

**Características histológicas del aparato
reproductivo de la hembra de *Mustelus schmitti*.
Cambios morfológicos y almacenamiento
espermático dentro del mismo.**

**Fernanda Gabriela Elías
Licenciada en Ciencias Biológicas**

Índice

Resumen	3
Capítulo 1 Introducción general	4
Capítulo 2 Materiales y Métodos	8
Capítulo 3 Ovarios	14
Capítulo 4 Glándulas Oviductales	28
Capítulo 5 Útero	41
Capítulo 6 Interacción epitelial y espermática en el aparato reproductor femenino	56
Capítulo 7 Conclusiones Generales	62
Capítulo 8 Bibliografía	70

Resumen

Mustelus schmitti (Chondrichthyes, Triakidae) llamado comúnmente gatuso o gatuzo, constituye la especie más común de tiburones en la pesca argentina. Este proyecto investiga algunos aspectos de la biología reproductiva de la hembra de *M. schmitti* con el fin de asesorar manejos pesqueros para prevenir la sobreexplotación. Normalmente, las muestras de peces son medidas, pesadas y sexadas de manera de conocer la condición reproductiva de una especie pesquera pero un conocimiento cabal requiere de un análisis detallado basado en técnicas histológicas, las cuales proveen datos sobre cambios a nivel celular. En consecuencia, el conocimiento del desarrollo del ovocito y del espermatozoide es necesario para evaluar la condición reproductiva de la especie bajo estudio en este trabajo.

El aparato reproductor de este pez está compuesto por un solo ovario izquierdo, un par de glándulas oviductales y un útero par que finaliza en un conducto cloacal. El ovario, las glándulas oviductales y el útero fueron examinados por microscopía óptica y electrónica en diferentes estados a lo largo del ciclo reproductivo. El ovario está formado por un epitelio germinal simple cúbico que descansa sobre una fina capa de tejido conectivo. Los folículos contienen desde el interior hacia el exterior, un ovocito, la zona pelúcida, un epitelio folicular y capa tecal formada por tejido conectivo. El epitelio folicular se origina simple con células planas, continúa con células cúbicas y finalmente, se transforma en un epitelio cilíndrico durante la foliculogénesis y vitelogénesis. Se observaron algunos folículos atrésicos y cuerpos lúteos. La capa tecal no se diferencia en interna y externa. Las glándulas oviductales muestran las cuatro zonas características: club, baffle, papilar y terminal, similares a las de otros condriictios. El almacenamiento espermático es observado en los túbulos de la zona terminal de hembras sexualmente maduras y preñadas. El útero par desarrolla distintos epitelios en el istmo, partes anterior y posterior uterinas, y cérvix. Durante la preñez, los embriones se sitúan en compartimentos uterinos sin placenta.

El esperma preparado para fertilizar sería aquel que primero interactúa con el epitelio uterino y luego se almacena en los túbulos de la zona terminal. Esta estrategia aseguraría la unión entre el ovocito y el espermatozoide debido a que se pueden encontrar a pesar de estar la hembra preñada.

Uno de los objetivos principales de esta tesis es presentar un amplio rango de modificaciones histológicas para ser empleadas en una mayor comprensión de la dinámica reproductiva de los condriictios en particular, y de los peces en

general, y promover la discusión sobre temas críticos para pesca sustentable dentro de un contexto histológico.

Capítulo 1

Introducción General

Los peces son el grupo más antiguo y diverso de vertebrados. Las especies ícticas forman la mitad del árbol taxonómico de los vertebrados y muestran una enorme diversidad no solo en morfología sino en modos reproductivos y distribución en todo el planeta. Los peces pueden ser clasificados en dos distintos grupos: Clase Osteictios (peces óseos) and Clase Condrictios (peces cartilagosos).

La clase de los condrictios incluye peces cartilaginosos que surgieron por primera vez en el período Ordovícico, aproximadamente unos 400 millones de años (Bird et al., 2002; Cole and Curri, 2007). Dentro de esta clase, existen dos subclases: los elasmobranquios (tiburones y rayas) y los holocéfalos (quimeras).

Todos los condrictios actuales tienen fertilización interna pero han desarrollado una gran variedad de modos reproductivos que van de la viviparidad hasta la oviparidad (Dulvy y Reynolds, 1997; Hamlett y Koob, 1999a). Éstos exhiben cuatro modos reproductivos en base a la fuente de nutrición del embrión. Existen tres tipos de viviparidad aplacentaria:

- 1) En la primera, el embrión se desarrolla a partir del vitelo que se encuentra en el saco vitelino y dicho elemento nutritivo disminuye durante la gestación.
- 2) En la segunda, el saco vitelino desaparece y la mucosa uterina desarrolla vellosidades ricamente vascularizadas, en algunas especies y trofonemata en las rayas.
- 3) Y en la tercera, el saco vitelino se agota y los embriones dentro del útero se nutren con óvulos liberados por la madre (oofagia). En algunos casos, el embrión que primero se desarrolla, es el que continúa alimentándose de sus hermanos más pequeños (canibalismo intrauterino).

El cuarto modo reproductivo es la viviparidad placentaria, donde el saco vitelino desaparece y se diferencia conjuntamente con el cordón vitelino en una placenta funcional y cordón umbilical (Callard y Klosterman, 1988;

Chiaramonte, 1996; Hamlett y Koob, 1999a; Koob y Callard, 1991; Storrie, 2004).

La variedad de modos reproductivos no sólo es observada entre las diferentes clases sino también dentro del mismo género, por ejemplo, *Mustelus* presenta algunas especies aplacentarias (*M. schmitti*) mientras que otras son placentarias (*M. canis*). El género *Mustelus* comprende cerca de 25 especies distribuidas en todo el mundo.

En el Mar Argentino, se pueden encontrar cerca de 35 especies de tiburones. *Mustelus schmitti*, que es un pequeño tiburón vivíparo aplacentario, es una de las especies presa de una pesca directa. Se distribuye geográficamente desde los 22° S, al norte de Rio de Janeiro (Brasil) hasta el sur de la Patagonia argentina, 47° 45 S (Chiaramonte, 1998; Chiaramonte y Pettovello, 2000; Massa et al., 2001). Esta especie nada en temperaturas que van de los 8 a los 11,7 ° C en la superficie marina y de los 5,5 a 11° C en el fondo (Menni, 1985; Menni et al., 1986; Davenport y Sayer, 1993).

Las hembras alcanzan su primera madurez cuando tienen cerca de 580 mm de longitud total mientras que los machos la logran aproximadamente a los 550 mm. Esta especie tiene un máximo de 950 mm de largo. La longitud total en la primera madurez ha cambiado en los últimos años lo que indica una presión pesquera elevada sobre la población de esta especie. Menni y colaboradores (1986) encontraron la primera madurez a los 600 mm en el largo total de machos y 620 mm para las hembras. En 1998, Cousseau et al. describieron la longitud total de los machos en 570 mm y para las hembras, en 590 mm, para ese mismo parámetro. Cousseau y Perrotta (2004) encontraron 600 mm para los machos y 620 mm para las hembras. In 2005, Sidders et al. describieron la primera madurez con un largo total de 550 mm y de 580 mm para las hembras. Por mi parte, en el 2004, capturé una hembra de 510 mm de largo total con huevos completamente maduros. El decrecimiento en el largo total está directamente relacionado con el número de embriones que una hembra es capaz de hacer prosperar; cuanto menor es el tamaño del animal, menor número de crías desarrollan.

El periodo de gestación varía de unos 11 a 12 meses, con la ovulación en diciembre y el parto entre noviembre y diciembre del año siguiente. El útero par despliega compartimentos donde el embrión se desarrolla y no hay presencia de placenta que conecte a éste con la madre. Los juveniles tienen 260 mm de largo en el momento del nacimiento. El número más frecuente para cada camada es de 5 a 6 embriones pero han sido reportados 16. La relación intrauterina existente entre los sexos es de 1:1 (Sidders et al., 2005).

El comportamiento reproductivo de los elasmobranquios es complejo y tiene modos previos a la cópula y durante la misma, donde se observa un alto grado de sofisticación. Numerosos comportamientos generales han sido descritos en los que se incluyen la segregación temporal sexual, cortejo y cópula. En los apareamientos exitosos se requiere que el macho sujete a la hembra mordiéndola en sus aletas pectorales o en sus flancos para mantenerla quieta y así poder introducir los claspers y exponer ambas cloacas para finalizar la fertilización interna (Pratt y Carrier, 2001). En lo que respecta al comportamiento de apareamiento de *M. schmitti*, no se han detectado cicatrices en el cuerpo de la hembra. Esto respondería al tipo de dentición en placa característico de esta especie. Esta observación fue señalada por Smale y Compagno (1997) en *Mustelus mustelus* y Chiaramonte y Pettovello (2000) hicieron similar análisis con respecto a la especie en estudio.

Es común la segregación sexual para los condriictios y *Mustelus schmitti* no es la excepción (Menni, 1985, Pratt y Carrier, 2001; Oddone et al., 2005). La cópula se lleva a cabo en las áreas de cría tales como los estuarios y bahías, donde las hembras dan a luz también, luego migran a aguas más cálidas (Van der Molen y Caille, 2001; Lopez Cazorla, 2004; Lucifora et al., 2004). Estas áreas protegidas son visitadas periódicamente primero por los machos y un poco más tarde por las hembras. Una vez que el embrión nace, la hembra vuelve a quedar preñada inmediatamente. Las migraciones por temporadas son comunes entre los condriictios y son debidas a la temperatura, comportamiento reproductivo o requerimientos nutricionales (Heithaus, 2004). Durante el invierno habitan las costas de Brasil y desde septiembre hasta diciembre visitan las costas atlánticas argentinas. Estos movimientos han sido documentados por Oddone et al. (2005 y 2007).

En general, para conocer las condiciones reproductivas de especies ictícolas se procede a medir, pesar y sexar a las muestras (Saunders y McFarlane, 1993; Jones y Ugland, 2001, Oddone y Vooren, 2004; Oddone et al., 2007) pero un análisis cabal requiere de técnicas histológicas, las cuales proveen una visión más profunda desde el nivel celular (Polder, 1961; Treasurer y Holliday, 1981; Crim y Glebe, 1990; Patiño et al., 1996). En consecuencia, la comprensión del desarrollo del óvulo y del espermatozoide representa un requerimiento esencial para la evaluación del estado reproductivo de la especie bajo estudio (Wallace y Selman, 1981; Selman y Wallace, 1986, 1989; Ravaglia y Maggese, 2002). No obstante, la mayor información disponible sobre este tema proviene de un número pequeño de especies de laboratorio o de aquellas que se pueden adaptar al cautiverio y poseen importancia comercial.

Este pez constituye la principal especie de tiburón explotada por las pesquerías en Argentina (Chiaramonte, 1998; Van der Molen et al., 1998; Massa et al., 2001; Massa et al., 2004; Sidders et al. 2005). Por otro lado, Brasil también lo comercializa y los niveles de captura demuestran claramente su actual declinación. Durante la década de 1980, los juveniles y adultos eran capturados por las redes de arrastre en Plataforma Sul (sur de Brasil) pero durante los años 2003 y 2005 ya no se encontraron juveniles en la misma zona. Esto indicaría una disminución en la población que usa las aguas costeras como una nursery (Vooren y Klippel, 2005). En 2011, Pérez et al. reportaron idénticas capturas de *M. schmitti* de 10000 t. en la flota comercial argentina en los períodos de 2006-2008 y 1992-1999.

Actualmente, Perez y Massa (2011) han puesto en marcha un plan de marcación para *M. schmitti* que comenzó a finales de ese mismo año. Los objetivos de dicho plan incluyen el monitoreo de la población con fin de conocer aspectos demográficos, hábitos migratorios, crecimiento e índice de supervivencia. Al momento de la publicación no fueron registrados resultados de capturas de las marcas.

La propuesta del presente trabajo apunta a una mejor comprensión del ciclo reproductivo de la hembra de *Mustelus schmitti* para poder brindar asesoramiento al manejo pesquero como también ampliar el conocimiento de los peces cartilagosos dentro de un contexto histológico. Los objetivos son:

- 1) determinar la organización anatómica y microscópica del ovario, glándulas oviductales y útero a través de la maduración;
- 2) determinar la presencia de esperma almacenada en la glándula oviductal en hembras preñadas y no preñadas por medio de técnicas histológicas;
- 3) determinar la presencia de esperma en el útero y su interacción con células epiteliales en el aparato reproductor femenino.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Se tomaron muestras mensuales de *Mustelus schmitti* del estuario de Bahía Blanca entre los años 2002 y 2006. Se utilizó camarón (*Caridea*, Crustacea) como carnada para la pesca con línea. Las capturas se realizaron con marea alta durante el día.

Un total de 24 animales fueron capturados y procesados; 11 eran inmaduros, cuyos largos totales oscilaban entre los 28,5 cm y 50 cm. Seis animales estaban en vías de maduración con un largo total de 50-61 cm y 7 hembras maduras con un rango de 61-69 cm de largo; 4 ejemplares de este último grupo estaban preñadas. Las hembras inmaduras fueron aquellas que presentaban pequeños huevos blancos o no tenían huevos a simple vista, las glándulas oviductales eran de reducido tamaño y los úteros eran delgados y finos sin expansión alguna. Los animales en proceso de maduración tenían el ovario con huevos blancos o amarillo pálido, visibles macroscópicamente, con glándulas oviductales más grandes y poco enrolladas y los úteros expandiéndose de la región posterior a la anterior. Los ejemplares maduros eran los que poseían el ovario bien desarrollado con huevos amarillo fuerte y huevos más pequeños también con vitelo acompañando. El órgano epigonal asociado con el ovario en este estado madurativo estaba muy reducido. Las glándulas oviductales estaban completamente desarrolladas y se registró almacenaje espermático en ellas. Los úteros estaban completamente expandidos o contenían embriones. De este grupo de hembras maduras, 5 presentaban embriones uterinos. Se realizó sacrificio humanitario para cada ejemplar. Se practicó una incisión ventral en cada uno de ellos para la remoción de los ovarios, glándulas oviductales y úteros, luego las piezas se colocaron en solución Bouin para microscopía óptica y, en glutaraldehído al 2.5% en cacodilato al 0.1 M con sacarosa al 12% para microscopía electrónica y de barrido (Tabla I).

Tabla I. Mes de captura y estado reproductivo de las muestras.

Animal	Estado	Largo total (cm)	Glándula oviductal	Ovario	Útero	Mes de captura
1	Inmadura	36	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares.	Órgano epigonal notorio sin distinción de huevos a simple vista.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Marzo
2	Inmadura	28.5	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares.	Órgano epigonal notorio sin distinción de huevos a simple vista.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Marzo
3	Inmadura	36	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares.	Órgano epigonal notorio sin distinción de huevos a simple vista.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Marzo
4	Inmadura	42	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares. No Hay capas musculares.	Órgano epigonal notorio y huevos sin vitelo.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Marzo
5	Inmadura	43.5	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares. No Hay capas musculares.	Órgano epigonal notorio y huevos sin vitelo. Un folículo atrésico.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Abril
6	Inmadura	42	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares. No Hay capas musculares.	Órgano epigonal notorio y huevos sin vitelo.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Abril
7	Inmadura	44	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Huevos sin vitelo (pequeños y blancos).	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Mayo
8	Inmadura	43	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Huevos sin vitelo (pequeños y blancos).	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Mayo

Animal	Estado	Largo total (cm)	Glándula oviducal	Ovario	Útero	Mes de captura
9	Inmadura	39	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Órgano epigonal notorio sin distinción de huevos a simple vista.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Mayo
10	Inmadura	44	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Órgano epigonal notorio sin distinción de huevos a simple vista.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Junio
11	Inmadura	47	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Diferentes tamaños de huevos.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Octubre
12	Inmadura	53	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Diferentes tamaños de huevos.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Octubre
13	Inmadura	47	No se distinguen zonas y no hay glándulas tubulares	Diferentes tamaños de huevos.	Epitelio simple cilíndrico sin capas musculares definidas.	Noviembre
14	Madura	62	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos. El mayor con vitelo. Un folículo atrésico.	Epitelio estratificado con 3 capas musculares.	Diciembre
15	Madura	51	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos. Los más grandes con vitelo.	Epitelio estratificado con 3 capas musculares. Cérvix con esperma.	Diciembre
16	Madura	53	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos. Los más grandes con vitelo.	Epitelio estratificado con 3 capas musculares. Interacción espermática con las células uterinas de la porción posterior. Cérvix sin esperma.	Octubre
17	Madura	62	Con cuatro zonas.	Diferentes tamaños de huevos; 5 huevos grandes con vitelo.	Epitelio estratificado con 3 capas musculares.	Octubre

Animal	Estado	Largo total (cm)	Glándula Oviductal	Ovario	Útero	Mes de captura
18	Preñada	69	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos; 5 huevos grandes con vitelo; corpus luteum.	Dos embriones en el útero derecho y 3 en el izquierdo.	Octubre
19	Preñada	61	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos; los grandes con vitelo.	Dos embriones en el útero izquierdo y uno en el útero derecho.	Octubre
20	Madura	61	Con cuatro zonas. Almacenamiento espermático en la zona terminal.	Cinco huevos grandes; uno amarillo claro y varios blancos.	Una o dos capas de epitelio y tres capas musculares comprimidas. Cérvix con esperma.	Diciembre
21	Madura	55	Cuatro zonas sin almacenamiento espermático.	Diferentes tamaños de huevos; cuatro huevos visibles con vitelo; corpus luteum.	Epitelio estratificado y tres capas musculares.	Diciembre
22	Preñada	67	Cuatro zonas con almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos; cinco huevos visibles con vitelo; corpus luteum.	Un embrión en el útero izquierdo y dos en el útero derecho.	Mayo
23	Preñada	64	Cuatro zonas sin almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos; los grandes con vitelo.	Tres embriones en el útero derecho y tres en el útero izquierdo.	Mayo
24	Madura	57	Cuatro zonas sin almacenamiento espermático en la zona terminal.	Diferentes tamaños de huevos; 5 huevos grandes con vitelo.	Epitelio estratificado y tres capas musculares.	Mayo

Microscopía óptica

Las muestras de ovario, glándulas oviductales y de útero fueron disecadas y colocadas toda la noche en solución Bouin. Luego fueron deshidratadas en una serie progresiva de alcoholes (70-100%). Posteriormente se infiltraron en parafina y se armaron los tacos correspondientes a dichas muestras.

Se hicieron cortes de 5 μm de espesor con un micrótopo de deslizamiento y luego se adhirieron a portaobjetos. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, una combinación de Alcian Blue con ácido Peryódico de Schiff y la coloración tricrómica de Masson. A continuación, dichos cortes fueron montados con bálsamo de Canadá. Las microfotografías fueron obtenidas con una cámara C7070 Olympus adaptada a un microscopio Olympus BX51.

La imagen de la glándula oviductal completa fue tomada con el Scanner HP Scanjet 5590 L1910A perteneciente a la Biblioteca Central de la Universidad Nacional del Sur y editada con Adobe Photoshop CS6.

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de ovario y útero fueron fijadas primeramente con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato 0.5M (pH 7.4) con 12% de sucrosa (Hyder et al. 1983) a 4°C, durante 12 horas. Los tejidos se lavaron tres veces con el buffer durante 30 min cada vez a 4°C y luego se hizo una posfijación en tetróxido de osmio con el mismo buffer durante una hora a 4°C. Las muestras se deshidrataron en una gradación de etanol (50%, 70%, 80%, 95% y 3 veces en etanol 100%) y luego se infiltraron en resina de baja densidad (Spurr). Los tacos se cortaron primero en secciones de 1 μm de ancho (cortes semifinos) con un micrótopo Super Nova Reichert-Jung de 90 nm de ancho con cuchilla de vidrio y teñidas con acetato de uranilo al 2%, seguido de citrato de plomo durante 30 min. Los cortes ultrafinos se realizaron a 60 nm. Finalmente, cada uno de ellos se examinó y fotografió con la cámara ES1000W Erlangshen CCD, Model 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) unida al microscopio de transmisión electrónica JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japan) con 80 kV, perteneciente al Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Microscopía electrónica de barrido

Los tejidos extraídos de las glándulas oviductales se fijaron en glutraldehído al 2.5% en buffer cacodilat0 0.5M (pH 7.4) con sucrosa al 12% a 4°C. Después de la fijación, los especímenes fueron lavados 3 veces con agua bidestilada durante 10 min cada uno. Luego, fueron deshidratados progresivamente en concentraciones ascendentes de acetona: 1 lavado con acetona al 25% (10 minutos), 1 lavado con acetona al 50% y un tercero con acetona al 80%. Finalmente, las muestras fueron secadas por el método de punto crítico (Cohen, 1974) e impregnadas con oro antes de ser examinadas con un aumento de 350-7500X con el microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL JSM 6360 LV).

Capítulo 3

Ovario

Resumen

El único ovario de *Mustelus schmitti* se encuentra incluido en el órgano epigonal, localizado en el lado izquierdo de la cavidad corporal. Los cambios estructurales que ocurren durante la foliculogénesis y la vitelogénesis son estudiados por medio de las microscopías óptica y electrónica. Las capas que constituyen el folículo ovárico de *M. schmitti* son similares a las de cualquier vertebrado. El ovocito se halla rodeado por una capa acelular, denominada zona pelúcida y las células foliculares descansan sobre una membrana basal. Dichas células foliculares están rodeadas por capas tecales formadas de tejido conectivo. Cuando el folículo comienza su desarrollo, las células foliculares son planas dispuestas en una sola capa. A medida que la foliculogénesis continúa, el epitelio se torna más alto, haciéndose estratificado al final de la vitelogénesis. El grosor de la zona pelúcida aumenta durante el desarrollo del folículo pero cerca de la ovulación se vuelve tan delgada que es difícil detectarla con la microscopía óptica. La capa tecal está formada por tejido conectivo compacto vascularizado y numerosas fibras que forman una malla externa. Cuerpos lúteos y atrésicos se observan en distintos estadios del desarrollo del ovario.

Introducción

Los ovarios son los responsables de producir células germinales, adquirir y acumular vitelo durante la vitelogénesis y secretar hormonas sexuales.

En la mayoría de las familias de elasmobranquios, los ovarios se desarrollan embebidos en el órgano epigonal (Pratt, 1988). Usualmente, solo el ovario derecho está presente mientras que el izquierdo es ausente o reducido. No existe correlación entre la simetría ovárica y el modo reproductivo, aunque en las especies vivíparas se observa una predominancia del ovario derecho (Hamlett and Koob, 1999a). Esta característica contrasta en *M. schmitti*, ya que su ovario es izquierdo. En las especies ovíparas es común la presencia de ovarios pares.

Antes de proceder con la descripción del órgano en estudio en este capítulo, es valioso notar la diferencia entre foliculogénesis y vitelogénesis. El primer proceso consiste en el desarrollo y maduración de las células foliculares previos a la vitelogénesis, mientras que el segundo, es el proceso donde la

fosfovítina y la lipovitelina son almacenadas en el ovocito (Tesis doctoral de M. Storrie, *Microscopic modifications of the female reproductive tissues of Mustelus antarticus*, abril 2004, 153pp). Ambos procesos ocurren casi simultáneamente una vez que el animal alcanza la madurez sexual. No obstante, la foliculogénesis se inicia primero en etapas tempranas del desarrollo embrionario de la hembra, aumentando de tamaño del ovocito. La foliculogénesis y la vitelogénesis constituyen en forma conjunta, otro proceso llamado ovogénesis, que es la formación del óvulo. Las hembras inmaduras contienen pequeños folículos ováricos con poco o nada de vitelo. Por otro lado, algunas especies de tiburones presentan un crecimiento de los folículos durante la preñez, lo cual es característico de especies de gestación anual. Mientras que los folículos que crecen entre preñez y preñez son comunes tanto para especies de tiburones como de rayas (Hamlett and Koob, 1999a).

Las células primordiales se originan en el endodermo del saco embrionario y luego migran al borde germinal, donde se asociarán con las células foliculares. Los folículos ováricos han sido examinados histológicamente en pocos elasmobranquios (Andreucetti et al., 1999; Babel, 1967; Callard y Klosterman, 1988; Dodd y Dodd, 1980; Guraya, 1986; Haines et al., 2005; Hamlett et al., 1999a; Hamlett y Koob, 1999; Prisco et al., 2002 a, b; Prisco et al., 2007). En algunos condriictios, el epitelio folicular comienza como una capa simple y se mantiene de esa manera a lo largo del desarrollo folicular, en cambio, en otros, dicha capa cambia a pseudoestratificada y en otras especies se estratifica (Dodd y Dodd, 1980; Guraya, 1986; Hamlett et al., 1999; Lutton et al., 2005).

Se produce un **folículo atrésico** cuando el folículo ovárico degenera antes de la ovulación mientras que un **cuerpo lúteo (corpus luteum)** es el remanente folicular después de la ovulación (Lutton et al., 2005). Todos los ovarios de los vertebrados exhiben atresia y ésta se presenta en cualquier estado de desarrollo del folículo. Ocurre independientemente de la edad, condición reproductiva y salud del animal y condiciones ambientales (tales como temperatura, fotoperíodo, disponibilidad de alimento, etc.). No obstante, se halla descrito más frecuentemente en ovocitos en vías de maduración y que no han sido ovulados.

La organización del cuerpo lúteo es similar en elasmobranquios vivíparos y ovíparos y consiste en células lipídicas derivadas del epitelio folicular, dispuestas alrededor de un lumen central, las cuales son invadidas por el tejido conectivo circundante vascularizado de la capa teical (McMillan, 2007). En algunos estudios se ha destacado al stress ambiental como la causa de la atresia; en otros, una pobre nutrición o factores reductores de los niveles de

gonadotropinas (Wallace and Selman, 1981). La degeneración del folículo puede ocurrir en cualquier estado del ciclo reproductivo.

El presente trabajo estudia los cambios celulares que se llevan a cabo en el folículo ovárico durante la foliculogénesis y la vitelogénesis. Los resultados contribuirán a una mayor comprensión de la estructura y función del ovario de *Mustelus schmitti* y a la expansión del conocimiento en la biología reproductiva de los Condriictios.

Resultados

Microscopía óptica

El único ovario de *Mustelus schmitti*, está situado en la superficie medial izquierda de la pared dorsal del cuerpo y está cubierto con epitelio simple cúbico. No se encontró ovario u órgano epigonal en el lado derecho del animal. Se observó una gran vascularización que rodea a todo el órgano (Figura 1a). La cubierta del ovario consistió en un epitelio simple cúbico apoyado sobre tejido conectivo. En los animales inmaduros sexualmente, los folículos no fueron visibles a simple vista; se identificó únicamente el órgano epigonal. Los cortes histológicos de ovarios inmaduros mostraron un ovocito rodeado por células foliculares planas (Figura 1b). Cuando el animal estaba maduro, los ovocitos se hallaban cubiertos por células foliculares y externamente, por tejido conectivo (capa tecal) altamente vascularizado. Se pudieron observar simultáneamente folículos en distintos estados de desarrollo pero sólo un grupo de ellos estaba preparado para ovular y se encontraban con el mismo grado de maduración (Figuras 1c, d).

Un folículo está compuesto, desde el interior hacia el exterior, por un ovocito cubierto de una capa acelular denominada zona pelúcida, células foliculares dispuestas en un epitelio y finalmente, la teca constituida por tejido conectivo vascularizado que se colorea PAS+. La zona pelúcida aparece cuando las células foliculares son cúbicas. Esta zona aumenta su grosor a medida que el folículo crece (Figura 2a). Se hizo más delgada cuando las plaquetas de vitelo estuvieron bien formadas y las células foliculares eran cilíndricas (Figuras 2b, c, d).

