *O. rubescens* y *O. bimaculooides*, lo que puede influir en la estrategia reproductiva empleada al madurar a tallas muy tempranas, lo cual no indica que estas hembras estén listas para copular.

El aparato reproductor de los machos es más complejo que el de las hembras. Diversos autores han diferido en la nomenclatura de los órganos que lo componen, excepto por el testículo y el saco de Needham. El ducto espermático, nombre que se le asignó en este trabajo al conducto que se origina en el testículo y que en la literatura relacionada se menciona en forma común como “ductos espermáticos”, haciendo alusión a varios ductos y no a uno solo. Es probable que esta nomenclatura se deba a que es un ducto muy enrollado y compactado, por lo que es difícil su observación individual. Price (1959) describe este mismo órgano indistintamente como vaso deferente proximal o ducto espermático, mientras que Boyle y Rodhouse (2005), señalan que la región distal de este órgano se localiza entre la glándula espermatofórica y la glándula accesoria espermática. Price (1959) e Ishiyama (1999) señalan que el ducto espermático o vaso deferente distal se encuentra comunicando a la glándula accesoria espermática con el saco de Needham, lo cual coincide con lo señalado por Álvarez y Haimovici (1991), Arkhipkin (1992) y Budelmann *et al.* (1997).

En relación a las glándulas que componen el aparato reproductor masculino de los pulpos, algunos autores como Boyle (1991) adoptaron la nomenclatura establecida por Brock (1992), quien denominó como glándula espermatofórica a la glándula más próxima al ducto espermático y como glándula accesoria espermática a la siguiente (Price, 1959).

Otros autores como Álvarez y Haimovici (1991), Boyle y Knobloch (1991), Budelmann *et al.* (1997) y Boyle y Rodhouse (2005), mencionan a las glándulas espermatofórica y accesoria espermática como sistema glandular I y sistema glandular II, respectivamente. Incluso Budelmann *et al.* (1997) las denominaron como vesícula seminal a la glándula espermatofórica, al igual que Ishiyama (1999) y como próstata a la glándula accesoria espermática. Probablemente las glándulas espermatofórica y la accesoria espermática realicen una función similar a la

vesícula seminal y a la próstata, respectivamente, la de producir el líquido seminal que nutre y protege a los espermatozoides. Sin embargo, no es apropiado referirse a estas glándulas bajo esos términos, debido a que no se ha confirmado la secreción de las sustancias que componen del líquido seminal, solo se presume que secretan algún tipo de mucus.

El órgano más distal que compone el aparato reproductor de los machos es comúnmente denominado como pene (Solís-Ramírez, 1967, Ishimaya, 1999, Hochberg *et al.*, 2006, Leoporati, 2008, Wodinsky, 2008), sin embargo, en el presente estudio se adoptó la nomenclatura propuesta por Boyle y Knobloch (1984) y Boyle y Rodhouse (2005), quienes señalan a este órgano como ducto excurrente y no pene, debido a que no tiene la función de un órgano intromitente, por lo tanto es erróneo llamarlo de esa manera. Sin embargo, en unas cuantas especies de calamares (*Onychoteuthis sp.*) el órgano final del aparato reproductor de los machos es muy largo y funciona como un pene, debido a que los espermátóforos se transfieren directamente a la hembra mediante este órgano (Arkhipkin, 1992).

Aunque el sistema reproductor de los machos es muy complejo y hay una gran discrepancia en cuanto a la nomenclatura de los órganos que lo componen, estructuralmente hay una mayor uniformidad entre las especies de cefalópodos, en comparación con las hembras (Arkhipkin, 1992).

Diversos autores coinciden en que en los machos, el testículo está constituido por numerosos túbulos seminíferos, donde se producen los espermatozoides y que estos túbulos están rodeados de tejido conectivo (Budelmann, 1997, Olivares 2003, Ávila-Poveda *et al.* 2009) incluso hay quienes han observado que este tejido está compuesto por vasos hemolinfáticos y células intersticiales (Price, 1959, Khallahi, 2001). En contraste, Ishiyama *et al.* (1999) no observó túbulos seminíferos en el testículo de *O. mimus* pero sí pliegues en la pared de la gónada, lugar donde se realiza la espermatogénesis.

La composición histológica del ducto espermático de *O. rubescens* y *O. bimaculoides* coincide con la descrita por Price (1959) para *O. bimaculoides*, quien

no detectó secreciones mucosas en este órgano, a pesar de que deduce que los espermatozoides son conglomerados o empaquetados. También coincide con la descripción de la glándula espermatorfórica, la cual es muy compleja y su composición varía longitudinalmente. El autor confirmó la secreción de mucus en las diferentes porciones de esta glándula. El tejido que constituye a la glándula accesoria espermática también es similar al descrito por este autor, solo que él le denomina túbulos secretores y no unidades.

La morfología general y la composición histológica del saco de Needham en *O. bimaculoides* descritas por Price (1959), coincide con las observadas en las muestras de *O. rubescens* y *O. bimaculoides*, solo que este autor no hace énfasis en los numerosos pliegues ni en el abundante tejido conjuntivo que los rodea

La forma y estructura del espermatóforo maduro coincide con la que fue descrita para *O. dofleini martini* (Boyle, 1991; Boyle y Rodhouse, 2005). La parte media del espermatoforo contiene el aparato eyaculador, que por medio de la “reacción espermatorfórica”, libera los espermatozoides, este proceso ocurre en los oviductos distales (Froesch y Marthy, 1975). Los espermatóforos son evacuados peristálticamente por el tejido muscular que conforma al ducto excurrente (Price, 1959). Sin embargo, no todos los cefalópodos forman espermatóforos, por ejemplo los pulpos incirrininos forman paquetes de espermatozoides en lugar de espermatóforos (Arkhipkin, 1992). Los espermatóforos son bombeados peristálticamente por el tejido muscular que conforma al ducto excurrente (Price, 1959 y Boyle 1991).

En relación con la asignación de los estadios de madurez en la espermatogenesis de los machos, considerando que los machos se encuentran maduros a lo largo de toda su vida y que el proceso es menos complejo que en las hembras, la mayoría de los estudios establecen básicamente cuatro estadios: inmaduro, en maduración, maduro y desovado, que en este caso, el mejor término sería eyaculado. La característica comúnmente usada para determinar que un organismo está maduro, es la presencia de espermatóforos almacenados en el

saco de Needham (Moriyasu, 1988; Ezzeddine-Najai, 1997; Olivares *et al.* 2003; Rodríguez-Rua, 2005; Jiménez-Badillo *et al.* 2008)

Gran parte de los estudios reproductivos de los machos en diferentes especies de pulpo (Boyle y Knobloch, 1984; Cortez *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004; Rodríguez-Rua *et al.*, 2005; Akyol, 2007; Leporati *et al.*, 2008) coinciden en que estos maduran más rápido que las hembras. El tamaño de los organismos es una característica importante que se debe tomar en cuenta, ya que los trabajos se han realizado con organismos de mayor tamaño que los utilizados en este estudio, donde el intervalo de peso fue de 3.3 a 54.2 g, en *O. rubescens*, y de 6.1 a 86.6 g en *O. bimaculoides*. También Ávila-Poveda *et al.* (2009) trabajaron con pulpos en etapas tempranas del desarrollo y encontraron machos maduros de *O. maya* a partir de los 7.29 g de peso.

El examen histológico es un proceso largo y no práctico en campo, sin embargo, es la herramienta más confiable para estimar con mayor precisión el estado de madurez en el que se encuentran los organismos. Por lo tanto, diversos autores han propuesto diferentes escalas de madurez con base a sus propios criterios y al cálculo de diversos índices, principalmente el índice de condición y el gonadosomático e incluso utilizan escalas propuestas por otros autores.

El presente trabajo brinda una visión más amplia de cómo es la estructura macroscópica y microscópica del sistema reproductor de *O. bimaculoides* y *O. rubescens*. Además de proponer una escala microscópica sencilla que puede ser utilizada para determinar el grado de madurez en el que se encuentran estos organismos en investigaciones posteriores. Asimismo, la descripción histológica de *O. bimaculoides* complementa y amplía la información descrita por Price (1959) para esta misma especie. En *O. rubescens*, este trabajo constituye la primera descripción del desarrollo gonádico.