Durante la embriogénesis se originan al mismo tiempo grupos de oogonias y continúan apareciendo de esta manera a lo largo de la vida del animal. En los cortes histológicos fue común observar agrupaciones de pequeños ovocitos rodeados por células foliculares planas que en conjunto se los denomina folículos primordiales. A medida que el folículo creció, se hizo más notoria la

zona pelúcida y las células foliculares y tecales aumentaron su número y su tamaño.

Tanto los animales recién nacidos como los que tenían cerca de 44 cm de largo no presentaron ovarios distinguibles a simple vista. Sólo a través de los cortes histológicos se pudieron detectar los grupos de oogonias o folículos primordiales. Recién cuando el animal alcanzó los 50 cm se observaron macroscópicamente los huevos de color blanco. Finalmente, cuando la hembra llegó a los 51 cm, los huevos se evidenciaron de color amarillo. El número de huevos listos para ser liberados en la ovulación siempre fue de 4, 5 ó 6, es decir, se desprende la cantidad necesaria de huevos que ambos úteros pueden sostener.

La foliculogénesis comenzó con folículos que presentan una única capa de células foliculares planas. La vitelogénesis se inició cuando dichas células planas se tornan cúbicas y el ovocito alcanzó un diámetro aproximado de 550 μm . Finalmente, estas células pasaron a ser cilíndricas rodeando al ovocito.

En todas las muestras examinadas, unos pocos cuerpos lúteos se evidenciaron (Figura 3a, b) y un solo folículo atrésico preovulatorio (Figura 3c, d) fue detectado en un animal inmaduro de 44 cm de largo. Las células del cuerpo lúteo presentaban el aspecto típico de células secretoras, llenas de vesículas lipídicas. Las células tecales rodeaban a la estructura folicular externamente con numerosas fibras. Por otro lado, en el folículo atrésico se observó una zona pelúcida plegada por un extremo (Figura 3c). Las células foliculares tenían núcleos picnóticos y las células tecales rodeaban al folículo sin signos de desintegración. No se detectaron plaquetas de vitelo ni núcleo dentro del ovocito.

Microscopía electrónica

El epitelio folicular de los folículos maduros se tornó estratificado y los núcleos de las células se dispusieron próximos a la membrana basal debido al transporte de gránulos de secreción hacia el ovocito. La zona pelúcida era muy delgada en este estadio de maduración (Figura 2d).

Los cortes semifinos de ovarios de hembras maduras mostraron grupos de oogonias con células foliculares acompañantes (Figura 4a). Este tipo de agregado celular pudo ser observado tanto en ovarios inmaduros como maduros. Los folículos primordiales consisten en un ovocito y células foliculares planas, las cuales presentaron precursores vitelogénicos dispuestos claramente en un extremo de la célula (Figura 4b).

En las imágenes de microscopía electrónica aparecieron células foliculares con el aparato de Golgi en las proximidades de la zona pelúcida. También fueron notorias numerosas mitocondrias en el mismo área (Figura 4c). Las mismas se dispusieron en grupo alrededor del núcleo. Las vesículas secretoras incrementaron su tamaño con la unión de varias vesículas pequeñas (Figuras 4d, 5a, b).

Discusión

Mustelus schmitti posee un solo ovario ubicado en el costado izquierdo del cuerpo y es similar a los encontrados en el género *Mustelus* (Stanley, 1963; Dodd and Dodd, 1985; Hamlett and Koob, 1999; Davenport et al., 2011). Este órgano está asociado con el órgano epigonal, característica común en los Condrictios. No existe ovario en el lado derecho del animal y consecuentemente, tampoco se halla el órgano linfomieloide (órgano epigonal) respectivo.

Las capas que forman los folículos ováricos son las mismas de cualquier pez: un ovocito rodeado por la zona pelúcida, un epitelio folicular asociado con la membrana basal y la capa tecal (Dodd y Dodd, 1980; Hamlett et al., 1999; Hamlett y Koob, 1999; Davenport et al. 2011; Elías y Estecondo, 2006a).

Se observaron grupos de **oogonias** en el ovario de *M. schmitti* en cualquier estadio de maduración. Prisco y colaboradores (2007) describieron grupos de estas células en *Torpedo marmorata*, las cuales se originan durante la embriogénesis y continúan con la misma organización en los recién nacidos. En hembras sub-adultas y maduras, la población entera de células germinales se organiza en folículos en desarrollo. Es de destacar que estos autores sólo encontraron en una hembra madura, la persistencia de células germinales desnudas, organizadas en grupos, aisladas o rodeadas de células somáticas, indicando la posibilidad de mantener células progenitoras en la adultez. Estos investigadores consideran este caso como un ejemplo de una fuerte plasticidad reproductiva demostrada por los Condrictios. Una condición similar podría observarse en *M. schmitti*. Por otro lado, Ravaglia y Maggese (2002) describieron similares nidos de oogonias en un pez teleósteo, *Synbranchus marmoratus*.

Los ovocitos de todas las especies de vertebrados producen una capa acelular denominada “zona radiata”, “corion”, “membrana vitelina”, “envoltura vitelina”, “cortex radiatus”, “zona pelúcida” (Guraya, 1978, Laale, 1980, McMillan, 2007). Los materiales que componen esta capa son depositados

durante el crecimiento del folículo. Las investigaciones muestran que esta capa acelular puede variar en su composición y su grosor a lo largo del tiempo (Lutton et al, 2005). Comienza a formarse en una determinada etapa de la ovogénesis pero aún se desconoce el factor desencadenante que la origina o cuándo exactamente empieza (Guraya, 1986).

Todas las especies de condriictios examinadas hasta la actualidad poseen una **zona pelúcida** que separa los ovocitos de la pared folicular así como existe una lámina basal entre la capa granulosa y las tecas. Cabe señalar, que esta zona acelular en las especies de tiburones es sustancialmente más gruesa que la encontrada en los batoideos (Davenport, 2003). Guraya (1986) refiere que Götting (1967, 1974) encontró la formación de dicha capa acelular en especies vivíparas y ovovivíparas diferente de la de aquellos que son ovíparos, en que decrece debido a las relaciones materno-embriónicas más íntimas en los primeros más que en los segundos (Guraya, 1986; Hamlett et al. 1999). Muchas más funciones han sido atribuidas a la zona pelúcida, tales como el sitio de unión de receptores para la reacción acrosomal, la prevención de la polispermia y el reconocimiento especie-específico del espermatozoide (Ravaglia y Maggese, 2003).

La composición química de la zona pelúcida de toda especie ictícola consiste en mucopolisacáridos, proteínas y combinaciones de polisacáridos y glucoproteínas (Anderson, 1967; Guraya, 1986; Breed et al. 2002; Ravaglia y Maggese, 2003). Esto es similar para *M. schmitti* ya que dicha zona se colorea PAS+, indicando la presencia de mucopolisacáridos.

Alrededor de la zona pelúcida aparece un epitelio denominado folicular o granulosa. De las especies de tiburones estudiadas hasta la actualidad, existe un solo tipo de células que integra al **epitelio folicular**. Estas células comienzan planas, luego se diferencian en cuboideas y finalmente se elongan hasta hacerse cilíndricas (Davenport, 2003). Cuando la vitelogénesis finaliza, temporariamente, estas células conforman un epitelio estratificado.

Esta diferenciación celular sucede en la especie estudiada, *M. schmitti*, y la naturaleza transitoria de las células foliculares que se tornan en una monocapa en estadios avanzados sugeriría una condición temporaria que serviría de reserva celular para ser empleada durante el crecimiento del ovocito (Guraya, 1986).

Los núcleos de las células foliculares en *M. schmitti*, son desplazados hacia la región basal celular al final de la foliculogénesis. Numerosos estudios histológicos demuestran que, durante la foliculogénesis, las células foliculares se diferencian en uno o dos tipos; por ejemplo, en *Squalus acanthias*, *Chiloscyllium griseum*, *Heptanchus cinereus*, *Mustelus laevis*, *Scyliorhinus canicula*, *Scyliorhinus stellaris*, *Scymnus lichea*, *Spinax niger*, las células

foliculares permanecen todas cuboideas o cilíndricas, en cambio en *Chimaera monstrosa*, *Myliobatis bovina*, *Raja spp*, *Scyllium spp*, *Torpedo marmorata*, *Trygon violacea*, algunas de ellas se transforman en piriformes y más grandes (Lutton et al., 2005).

De acuerdo a Davenport (2003), las células foliculares comienzan como planas, se diferencian en cuboideas aproximadamente cuando alcanzan los 0.5 mm de diámetro y se alargan en cilíndricas cerca de los 2.0 mm. Las células planas que acompañan al ovocito constituyen en conjunto el folículo primordial (Hamlett et al. 1999). Las células foliculares contienen diferentes organelas como el aparato de Golgi, vesículas, mitocondrias y cuerpos densos que se hacen evidentes en la microscopía electrónica. Guraya (1986) mencionó estas características para especies de teleósteos (Jollie y Jollie, 1964; Hurley y Fischer, 1966; Wourms y Sheldon, 1976; Ohta y Teramishi, 1982). Estudios actuales refieren las mismas estructuras para las especies de condriictios (Hamlet et al., 1999; Prisco et al., 2002a; Prisco et al., 2002b; Prisco et al., 2007; Davenport et al., 2011). Estas organelas incrementan su número durante el desarrollo del folículo. Lo mismo ha sido observado en *M. schmitti*.

Las células foliculares parecen ser capaces de producir progesterona, testosterona y estradiol independientemente del eje hipotalámico-hipofisario, lo cual es totalmente diferente de otros grupos de vertebrados (Lutton et al. 2005). Los estudios histoquímicos también sugieren que dichas células estarían involucradas en la síntesis de diferentes proteínas y lípidos durante el desarrollo del ovocito (Ravaglia y Maggese, 2003; Hamlett et al. 1999a).

La **capa tecal** está constituida por células y fibras de tejido conectivo que rodean al epitelio folicular, el cual descansa sobre la lámina basal. *M. schmitti* presenta una capa compacta de células tecaes que rodean al epitelio folicular con fibras externas laxamente dispuestas. Esta disposición de la teca recuerda a la que posee *Urobatis jamaicensis* (Hamlett et al. 1999). En otros condriictios como *Torpedo marmorata* (Prisco et al., 2002), *Squalus acanthias* (Lance and Callard, 1969) y *Scyliorhinus canicula* (Dodd y Dodd, 1980), las células tecaes se dividen en dos capas, interna y externa; la primera con células planas de aspecto fibroso y las segundas, cúbicas. Por otro lado, en *Rhinobatus granulatus* y *Scoliodon sorrakowah* (Guraya, 1978) esta disposición aparece de manera invertida.

La degeneración de los folículos antes de la ovulación es común entre los elasmobranquios. Esto puede ocurrir en cualquier estado del desarrollo del ovocito y puede contener cantidades variables de vitelo en el citoplasma. Se hace difícil distinguir macroscópicamente los folículos preovulatorios de los

postovulatorios en algunas especies. *Mustelus schmitti* es un ejemplo de esto. Los **folículos atrésicos** están formados por la degeneración de los folículos preovulatorios presentando los mismos elementos del folículo propiamente dicho. Este proceso puede ocurrir en cualquiera de los tamaños que alcancen los folículos dependiendo de mecanismo que aún no han sido dilucidados. Se ha descrito la atresia en folículos pequeños en varias especies de elasmobranquios. Las observaciones ultraestructurales en *Torpedo marmorata* indican la disolución del núcleo, la degeneración de mitocondrias y otros elementos citoplasmáticos (Chieffi Baccari et al, 1992).

Otro proceso similar a la atresia pero donde la maduración es alcanzada, es la formación del **cuerpo lúteo (corpus luteum)**. El epitelio folicular persiste in el ovario y degenera por apoptosis, que es el mayor mecanismo de eliminación de este tipo de células (McMillan, 2007). No obstante, en algunas especies de elasmobranquios, las células foliculares proliferan después de la ovulación como en el caso de *Squalus acanthias* y en varias especies de *Raja* y *Scyliorhinus stellaris*; ambas células, tecaes y foliculares constituyen al cuerpo lúteo (Fasano et al., 1989). De todas maneras, la organización básica del cuerpo lúteo en los elasmobranquios es similar tanto en especies ovíparas como en las vivíparas, consistiendo en células lipídicas que derivan de las células foliculares. El cuerpo lúteo en los peces ovíparos se degrada en un corto periodo de tiempo mientras que en los vivíparos persiste durante la gestación (MacMillan, 2007).

El estradiol, la progesterona y la testosterona son las hormonas que regulan la foliculogénesis y la vitelogénesis. La información disponible sugiere que las hormonas ováricas regulan la función del tracto reproductor. El estradiol y la testosterona actúan conjuntamente en el desarrollo folicular y la progesterona está asociada con la retención de los huevos al comienzo de la gestación y más tarde a la de los embriones. El epitelio folicular de diversas especies de condriictios secreta testosterona, estradiol-17 β y progesterona sin la intervención de las células tecaes. Estas células producen predominantemente testosterona como el cuerpo lúteo. Este último también es responsable de la secreción de progesterona en especies tanto vivíparas como ovíparas (McMillan, 2007).

Como fue mencionado anteriormente, los ovarios de los Condriictios se hallan embebidos en el órgano epigonal, un tejido linfomieloide. Éste es un tejido inmune que funciona como la médula ósea de los vertebrados superiores produciendo leucocitos. La asociación directa de las gónadas con este tipo de tejido sugeriría una relación funcional entre ambos. Un sistema portal del

ovario y el órgano epigonal en *Leucoraja erinacea* induce a pensar que el tejido epigonal filtraría el material antigénico del ovario (Lutton y Callard, 2004). En varias especies se ha demostrado una directa asociación entre las células del ovario y el órgano epigonal como en *Urobatis jamaicensis* (Hamlett et al. 1999), *Raja asterias* (Andreucetti et al. 1999), *Torpedo marmorata* (Prisco et al. 2002b) y *Leucoraja erinacea* (Lutton y Callard, 2004). También se ha detectado la presencia de leucocitos en las capas tecaes de las especies mencionadas anteriormente, a excepción de *Raja asterias* (Hamlett et al. 1999; Prisco et al. 2002b, Lutton y Callard, 2004). Además, Lutton et al. (2005) mencionan que Fänge y Pulsford (1983) demostraron diapedesis en leucocitos de elasmobranquios, lo que indicaría una constante y fluida conexión entre las células típicas ováricas y el órgano epigonal.

Recentemente, Bircan-Yildirim et al. (2011) describieron el órgano epigonal de *Rhinobatos rhinobatos* y mencionaron la dificultad de observar a simple vista a dicho órgano en hembras maduras pero que nunca desaparece completamente de los cortes microscópicos. Los autores también señalan que el contacto entre las gónadas y el órgano epigonal varía de una muestra a otra. Este hecho también fue observado en *M. schmitti*. Esto llevaría a plantear algunas preguntas aún sin resolver tales como, si este órgano linfomieloide actuaría durante algún tiempo de la vida del animal o su función variaría de acuerdo a las especies o a su modo reproductivo. Sin duda, investigaciones más profundas dentro de este campo serán requeridas en el futuro.

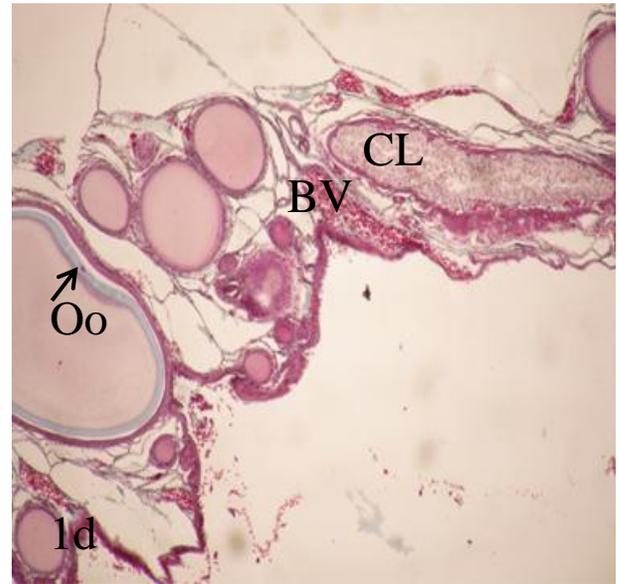
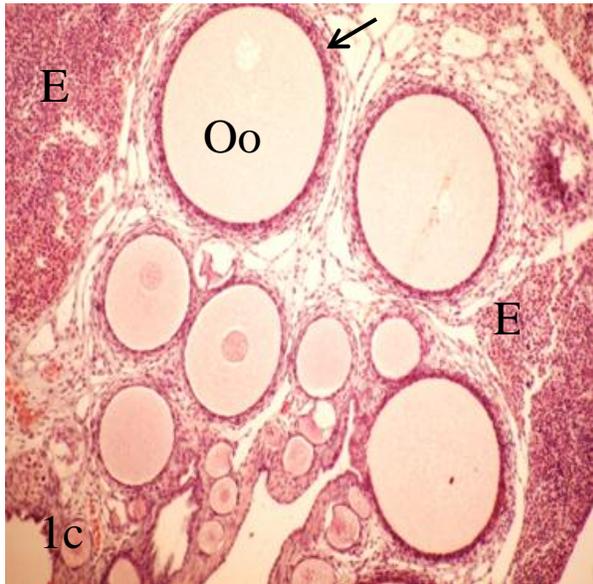
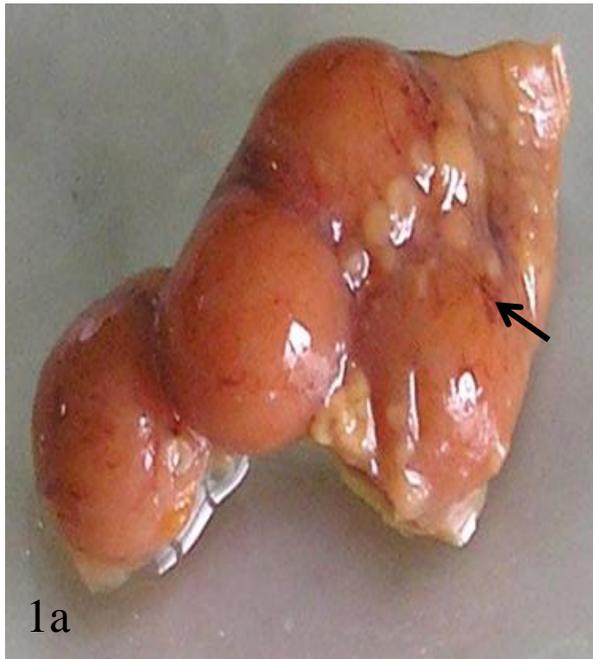


Figura 1: Anatomía y organización básica de un folículo ovárico.

a: Macrofotografía de un ovario maduro. La flecha señala la vascularización. Se observan cuatro huevos llenos de vitelo (color naranja) y los demás son previtelogénicos.

b: Microfotografía de un ovario de una hembra inmadura. El órgano epigonal está más desarrollado que el órgano reproductivo. La flecha indica las incipientes células foliiculares. Masson. 20X.

c: Ovario en maduración. Los folículos se hallan en distintos estados madurativos con la capa tecal rodeándolos (flecha). H & E. 10X.

d: Ovario maduro. La zona pelúcida está completamente desarrollada (flecha). Se distingue un cuerpo lúteo entre los folículos. Masson. 10X.

BV: Vaso sanguíneo; CL: cuerpo lúteo; E: órgano epigonal; Oo: ovocito.

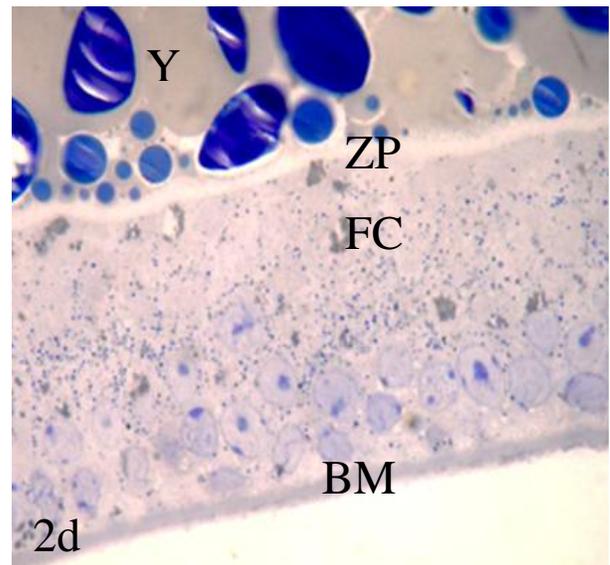
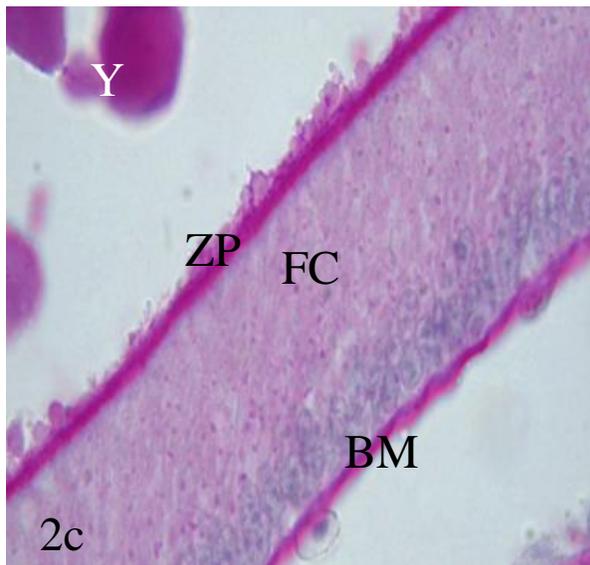
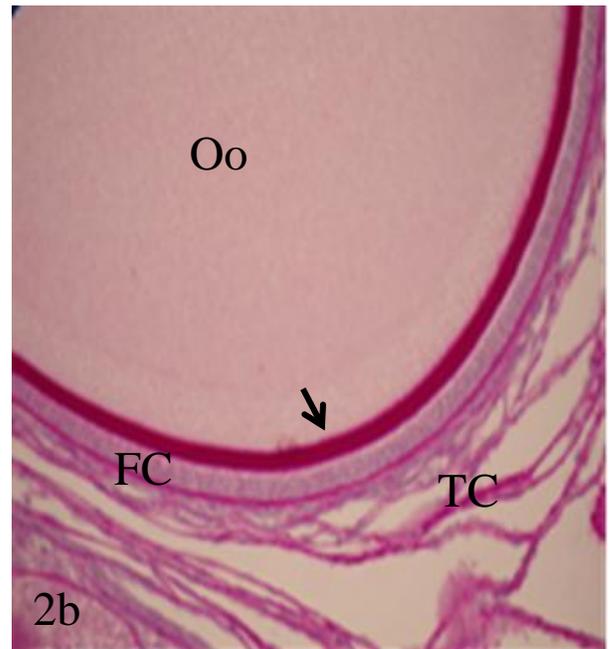
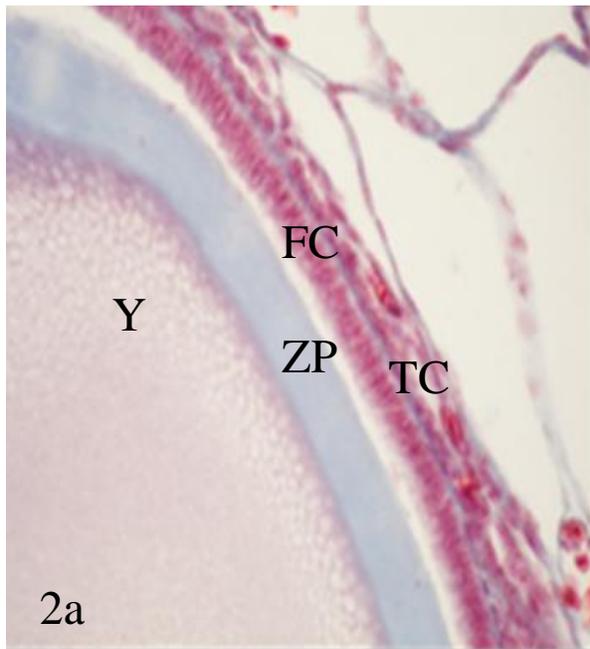


Figura 2: Microscopía óptica de los elementos de un folículo ovárico y la microestructura del epitelio folicular.

a: Zona pelúcida muy desarrollada en un folículo en proceso de vitelogénesis. Masson. 40X.

b: La zona pelúcida se hace más delgada (flecha). PAS.40X.

c: La zona pelúcida se adelgaza mientras el folículo crece. Se observan pequeñas vesículas dentro de las células foliculares. Éstas se hallan enmarcadas por la membrana basal y la zona pelúcida. PAS. 100X.

d: Corte semifino de células foliculares con núcleos desplazados hacia la membrana basal mientras las vesículas vitelinas son sintetizadas. La zona pelúcida se adelgaza. Azul de Toluidina. 100X.

BM: Membrana basal; FC: Células foliculares; Oo: ovocito; TC: Células tecales, Y: Vitelo; ZP: Zona pelúcida.

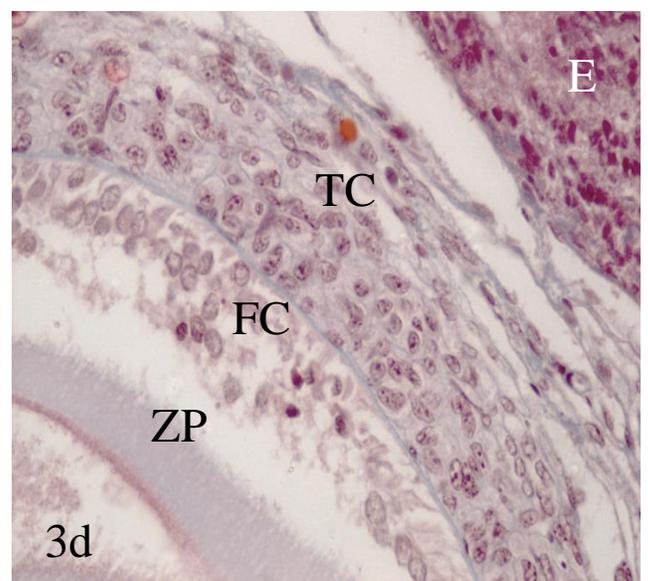
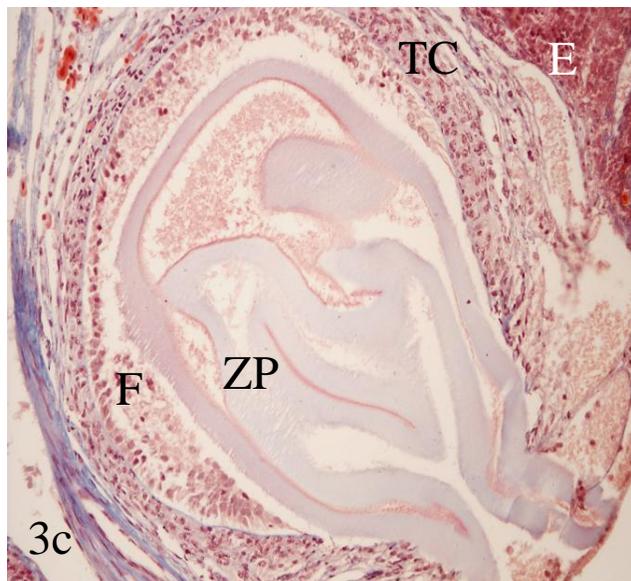
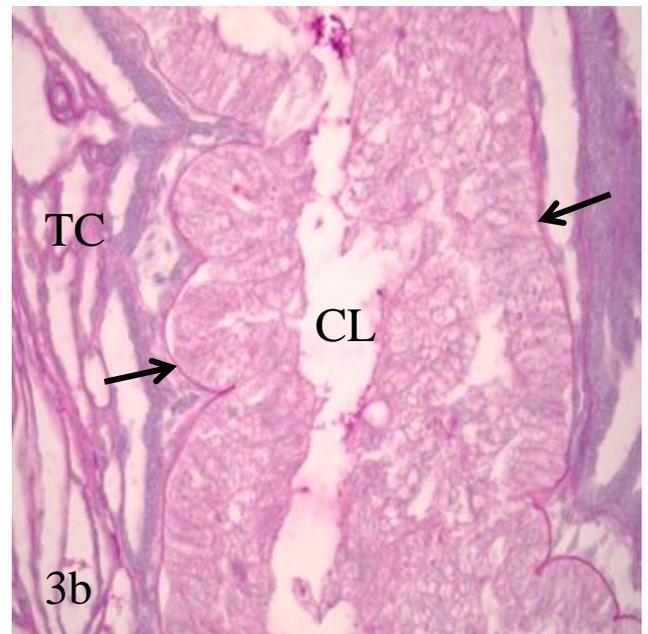
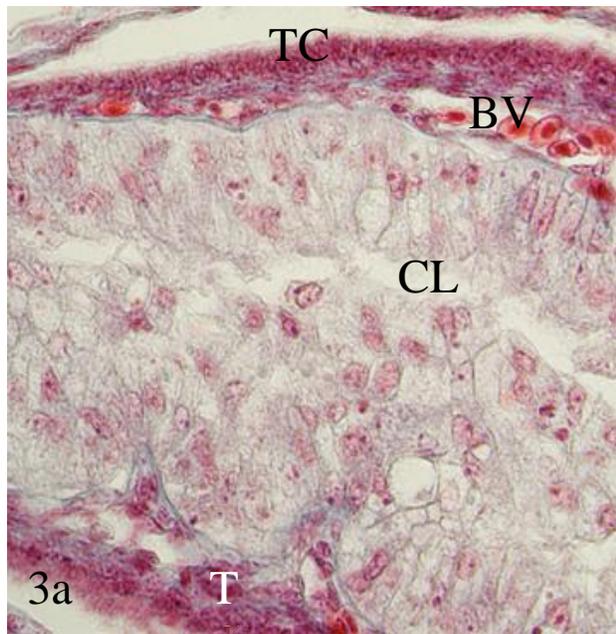


Figura 3: Microestructura de un cuerpo lúteo y un folículo atrésico.

a: Corte de un cuerpo lúteo mostrando sus células secretoras. Las células tecales rodean a dicha estructura. Masson. 40X.

b: Cuerpo lúteo en el que se evidencia la membrana basal con la tinción específica (flechas). PAS. 40X.

c: Un folículo atrésico mostrando la zona pelúcida replegada sobre sí misma. Masson.20X.

d: Detalle de un folículo atrésico. Algunas células foliculares permanecen con núcleos picnóticos. La capa tecal se encuentra muy desarrollada. Masson.60X.

BV: Vaso sanguíneo; CL: Lumen central; E: órgano epigonal; FC: células foliculares, TC: células tecales; ZP: Zona pelúcida.

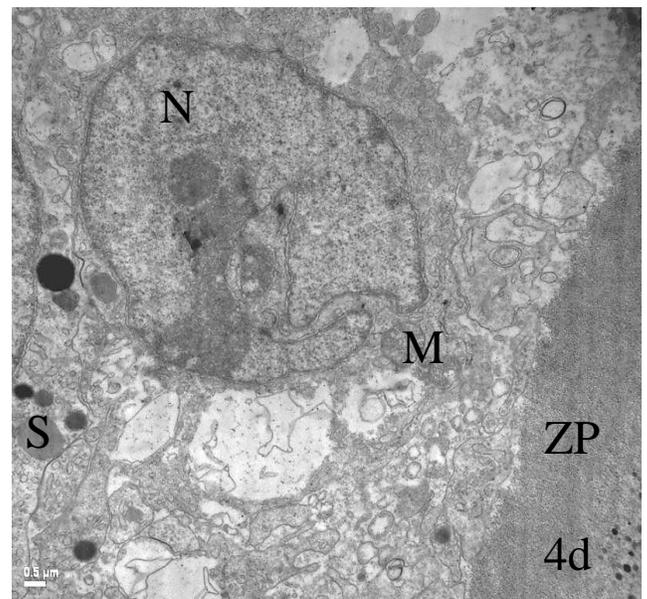
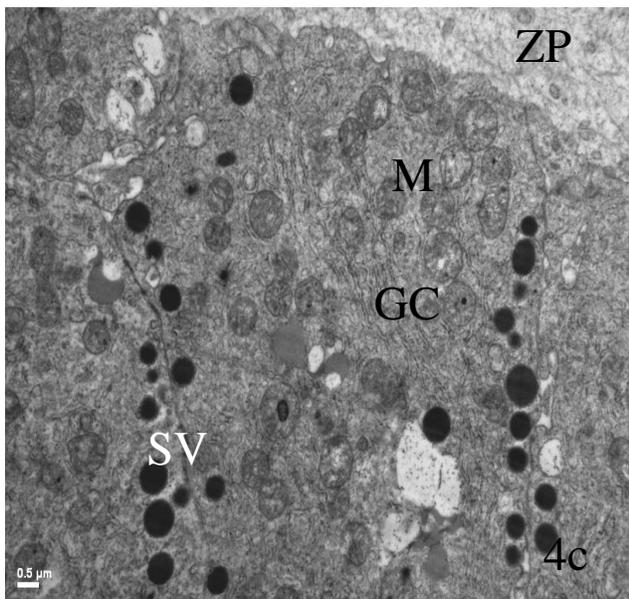
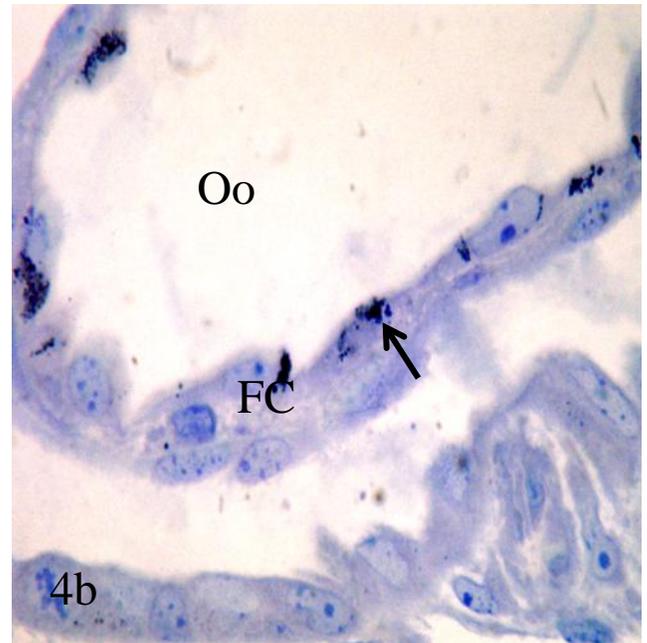
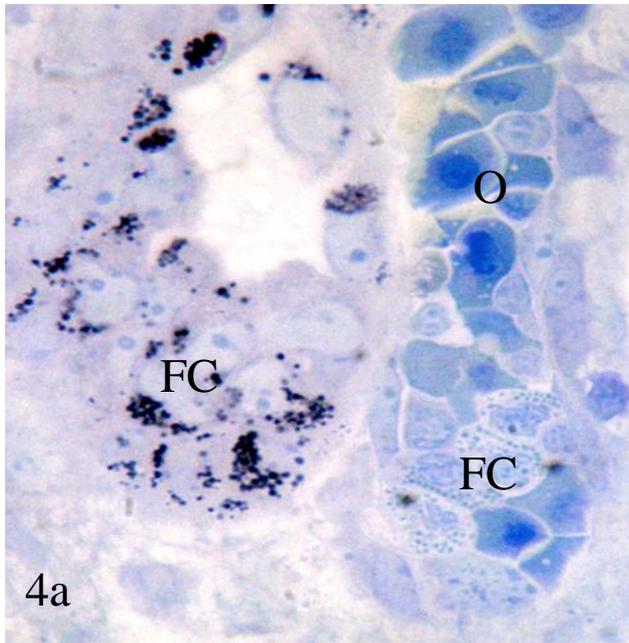


Figura 4: Microfotografías de cortes semifinos y microscopía electrónica de células foliculares.

a: Oogonias con sus células foliculares dispuestas en conjunto. Azul de Toluidina. 100X.

b: Un folículo primordial con células foliculares planas donde se observan las vesículas precursoras de vitelo siendo sintetizadas (flecha). Azul de Toluidina. 100X.

c: Las vesículas secretoras se alinean sobre la membrana citoplasmática. Numerosas mitocondrias se reúnen cerca de la zona pelúcida próxima al aparato de Golgi.

d: Célula folicular con vesículas secretoras en su interior.

FC: Células Foliculares; GC: Aparato de Golgi; M: Mitocondria; N: Núcleo; O: Ovogonia; Oo: ovocito; SV: vesículas secretoras; ZP: Zona pelúcida.

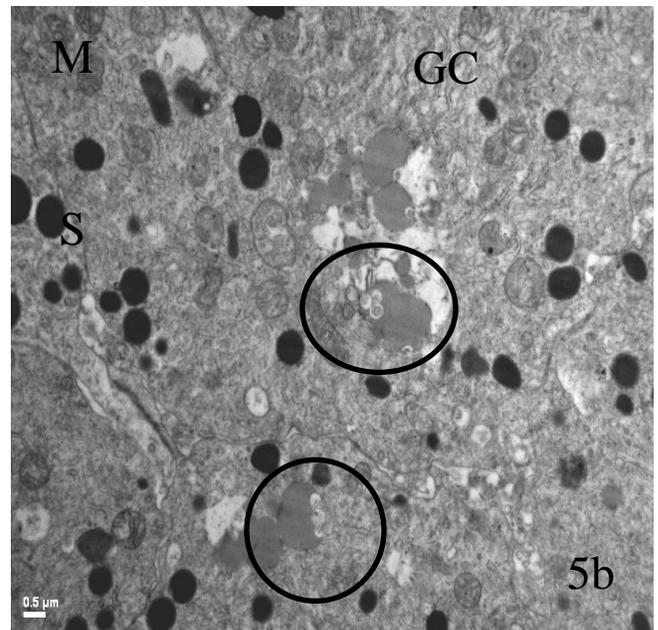
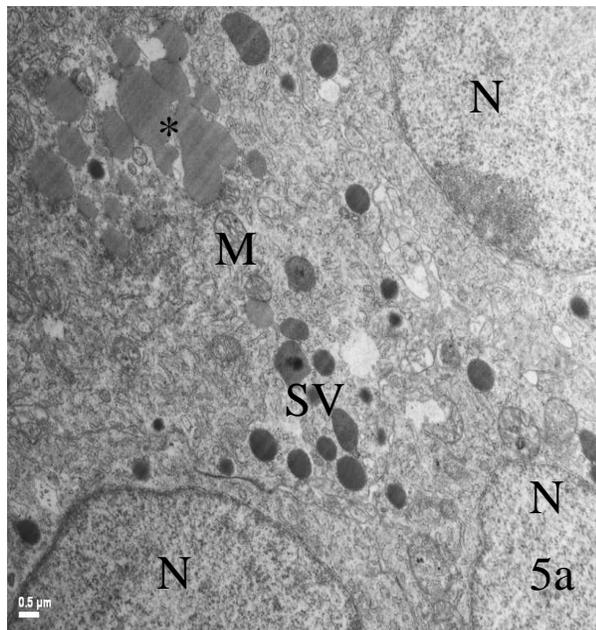


Figura 5: Ultraestructura de células foliculares.

a: Las vesículas secretoras (asterisco) se fusionan cerca de los núcleos de las células foliculares.

b: Microfotografía de TEM de las zonas periféricas de las células foliculares donde la fusión de las vesículas puede ser observada (círculo). Algunas mitocondrias y el aparato de Golgi también están presentes.

GC: Aparato de Golgi; M: Mitocondria; N: Núcleo; SV: Vesículas secretoras.

Capítulo 4

Glándula Oviductal

Resumen

Se examinaron microscópicamente las glándulas oviductales tanto inmaduras como maduras de *M. schmitti*. Los resultados indican que dichas glándulas poseen la misma zonificación que en la mayoría de los Condrictios; nombradas de anterior a posterior son: zonas Club, Papilar, Baffle y Terminal. La glándula en su totalidad está compuesta por glándulas tubulares simples que se conectan por medio de conductos a lo largo de todo el órgano. La zona Club presenta una forma típica de hacha india con un epitelio simple cilíndrico ciliado incluyendo células secretoras PAS (+) y AB (+). La zona Papilar se caracteriza por pequeñas laminillas cónicas en número de tres. El epitelio de esta zona contiene células ciliadas con núcleo apical y células secretoras con núcleo basal que se colorean AB (+). La zona Baffle consiste en una lámina aplanada que alterna con “spinnerets”, las cuales son pequeñas y delgadas proyecciones dispuestas a ambos lados de la misma. La estructura completa se presenta en número de ocho a nueve unidades. Un epitelio simple cilíndrico ciliado recubre tanto las spinnerets como la lámina plana y no se observó tinción positiva tanto para AB como para PAS. El epitelio de la zona Terminal es PAS (-) y AB (+), y delgados túbulos que corren de manera adyacente a la zona Baffle son el sitio donde grupos de espermatozoides son observados en el lumen. El epitelio de los túbulos de almacenaje espermático no se tiñe con ninguna de las coloraciones empleadas. También fue observado esperma en la zona Baffle, pero se presume que su disposición ahí se debería al recorrido hacia la fecundación ya que se hallaba disperso entre los pliegues del epitelio. Por medio de la microscopía electrónica de barrido pudo ser detectado el esperma en las zonas Baffle y Club de una hembra preñada.

Introducción

Todas las especies de Condrictios desarrollan una glándula única en su tipo derivada de los oviductos denominada glándula oviductal (OG) de acuerdo a la terminología adoptada por Hamlett et al., 1998a.

Esta glándula es una expansión del oviducto anterior cuando el animal está inmaduro. Al alcanzar la madurez, la misma adquiere una forma acorazonada con extensiones laterales que recuerdan a los cuernos de un carnero. Se observan cuatro zonas típicas considerando desde proximal a distal: Club,

Papilar, Baffle y Terminal (Hamlett et al., 1998a). La morfología externa e interna de esta glándula fue estudiada por varios autores (Metten, 1939; Nalini, 1940; Prasad, 1945, 1948; Brown, 1955; Rusaoüen et al. 1976; Hamlett, 1996, 2002; Knight et al., 1996; Conrath y Musick, 2002; Hamlett et al., 1998, 2002a, 2005; Smith et al., 2004; Storrie et al., 2008; Serra-Pereira et al., 2011).

En algunas especies, la zona Baffle no está desarrollada como en *Urobatis halleri* (Babel, 1967), *Urobatis jamaicensis* (Hamlett, 1996, Hamlett et al., 1998), *Myliobatis nieuhofii* (Prasad, 1951); se presentan solamente las zonas Club y Papilar.

Excepcionalmente, existe una sola familia, Narcinidae (Torpediniformes), que no posee glándulas oviductales (Prasad, 1945).

Las zonas Club y Papilar producen diferentes cubiertas gelatinosas que cubren el huevo en su paso hacia el útero. La zona Baffle secreta diversos tipos de sustancias que también cubren al huevo. La zona Terminal es donde se almacena el espermatozoos y es la responsable de la formación de los filamentos de la superficie de la cápsula en algunas especies de *Raja*.

Según Hamlett et al. (1998), a pesar de las variaciones entre las especies, la glándula oviductal parece ser que emplea el mismo proceso básico de ensamble para producir tanto cápsulas duras como blandas o envolturas ovocitarias. La extrusión del material se realiza por medio de conductos de la glándula formando una lámina simple que cubre al huevo. La cubierta extruida de este modo, dispone las moléculas de una manera compleja y precisa. Dicho proceso ha sido investigado en especies ovíparas (Knupp et al., 1996; Knupp et al., 1998; Knupp y Squire, 1998; Koob y Cox, 1988; Rusaoüen et al., 1976; Smith et al., 2004; Oddone et al., 2008) pero en ninguna vivípara por lo tanto se asume que ocurre lo mismo para estas últimas especies.

Resultados

La glándula oviductal puede ser observada macroscópicamente en la Figura 1a con su característica forma de corazón. También se muestra un corte longitudinal en la misma foto. La microscopía electrónica de barrido proporcionó una completa idea del paso del huevo a través del lumen de esta glándula. Cada túbulo libera su propia secreción en el conducto central (Figura 1b).

La glándula oviductal inmadura es una expansión del oviducto. Al comienzo de la maduración, el lumen se expande y en una fase posterior, la superficie

del epitelio se pliega para dar las formas características de cada zona (Figura 1c, d).

La glándula oviductal madura se forma con las cuatro zonas: Club, Papilar, Baffle y Terminal. Básicamente, cada zona consiste en túbulos secretores rodeados de tejido conectivo vascularizado los cuales liberan sus secreciones hacia el lumen glandular (Figura 2a, b).

Zona Club

La zona Club se caracterizó por pliegues epiteliales con forma de hacha. Esos pliegues alternan con depresiones donde se vacían glándulas tubulares simples (Figura 3a, b). El epitelio de los túbulos presentó dos tipos celulares: uno, con núcleo apical con gránulos de cromatina y ciliado y el otro, estaba representado por células secretoras con núcleo basal con gránulos de cromatina que se colorea, PAS (+) y AB (+).

Zona Papilar

La zona Papilar se distinguió por las laminillas delgadas con células que contienen núcleos ovales eucromáticos que alternan con glándulas tubulares simples que se tiñen PAS (+) y AB (-) (Figura 3b, c). El epitelio era simple cilíndrico ciliado como el de la zona Club. Estas glándulas se colorearon más intensamente PAS (+) que las que se encuentran en la zona Club. Esta zona se presentó con no más de tres o cuatro pliegues. Estas laminillas son menos numerosas que en el resto de las zonas (Figura 3c, d).

Las fila más caudal de túbulos consiste en una hilera simple de túbulos, AB (+) (Figura 4a). El epitelio de estos túbulos presentó dos tipos de células que se caracterizan por núcleos basales heterocromáticos y núcleos luminales con componentes eucromáticos (Figura 4b).

Zona Baffle

La unidad funcional de la zona Baffle está formada por una proyección plana con un centro de tejido conectivo que alterna con “spinnerets”, que son pequeñas prolongaciones dispuestas a ambos lados del pliegue plano. La estructura en su conjunto se presenta en número de ocho a nueve unidades. Un epitelio simple cilíndrico ciliado recubre tanto a la proyección plana como a las “spinnerets” y no se observó coloración AB ni PAS en ellas. Dos tipos de células formaron los túbulos, uno, ciliado con núcleo oval apical y el otro es secretor con núcleo redondeado basal. Las células ciliadas eran menos numerosas que las secretoras. La microscopía electrónica mostró algunas células secretoras con vesículas claras en cuyo interior hay un centro denso (Figura 4c).

Se detectó también esperma en la superficie de la zona Baffle (Figura 4d). Se asume que su presencia en dicha zona se debería al tránsito hacia el óvulo para la fecundación.

Zona Terminal

El epitelio de esta zona contiene células ciliadas con núcleo apical y células secretoras con núcleo basal que se colorean AB (+) (Figura 5a). La zona Terminal está formada por túbulos alargados que corren adyacentes a la zona Baffle donde grupos de espermatozoides se observaron en el lumen (Figura 5b), indicando el lugar de almacenaje espermático. Estos túbulos estaban asociados con vasos sanguíneos. Los grupos de espermatozoides dentro de dichos túbulos, no presentaron patrón alguno en su disposición (Figura 5c). El epitelio de los túbulos donde se almacena el esperma no se coloreó con ninguna de las coloraciones utilizadas en este estudio.

También se observó esperma en las zonas Club (Figura 5d) y Baffle (Figura 6a) en una hembra preñada de *M. schmitti*.

Cortes semifinos revelaron diferencias entre los túbulos de la zona Terminal que almacenaban esperma y aquellos que no los contenían. Los túbulos sin esperma tenían células secretoras con núcleos basales y gránulos de secreción esféricos (Figura 6b). Con el uso de TEM, se pudieron observar claramente los núcleos apicales de las células ciliadas y los gránulos redondos de las células secretoras que desplazan al núcleo a su parte basal (Figura 6c).

El almacenaje espermático se registró en la glándula oviductal a lo largo de todo el ciclo reproductivo, estando aún la hembra preñada. Esto podría sugerir que el aparato reproductor de la hembra podría retener esperma en la glándula oviductal cerca 11 meses. Una observación notable de destacar es que la secreción en los túbulos de almacenaje espermático era escasa y no tenía contacto con el mismo (Figura 6d). Esto fue confirmado con la microscopía electrónica de transmisión en detalle (Figura 6e).

Discusión

Las funciones de esta particular glándula son producir coberturas gelatinosas, formar la envoltura terciaria del huevo, almacenar y nutrir al esperma y protegerlo del ataque inmunológico materno (Hamlett et al., 2005). Esta glándula permite la formación de cubiertas gelatinosas que se hacen plegables lo que constituye una estrategia para formar protecciones grandes en un espacio reducido. Casi todas las especies de Condrictios presentan en sus glándulas oviductales las cuatro características zonas: Club, Papilar, Baffle y Terminal. Las zonas Club y Papilar están presentes en especies ovíparas o

vivíparas y son las responsables de producir las cubiertas gelatinosas que cubren al huevo. Incluso en *Urolophus jamaicens*, el cual no posee zona Baffle ya que no presenta una envoltura ovocitaria, aparecen ambas zonas, Club y Papilar (Hamlett et al., 1998; Hamlett et al., 1999c).

La zona Baffle produce varios tipos de cubiertas ovocitarias que son comunes dentro de los peces condriictios (Hamlett et al. 1997). La zona Terminal es la encargada de almacenar esperma en sus túbulos y produce secreciones que forman los filamentos de la superficie de la cápsula de algunas especies de *Raja* (Hamlett et al., 2002a).

La diversidad en la naturaleza de la cubierta gelatinosa podría existir también en especies con diferentes modos reproductivos. En algunos tiburones y rayas, el huevo y la cubierta llenan totalmente la cápsula ovígera y los embriones en desarrollo rompen la envoltura que los cubre para completar su crecimiento de manera libre dentro del útero. En otras especies vivíparas, la cubierta gelatinosa ocupa sólo una porción pequeña de la cápsula. Y en los tiburones placentarios el componente gelatinoso es reducido y rodea al huevo fertilizado durante las primeras etapas de gestación (Hamlett et al. 2002a).

La técnica de PAS es usada para reconocer glicoproteínas o cualquier sustancia mucosa que contenga azúcares neutros. La coloración AB pH 2,5 señala la presencia glucosaminoglucanos ácidos sulfatados y no sulfatados y sialoglicoproteínas. Por lo tanto, las glucoproteínas o cualquier sustancia mucosa que contenga azúcares neutros se encuentran en las células basales de las laminillas de la zona Club y en los túbulos de las zonas Club y Papilar. Por otro lado, los glucosaminoglucanos ácidos sulfatados y no sulfatados son secretados por las células de los túbulos de las zonas Club y Terminal. La composición química exacta de dichas secreciones todavía deber ser investigada.

Considerando estudios histoquímicos de la glándula oviductal de *Callorhynchus milli* (Smith et al., 2004) es posible observar que la zona Club es PAS (+) y AB pH 2,5 (+), la zona Papilar es AB (+), la zona Baffle, PAS y AB (-) y la zona Terminal, fuertemente AB (+). Comparando con *M. schmitti* se encontró que las zonas Club, Baffle y Terminal son idénticas histoquímicamente mientras que la zona Papilar es PAS (+), AB (-).

El tiburón *Iago omanensis* presenta las cuatro zonas típicas en sus glándulas y las células que las componen son prácticamente idénticas (Fishelson y Baranes, 1998; Hamlett et al., 2002a) a aquellas que se encuentran en *M. schmitti* pero en este último, la zona Terminal es AB (+) y PAS (-). La zona Terminal en *I. omanensis* es PAS (+). Existen diferencias entre las zonas Papilar y Terminal de *Callorhynchus milli* e *Iago omanensis* respecto a aquellas pertenecientes a *M. schmitti*. Las tres especies han desarrollado

diferentes modos reproductivos y esa podría ser la razón de las diferencias en la naturaleza de las secreciones. Evidentemente, una mayor investigación es requerida para dilucidar este punto.

Se halló esperma en la zona Baffle de la glándula oviductal de *Mustelus schmitti* pero se debe a su tránsito hacia el oviducto anterior donde la fertilización se lleva a cabo. Este esperma sería removido cuando los huevos fertilizados descienden hacia el útero. Hasta la actualidad, la zona Terminal es la única área considerada para el almacenaje espermático. Otros autores también mencionan la presencia de esperma en la zona Baffle (Stevens, 2002; Basallo et al. 2011) pero lo ubican dentro de los túbulos, lo que sugeriría otro sitio para almacenar esperma.

La complejidad de la zona Baffle está directamente relacionada con la complejidad de la cápsula producida y dado que *M. schmitti* es una especie vivípara aplacentaria, dicha zona muestra una estructura simple; lo mismo ocurre para las zonas Club y Papilar, que no están muy desarrolladas.

La presencia de esperma en la zona Club en una hembra preñada indicaría que el esperma almacenado sería el que fertiliza a los ovocitos en lugar del esperma fresco. Chiaramonte y Pettovello (2000) sugieren que el apareamiento ocurre antes del parto con inmediata ovulación. Ellos capturaron una hembra con embriones y huevos “in utero” y pequeños huevos en el ovario y otro ejemplar con embriones y huevos uterinos. Escasos ejemplos de hembras con embriones y huevos han sido reportados por pescadores. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que la fertilización ocurra con el esperma almacenado y algunas veces descenderían los huevos fertilizados antes que la parición suceda. La ovulación ocurriría simultáneamente con la preñez. Los apareamientos no pueden suceder antes del parto debido a que el paso de los embriones por el cérvix arrastraría el esperma depositado en el útero.

Otros autores han encontrado esperma en la glándula oviductal de *Dasyatis sabina* (Maruska et al., 1996) pero no especifican la zona.

Cabe destacar que el epitelio que mantiene almacenado al esperma es AB and PAS (-). También es notorio que el epitelio de la zona Baffle, donde se ha encontrado esperma numerosas veces, presenta la misma reacción histoquímica que la zona Terminal. Estudios similares han sido practicados en un pez teleósteo llamado *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*, donde el epitelio ovárico libera gránulos altamente PAS positivos al lugar donde el esperma es guardado en las primeras etapas del período de almacenamiento (Muñoz et al., 2002). Tal vez, el esperma de *M. schmitti* necesite un medio neutro para no sufrir la reacción de capacitación espermática.