VII. Conclusiones

- El aparato reproductor femenino presenta diferencias estructurales entre las especies de cefalópodos. En los pulpos incirrinos la composición del aparato reproductor es muy similar, consta de un ovario, un oviducto común que se bifurca inmediatamente para formar dos oviductos paralelos entre si, en los cuales se observan las glándulas oviductales.
- El ovario presenta una túnica albugínea similar a la del testículo de los machos, la cual emite proyecciones al interior del ovario en forma de ramificaciones, donde se originan las células germinales y se desarrollan los ovocitos.
- En las muestras histológicas de las glándulas oviductales se observó una clara diferencia en el tejido periférico y central que compone a este órgano, sin embargo con las técnicas empleadas no se pudo identificar el tipo de sustancia que secreta cada sección de esta glándula. Además se observó la presencia de espermatecas en las glándulas oviductales así como espermatozoides libres almacenados en ellas.
- Existe una gran discrepancia entre la nomenclatura asignada a los órganos que integran el aparato reproductor masculino, sin embargo, estructuralmente hay una mayor uniformidad entre las diversas especies de cefalópodos machos, en comparación con las hembras.
- El testículo esta envuelto en una túnica albugínea que irradia tejido conectivo al centro del testículo y delimitan los túbulos seminíferos.
- La glándula espermatóforica es una glándula muy compleja y su estructura varia a lo largo de toda su organización.

- El proceso de formación de los espermátóforos es muy complejo e intervienen varios órganos, además su estructura también es muy compleja y poco estudiada.
- La especie *O. rubescens* tiende a madurar a etapas muy tempranas de su desarrollo.

VIII. Recomendaciones

- Debido a la organización de la glándula oviductal del sistema reproductor de las hembras, se recomienda que el estudio a nivel histológico se efectúe en cortes seriados y en diferentes planos de la glándula, con la finalidad de conocer su estructura tridimensional, y conocer el acomodo de los tejidos que la integran, así como la forma de las espermatecas.
- Es recomendable realizar cortes seriados y en diferentes planos de la glándula espermatofórica de los machos, para conocer la estructura de los tejidos que la integran y su composición tridimensional. Además de aplicar técnicas histoquímicas para conocer que tipo de sustancia es la que secreta cada sección para la formación del espermátforo.
- Realizar cortes consecutivos de la glándula accesoria espermática de los machos para conocer su estructura tridimensional y comprender el proceso por el cual es añadida la cubierta final al espermátforo. Además de utilizar algunas técnicas histoquímicas para determinar el tipo de sustancias que componen la cubierta del espermátforo.
- Aplicar técnicas histoquímicas para identificar el tipo de sustancias que secreta el saco de Needham para mantener a los espermátforos viables.
- Determinar en que momento y que glándula es la encargada de formar el aparato eyaculador del espermátforo.
- Estudiar la estimulación de la reacción espermática en los ductos espermáticos.

- Evaluar en las glándulas oviductales el mecanismo que permite a los espermatozoides llegar a la glándula y su almacenamiento en las espermatecas.
- Identificar el mecanismo o las sustancias que se sintetizan para la inmovilización de los espermatozoides en las espermatecas, así como su reactivación al momento de la fecundación.

IX. Literatura citada

- Akyol O.; Şen H. y Kınacıgil, H.T. 2007. Reproductive biology of *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Aegean Sea (Izmir Bay, Turkey) *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 87: 967–970 p.
- Alejo-Plata, M.C. y Cerdaneres-Ladrón de Guevara, G. 2002. Caracterización de la pesca de pulpo (Cephalopoda: Octopoda) en las costas de Oaxaca, México. Mem. I Foro Científico de Pesca Ribereña. 17-18 de octubre de 2002. INP CRIP Guaymas, Sonora
- Altman, J.S. y Nixon, M. 1970. Use of the beaks and radula by *Octopus vulgaris* in feeding. *Journal of Zoology*, London, 161: 25-38 p.
- Álvarez-Pérez, J.A. y Haimovici, M. 1991. Sexual Maturation and Reproductive Cycle of *Eledone Massyae*, Voss 1964 (Cephalopoda: Octopodidae) in Southern Brazil. *Bulletin of Marine Science*. 49 (1-2): 270-279 p.
- Anuario Estadístico de Pesca. 2003. SEMARNAP. CONAPESCA. México.
- Anuario Estadístico de Pesca. 2007. SEMARNAP. CONAPESCA. México.
- Arkhipkin, A.T. 1992. Reproductive System Structure, Development and Function in Cephalopods with a New General Scale for Maturity Stages. *J. Northw. All. Fish. Sci.*, 12: 63-74.
- Arnold, J.M. y Arnold, K.O. 1969. Some aspects of hole-boring predation by *Octopus vulgaris*. *American Zoologist* 9: 991-996 p.
- Ávila-Poveda, O.H.; Colin-Flores, R.F. y rosas, C. 2009. Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216: 94-102 p.
- Barrat, I.M.; Johnson, M.P. y Allcock, A.L. 2007. Fecundity and reproductive strategies in deep-sea incirrate octopuses (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology* 150: 387–398 p.