Pratt (1993) estudió once especies de tiburones pertenecientes a la costa Este del Atlántico Norte y se encontró almacenamiento espermático en nueve de ellos (*Alopias vulpinus*, *Lamna nasus*, *Carcharinus obscurus*, *Carcharinus plumbeus*, *Galeocerdo cuvieri*, *Prionacea glauca*, *Rhizoprionodon terranova*, *Sphyrna lewini* y *Sphyrna tiburo*). Solamente *Isurus oxyrinchus* y *Alopias superciliosus* carecen de esperma en sus respectivas glándulas oviductales. Por otro lado, sólo un adulto hembra de *Alopias vulpinus* presentó una cantidad moderada de esperma en los túbulos y el lumen de la glándula oviductal. Este autor considera que los tiburones Lamniformes siendo plesiomórficos han desarrollado un estilo de inseminación más simple. En cambio, los tiburones Carcariniformes muestran una variedad mayor de modos reproductivos. Hamlett et al. (1998) hicieron un relevamiento de varias glándulas oviductales de distintas especies como *Scyliorhinus canicula*, *S. stellaris*, *Raja erinacea*, *R. eglanteria*, *R. clavata*, *Squalus acanthias*, *Mustelus canis* y *Urolophus jamaicensis*. La morfología de estos órganos muestra las mismas cuatro zonas a pesar de la variación en sus modos reproductivos.

La zona Terminal es la última zona de la glándula oviductal, la cual es el sitio de formación de los filamentos que adornan el exterior de la cápsula ovígera en las especies ovíparas. Siendo *M. schmitti* vivíparo, esta zona sólo almacena esperma y desarrolla pliegues bajos que descienden hacia el útero. Estudios recientes en *Raja clavata* (Serra-Pereira et al., 2011) determinaron que la zona Terminal no estaba involucrada en el almacenaje espermático y su superficie estaba más extendida debido a la especialización en la formación de los filamentos de la cápsula ovígera.

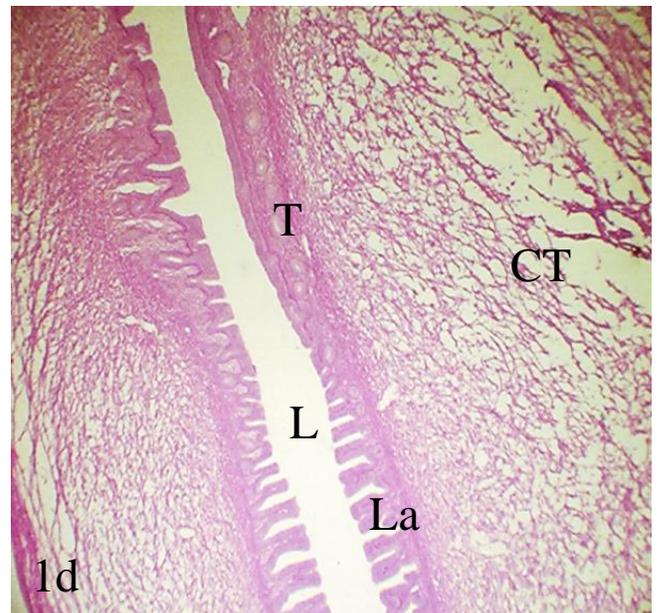
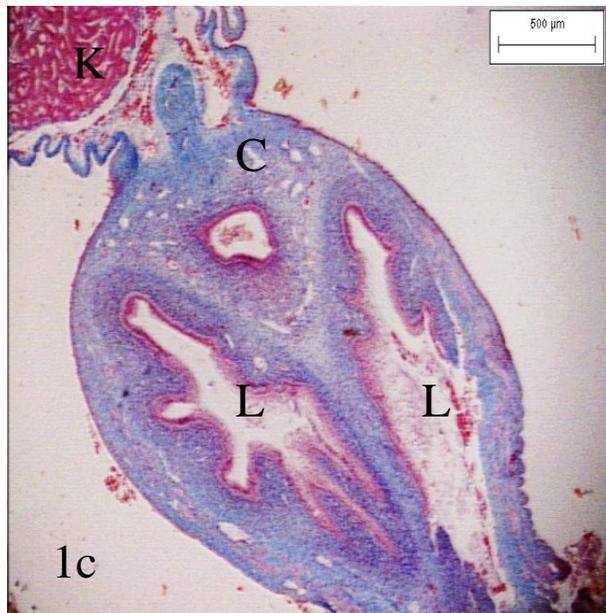
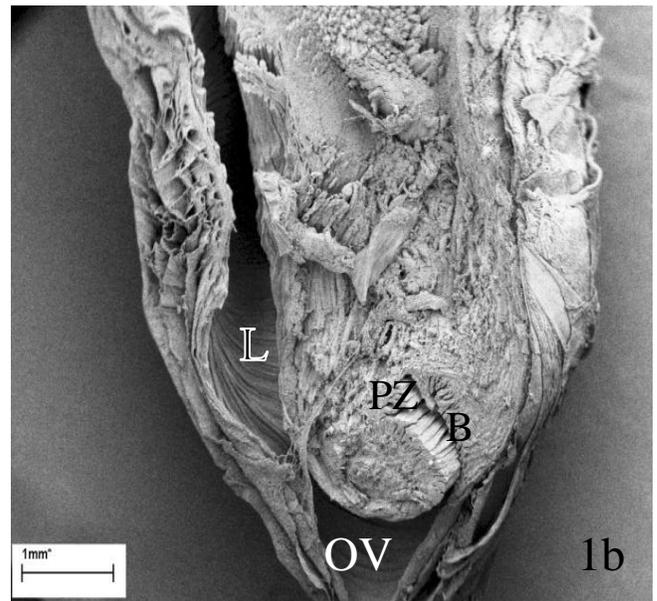
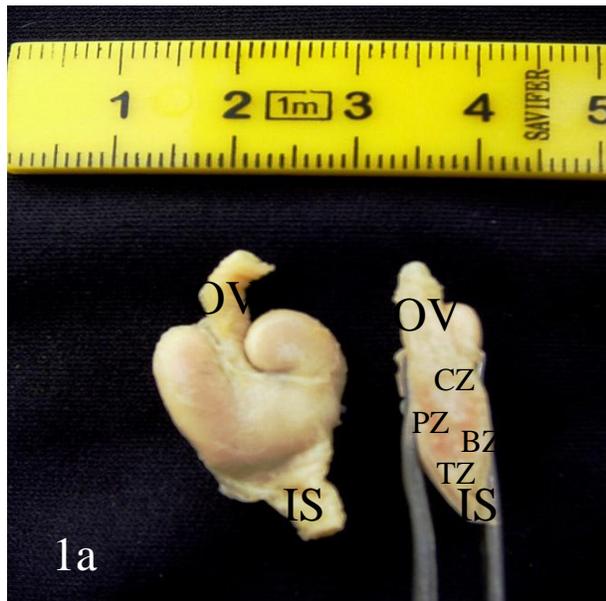


Figura 1: Organización básica de la glándula oviductal inmadura y madura.

a: Macroscopía anatómica de la glándula oviductal.

b: Microfotografía de barrido de la glándula. Se observan los túbulos que desembocan en el lumen.

c: Corte sagital de una glándula oviductal inmadura. Masson.

d: Corte sagital de una glándula oviductal inmadura en un estadio de mayor desarrollo que en la Figura 1c. Aparecen los túbulos y los pliegues del epitelio se comienzan a formar. PAS. 10X.

BZ: Zona Baffle; CT: Tejido conectivo; CZ: Zona Club; IS: Istmo; K. Riñón; L: Lumen; La: Laminillas; PZ: Zona Papilar; OV: Oviducto; TG: Glándulas tubular; TZ: Zona terminal.

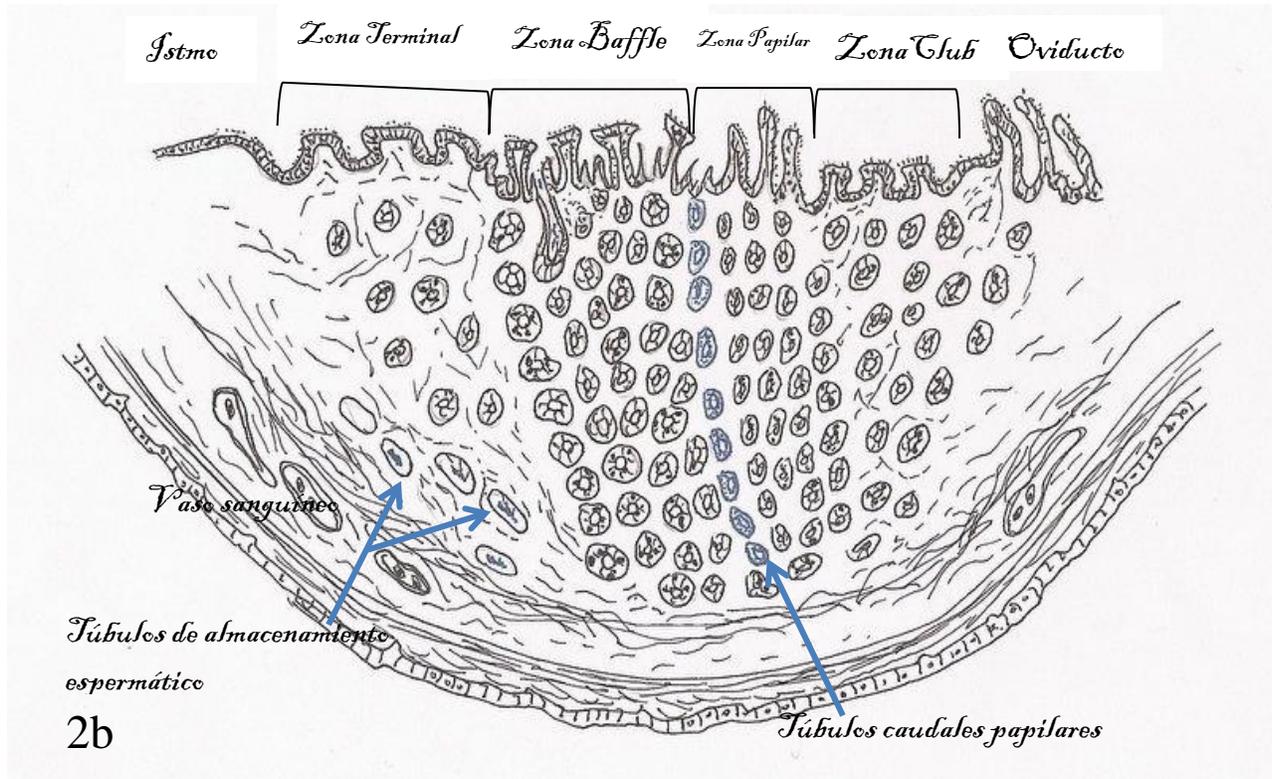
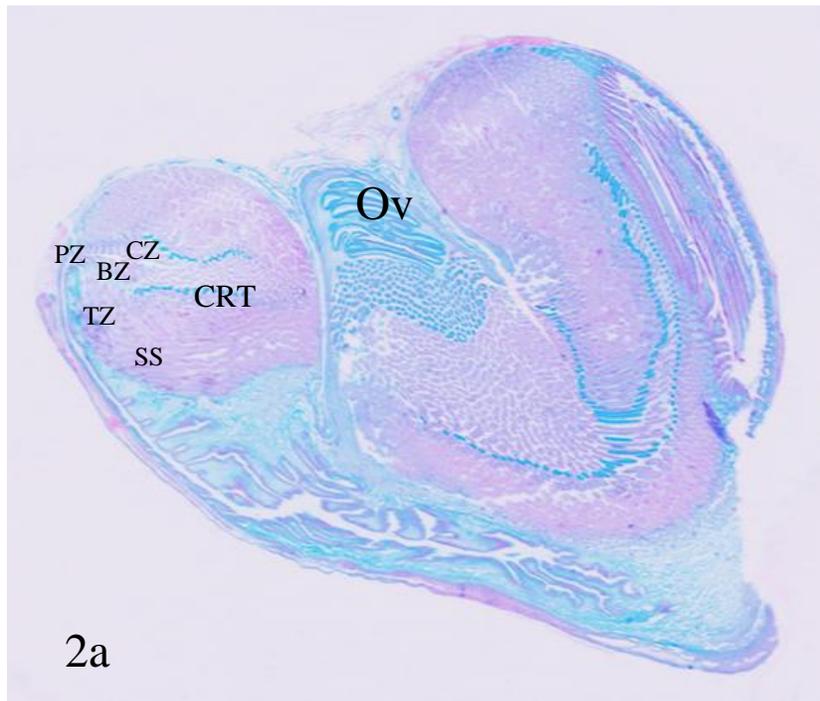


Figura 2: Organización de la estructura interna de la glándula oviductal.

a: Corte sagital de un glándula madura donde se muestra la coloración histológica en las diferentes zonas. PAS/AB. 9600ppp.

b: Esquema de la organización de las zonas de la glándula oviductal.

BZ: Zona Baffle; CB: Zona Club; CRT: Última fila de túbulos de la zona Papilar; Ov: Oviducto; PZ: Zona Papilar; SST: Túbulos de almacenamiento espermático.

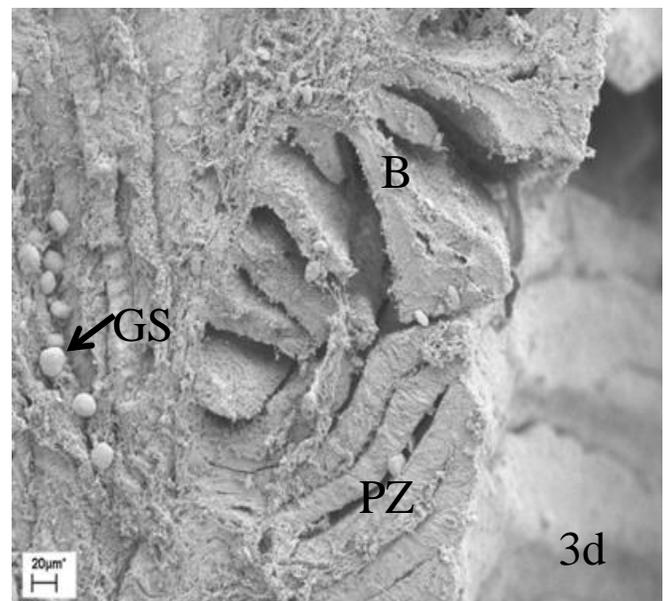
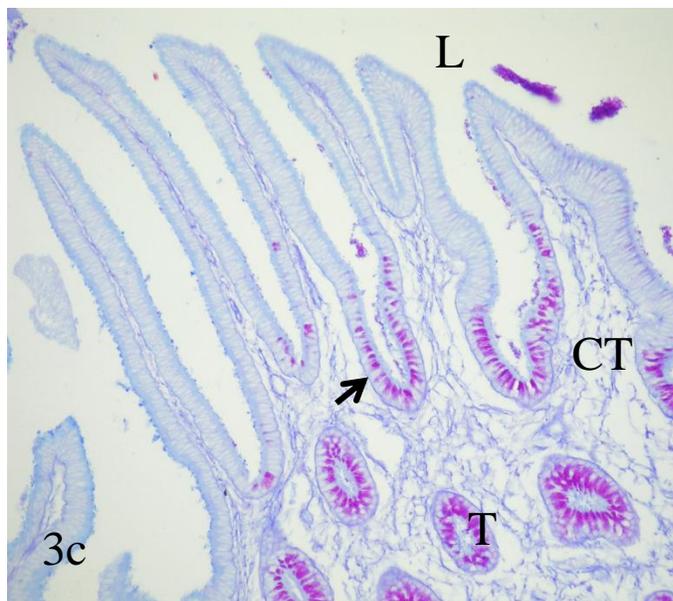
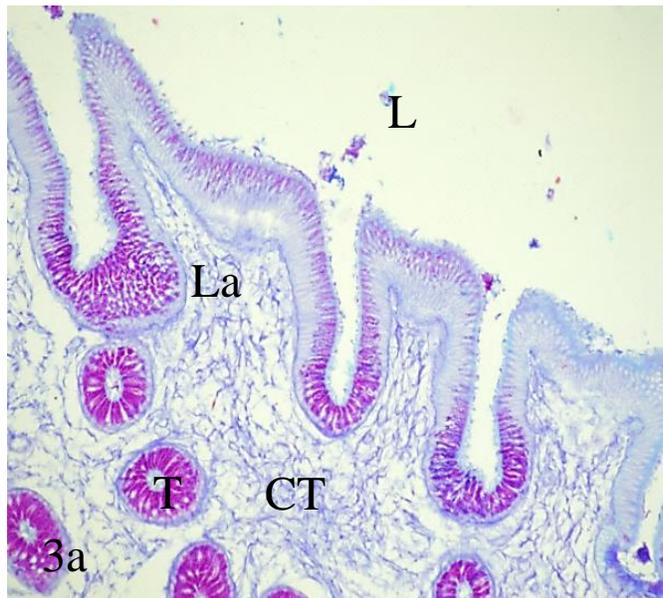


Figura 3: Estructura de las zonas Club, Papilar y Baffle.

a: Estructura de la zona club. Tinción PAS/AB (+) de células dispuestas entre los pliegues del epitelio. PAS/AB. 20X.

b: Estructura de las zonas Club, Papilar y Baffle. Masson. 20X.

c: Células secretoras de la zona Papilar con núcleos basales y gránulos PAS (+) (flecha). PAS/AB. 20X.

d: Microfotografía de barrido de la continuidad entre las zonas Papilar y Baffle.

BZ: Zona Baffle; CZ: Zona Club; CT: Tejido conectivo; GS: Gránulos de secreción; L: Lumen; La: Laminillas; PZ: Zona Papilar; SC: Células Secretoras; T: Túbulos.

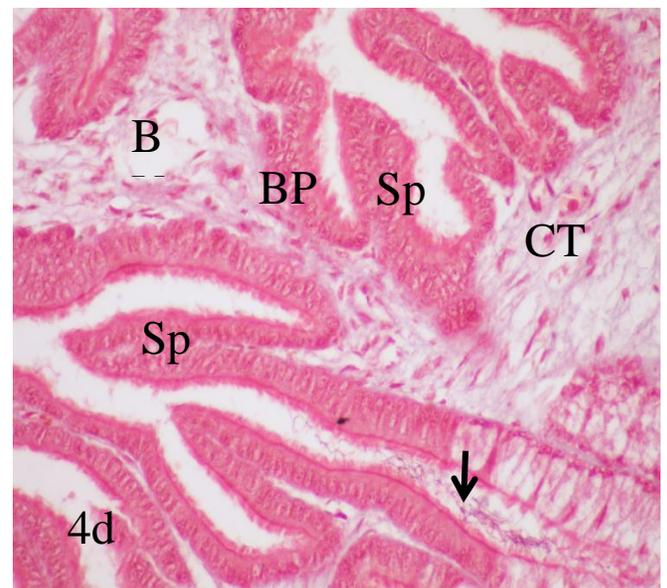
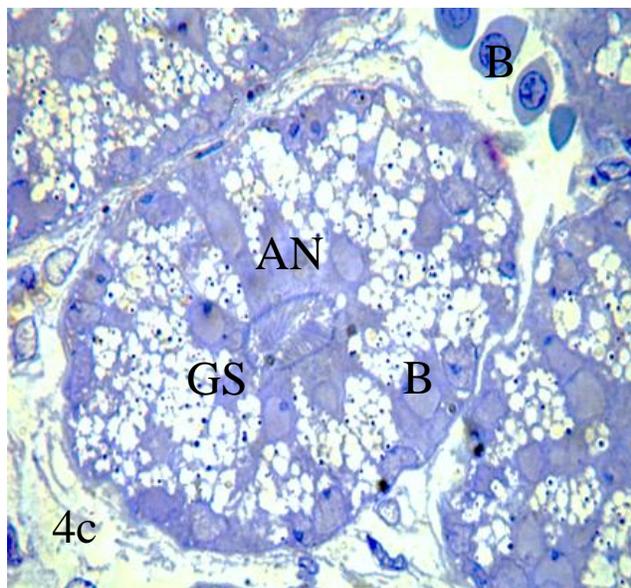
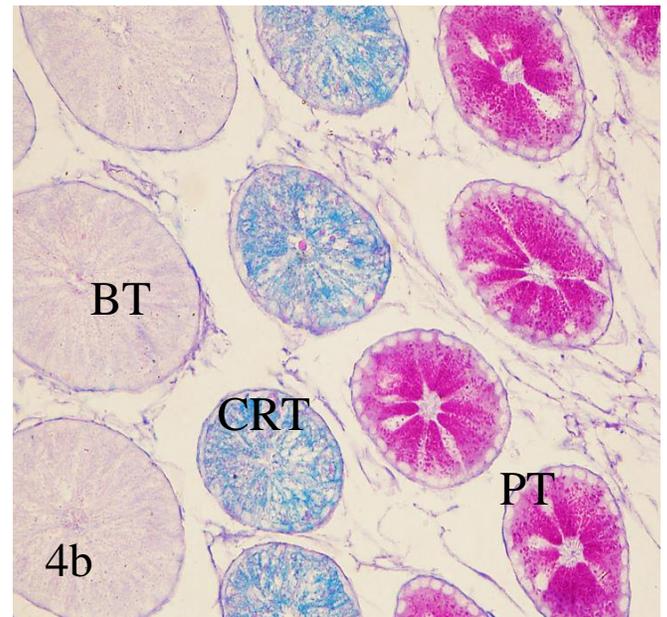
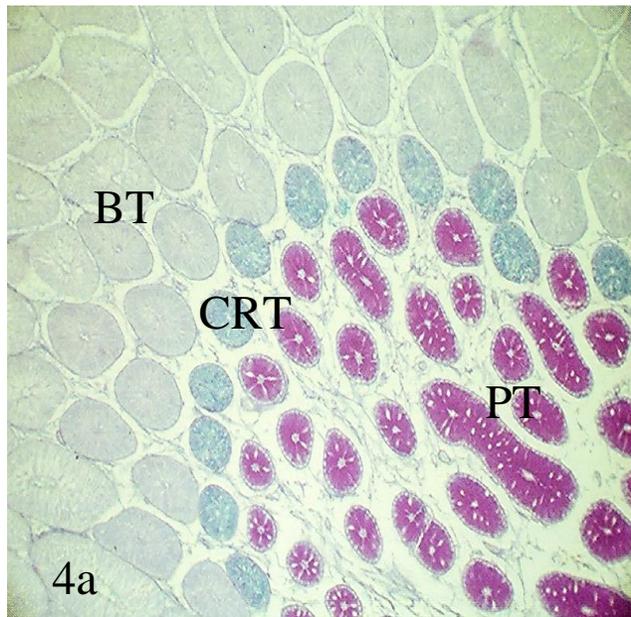


Figura 4: La fila más caudal de la zona Papilar y la organización estructural de la zona Baffle.

a: La fila más caudal de túbulos de la zona Papilar se tiñe AB(+) mientras que el resto de dicha zona se colorea fuertemente PAS(+). PAS/AB .10X

b: Detalle de los túbulos entre la zona Baffle y Papilar. PAS/AB .40X.

c: Corte semifino de un túbulo de la zona Baffle. Las células ciliadas con núcleo apical son menos numerosas que las células secretoras con núcleo basal. Azul de Toluidina. 100X

d: Presencia de esperma en la zona Baffle (flecha). Masson. 40X.

AN: Núcleo apical; BC: Células sanguíneas; BN: Núcleo basal; BP: Región plana Baffle; BT: Túbulos Baffle; BV: Vaso sanguíneo; CRT: Fila más caudal de túbulos; CT: Tejido conectivo; PT: Túbulos papilares; Sp: Spinneret.

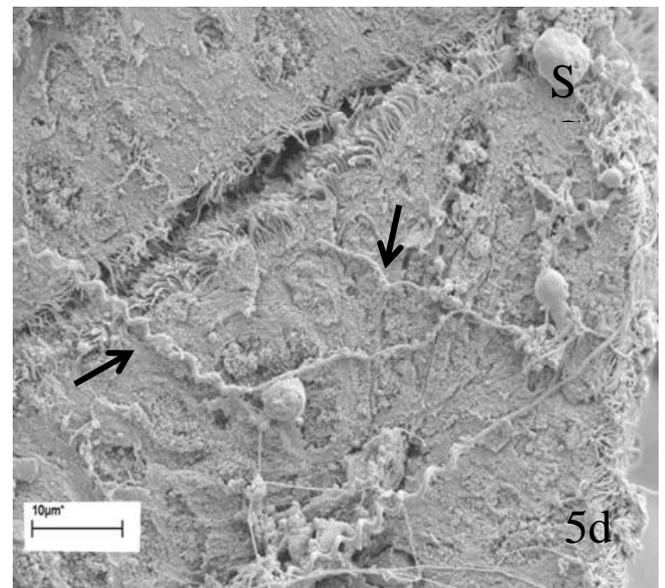
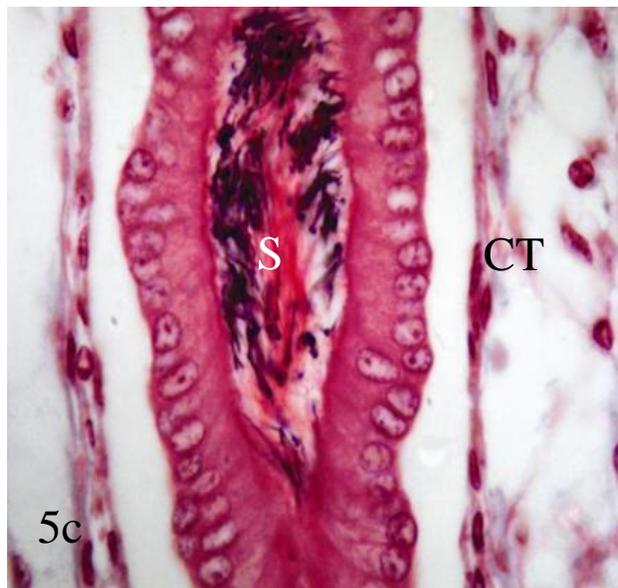
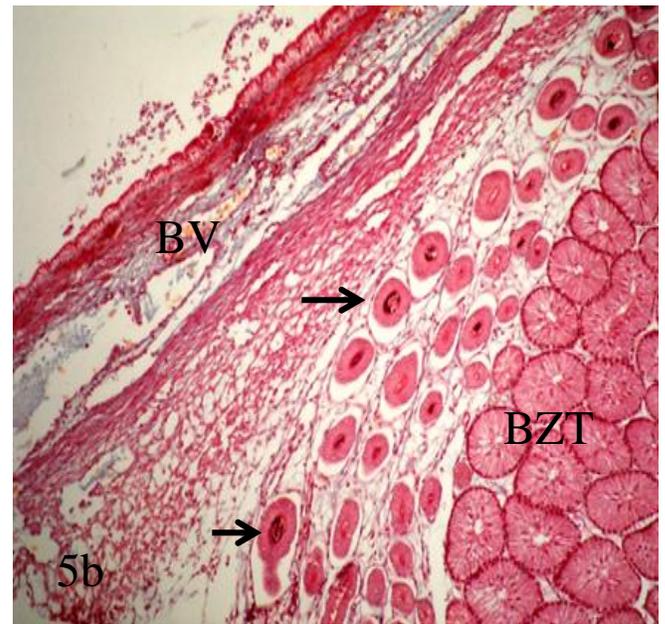
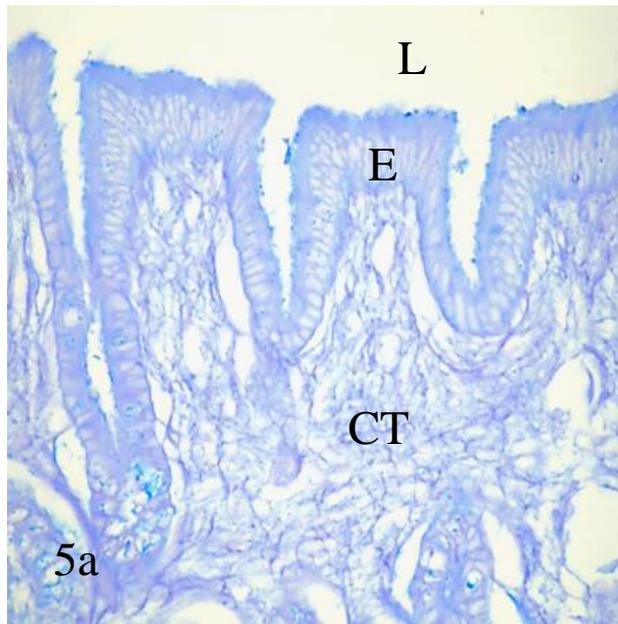


Figura 5: Presencia de esperma en las zonas Club y Terminal.

a: Epitelio de la zona Terminal con células secretoras AB (+). PAS/AB. 40X.

b: Almacenaje espermático en la zona Terminal (flechas). Los túbulos donde se almacena esperma se ubican cerca de la zona Baffle y están asociados a una importante vascularización. Masson. 10X.

c: Detalle de un túbulo de la zona Terminal con almacenamiento espermático. Masson. 100X.

d: Micrografía de barrido de la zona Club donde se observa la presencia de esperma (flecha).