- Borges, T.C.; Erzini, K.; Gama, I.; Goncalves, I.A.; Pereira, A.; Raposo, C.; Sendão, J.C.; Ramos, F.; Silva, L. y Sobrino, I. 2000. Cephalopod resources dynamics and fisheries trends in the Algarve and Gulf of Cadiz. Reporte Final de la Comisión Europea DG de Pesca. Proyecto no. 97/0086. Centro de Ciencias del Mar, Universidad de Algarve, Portugal, e Instituto Español de Oceanografía, Unidad de Cádiz, España.
- Boucher- Rodini, R., Boucaud-Camou, E. y Mangold, K. 1987. Feeding and digestion. En P.R. Boyle (ed) *Cephalopod Life Cycles*. Comparative Reviews. 2: 85-108 p.
- Boyle, P.R. 1986. Responses to water-borne chemicals by the octopus *Eledone cirrhosa* (Lamarck 1798). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104: 23-30 p.
- Boyle, P.R. 1991. The care and management of cephalopods in the laboratory. UFAW Handbook. Longman, Harlow, UK, 63 pp.
- Boyle, P.R. y Knobloch, D. 1984. Male Reproductive Maturity in the Octopus, *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda:Octopoda). *F. mar. boil. Ass. UK*. 64:572-579 p.
- Boyle, P.R. y Rodhouse, P. 2005. *Cephalopods. Ecology and Fisheries*. 1st ed. Blackwell. 452 pp.
- Boyle, P.R. y Thorpe, R. 1984. Optic gland enlargement and female gonad maturation in a population of the octopus *Eledone cirrhosa*: a multivariate analysis. *Marine Biology* 79: 127-132 p.
- Brock, J. 1882. Zur Anatomie und Systematik der Cephalopoden. *Zeit. Wiss. Zool.*, 36: 543 p.
- Budermann, B.U. Schipp, R. y Boletzky, S.V. 1997. Cephalopoda. Harrison, F.W. y Kohn. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Volume 6A, FW Harrison & AJ Kohn (eds). New York: Wiley-Liss, 119-414 p.

- Bustamante, P., Cherel, Y., Caurant, F. y Miramand, P. 1998. Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. *Polar Biology*, 19: 264-271 p.
- Bustamante, P., Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Caurant, F. y Miramand, P. 2000. Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 688-696 p.
- Carta Nacional Pesquera. 2000. SAGARPA-INAPESCA.
- Carta Nacional Pesquera. 2006. CONPESCA-SAGARPA.
- Chase, R. y Well, M.J. 1986. Chemotactic behaviour in *Octopus*. *Journal of Comparative Physiology, A*, 158: 375-381p.
- Cifuentes Lemus, J.L.; Torres-García, P.; Frías-M.,M. 1995. El Océano y sus Recursos. VI. Bentos y Necton. En:
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/46/htm/oceno6.htm>. Consultado en Agosto de 2007.
- Cortez, T.; Castro, BG. Y Guerra, A. 1995. Reproduction and condition of the female *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology* 123: 505-510 p.
- Día M. y Gouttschine, A. 1990. Echelle de maturite sexuelle do poulpe (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) des eaux mauritaniennes. *Bulletin Scientifique CNROP*, 1(6).
- Ezzeddine-Najai, S. 1997. Maturation sexuelle d' *Eledone moschata* (Cephalopoda, Octopoda) du golfe de Gabes (Tunisie, Méditerranée Orientale). *Vie. Milieu*, 47 (1): 69-76 p.
- FAO. 2001. FAO Species Catalogue. Cephalopods of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Volumen 3.

- FAO. 2002. En; <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/ac479e/AC479E34.pdf>. Consultado en febrero de 2009.
- FAO. 2006. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma.
- Fiorito, G. y Gherardi, F. 1999. Prey-handling behaviour of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) on bivalve preys. *Behavioural Processes*, 46: 75-88 p.
- Forsythe, J.W. y Hanlon, R.T. 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology*. 98: 369-379 p.
- Froesch, D. y Marthy, H.J. 1975. The structure and function of the oviducal gland in octopods (Cephalopoda). *Proceedings of the Royal Society of London B*. 188: 95-110 p.
- Gabr, H.R.; Hanlon, R.T.; Hanafy, M.H.; El-Etreby, S.G. 1998. Maturation, fecundity and seasonality of reproduction of two commercially valuable cuttlefish, *Sepia pharaonis* and *S. dollfusi*, in the Suez Canal. *Fisheries Research* 36: 99-115 p.
- González, A.F.; Guerra, A.; Pascual, S. y Segonzac, M. 2008. Female description of the hydrothermal vent cephalopod *Vulcanoctopus hydrothermalis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(2): 375–379 p.
- Grisley, M.S. 1993. Separation and partial characterization of salivary enzymes expressed during prey handling in the Octopus *Eledone cirrhosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B: 183-192 p.
- Grisley, M.S. y Boyle, P.R. 1990. Chitinase, a new enzyme in octopus saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 95: 311-316 p.

- Grubert, M.A. y Wadley, V.A. 2000. Sexual Maturity and Fecundity of *Octopus maorum* in Southeast Tasmania. *Bulletin of Marine Science*, 66(1): 131–142.
- Guerra, A. 1987. La reproducción en los moluscos cefalópodos. In: De los Monteros E, Labarta U (eds) *Reproducción en Acuicultura*. CAICYT, Madrid, 185–216 p.
- Hanlon. R.T. En Boyle, P.R. y Knobloch, D. 1983. The Female Reproductive Cycle of the Octopus, *Eledone cirrhosa*. *F. mar. boil. Ass. U.K.* 63: 71-83 p.
- Hochberg F.G.; Norman M.D. y Finn J. 2006. *Wunderpus photogenicus* n. gen. and sp., a new octopus from the shallow waters of the Indo-Malayan Archipelago (Cephalopoda: Octopodidae). *Molluscan Research* 26(3):128-140 p.
- Idrissi, F.H.; Koueta, N.; Idhalla, M.; Belghyti, D. y Bencherifi, S. 2006. Les modalités du cycle sexuel du poulpe *Octopus vulgaris* du Sud marocain (Tantan, Boujdour). *C. R. Biologies* 329: 902-911 p.
- Iglesias, J.; Otero, J.J.; Moxica, C.; Fuentes, L. y Sánchez, F.J. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12: 481-487 p.
- Iglesias, J. y Sánchez, F.J. 2007. La diversificación en moluscos cefalópodos: El pulpo (*Octopus vulgaris*). *Sesión Temática Diversificación. Ponencia*. IX Congreso de Acuicultura, Vigo, España.
- Inejih, C.A. 2000. Dynamique spatio-temporelle et biologie du poulpe (*Octopus vulgaris*) dans les eaux mauritaniennes: Modélisation de l'abondance et ménagement des pêcheries. Tesis postdoctoral. University of Bretagne Occidentale. 252 pp.
- Jiménez-Badillo, M.L., R.E. del Río-Rodríguez, M.I. Gómez-Solano, A. Cu-
Escamilla & D. Méndez-Aguilar, 2008. Madurez gonádica del pulpo *Octopus*