BV: Vaso sanguíneo; BZT: Túbulos de zona Baffle; CT: Tejido conectivo; E: Epitelio; L: Lumen; S: Esperma; SG: Gránulos secretores.

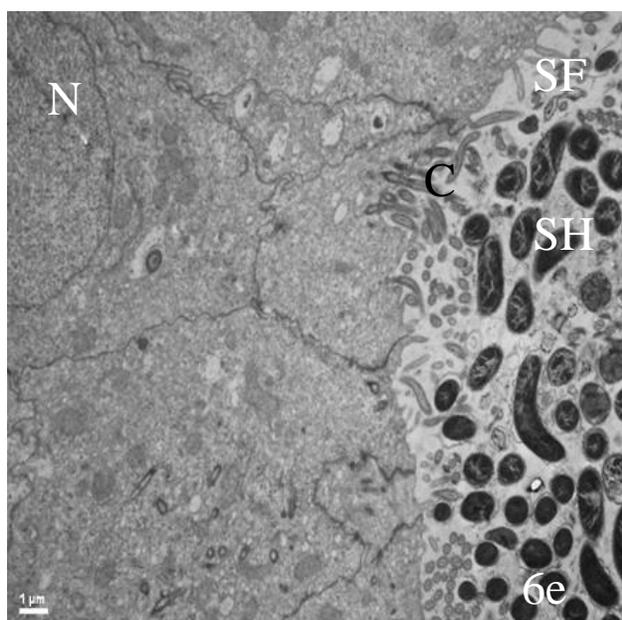
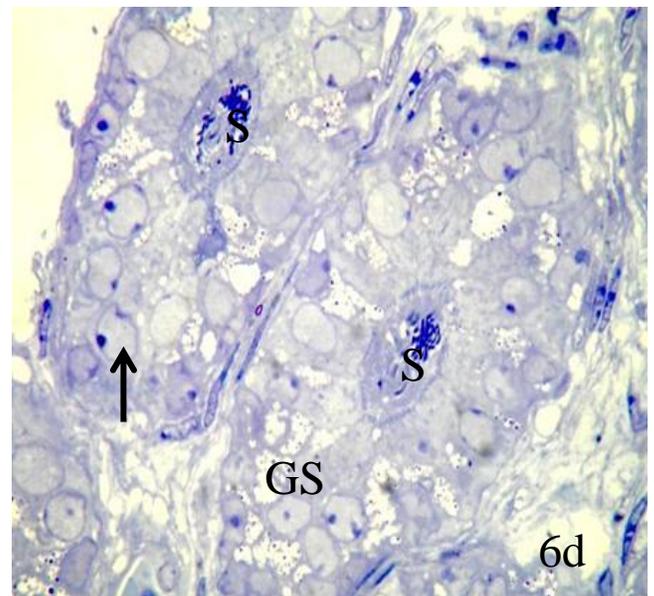
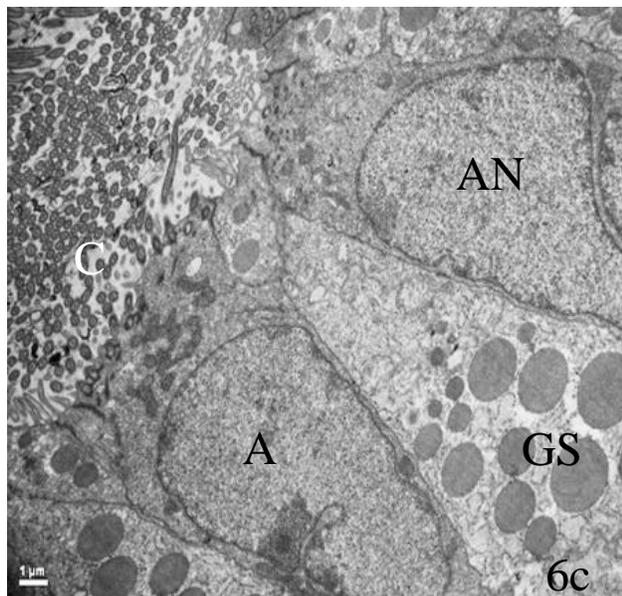
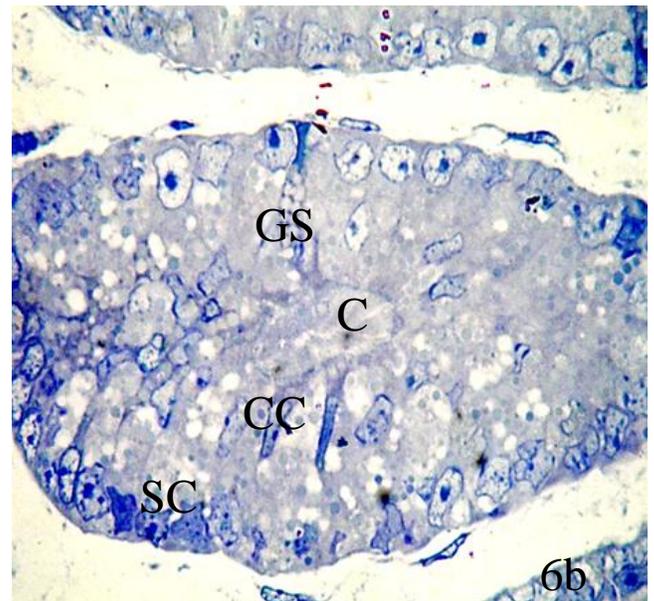
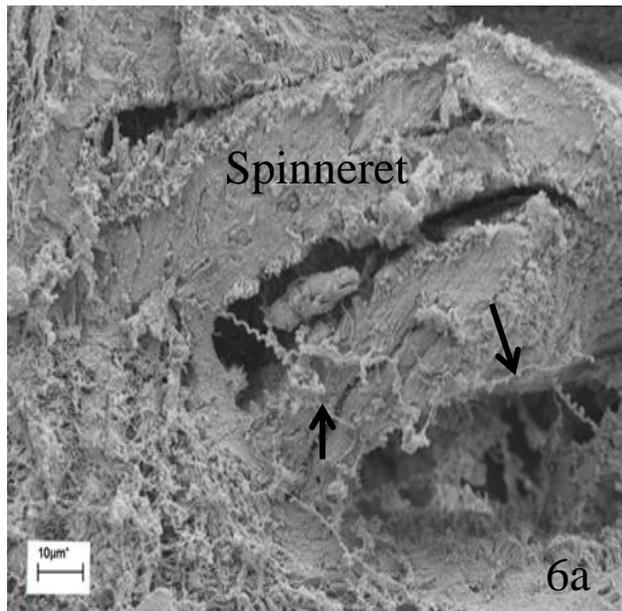


Figura 6: Presencia de espermatozoides en las zonas Baffle y Terminal.

a: Micrografía de barrido de espermatozoides (flecha) en la zona Baffle.

b: Corte semifiño de un túbulo de la zona terminal. Los granulos de secreción son esféricos y diferentes de aquellos encontrados en los túbulos de la zona Baffle. Azul de Toluidina. 100X.

c: Microfotografía electrónica de transmisión de un túbulo de la zona Terminal. Se evidencia claramente el núcleo apical de las células ciliadas y los granulos de forma redondeada de las células secretoras que desplazan al núcleo hacia la base. Azul de Toluidina. 100X.

d: Corte semifiño de túbulos de almacenamiento espermático. Hay escasos granulos de secreción que no entran en contacto con el espermatozoides. Los núcleos son basales euromáticos con 1 ó 2 nucleólos (flecha). 100X

e: Microfotografía electrónica de transmisión de un túbulo de la zona Terminal con espermatozoides.

AN: Núcleo apical; C: Cilios; CC: Células ciliadas; SC: Células secretoras; SH: Cabeza espermática; GS: Granulos de secreción; N: Núcleo; S: Espermatozoides; SF: Flagelo espermático.

Capítulo 5

Útero

Resumen

Mustelus schmitti presenta un útero par, tubular y ambos funcionales. Los mismos están delimitados anteriormente por un istmo y posteriormente, por el cérvix. Se emplearon microscopía óptica y electrónica para estudiar las regiones uterinas a lo largo de su maduración. El istmo tiene epitelio simple cilíndrico ciliado, PAS (+) y AB (-), seguido de dos capas musculares de disposición circular y longitudinal, finalizando en una fina serosa. El cérvix muestra un epitelio estratificado cilíndrico, PAS (+) y AB (+), con tres capas de músculo liso; la externa es circular y está separada de la capa intermedia longitudinal por un extenso y vascularizado tejido conectivo. La capa interna también es de disposición circular.

En animales inmaduros, el epitelio es simple cilíndrico con pequeños y numerosos pliegues, PAS (-) and AB (-). Por debajo de este epitelio, las fibras musculares se disponen longitudinalmente alternando con tejido conectivo y finalmente, se encuentra una serosa simple.

El epitelio uterino de la porción anterior en hembras maduras es estratificado, PAS (+) and AB (+) y con una rica vascularización subepitelial. A continuación se disponen tres capas musculares; la primera presenta una disposición particular de fibras, semejante a una red recubierta por tejido conectivo. La segunda capa tiene fibras longitudinales divididas en dos por tejido conectivo vascularizado y la tercera, es delgada y de disposición también longitudinal. Finalmente, una serosa típica cierra el órgano.

En la porción posterior uterina de las hembras maduras, el epitelio también es estratificado pero con una mayor cantidad de células secretoras. Desde la base hasta la parte apical de este epitelio, se puede observar cómo las células forman secreción y la disponen cada vez más densamente en vacuolas.

El epitelio uterino al principio de la gestación presenta una severa reducción en el número de capas requeridas para la difusión necesaria para el desarrollo del embrión.

Se detectó la presencia de espermatozoides en el cérvix y en la región posterior del útero, sugiriendo una particular interacción entre el epitelio uterino y las gametas masculinas.

Introducción

El útero de los Elasmobranquios es un órgano par, el cual consiste en dos largos tubos. Se hallan separados de las glándulas oviductales por el istmo y de la cloaca por el cérvix. Ambos extremos sirven de esfínteres y previenen el reflujo de secreciones y de los embriones (Matthews, 1950; Gilmore et al., 1983; Baranes y Wendling, 1981; Hamlett y Koob, 1999a). En algunas especies, solo un útero es funcional (Devadoss, 1982; Johnson y Snelson, 1996; Smith y Merrier, 1986; White et al., 2001).

Todos los Elasmobranquios inicialmente se alimentan de las reservas de vitelo que se encuentran en el huevo. Esto sucede tanto para especies ovíparas como par las vivíparas. Las primeras necesidades nutricionales del embrión son abastecidas por el vitelo que es internalizado por las células blastodérmicas y digerido intracelularmente (Hamlett et al., 1993). En las especies ovíparas, el útero mantiene la cápsula ovígera durante la esclerotización hasta la puesta del huevo (eso puede llevar varios días). Después de la liberación del huevo, el desarrollo embrionario prosigue sin la contribución materna, proceso denominado lecitotrofia. Los solutos esenciales para finalizar el desarrollo hasta el nacimiento, son tomados del agua marina.

El útero de las especies ovíparas está especializado en la formación de la cápsula ovígera. Para ello, generalmente, se desarrolla una mucosa muy plegada con células secretoras y ciliadas en el epitelio, una extensa vascularización y paredes musculares. Además, las glándulas oviductales producen una matriz que es liberada al lumen glandular. La pared y el epitelio uterinos se modifican por el activo movimiento de la cápsula que atraviesa el lumen uterino. El útero, además, sintetiza y secreta el material hacia el lumen facilitando el transporte de oxígeno para el proceso de oxidación utilizado en el oscurecimiento de la cápsula, y también tiene espacios intercelulares para la remoción del agua del espacio interno uterino. Estas características han sido investigadas en especies ovíparas por algunos autores (Stanley, 1963; Young, 1995; Koob y Hamlett, 1998; Hamlett y Hysell, 1998a; McMillan, 2007).

Muchos autores han demostrado que la diversidad en los modos reproductivos de los Elasmobranquios evidencia una función uterina muy compleja (Jollie and Jollie, 1967; Hamlett, 1986; Hamlett, 1990a; Hamlett, 1990b; Hamlett et al. 1993; Dulvy y Reynolds, 1997; Hamlett y Hysell, 1998a; Hamlett y Hysell, 1998b, Fishelson y Baranes, 1998; Chen et al., 2001; Guallart y Vicent, 2001; Stevens, 2002; Storrie et al., 2009). La mayoría de las especies vivíparas encapsulan los huevos con cubiertas gelatinosas producidas por la glándula oviductal. La embriogénesis comienza dentro de estas envolturas. Desde ese

momento hasta el nacimiento, diversas formas de desarrollo se llevan a cabo de acuerdo a los modos de viviparidad:

Viviparidad aplacentaria vitelina: Un cuarto de las especies de tiburones actuales tienen este tipo de reproducción (Hamlett y Koob, 1999b). En este modo reproductivo, los embriones se nutren con el vitelo contenido en el saco vitelino. El útero regula el medio intrauterino. El vitelo es transferido desde el saco vitelino externo a través del cordón vitelino hasta el intestino embrionario; finalmente, el complejo sincitial vitelo-endodermo lo digiere (Hamlett et al., 1993; Moura et al., 2011). Antes que la gestación esté completa, la cápsula se rompe y el embrión finaliza su desarrollo de manera libre dentro de los fluidos uterinos. *Squalus acanthias* representa un ejemplo de este tipo de reproducción. El útero grávido se modifica con pliegues dispuestos en hileras longitudinales. Dichos pliegues están cubiertos con un epitelio estratificado cúbico con microvellosidades. Por debajo de la membrana basal que delimita al epitelio hay un complejo de vasos sanguíneos yuxtaepiteliales, un delgado corion de tejido conectivo y capas musculares (Jollie and Jollie, 1967; Hamlett and Hysell, 1998).

Viviparidad aplacentaria con vellosidades uterinas o trofonemata: esta estrategia es utilizada sólo por rayas. El endometrio del útero desarrolla una vascularización y secreta una sustancia rica en nutrientes. La misma es ingerida por el embrión y absorbida por las branquias embrionarias externas (Hamlett et al., 1993). El epitelio uterino desarrolla unas vellosidades largas vascularizadas denominadas trofonemata. Cada una de esas prolongaciones posee un centro con un vaso sanguíneo que se ramifica en capilares que proveen a la periferia de la proyección. La superficie entera del útero está disponible para la secreción (Hamlett et al., 1996a). El ejemplo típico para este tipo de reproducción se encuentra en *Urolophus jamaicensis* (Hamlett y Hysell, 1998a).

Viviparidad aplacentaria con oofagia y canibalismo intrauterino: sólo unas pocas especies de tiburones Lamniformes emplean este modo reproductivo (Hamlett y Koob, 1999b). El desarrollo embrionario inicial es el mismo que el de las especies aplacentarias con saco vitelino. Primeramente, los embriones dependen del material del saco embrionario y luego los nutrientes provienen del vitelo contenido en los huevos liberados en la ovulación. Los embriones se alimentan de estos huevos y almacenan el vitelo en la porción cardial del estómago; también practican canibalismo. El primer embrión que alcanza los 80-100 mm de largo es el dominante y comienza a alimentarse de los otros

embriones hermanos. Finalmente, nacen sendos embriones de cada útero. *Carcharias taurus*, es el tiburón que ha desarrollado este modo reproductivo. A medida que la preñez avanza, el útero forma pliegues longitudinales, densamente vascularizados que funcionan como membranas respiratorias (Stribling et al., 1980; Gruber y Compagno, 1981; Gilmore, 1983; Gilmore, 1991; Gilmore, 1993; Hamlett et al., 1993; Chen et al., 1997; Hamlett y Koob, 1998; Yano et al., 1999; Costa et al., 2002).

Viviparidad placentaria: ocurre sólo en tiburones y está representada por el 10% de las especies actuales (Hamlett y Koob, 1999b). El desarrollo embrionario es similar al de los viviparos aplacentarios, donde los huevos son encapsulados y los embriones se nutren del vitelo. En la mitad de la gestación, las secreciones uterinas aumentan mientras el vitelo almacenado disminuye y en las últimas fases de la preñez se forma la placenta (epiteliocorial). El saco vitelino se implanta en la pared uterina pero no invade tejidos profundos de dicha estructura. *Rhizoprionodon terraenovae* es una especie vivipara placentaria en la cual el útero a término está modificado en un epitelio simple cúbico con vascularización adyacente. Existe un contacto íntimo entre la porción fetal de la placenta (antiguo saco vitelino) y la cubierta ovocitaria que delinea el epitelio uterino (Hamlett, 1987; Hamlett y Hysell, 1998a). En general, los tiburones placentarios desarrollan compartimentos separados donde cada embrión está rodeado por su propia envoltura ovocitaria. La orientación de cada embrión en cada compartimento cambia de oblicua a longitudinal durante la preñez y esta rotación constituye un movimiento natural para facilitar el nacimiento (Hamlett et al., 1993; Hamlett y Hysell, 1998b; Storrie, 2004).

Tota (1999) señala que muchas especies de Elasmobranchios son vivíparas y algunas experimentan una expansión del volumen sanguíneo relacionado con una placenta altamente vascularizada (Hamlett, 1987) y a una mucosa uterina hipertrofiada en el caso de las rayas (Hamlett et al. 1985, 1996). Por ejemplo, en la preñez de *Squalus suckleyi*, el volumen sanguíneo aumenta de 5% a 10-13% sin cambio en el hematocrito (Martin, 1950). Aunque ningún estudio ha documentado cuánto sería el “costo” de la viviparidad en términos de ajustes cardiovasculares, se debería esperar adaptaciones cardíacas notables en respuesta a semejantes cargas hemodinámicas.

Dentro del género *Mustelus*, sólo se observan dos modos reproductivos: placentario y aplacentario. Los estudios han demostrado que ocho especies son placentarias (*M. griseus*, *M. canis*, *M. mustelus*, *M. norrisi*, *M. higmani*, *M. dorsalis*, *M. californicus* y *M. henlei*), seis aplacentarias (*M. antarcticus*, *M.*

palumbes, *M. lenticulatus*, *M. manazo*, *M. schmitti* y *M. mento*) y nueve especies en las cuales el modo reproductivo no ha sido descrito aún (*M. mosis*, *M. punctulatus*, *M. lunulatus*, *M. whitleyi*, *M. fasciatus*, *M. maculatus*, *M. albipinnis* (Castro Aguirre et al., 2005), *M. sinusmexicanus* y *M. asterias*) (Storrie et al., 2009).

La composición general de todas las regiones uterinas de la mayoría de los Condrictios consiste en a) un epitelio con membrana basal, b) tejido conectivo vascularizado, c) una capa muscular interna circular y una externa longitudinal de músculo liso y d) la serosa. Las modificaciones en el útero ocurren durante el ciclo reproductivo. Los cambios más notorios son el incremento en la vascularización y el adelgazamiento de la superficie epitelial convirtiéndose en una simple capa plana que facilita el intercambio gaseoso y la secreción de productos pero también cada una de las capas uterinas se modifican reflejando la variedad de modos reproductivos propio de este grupo (Hamlet et al., 1993; Hamlett y Hysell, 1998a; Hamlett y Koob, 1999; McMillan, 2007; Cateni et al., 2003; Storrie et al. 2009).

El presente estudio provee una detallada información de los cambios estructurales y funcionales sufridos por una especie vivípara aplacentaria de Condrictio durante su desarrollo sexual.

Resultados

Mustelus schmitti mostró dos úteros, ambos funcionales, delgados y largos sin ninguna expansión en toda su extensión cuando el espécimen era inmaduro (Figura 1a). Tan pronto como el proceso de maduración comienza en las hembras, se desarrolla una expansión desde la parte posterior del útero hacia la anterior (Figura 1b, c). En las hembras inmaduras, el epitelio simple cilíndrico presenta numerosos y pequeños pliegues, PAS (-) y AB (-). Por debajo de este epitelio, se disponen fibras musculares que corren longitudinalmente alternando con tejido conectivo. Una serosa simple cubre al órgano (Figura 2a, b).

Los úteros están delimitados por una porción anterior denominada istmo y otra caudal, llamada cérvix. Ambos extremos y los úteros propiamente dichos desarrollan diferentes epitelios y capas musculares. Las hembras maduras de *M. schmitti* ovulan entre octubre y diciembre, dando a luz entre noviembre y diciembre del año siguiente.

El istmo presentó un epitelio simple cilíndrico ciliado seguido de dos capas musculares, dispuestas circular y longitudinalmente, finalizando en una serosa delgada (Figura 2c). El epitelio era PAS (+) y AB (-) (Figura 2d).

El cérvix estaba constituido por un epitelio estratificado muy plegado, PAS (+) y AB (+), con dos capas de músculo liso más compactas que las de la porción anterior uterina (Figura 3a, c). El epitelio cervical presentó células basales con núcleos ovals eucromáticos y células apicales llenas de grandes vacuolas con mucus que desplazaban a los núcleos heterocromáticos hacia un extremo (Figura 3b, c). Por debajo del epitelio había un corion seguido de dos capas de músculo liso finalizando en una serosa con epitelio simple cilíndrico (Figura 3d).

Los úteros fueron seccionados en dos sectores bien separados para determinar una región anterior y otra posterior del órgano.

En la porción anterior uterina de hembras maduras, el epitelio era estratificado, PAS (+) y AB (+), con una rica vascularización subepitelial (Figura 4a, b). Continúan tres capas musculares; la primera desplegó una disposición única y particular de fibras semejante a una red con tejido conectivo (Figura 4b, c). La segunda capa tenía fibras longitudinales divididas en dos por tejido conectivo y la tercera, era también longitudinal pero muy delgada. Finalmente, una serosa típica cubría al órgano (Figura 4d). Empleando cortes semifinos se observó que el epitelio estratificado en su porción apical muestra abundantes vesículas secretoras de tipo holocrino (Figura 5a). Las células comienzan a producir la secreción desde la parte media del epitelio hasta la región luminal del mismo. Las células epiteliales próximas al lecho vascular, presentaron núcleos ovals con uno o dos nucléolos y sin vacuolas secretoras. Las células apicales mostraron núcleos desplazados hacia un extremo debido a que la secreción ocupaba casi todo el citoplasma (Figura 5b).

En la porción posterior uterina de hembras maduras, el epitelio también era estratificado pero con menos células secretoras. Desde la base hasta el ápice del epitelio uterino se pudo observar cómo las células forman su secreción en vacuolas. El citoplasma de las células apicales era más oscuro en aquellas ubicadas en las hileras basales. La microscopía electrónica de transmisión mostró células superficiales altamente vacuoladas. Algunas de ellas eran liberadas al lumen e interactuaban con el esperma recién depositado (Figura 5c). Algunas de las cabezas espermáticas estaban adheridas a estas células (Figura 5d).

La microestructura de las células liberadas en el lumen uterino presentaba núcleo eucromático y el citoplasma estaba repleto de vacuolas de diferente secreción (Figura 6a). La microscopía electrónica de transmisión reveló que la interacción entre las células uterinas y las cabezas espermáticas era la desintegración de la cabeza del espermatozoide y por consiguiente de la

gameta (Figura 6b). La interacción de algunas cabezas espermáticas indicaría una selección de las células reproductivas.

El epitelio uterino previo a recibir los huevos, sufre una reducción drástica en el número de capas. Había muy pocas o casi ninguna célula secretora uterina y las capas musculares estaban comprimidas. La primera capa muscular no desarrolló la morfología de red característica (Figura 6c). Una o dos capas de células uterinas enfrentaban al lumen y pequeños grupos de vasos sanguíneos subyacían próximos a la membrana basal (Figura 6d).

Discusión

Los úteros de *M. schmitti* comparten características similares con los de otros Condrictios estudiados. Ambos son funcionales y tienen un epitelio que se apoya sobre la membrana basal, una vascularización subyacente al epitelio rodeada de tejido conectivo, capas musculares circular y longitudinal y finalmente una serosa (Chen y Mizue, 1973; Teshima, 1975; Baranes y Wendling 1981; Castro y Wourms, 1993; Hamlett y Hysell 1998a; Koob y Hamlett, 1998; Hamlett y Koob, 1999; Hamlett et al., 2002; Storrie et al. 2009).

Ambos úteros están delimitados por un istmo, anteriormente y por un cérvix, posteriormente. La mucosa del istmo presenta un epitelio simple cilíndrico con secreciones PAS (+) y un tejido conectivo subyacente. Dos capas musculares de disposición circular y longitudinal, desde adentro hacia afuera, dan estructura al órgano, finalizando con una simple serosa. El área ístmica (Elias y Hamlett, 2006c) es similar a la observada en otras especies de Condrictios como *Squalus acanthias*, (Hamlett y Hysell, 1998), *Carcharias Taurus* (Gilmore et al. 1983), *Cetorhinus maximus* (Matthews, 1950), *Iago omanensis* (Fishelson and Baranes, 1998) y *Mustelus antarticus* (Storrie et al., 2009).

El otro esfínter localizado en el extremo posterior del útero es el cérvix; altamente plegado con numerosas células mucosas que componen un epitelio estratificado que provee lubricación. El extenso plegamiento del epitelio y la secreción mucosa contribuyen con el parto (Baranes y Wendling, 1981; Callard y Klosterman, 1988; Koob y Callard, 1991; Sorbera y Callard, 1995; Hamlett y Koob, 1999, Storrie et al., 2009). El cérvix de *M. schmitti* (Elias y Hamlett, 2006c) es similar al hallado en *Mustelus antarticus* (Storrie et al., 2009). La morfología y función de este esfínter permanecen sin ser estudiadas en otras especies de Condrictios (Hamlett y Koob, 1999).