- vulgaris* en el Golfo de México: análisis macroscópico y microscópico. Universidad Autónoma de Campeche. 48 pp.
- Ishiyama, V.; Siga, Betty y Talledo, C. 1999. Biología Reproductiva del Pulpo *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda) de la Región de Matarani, Arequipa, Perú. *Revista Peruana de Biología*. Vol. 6. No. 1.
- Khallahi, O.M.F. 2001. Etude de la gametogenese chez le poulpe *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). Bulletin Scientifique de l'Institut Mauritanien de Recherches Océanographiques et des Pêches, 28: 44-52 p.
- Khallahi, O.M.F. y Inejih, C.A.O. 2002. Proposition d'une echelle macroscopique de maturite sexuelle des femelles de poulpe *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) Bulletin Scientifique de l'Institut Mauritanien de Recherches Océanographiques et des Pêches – vol. XXIX.
- Klaich, M.J.; Ré, M.E. y Pedraza, S.N. 2006. Effect de la Temperature, Sexual Maturity and Sex Growth, Food Intake and Gross Growth Efficiency in the “Pulpito” *Octopus tehuelchus* (D'Orbigny, 1843). Journal of Shellfish Research, 25 (3): 979-983 p.
- Kreuzer, R., 1984. Cephalopods: handling, processing and products. FAO Fish. Tech. Pap; (254):108.
- Lang, M.A. y Hochberg, F. G.1997. Proceedings of the Workshop on *The fishery and Market Potential of Octopus in California*. Smithsonian Institution: Washington. 192 pp.
- Laptikhovsky, V.V. y Arkhipkin, A.I. 2001- Oogenesis and gonad development in the cold water loliginid squid *Loligo gahi* (Cephalopoda: Myopsida) on the Falkland shelf. Journal Mollusca Studies, 67: 475-482 p.
- Lee P.G., 1994. Nutrition of cephalopods: fueling the system. Marine and Freshwater Behavior and Physiology. 25: 35-51 p.
- Leporati, S.C.; Pecl, G.T. y Semmens, J.M. 2008. Reproductive status of *Octopus pallidus*, and its relationship to age and size. Mar. Biol. 155: 375–385.

- Lewis, A. R. 1991. Reproductive biology of *Idiosepius pygmaeus* (Cephalopoda: Idiosepiidae) from waters near Townsville, North Queensland, Australia. B.Sc. (Hons) Thesis. James Cook Univ., Townsville.
- López, L. 2000. Estudian mejoras en pulpo. Pesca. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Gaceta Universitaria en; <http://www.gaceta.udg.mx/Hemeroteca/paginas/148/10-148.pdf>
- Moriyasu, M. 1988. Analyse de la maturation sexuelle d'*Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda) du Golfe du Lion. Aquat. Living Resour. 1: 59-55 p.
- Morales, J.J. 2007. Busca la UNAM criar pulpo maya en cautiverio, para comercializarlo. La Jornada. En: <http://www.jornada.unam.mx/2007/03/21/index.php?section=ciencias&article=a03n1cie>. Consultado en noviembre de 2008.
- Olivares-Paz, A.; Zamora-Covarrubias, M.; Portilla-Reyes, P. y Zuñiga-Romero, O. 2001. Estudio histológico de la ovogénesis y maduración ovárica en *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae) de la II región de Chile. Estudio Oceanológico, 20:13-22 p.
- Olivares-Paz, A.; Bustos-Obregon, E.; Castillo, A. V. y Zúñiga-Romero, O. 2003. Variaciones del funcionamiento testicular en *Octopus mimus* adultos. International Journal Morphology, 21(4):315-323 p.
- O'Dor, R.K. y Wells M. J. 1973. Yolk Protein Synthesis in the Ovary of *Octopus vulgaris* and its Control by the Optical Gland Gonadotropin. Journal of Experimental Biology (1973). 59: 665-674 p.
- Otero, J.; Gonzalez, A.F.; Guerra, A.; Regueira, M. y Garci, M.E. 2004. Reproductive biology of *Octopus vulgaris* in an upwelling area (NE Atlantic). International Council for the Exploration of the Sea ICESCM CCI:01.
- Price Peterson. 1959. The anatomy and histology of the reproductive systems of *Ocotpus bimaculoides*. Department of Zoology, Pomona College, California.