Las hembras inmaduras de *M. schmitti* tienen úteros delgados, no expandidos con un epitelio simple cilíndrico y las capas musculares no se encuentran completamente definidas; fibras longitudinales musculares acompañan al órgano en toda su extensión. Similares características fueron observadas por Storrie (2004) en *M. antaricus*, en cambio, Stevens (2002) describió hembras inmaduras de *Pristiophorus cerratus*, con un epitelio estratificado cúbico bien vascularizado y dos capas de músculo liso longitudinal y circular.

A medida que la maduración prosigue, ocurre una expansión de posterior a anterior que involucra a las capas musculares y el epitelio se torna estratificado con secreción mucosa. *M. schmitti* presenta tres capas en su pared uterina: la primera es similar a una red y las otras dos son longitudinales, siendo la tercera muy delgada (Elias y Hamlett, 2006b). La mayoría de los autores describe y se concentra en el epitelio del útero, donde los cambios más drásticos ocurren (Hamlett y Hysell, 1998; Storrie et al., 2009; Haines et al., 2005; Galindez et al., 2010). Haines et al. (2005) estudiaron la pared uterina de hembras preñadas de *Rhizoprionodon terraenovae* y describieron la existencia de presuntos agregados linfoides en el momento de la implantación. Fue la primera vez que se reportaron agregados inmunológicos para Elasmobranchios.

La estructura única de la primera capa muscular uterina, donde fascículos de fibras musculares son rodeados de tejido conectivo y conectados a otros grupos de fibras por medio de delgados hilos de tejido conectivo, sugiere que dicha capa muscular facilita la flexibilidad uterina necesaria para cuando los embriones están bien desarrollados. Las otras dos capas musculares proveerían un fuerte soporte dentro de la madre, especialmente la segunda, que se encuentra dividida en dos por una banda de tejido conectivo con vasos sanguíneos.

Una característica común entre las descripciones de los distintos autores es la continua vascularización dispuesta debajo del epitelio de todos los úteros, cualquiera sea su modo reproductivo. De todas maneras, Storrie (2004) hizo referencia que (1934) encontró que los especímenes de *Mustelus* placentarios presentan una red capilar menos extensa o superficial respecto de los aplacentarios. Esto facilita el intercambio gaseoso y los nutrientes distribuidos desde la madre hacia el embrión.

Los cortes semifinos de la porción anterior de úteros maduros de *M. schmitti* revelan células holocrinas que liberan su secreción al lumen. Dicha secreción funcionaría como sustancia facilitadora del paso del espermatozoide o prepararía las gametas masculinas para la inseminación. Las células basales no presentan vacuolas de secreción; las mismas comienzan a formarlas desde la mitad del epitelio. La secreción desplaza al núcleo hacia un extremo de la célula.

Características similares fueron encontradas en *M. antarticus* por Storrie (2004).

La porción posterior del útero de *M. schmitti* también tiene un epitelio estratificado. Desde la base hasta la parte apical del epitelio uterino se puede observar cómo las células forman su secreción en las vacuolas. El citoplasma de las células apicales es más oscuro que el de las células basales, el cual contiene numerosas vacuolas secretoras. La evidencia muestra que hay una interacción entre las células epiteliales y el esperma que ha penetrado en la hembra luego de la copulación. Hamlett et al. (2002) han demostrado la presencia de masas de esperma asociado a algunas células paraplacentales en hembras postparto de *Mustelus canis*. Las diferencias entre las células de los sitios uterinos se deben a los modos reproductivos, placentario y aplacentario, respectivamente, de las dos especies estudiadas de *Mustelus*. Las células uterinas de esta última porción del órgano están especializadas en la interacción con el esperma. Se evidenció la correlación entre las células uterinas y el esperma en algunas cabezas espermáticas mientras otras se mantenían intactas sugiriendo una selección de la gametas masculinas. Continuando con la remodelación del epitelio uterino, se determine que en *M. schmitti* ocurre una reducción del mismo antes que los huevos fertilizados descendan de las glándulas oviductales. El epitelio descansa sobre numerosos y pequeños vasos sanguíneos y las capas musculares están comprimidas, especialmente la primera. Características similares fueron encontradas por Storrie (2004) en el útero de *Mustelus antarticus* conteniendo huevos. Esta diferencia en el estado del ciclo reproductivo podría sugerir que la reducción en el epitelio uterino comenzaría antes del descenso de los huevos.

Mustelus schmitti es una especie vivípara aplacentaria con un ciclo reproductivo de un año. Los úteros sufren una remodelación cíclica no solo en los epitelios sino también en las capas musculares. Las células epiteliales también se preparan para interactuar íntimamente con el esperma. *M. schmitti*, como muchos tiburones del género *Mustelus* tiene importancia comercial y, por ende es crucial considerar estos datos de su ciclo reproductivo para prevenir la sobreexplotación (Massa et al., 2001, 2004; Sidders et al. 2005).



Figura 1: Anatomía del útero y la expansión del mismo durante la maduración.

a: Animal inmaduro sin expansión uterina.

b: Animal en maduración con la mitad de la expansión uterina.

c: Animal maduro con el útero totalmente expandido.

Ut: Útero; OG: Glándula oviductal; Ov: Ovario.

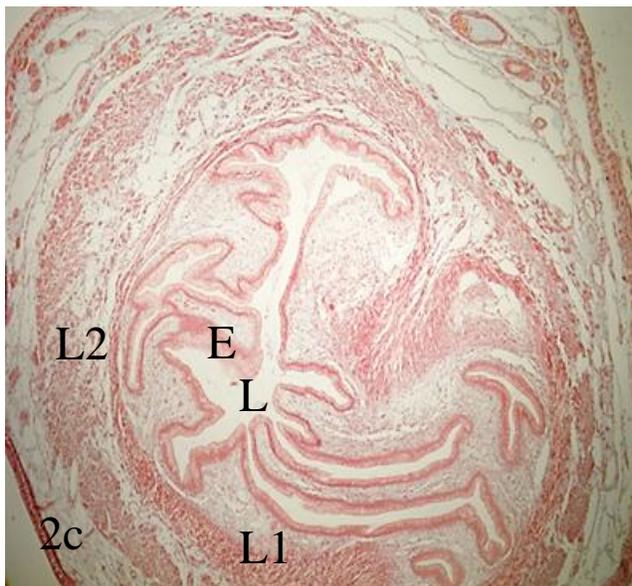
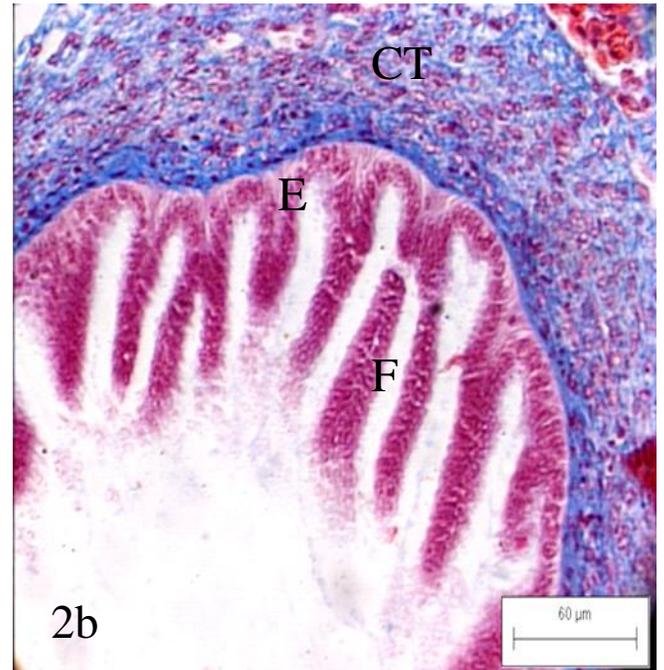
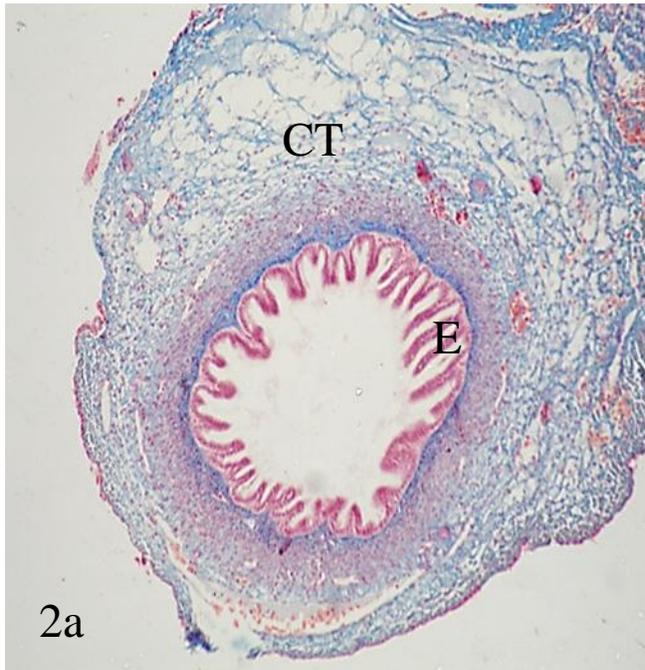


Figura 2: Microscopía óptica del útero inmaduro y el istmo.

a: Corte transversal de un útero inmaduro. Masson. 10X.

b: Detalle del útero inmaduro. Masson.

c: Corte transversal del istmo. Masson. 4X

d: Detalle del epitelio del istmo. PAS/AB. 40X.

E: Epitelio; F: Pliegues; CT: Tejido conectivo; L: lumen; L1 and L2: Capas musculares 1 y 2.

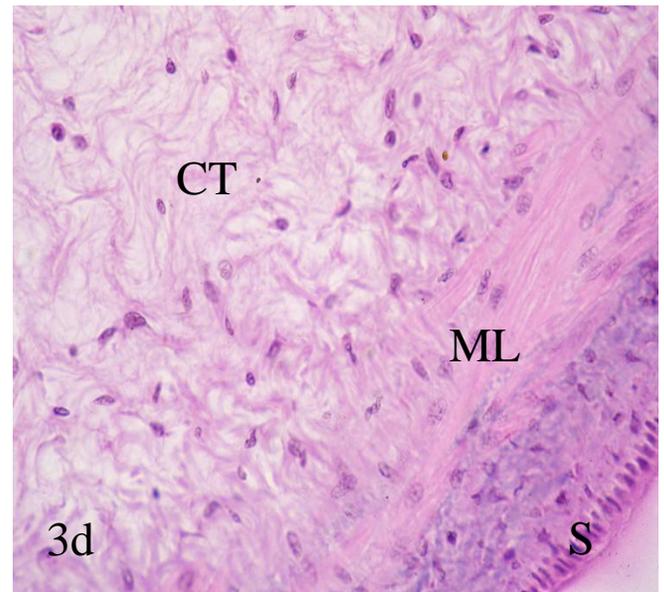
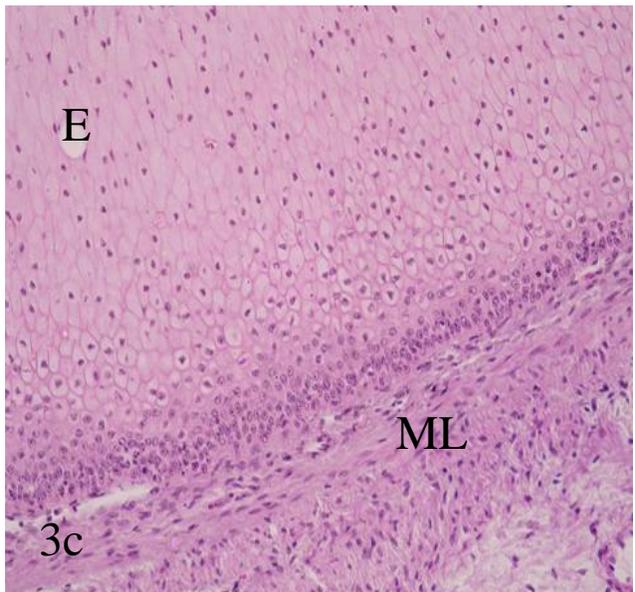
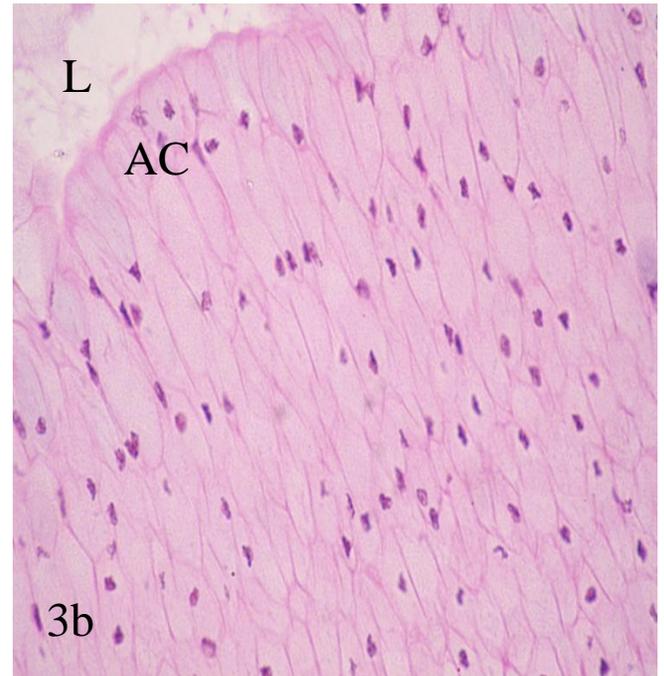


Figura 3: Microscopía óptica del cérvix.

a: Vista general del cérvix. H & E. 10X.

b: Detalle de la región luminal del epitelio. H & E. 40X

c: El epitelio estratificado del cérvix descansa sobre la capa muscular. H & E. 20X.

d: Detalle de las capas musculares y de la serosa del cérvix. H & E. 40X.

AC: Células apicales; CT: Tejido conectivo; FE: Pliegues del epitelio; L: Lumen; ML: Capa muscular; S: Serosa.

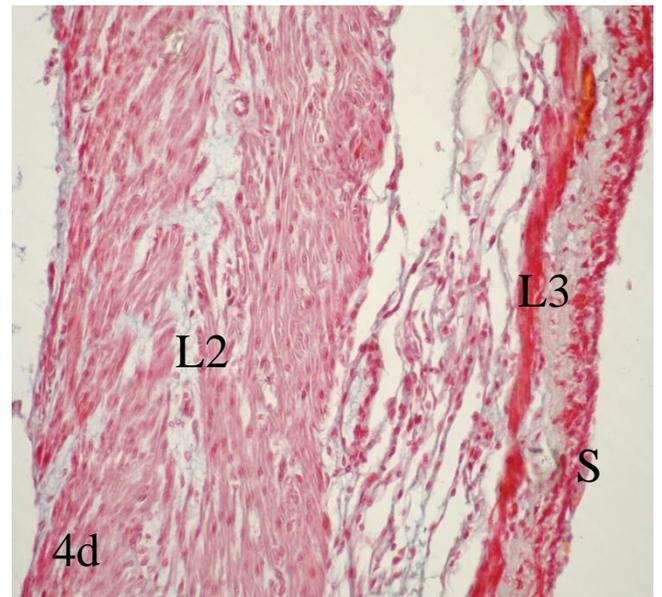
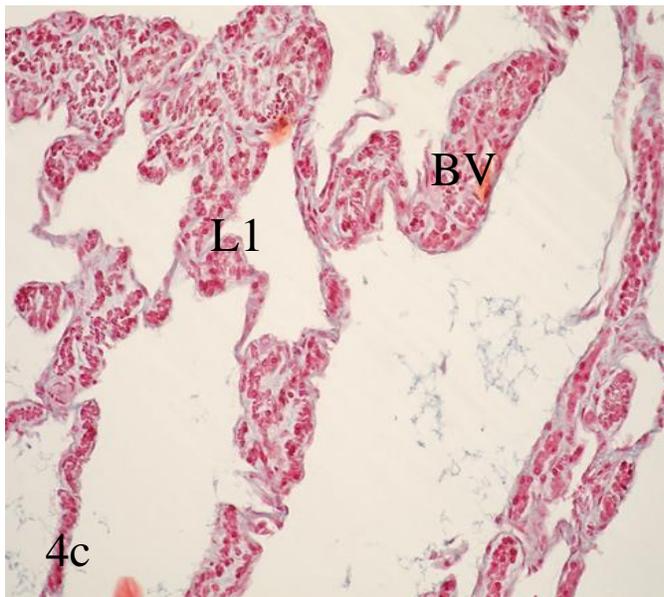
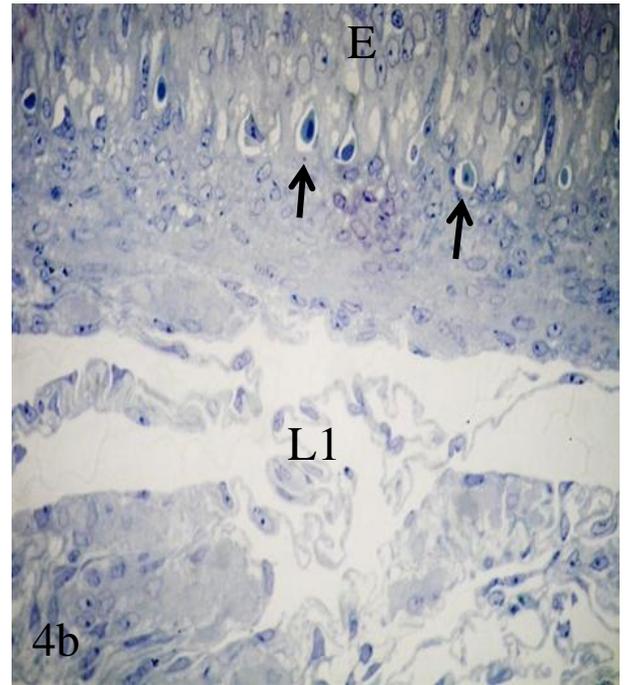
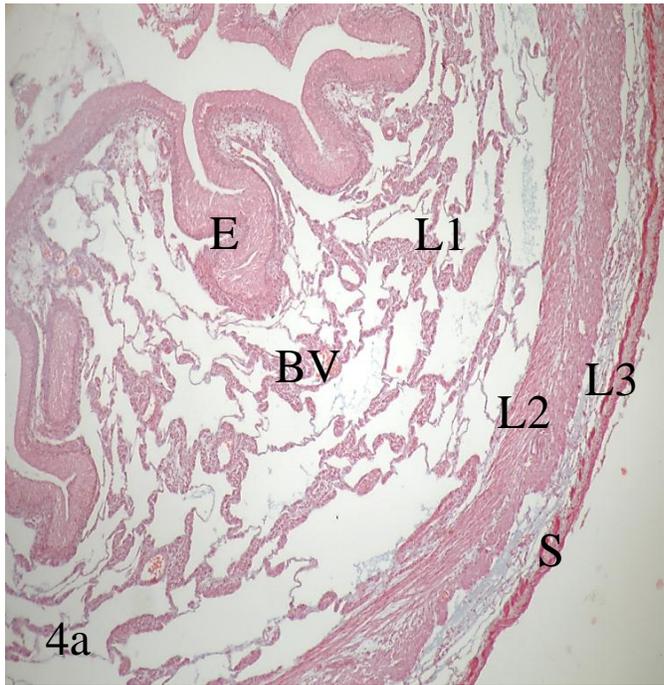


Figura 4: Microscopía óptica y corte semifino de TEM de la pared uterina de hembra madura.

a: Corte transversal de útero maduro. Masson. 4X.

b: Corte semifino del epitelio estratificado uterino que se dispone sobre una línea vascular (flechas) y la primera capa muscular de estructura en red. Azul de Toluidina. 40X.

c: Detalle de la estructura en red de la primera capa muscular uterina donde se pueden observar conjuntos de fibras musculares rodeadas de tejido conectivo. Masson. 40X.

d: Las capas media y externa de la pared uterina finalizando en una serosa típica. Masson. 40X.

BV: Vaso sanguíneo; CT: Tejido conectivo; E: Epitelio; L1: Capa muscular 1; L2: Capa muscular 2; L3: Capa muscular 3; S: Serosa.

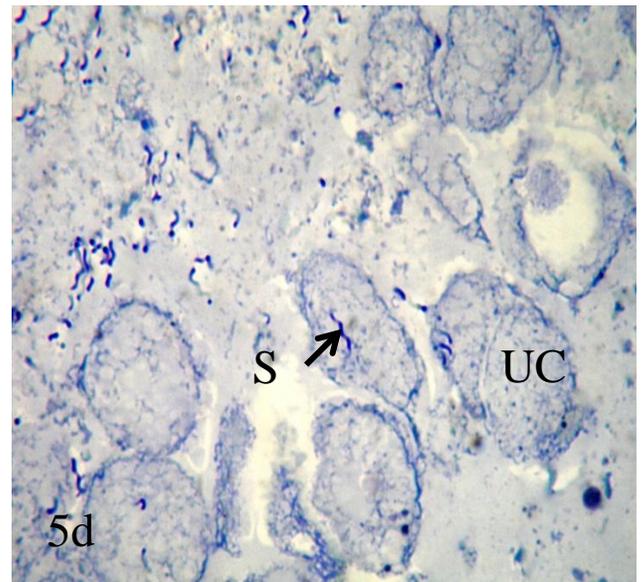
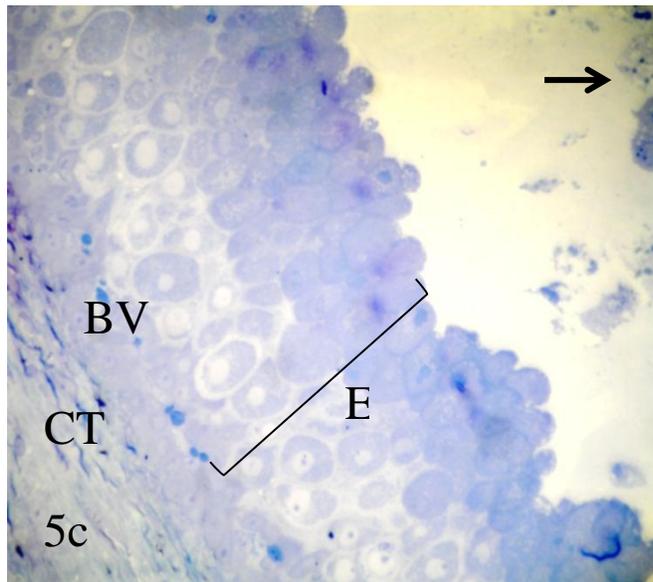
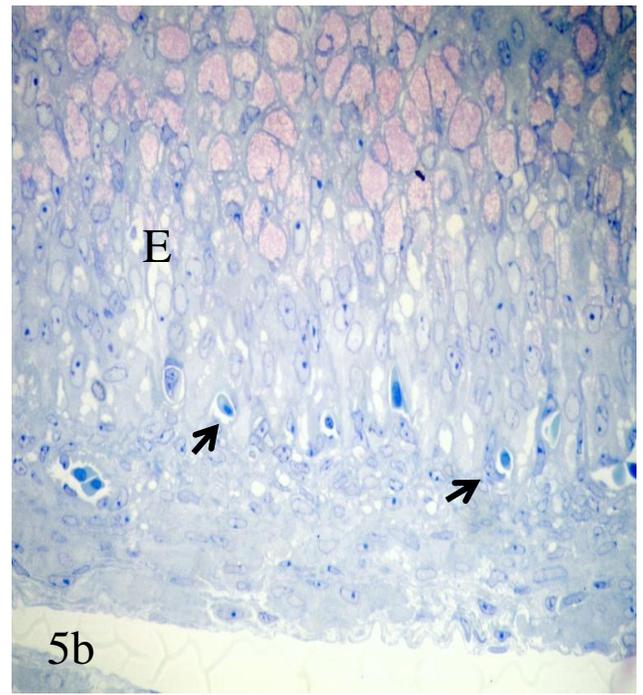
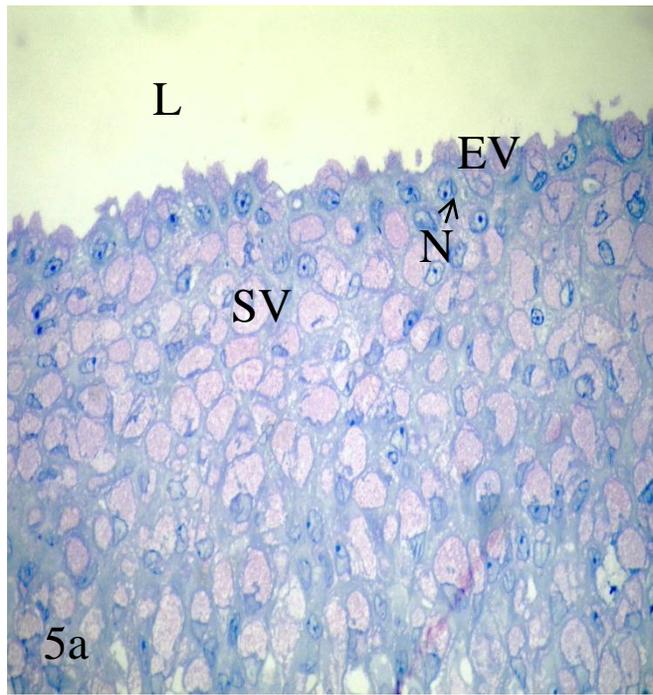


Figura 5: Microscopía óptica de cortes semifinos del epitelio de un útero maduro.

a: El epitelio uterino es estratificado con numerosas células secretoras. Azul de Toluidina. 40X.

b: Corte semifino de la línea vascular (flechas) entre el epitelio uterino y la capa muscular de la porción anterior del útero. Azul de Toluidina. 40X.

c: Corte semifino del epitelio de la porción posterior uterina. Algunas células se desprenden del epitelio e interactúan con el esperma en el lumen uterino (flecha). 40X.

d: Magnificación de la Figura 5c donde el esperma interactúa con las células uterinas las cuales secretarían sustancias para desintegrar las gametas masculinas. Azul de Toluidina. 100X.

E: Epitelio; EV: Vesícula exocística; CT: Tejido conectivo; L: Lumen; N: Núcleo; SH: Cabeza espermática; SV: Vesículas secretoras; UC: Células uterinas; VB: Línea Vascular.

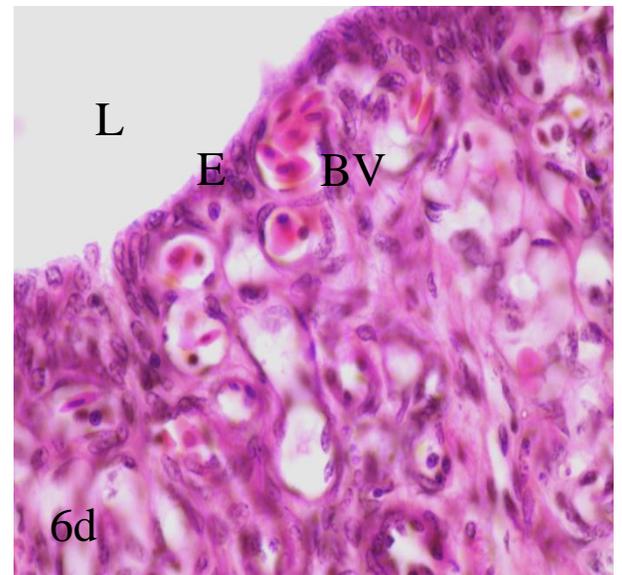
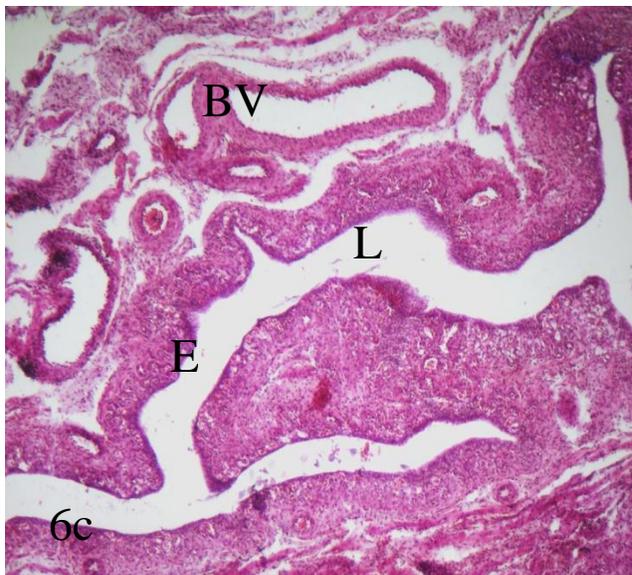
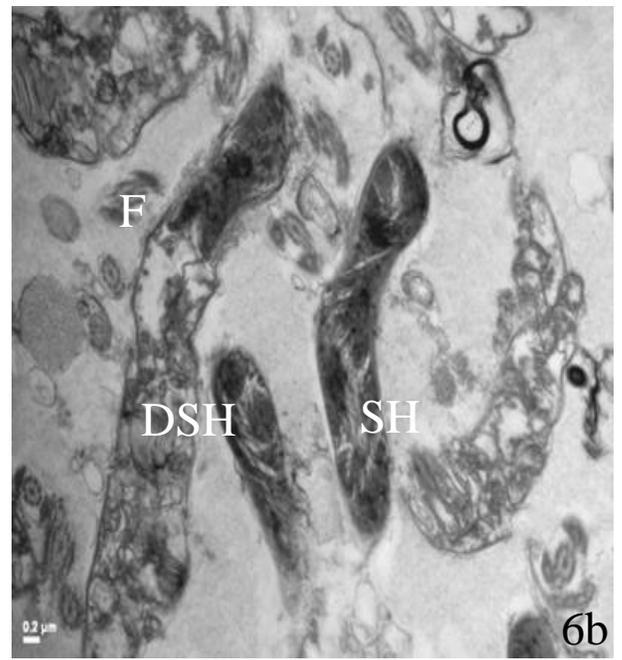
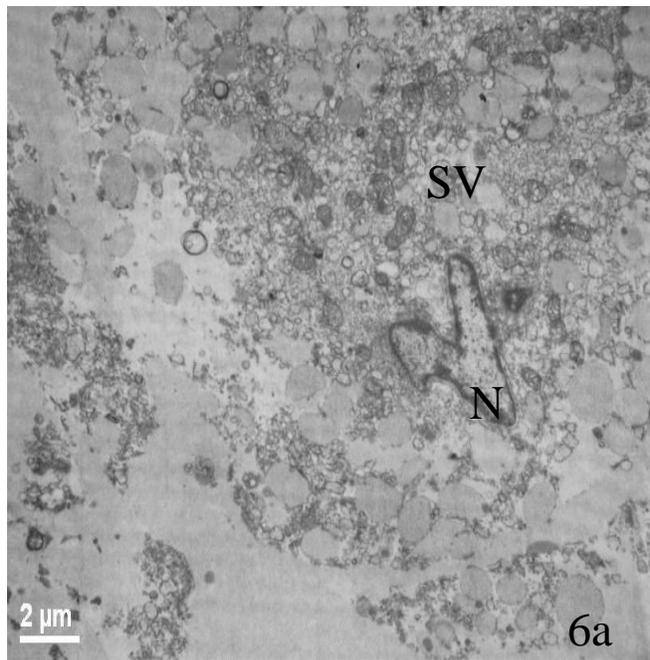


Figura 6: Microscopía electrónica de transmisión de células uterinas relacionadas con espermia y útero previo a la implantación.

a: Microscopía electrónica de transmisión del núcleo de una célula epitelial liberada al lumen uterino. Numerosas vacuolas rodean al núcleo.

b: Microscopía electrónica de transmisión de una cabeza espermática siendo desintegrada en el lumen del útero posterior.

c: Microscopía óptica de epitelio uterino previo a la implantación del embrión. H & E. 10X.

d: Un detalle del epitelio uterino con la vascularización subyacente. H & E. 40X.

E: epitelio; BV: Vasos sanguíneos; F: Flagelo; DSH: Cabeza espermática desintegrándose; L: Lumen; N: Núcleo; SH: Cabeza espermática; SV: Vesículas secretoras.

Capítulo 6

Interacción entre el espermatozoide y los diferentes epitelios a lo largo del aparato reproductor femenino

Resumen

Se observó la presencia de espermatozoides en varios órganos del tracto reproductor de *M. schmitti*. Algunos de ellos fueron las zonas Club, Baffle y Terminal de las glándulas oviductales, la porción posterior del útero y el cérvix. Este hecho permite tomar en consideración no sólo su almacenamiento en la mencionada glándula, sino también su interacción con los epitelios uterinos.

Los estudios realizados con microscopía electrónica de barrido detectaron espermatozoides sueltos en las zonas Club y Baffle en una hembra preñada. Por otro lado, las técnicas histoquímicas mostraron que los túbulos de almacenaje espermático de la zona Terminal, los cuales contienen grupos de espermatozoides, no se colorearon con AB o PAS.

La desintegración de algunas gametas masculinas se observaron en la parte posterior del útero con estudios de microscopía electrónica de transmisión, lo que indicaría una primera selección espermática. Las células epiteliales uterinas involucradas en este proceso fueron liberadas desde el epitelio. Las mismas se encontraban llenas de vacuolas de secreción.

Se encontró espermatozoides en el cérvix sin la matriz con la que se constituye el espermatozoogonada formado en el aparato reproductor masculino. Algunas de las cabezas espermáticas se despiralizaron mientras interactuaban con las células cervicales.

Introducción

Conocer el destino del espermatozoide dentro del aparato reproductor femenino es de gran interés desde diferentes puntos de vista como la inseminación artificial (en animales domésticos y humanos), para la preservación del DNA de gametas para prevenir extinciones de especies y descubrir relaciones filogenéticas.

El viaje del espermatozoide en el interior del tracto reproductor de las hembras es un hecho que ocurre en todos los grupos de vertebrados y es de interés desde un punto de vista comparativo. Los espermatozoides deben interactuar con, y son alterados por, su medio bioquímico inmediato y las células epiteliales o inmunocompetentes (Leahy y Gadella, 2011). Además, las gametas masculinas al ser células altamente diferenciadas, cada compartimento celular

no sólo debe estar intacto sino también debe responder apropiadamente a las señales intra y extracelulares de las mismas (Holt, 2009).

Este viaje a través del tracto femenino conduce a dos fenómenos ampliamente distribuidos en todo el espectro de animales, vertebrados e invertebrados: el almacenamiento espermático y la paternidad múltiple.

El almacenamiento espermático consiste en guardar gametas masculinas en un reservorio femenino de manera que se encuentren preparadas para la fertilización cuando la ovulación está desfasada con el apareamiento o las posibilidades de copulación están reducidas debido a la segregación sexual u otras causas. No sólo los peces presentan almacenamiento espermático en órganos especiales como las glándulas oviductales de los Condrictios o en los ovarios de algunos Teleósteos. Los anfibios han desarrollado este proceso también y se ha demostrado como propia de salamandras y cecilias. Un solo sapo, *Ascaphus truei*, con fertilización interna posee esta estrategia. Este fenómeno es común en reptiles, aves y mamíferos (marsupiales, murciélagos y otros mamíferos euterios). Como el almacenaje espermático ocurre en grupos tan diversos, esto sugiere que las ventajas adaptativas deben ser considerables y por la misma razón, ha evolucionado repetidamente todo a lo largo del árbol evolutivo (Holt y Lloyd, 2010).

Si al almacenaje espermático se lo asocia con la competencia interespecífica espermática y/o selección de esperma por parte de la hembra, se encuentra otro factor que hace más complejo todo este escenario. Es bien conocido que la competencia interespecífica espermática se desarrolla ni bien las gametas son depositadas en el tracto femenino y continúa en todo el trayecto hacia la fertilización. Parker et al. (2010) mencionan algunos trabajos de Birkhead (Birkhead y Moller, 1998; Birkhead et al., 2009) donde se alude a una selección sexual postcopulatoria como un potente agente de la diversificación evolutiva, generando una variación de comportamiento en hembras y machos, morfología, fisiología y bioquímica. La competencia espermática depende de varios factores como el volumen eyaculado, número espermático, forma de los espermatozoides, la velocidad de desplazamiento, la bioquímica del plasma seminal y una compleja variedad en la interacción entre los diferentes eyaculados de los machos competentes y finalmente las interacciones entre el cada macho y la hembra en el que el eyaculado compite (Parker et al., 2010).

La paternidad múltiple deriva de la copulación múltiple que una hembra puede realizar con diversos machos de la misma especie y de los distintos espermatozoides que pertenecen a esos variados machos que pueden fertilizar

numerosos ovocitos dando lugar simultáneamente a hermanos provenientes de más de dos padres. Esta estrategia es desarrollada por la naturaleza en un amplio rango de grupos de vertebrados y se sugiere como un mecanismo por el cual las poblaciones podrían maximizar la variabilidad genética y es poderosa en la dirección de muchos procesos evolutivos (Feldheim et al., 2001; Saville et al., 2002; Coleman y Jones, 2011; Veríssimo et al., 2011). La paternidad múltiple es extremadamente común entre los grupos de peces y está asociada directamente con el cuidado parental y la elección para el apareamiento (Coleman and Jones, 2011).

Una vez que el espermatozoide es depositado en el tracto reproductor de la hembra de *M. schmitti*, tiene que viajar a lo largo de varios órganos con diferentes secreciones lo que implica una variedad de medios extracelulares. Las gametas masculinas interactúan con las células epiteliales en diferentes ocasiones. Primero, llegan al cérvix, luego continúan dentro del útero y finalmente son almacenadas en las glándulas oviductales, antes de reprogramar su viaje hacia el oviducto donde se estima que la fertilización tiene lugar.

Resultados

Se detectó espermatozoide en diferentes partes del aparato reproductor femenino de *M. schmitti*. Se halló espermatozoide en tres zonas distintas de la glándula oviductal: Club, Baffle and Terminal. Las dos primeras zonas indicarían una posición transitoria mientras que la última fue el lugar específico de almacenaje.

Los túbulos de almacenaje espermático de la zona Terminal fueron detectados tanto en hembras inmaduras como maduras. No hubo diferencias histológicas o morfológicas entre el espermatozoide almacenado en las hembras maduras o aquellas que estaban preñadas. En ambos casos, las células tubulares no tuvieron afinidad con las tinciones AB o PAS (Figura 1a). Con el empleo de cortes semifinos se pudo demostrar que en los túbulos de almacenaje espermático había escasa secreción cerca de los espermatozoides (Figura 1b) y los estudios con microscopía electrónica de transmisión lo determinaron (Figura 1c).

Se observaron espermatozoides libres dentro de la zona Club de la glándula oviductal de una hembra preñada (Figura 1d). También se detectó la presencia de espermatozoides en la zona Baffle y en los túbulos respectivos sin que los mismos se adhirieran o contactaran con las células epiteliales (Figura 1d). En este caso, las hembras capturadas en diciembre (época de apareamiento) estaban maduras y no preñadas.

Se observó en los cortes semifinos de microscopía electrónica, una interacción entre las células uterinas y los espermatozoides en la porción posterior del útero de una hembra madura (Figura 2a). Las células apicales del epitelio uterino presentaban gran cantidad de vacuolas y algunas de ellas eran liberadas al lumen donde interactuaban con el esperma. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión de la misma porción del útero determinaron una desintegración de algunas gametas masculinas inmersas una matriz coloidal (Figura 2b, c).

Se encontró esperma recientemente depositado en el cérvix y se observó una interacción específica con las células cervicales donde la cabeza espermática se despiralizaba (Figura 3a, b).

Discusión

El viaje a través del aparato reproductor femenino tiene interés no solo para los peces sino también en diversas especies porque dilucida qué ocurre en él y podría facilitar la inseminación artificial y ampliar el conocimiento en la biología reproductiva. Holt (2011) indica en estudios recientes los espermatozoides frecuentemente intiman y hacen contacto específico con células epiteliales respondiendo “de novo” a la transcripción génica y la síntesis de nuevas proteínas. Basándonos en las observaciones histológicas del aparato reproductor de la hembra de *M. schmitti* y los datos brindados en este trabajo, se propone aquí que la fertilización ocurre con el esperma almacenado en la zona Terminal. Los espermatozoides serían previamente capacitados en el útero (Hamlett et al., 2002) y comenzarían su trayecto ascendente a la región superior de las glándulas oviductales desde los túbulos de almacenaje espermático mientras la hembra está preñada. El tiempo transcurrido en la zona Terminal de la glándula oviductal, donde el esperma es almacenado por un cierto periodo (no se ha determinado con precisión dicho lapso aún), mantendría viable a la gameta en un arresto para futuras preñeces. Además, Chiaramonte y Petovello (2000) registraron dos hembras con embriones y huevos en el útero simultáneamente. Aparentemente, es un raro hecho que ocurre de tiempo en tiempo lo que podría deberse a una superposición en las preñeces. Como no se pudieron obtener muestras de este tipo (todavía) esta deducción permanece en el campo de la especulación; no obstante, datos confiables pertenecientes a pescadores experimentados obtenidos durante las campañas de muestreo apoyaban lo publicado por los autores antes mencionados, lo que abriría una nueva área de investigación.

Se encontró esperma en las zonas Club y Baffle de una hembra con avanzado estado de preñez. Por otro lado, numerosos espermatozoides libres fueron

detectados en la zona Baffle en las hembras maduras preparadas para la cópula. Estas gametas se encontraban profundamente en los túbulos lo que sugeriría movimientos previos para la fertilización. Esta última observación podría llevar a la idea que la zona Baffle sería otro reservorio de esperma (Stevens, 2002; Basallo et al. 2011). Considerando estas propuestas, sugiero que la zona Baffle sería un lugar donde cambios bioquímicos específicos afectan al esperma en su trayecto de encuentro con el óvulo. Esta podría ser la razón por la cual el esperma se introduce profundamente en los túbulos de dicha zona.

Por otro lado, se capturaron hembras recientemente habían copulado y el esperma estaba interactuando con la región posterior y el epitelio cervical. Esto mostraría que el esperma primero debe adjuntarse a las células uterinas donde presumiblemente sufre cambios para su preparación para la fertilización. Algunos autores detectaron esperma en el cérvix (Storrie, 2004) y Maruska et al. (1996) encontraron masas espermáticas en la cloaca en el 60% de las hembras capturadas indicando una cópula reciente.

En la adhesión de las gametas masculinas a las células cervicales en *M. schmitti* se observa cabezas espermáticas despiralizadas. Debido a que la cabeza espiralada del espermatozoide rota sobre su eje desplazándolo de forma longitudinal con un pequeño movimiento lateral de la cola (Hamlett, 1999c), la rectitud de la cabeza podría indicar una primera selección debida a la dificultad en el desplazamiento. Evidentemente, la gameta masculina necesita confrontar varios medios desde que abandona el testículo que lo origina.

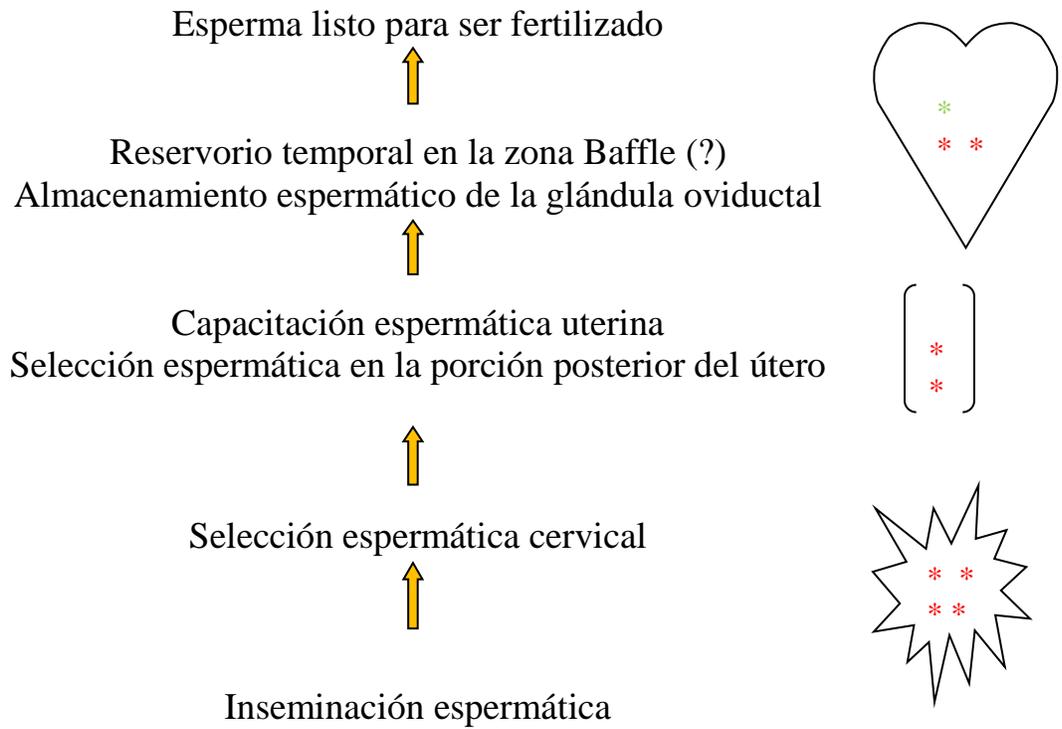
Trabajos recientes tanto en peces de agua dulce como en marinos demuestran cambios químicos en la membrana citoplasmática del espermatozoide. En *Poecilia reticulata*, un teleóteo ovovivíparo, el esperma es liberado en grupos (spermatozeugmata) y los movimientos flagelares comienzan espontáneamente con la disociación de la matriz que une al grupo de gametas. Esta evidencia muestra que ni el balance iónico ni la osmolaridad tienen efecto sobre la hiperactivación en esta especie, lo que sugeriría la existencia de otros mecanismos de inhibición espermática o activación aún desconocidos. Tabares et al. (2005) consideran que el propósito de la cascada de señales es la activación del metabolismo celular, el cual le da energía al flagelo favoreciendo su desplazamiento hacia el ovocito.

Minakinawa y Morisawa (1996) estudiaron los espermatozoides de un tiburón vivíparo los cuales exhibieron poca movilidad en todas las concentraciones probadas de una solución no electrolítica, y se movieron vigorosamente en las soluciones de NaCl o KCl a una concentración de 500 mM cuya osmolalidad era de 1000 mOsm/kg. Debido a que el esperma de los tiburones se mezcla

con el agua marina desde el sifón y el fluido uterino presenta una osmolalidad de aproximadamente 1000 mOsm/kg, es probable que el ambiente con ambos iones y la osmolalidad isotónica del fluido uterino sea un prerequisite para la iniciación de la movilidad espermática de los tiburones, aunque los factores que actuarían como los disparadores permanecen sin ser dilucidados. Estos autores encontraron que la concentración de glucosa en el fluido uterino era 13 veces mayor que en el plasma seminal. Más aún, la movilidad espermática se mantuvo alta en el fluido uterino o en el plasma sanguíneo que contenía altas concentraciones de glucosa mientras que la movilidad espermática decreció rápidamente sobre un medio diluido sin glucosa que tuviera la misma composición iónica que el fluido uterino. Estos resultados sugieren que las hexosas, especialmente la glucosa, tiene algunos roles para el mantenimiento de la motilidad espermática en los órganos reproductivos femeninos. Tanto la glucosa como la fructosa son consideradas como fuente de energía para la movilidad espermática en mamíferos y en peces vivíparos.

La interacción del espermatozoides con las diversas regiones del aparato reproductor femenino de *M. schmitti* fue estudiada analizando los cambios histológicos y estructurales en distintas instancias.

El espermatozoides experimenta cambios estructurales durante el viaje hacia la fertilización. Los resultados encontrados fortalecen la hipótesis que el espermatozoides realiza interacciones con los diferentes epitelios y secreciones para lograr dos objetivos principales: 1) almacenaje y capacitación, y 2) selección, como parte de un proceso natural de las especies para la preservación y la variabilidad (Esquema). Ambos objetivos aparecen congruentes con la paternidad múltiple como un mecanismo viable. La glándula oviductal, por ser el lugar óptimo para el almacenaje, y las modificaciones cíclicas uterinas merecen una especial atención para profundizar las investigaciones, específicamente de los contenidos bioquímicos y en la fisiología. Esto sería particularmente importante para el desarrollo de mejoras en la comprensión biológica del fenómeno de capacitación y selección espermática.



Representación esquemática que muestra la presencia de esperma (*) en el cérvix, porción posterior del útero y la glándula oviductal (zona terminal). Esperma localizado en la zona Baffle (*).

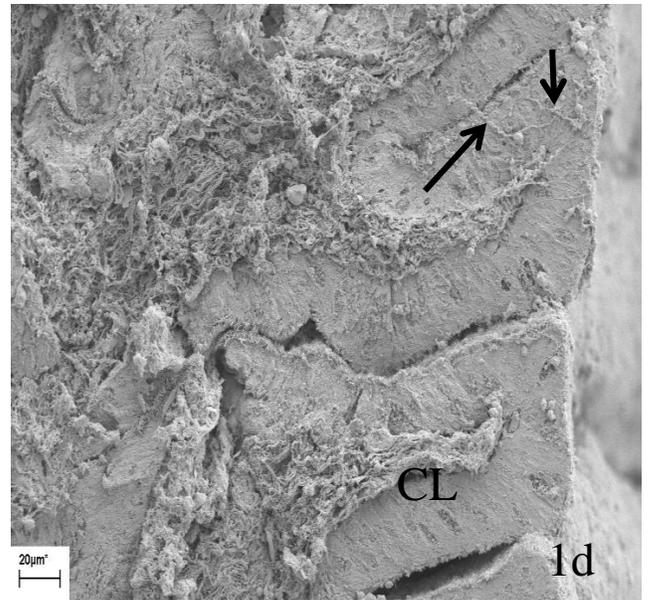
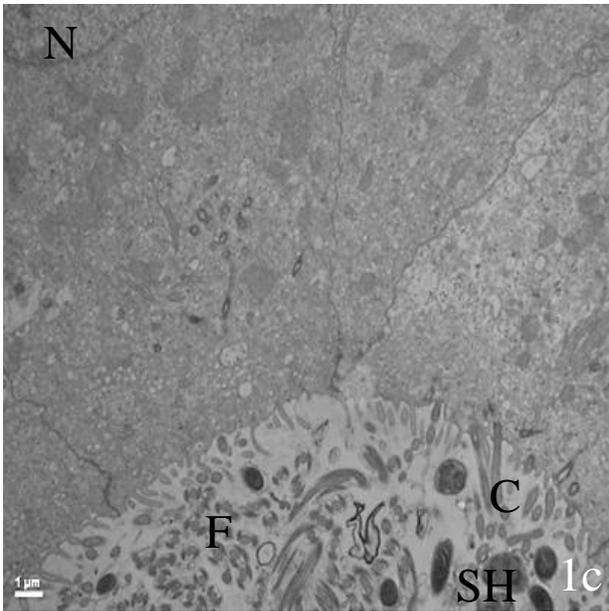
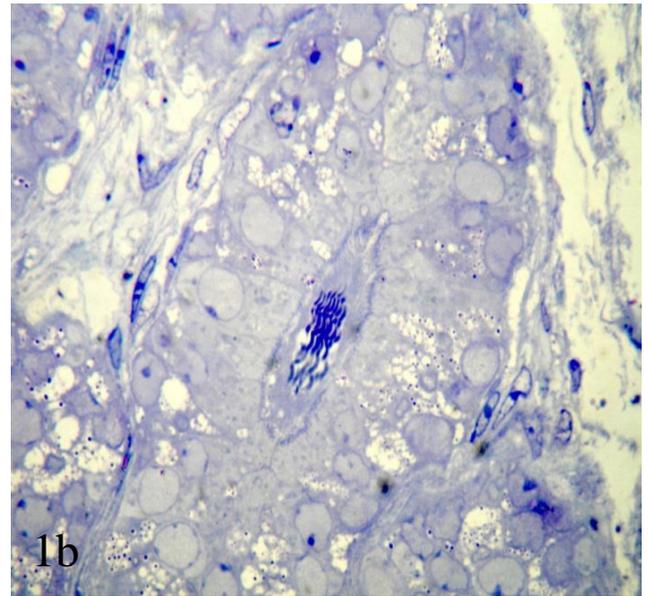
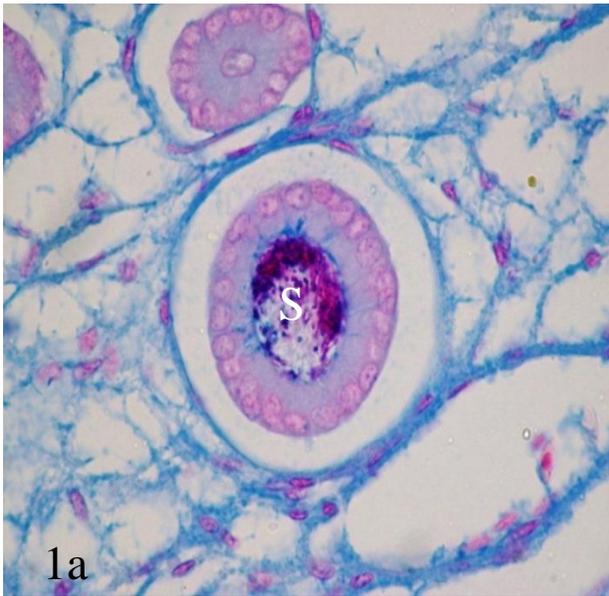


Figura 1: Presencia de espermatozoides en la glándula oviductal.

a: Túbulo de almacenaje espermático. AB/PAS. 40X.

b: Corte semifino de túbulo de almacenaje espermático en la zona terminal. Azul de Toluidina. 100X.

c: Microfotografía electrónica de transmisión de almacenaje espermático de la zona terminal. El espermatozoide está embebido en una matriz. La hembra estaba preñada.

d: Microfotografía de barrido de la zona Club con espermatozoides libres.

e: Espermatozoides en la zona Baffle zone (flechas). Masson. 40X.

C: Cilia; CL: Laminillas de la zona Club; F: Flagelo; N: Núcleo; S: Espermatozoide; SH: Cabeza espermática.