- Quetglas, A.; Alemany, F.; Carbonell, A.; Merella, P. y Sanchez, P. 1998. Biology and Fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, Western Mediterranean). *Fisheries Research* 36: 237-249 p.
- Rodríguez-Rúa; Pozuelo, I; Prado, M; Gómez, M.J; Bruzón, M. A. 2005. The gametogenic cycle of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) as observed on the Atlantic coast of Andalusia (South of Spain). *Marine Biology*, 147: 927-933 p.
- Rosas, C.; Caamal, C.; Cázarez, R.; Rodríguez, D.; Romero, Martín y Chay, D. 2006. Manual Preliminar para el Cultivo del Pulpo *Octopus maya*. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, UNAM, Sisal, Yucatán. Secretaria de Gobierno Rural y Pesca, Gobierno de Yucatán. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- Sánchez, A.; Carriquiry, J. Barrera, J y López-Ortiz, E. 2009. Comparación de modelos de transporte de sedimento en la Bahía Todos Santos, Baja California, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 61 (1): 13-24 p.
- Santos-Valencia, M.G.J. y Re-Regis, C. 2003. Biología reproductiva del pulpo de la costa *Octopus maya* (Voss y Solís, 1966) en el suroeste de la Península de Yucatán. Informe técnico, Centro Regional de Investigaciones Pesqueras, Lerma, Campeche, México.
- Secretaria de Marina México Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. 1974. Estudio geográfico de la región de Ensenada B.C. 462 pp.
- Selmi, M.G. 1996. Spermatozoa of Two Eledone Species (Cephalopoda, Octopoda). *Tissue and Cell*. 28 (5): 613-620 p.
- SEMARNAP. 1999. Estadísticas pesqueras básicas, Dir. Gral. De Informática y Reg. Pesq. México, 125 pp.
- Shaw, B.L. y Batle, H.L. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35: 325-346 p.

- Silva, L., Ramos, F. y Sobrino, I. 2004. Reproductive biology of *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Gulf of Cádiz (south-western Spain, ICES Division IXa). *Journal of Marine Biology Ass. U.K.*, 84, 1221-1226 p.
- Smith, C.D.; Groeneveld, J.C. y Maharaj, G. 2006. The life history of the giant octopus *Octopus magnificus* in South African waters. *African Journal of Marine Science* 3–4: 561–568 p.
- Solís-Ramírez, M.J. 1985. Evaluación y Régimen Óptimo de Pesca del pulpo en la Península de Yucatán, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. Mérida, Yucatán, México. En;
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1986-3/articulo236.html>. Consultado en mayo de 2009.
- Solís-Ramírez, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo: *Octopus maya* Voss y Solís. México, D.F. Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas Pesqueras.
- Vaez P.; Seixas, P.; y Barbosa, A.. 2004. Acuaculture potencial of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797). *Aquaculture* 238 (2004) 221-238 p.
- Valderrama, K.; Oliva, M.; Campos, B. y Brown, D. 2004. Parasitic castration of *Eurhomalea lenticularis* (Bivalvia: Veneridae) by a digenetic trematode: quantitative histological analysis. *Disease of aquatic organism*. 59: 151-158 p.
- Wells, M.J. 1960. Optical glands and the ovary of *Octopus*. *Symposia of the Zoological Society of London* 2: 87-107 p.
- Wells, M.J. 1978. *Octopus, Physiology and Behaviour of an Advanced Invertebrate*. London, Chapman and Hall.
- Wilbur, K.M.; Verdonk, N.H. y Van Den Biggelaar, J.Z.M. *The Mollusca*. Academic Press, Inc. Volume 7 Reproduction. 486 pp.
- Wodinsky, J. 1969. Penetration of the shell and feeding on gasteropods by *Octopus*. *American Zoologist*, 9: 997-1010 p.
- Wodinsky J. 2008. Reversal and transfer of spermatophores by *Octopus vulgaris*

- and *O. hummelincki*. *Marine Biology*, 155: 91–103 p
- Zamora-Covarrubias, M. y Olivares-Paz, A. 2004. Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca:Cephalopoda). *International Journal of Morphology*, 22(3):207-216 p.
- Zúñiga-Romero, O.; Olivares-Paz, A. y Ossandón-R., L. 1995. Influencia de la luz en la maduración sexual de hembras *Octopus mimus*. *Estudios Oceanológicos* 14: 75-76 p.