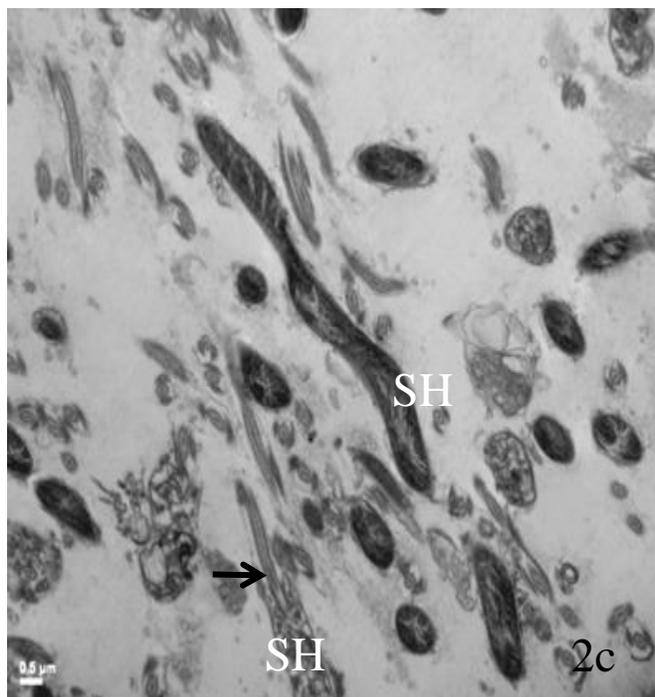
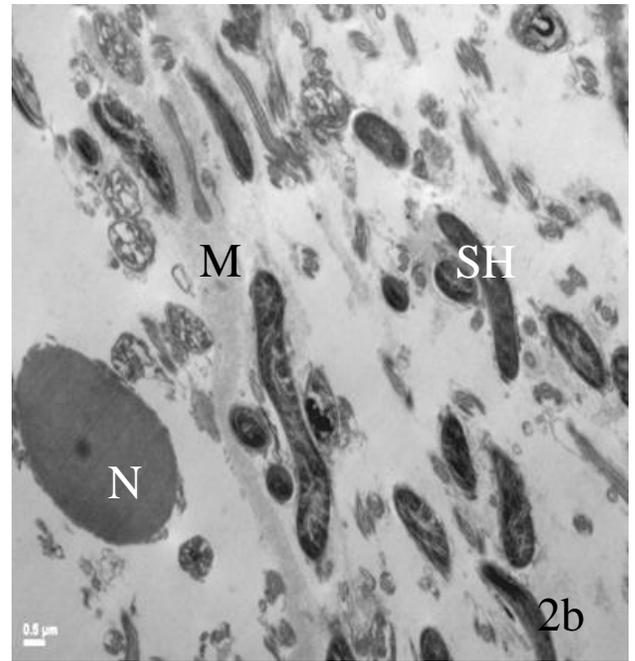
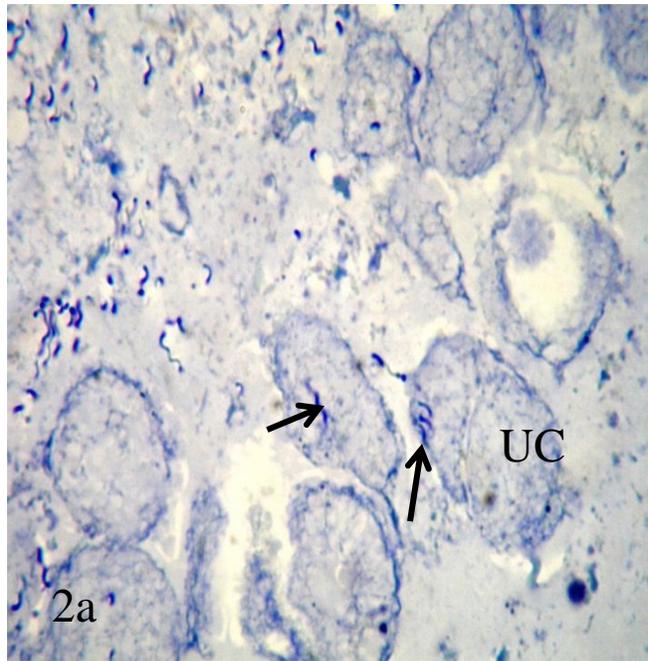


Figura 2: Presencia de espermatozoides en la región posterior del útero.

a: Corte semifiado del espermatozoide interactuando con células uterinas (flechas). Azul de Toluidina. 100X.

b: Microfotografía electrónica de transmisión del espermatozoide en la región posterior del útero de una hembra madura.

c: Microfotografía electrónica de transmisión del espermatozoide en la región posterior del útero de una hembra madura. Notar el flagelo que sale de la cabeza desintegrándose (flecha).

N: Núcleo; M: Matriz; SH: Cabeza espermática; UC: Célula uterina.

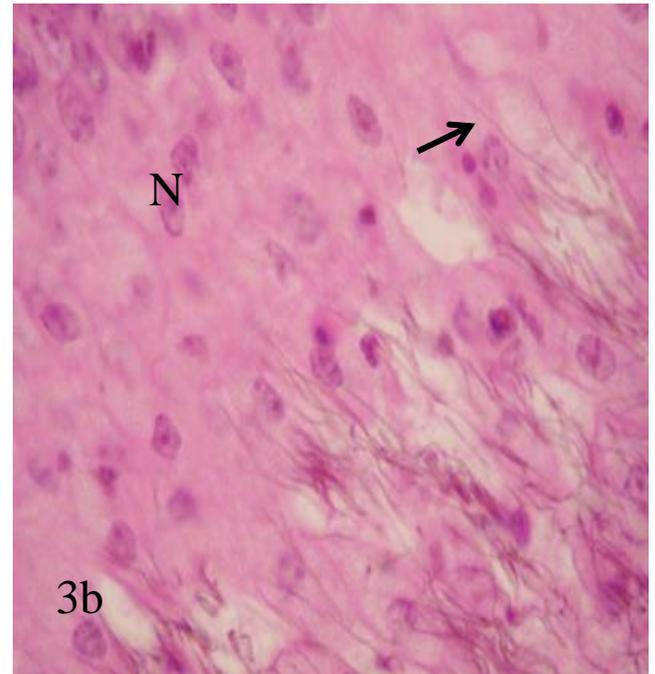
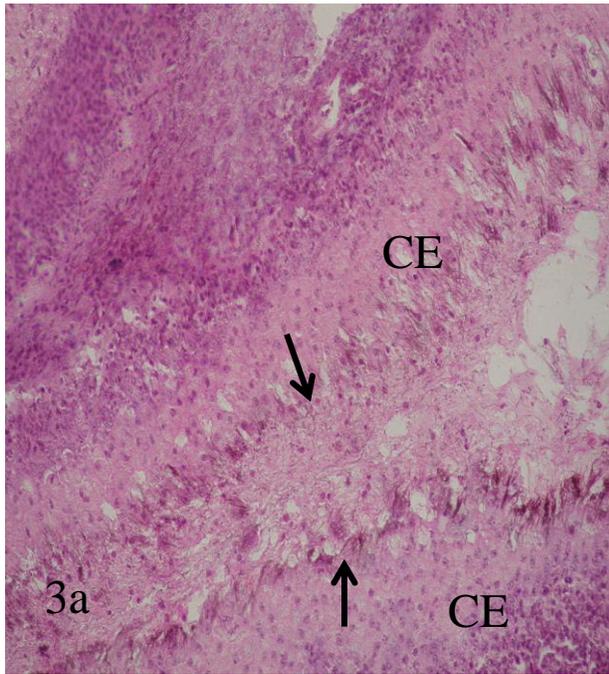


Figura 3: Presencia de esperma en el cérvix.

a: Esperma alineado en el cérvix (flechas). H & E. 20X.

b: Esperma interactuando con células cervical células. Cabezas espermáticas despiralizadas (flecha). H & E. 100X.

CE: Epitelio cervical; N: Núcleo.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente trabajo se derivaron 38 conclusiones de las modificaciones microscópicas del aparato reproductivo de la hembra de *Mustelus schmitti*.

Ovario

- 1) *Mustelus schmitti* posee un ovario único localizado en el costado izquierdo de la pared dorsal del cuerpo.
- 2) Como en la mayoría de las especies de elasmobranquios, el ovario de *M. schmitti* está asociado a un órgano epigonal.
- 3) Grupos de oogonias se hallan presentes en el ovario en cualquier estado de maduración.
- 4) Los folículos ováricos consisten en un ovocito en desarrollo con una pared follicular.
- 5) La pared folicular consiste en una zona acelular, la zona pelúcida, un epitelio folicular con membrana basal y una capa tecal formada con tejido conectivo.
- 6) El epitelio folicular comienza como simple plano pero cambia a estratificado hacia el final de la foliculogénesis.
- 7) El grosor de la zona pelúcida se reduce conforme la foliculogénesis avanza.
- 8) La capa tecal está formada por un tejido conectivo compacto vascularizado y numerosas fibras externas forman una red rodeando al folículo.
- 9) Los gránulos precursores de vitelo son transportados a través de la pared folicular hacia el ovocito en desarrollo.
- 10) Folículos atrésico y cuerpos lúteos son observados en diversos estados de maduración del ovario.

- 11) Los folículos atrésicos presentan una zona pelúcida plegada con núcleos picnóticos en las células foliculares remanentes. No se detectan en el ovocito núcleo ni plaquetas de vitelo.
- 12) Los cuerpos lúteos están constituidos por células secretoras, llenas de vesículas lipídicas. Las células tecales recubren la estructura con numerosas fibras dispuestas externamente.

Glándulas Oviductales

- 13) *M. schmitti* presenta un par de glándulas oviductales.
- 14) La morfología externa de las glándulas es similar a la de las de las especies de *Mustelus*.
- 15) La organización interna de dichas glándulas es similar a las de otros condriictios.
- 16) Los túbulos de la zona terminal son el sitio de almacenaje espermático en *M. schmitti*.
- 17) El epitelio de los túbulos de almacenaje espermático de la zona terminal no se colorean con ninguna de las coloraciones aplicadas.
- 18) El esperma también fue observado en la zona Baffle, presumiblemente, de paso en su recorrida para la fecundación en el oviducto debido a que no presentaba un patrón de agregación y se encontraba entre los pliegues del epitelio.
- 19) Los estudios de microscopía electrónica de barrido revelan esperma en las zonas Club y Baffle de la glándula oviductal perteneciente a una hembra preñada.
- 20) Se observa almacenaje espermático en la glándula oviductal a lo largo del ciclo reproductivo y aún en hembras preñadas.

Uterus

- 21) El útero de *M. schmitti* es par y ambos son funcionales.

- 22) La gestación dura entre 11-12 meses.
- 23) El número máximo de embriones observado es de 6.
- 24) Tanto el istmo y como el cérvix actúan como esfínteres mucosos.
- 25) El istmo tiene un epitelio simple cilíndrico ciliado, PAS (+) y AB (-), seguido de dos capas musculares, dispuestas de adentro hacia afuera, circular y longitudinalmente, finalizando con una fina serosa.
- 26) El cérvix muestra un epitelio estratificado cilíndrico, PAS (+) y AB (+), con tres capas de músculo liso.
- 27) El útero en animales inmaduros presenta un epitelio simple cilíndrico con pequeños y numerosos pliegues, PAS (-) y AB (-).
- 28) El epitelio uterino en su porción anterior en animales maduros se halla estratificado, PAS (+) y AB (+), con rica vascularización subepitelial y tres capas musculares:
 - a) La primera capa posee una disposición particular de fibras musculares, semejante a una red, alternando con tejido conectivo.
 - b) La segunda, tiene fibras musculares dispuestas longitudinalmente y se halla dividida en dos por tejido conectivo vascularizado y,
 - c) La tercera, es muy delgada y se dispone también longitudinalmente.
- 29) En la porción posterior uterina en hembras maduras, el epitelio se encuentra también estratificado pero con menos células secretoras.
- 30) El epitelio uterino antes del comienzo de la gestación presenta una severa reducción en el número de capas celulares, las cuales se requerirán para la difusión que mantendrá el desarrollo embrionario.
- 31) En el cérvix y en la porción posterior del útero se encontró esperma lo que sugeriría una interacción particular entre el epitelio uterino y las gametas masculinas.
- 32) *M. schmitti* no desarrolla placenta.

Presencia e interacción de espermatozoides con diferentes epitelios

- 33) Se detectó la presencia de espermatozoides en las zonas Club, Baffle y Terminal de la glándula oviductal, en la porción posterior del útero y en el cérvix.
- 34) El epitelio de los túbulos de almacenaje espermático no se tiñen ni con PAS ni AB.
- 35) Los cortes semifinos de los túbulos de almacenaje espermático muestran escasa secreción cerca del espermatozoides.
- 36) Con los estudios de microscopía electrónica de transmisión en la región posterior del útero se pudo observar la desintegración de algunas gametas masculinas, lo cual indicaría una primera selección espermática.
- 37) El espermatozoides hallado en el cérvix no está cubierto de la matriz extracelular que constituye el spermatozeugmata que se forma en el tracto reproductor masculino.
- 38) Algunas cabezas espermáticas en el cérvix se encontraban despiralizadas mientras interactuaban con las células cervicales.

El presente trabajo ofrece datos valiosos sobre la biología reproductiva de los Condrictios, especialmente para el género *Mustelus* para dilucidar los mecanismos celulares que juegan un rol fundamental en la fecundación, en particular y en la reproducción, en general. Este estudio provee suficiente orientación para dar origen a investigaciones futuras en fisiología en el campo de una primera selección espermática en el cérvix y posteriormente en el útero, y sobre la interacción del espermatozoides con los túbulos que los almacenan, para un mejor entendimiento en cuanto a la histoquímica de los mismos.

Capítulo 8

Bibliografía

Anderson, E. (1964). Cytologic changes during oocyte differentiation and formation of the vitelline envelope in certain teleost fish. *Journal of Cell Biology* **23**, 4A.

Andreuccetti, P., Iodice, M., Prisco, M., y Gualteri, R. (1999). Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the elasmobranch *Raja asterias*. *The Anatomical Record* **255**, 180-187.

Baranes, A., y Wendling, J. (1981). The early stages of development in *Carcharias plumbeus*. *Journal of Fish Biology* **18**, 159-175.

Babel, J.S. (1967). Reproduction, life history and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. *California Fish and Game Bulletin* **137**, 1-104.

Basallo, A., Varela Junior, A.S., y Oddone, M. C. (2011). Armazenamento de esperma da glândula ovidutal da raia ovípara *Atlantoraja platana* (Günther, 1880) (Chondrichthyes, Rajoidei). XIV Congreso Latino-americano de Ciencias do Mar (COLACMAR), Camboriú, Brasil.

Bircan-Yildirim, Y., Çek, S., Basusta, N., y Atik, E. (2011). Histology and morphology of the epigonal organ with especial reference to the lymphomyeloid system in *Rhinobatos rhinobatos*. *Turkish journal of Fisheries and aquatic sciences* **11**, 351-358.

Bird, S., Wang, T., Zou, J., Cunningham, C., y Secombes, C. (2002). The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1 β in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *The Journal of Immunology* **168**, 3329-3340.

Birkhead, T.R. and Møller, A.P. (1998). Sperm Competition and Sexual Selection. (Eds. Birkhead T.R. and Moller A.P.) pp 850 (Academic Press, London).

Birkhead, T.R., Hosken, D.J. and Pitnick, S. (2009). Sperm Biology. An Evolutionary Perspective. (Eds. Birkhead, T.R., Hosken, D.J. and Pitnick, S.) pp650 (Burlington, MA: Academic Press).

Breed, W.G., Hope, R.M., Wiebkin, O.W., Spargo, S.C., y Chapman, J.A. (2002). Structural organization and evolution of the marsupial zona pellucida. *Reproduction* **123**, 13-21.

Callard, I.P., y Klosterman, L. (1988). Reproductive physiology. Part A: The female. In: *Physiology of Elasmobranch Fishes*. (Ed. Shuttleworth, T.J.). pp 277-292. (Springer Verlag: Berlin).

Callard, I.P., y Koob, T.J. (1993). Endocrine Regulation of the Elasmobranch reproductive tract. *The Journal of Experimental Zoology* **266**, 368-377.

Castro, J.L. and Wourms, J.P. (1993). Reproduction, placentation and embryonic development of the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Journal of Morphology* **218**, 257-280.

Castro Aguirre, J.L., Antuna Mendiola, A., González Acosta, A.F. y de la Cruz Agüero, J. (2005). *Mustelus albipinnis* sp. Nov. (Chondrichthyes: Carcharhiniformes: Triakidae) de la costa suroccidental de Baja California Sur, México. *Hidrobiológica* **15**, 123-130.

Cateni, C., Paulesu, L., Bigliardi, E., y Hamlett, W. C. (2003). The interleukin I (IL-I) system in the uteroplacental complex of a cartilaginous fish, the smoothhound shark, *Mustelus canis*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **1**:25.

Chen, C.T., y Mizue, K. (1973). Studies on sharks – Reproduction of *Galeorhinus japonicas*. *Bulletin of Faculty of Fisheries Nagasaki University* **36**, 37-51.

Chen, C-T., Liu, K-M., y Chang, Y-C. (1997). Reproductive biology of the bigeye thresher shark, *Alopias superciliosus* (Lowe, 1839) (Chondrichthyes: Alopiidae), in the Northwestern Pacific. *Ichthyological Research* **44**, 227-235.

Chen, M. Qiu, S. y Yang, S. (2001). The form and structure of the uterus of spadenose shark, *Scoliodon laticaudus*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)* **40**, 92-97.

Chiaramonte, G.E. (1996). Placentación de la “Bacota”, *Carcharhinus brachyurus* (Chondrichthyes: Carcharhinidae): tipificación, descripción macroscópica y otros aspectos reproductivos. *Museo Argentino de Ciencias*

Naturales “Bernardino Rivadavia” e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales **143**, 1-7.

Chiaramonte, G.E. (1998). Shark fisheries in Argentina. *Marine and Freshwater Research* **49**, 747-756.

Chiaramonte, G.E., y Pettovello, A.D. (2000). The biology of *Mustelus schmitti* in southern Patagonia, Argentina. *Journal of Fish Biology* **57**, 930-942.

Chieffi Baccari, G., Minucci, S, Di Mateo, L., y Chieffi, G. (1992). Ultrastructural investigation of the corpora atretica of the electric ray, *Torpedo marmorata*. *General and Comparative Endocrinology* **86**, 72-80.

Cohen, A. (1974). Critical Point Drying. In: Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. (Ed. Hayat) pp. 3-49 (Von Nostrand Reinhold, New York).

Cole, N. J., y Currie, P.D. (2007). Insights from sharks: Evolutionary and developmental models of fin development. *Developmental Dynamics* **236**, 2421-2431.

Coleman, S.W., y Jones, A.G. (2011). Patterns of multiple paternity and maternity in fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**, 735-760.

Conrath, C. L., y Musick J.A. (2002). Reproductive biology of the smooth dogfish, *Mustelus canis*, in the northwest Atlantic Ocean. *Environmental Biology of Fishes* **64**, 367-377.

Costa, F.E.S., Braga, F.M.S, Arfelli, C.A., y Amorim, A.F. (2002). Aspects of the reproductive biology of the shortfin Mako, *Isurus oxyrinchus* (Elasmobranchii, Lamnidae) in the southeastern region of Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 239-248.

Cousseau, M.B. (1986). Estudios biológicos sobre peces costeros con datos de dos campañas de investigación realizadas en 1981. IV. El gatuzo (*Mustelus schmitti*). Publicaciones Científicas Tecnológicas de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marino **1**, 60-65.

Cousseau, M.B., y Perrotta, R. (2004). Peces marinos de Argentina. Biología, distribución y pesca. Publicaciones especiales INIDEP, Mar del Plata, 167 pp.

Cousseau, M. B., Carozza, C. R., y Macchi, G.J. (1998). Abundancia, reproducción y distribución de tallas del gatuzo (*Mustelus schmitti*) en la zona común de pesca argentino-uruguaya y en El Rincón. Noviembre, 1994. In: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Informe Técnico **21**, 103-105.

Crim, L. W., y Glebe. B. D. (1990). Reproduction. En: Methods for fish biology. (Eds. C. B. Schreck and P. B. Moyle) pp 529–553 (American Fisheries Society, Bethesda, Maryland).

Davenport, J., y Sayer, M.D.J. (1993). Physiological determinants of distribution in fish. Journal of Fish Biology (Supplement A) **43**, 121-145.

Davenport, I.R., Weaver, A.L. y Wourms, J.P. (2011). A novel set of structures within the Elasmobranch, Ovarian Follicle. Journal of Morphology, **272**, 557-565.

Devadoss, P. (1982). On the embryonic stage of the mottled ray, *Aetomylus maculatus* (Gray), with a note on its breeding season. Indian Journal of Fisheries **29**, 253-255.

Dodd, M.H.I., y Dodd, J.M. (1980). Ultrastructure of the ovarian follicle in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. General and Comparative Endocrinology **40**, 330-331.

Dulvy, N.K., y Reynolds, J.D. (1997). Evolutionary transitions among egg-laying, live bearing and maternal inputs in sharks and rays. Proceedings of the Royal Society of London, B **264**, 1309-1315.

Elías, F.G. y Estecondo, S. (2006a). Foliculogénesis en el ovario de *Mustelus schmitti*, Springer 1939 (Chondrichthyes, Triakidae). X Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNICEN. Tandil, Buenos Aires, Argentina, página 36.

Elías, F. G. y Hamlett, W.C. (2006b). Orientation of the uterine musculature of the smooth hound, *Mustelus schmitti* Springer 1939. V Reunión de la

SBEEL y I Congreso Latinoamericano de Condriictología. UNIVALI, Itajaí, Brasil. ISBN 85-7682-158-3, página 89.

Elías, F. G. y Hamlett, W.C. (2006c). Cambios histológicos y estructurales en la pared uterina de *Mustelus schmitti* (Chondrichthyes, Triakidae) en hembras jóvenes y adultas. VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIV Coloquio de Oceanografía. Puerto Madryn, Chubut, Argentina, página 177.

Fänge, R., y Pulsford A. (1983). Structural studies on the lymphomyeloid tissues of the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L. Cell and Tissue Resarch **230**, 337-351.

Fasano, S., Pierantoni, R., y Chieffi G. (1989). Reproductive biology of elasmobranchs with emphasis on endocrines. Journal of Experimental Zoology, Supplement **2**, 53-61.

Feldheim, K.A., Gruber, S.H., y Ashley, M.V. (2001). Multiple paternity of a Lemon shark litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae). Copeia **3**, 781-786.

Figueiredo, J.L. (1977). Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. I. – Introdução, Caçones, Raias e Quimeras. São Paulo: Ed. Museu de Zoología, Universidade São Paulo.

Fishelson, L., y Baranes, A. (1998). Observations on the Oman shark, *Iago omanensis* (Triakidae), with emphasis on the morphological and cytological changes of the oviduct and yolk sac during gestation. Journal of Morphology **236**, 151-165.

Galíndez, E. J., Díaz Andrade, M. C., Moya, A. C. y Estecondo, S. (2010). Morphological Changes in the Pregnant Uterus of the Smooth Hound Dogfish *Mustelus schmitti* Springer, 1939 (Gatuzo) (Chondrichthyes, Triakidae). Microscopic Study and Phylogenetic Reproductive Implications. International Journal of Morphology **28**, 1003-1010.

Gilmore, R.G., Dodrill, J.W., y Linley, P.A. (1983). Reproduction and embryonic development of the sand tiger shark, *Odontaspis Taurus* (Rafinesque). Fishery Bulletin **81**, 201-225.

Gilmore, R.G. (1991). The reproductive biology of the lamnoid sharks. Underwater Naturalist **19**, 64-67.

Gilmore, R.G. (1993). The reproductive biology of the lamnoid sharks. *Environmental Biology of Fishes* **38**, 95-114.

Girard, M., y Du Buit, M.H. (1999). Reproductive biology of two deep-water sharks from the British Isles, *Centroscyrmus coelolepis* and *Centrophorus squamosus* (Chondrichthyes: Squalidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **79**, 923-931.

Gruber, S.H., y Compagno, L.J.V. (1981). Taxonomic status and biology of the bigeye thresher, *Alopias superciliosus*. *Fishery Bulletin* **79**, 617-640.

Guallart, J., y Vicent, J.J. (2001). Changes in composition during embryo development of the gulper shark, *Centrophorus granulosus* (Elasmobranchii, Centrophoridae): an assessment of maternal-embryonic nutritional relationships. *Environmental Biology of Fishes* **61**, 135-150.

Guraya, S.S. (1978). Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates. In: *The vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution*. (Ed. Jones, R.E.) pp261-329 (Plenum Press: London).

Guraya, S.S. (1986). The cell and molecular biology of fish oogenesis. In: *Monographs in Developmental Biology*. (Ed. Sauer H.W.) pp110-163 (Karger A.G., Basel) vol. 18.

Haines, A.N., Flajnik, M.F., Rumfelt, L.L, y Wourms, J.P. (2005). Immunoglobulins in the eggs of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Developmental and Comparative Immunology* **29**, 417-430.

Haines, A.N., Flajnik, M.F., y Wourms, J.P. (2006). Histology and Immunology of the placenta in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Placenta* **27**, 1-10.

Hamlett, W.C. (1986). Prenatal nutrient absorptive structures in selachians. En: *Indo-Pacific fish biology: Second international conference on Indo-Pacific fishes*. Tokyo. (Eds. Uyeno, T. Arai, R., Taniuchi, T. and Matsura, K.) pp.333-344 (Ichthyological Society of Japan).

Hamlett, W.C. (1987). Comparative morphology of the Elasmobranch placental barrier. *Arch. Biol.* **98**, 135-162.

Hamlett, W.C. (1990a). Functional Electron microscopic investigations of the fetal membranes and uterus in the blacknose shark *Carcharhinus acronotus*. *Anatomical Record* **226**, 40a.

Hamlett, W.C. (1990b). Functional organization of uterine trophonemata and fetal alimentary structures in the southern stingray. *American Zoologist* **30**, 39a.

Hamlett, W.C., Eulitt, A.M., Jarrel, R.L., y Kelly, M.A. (1993). Uterogestation and placentation in elasmobranchs. *The Journal of Experimental Zoology* **266**, 347-367.

Hamlett, W.C. (1996). Ultrastructure of the oviducal gland in the yellow spotted stingray, *Urolophus jamaicensis*, with observations on a novel inclusion. *Journal of Anatomy* **188**, 244-245.

Hamlett, W.C., Musick, J.A., Eulitt, A.M., Jarrel, R.L., y Kelly, M.A. (1996a). Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal of Zoology* **74**, 1417-1430.

Hamlet, W.C., Schwartz, E.J., Schmeinda, R., y Cuevas, E. (1996b). Anatomy, histology, and development of the cardiac valvular system in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology* **275**, 83-94.

Hamlett, W.C., y Hysell, M.K. (1998a). Uterine specializations in Elasmobranchs. *The Journal of Experimental Zoology* **282**, 438-459.

Hamlett, W.C., Hysell, M.K. (1998b). Reproductive accommodations for gestation in the Atlantic guitarfish, *Rhinobatos lentiginous*, Rhinobatidae. *The Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* **114**, 199-208.

Hamlett W.C., Knight D.P., Koob T.J., Jezior M., Luong T., Rozycki T., Brunette N. y Hysell M.K.(1998). Survey of Oviducal Gland Structure and Function in Elasmobranchs. *The Journal of Experimental Zoology* **282**, 399-420.

Hamlett, W.C., Jezior, M., y Spieler, R. (1999a). Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray, *Urolophus jamaicensis*. *Annals of Anatomy* **181**, 159-172.

Hamlett, W.C., y Koob, T. J. (1999b). Female Reproductive System. En: Sharks, Skates and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes. (Ed. Hamlett, W.C.) pp 398-443 (The John Hopkins University Press: Baltimore).

Hamlett, W.C. (1999c). Male Reproductive System. En: Sharks, Skates and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes. (Ed. Hamlett, W.C.) pp 444-470 (The John Hopkins University Press: Baltimore).

Hamlett, W.C., Hysell, M.K., Jezior, M., Rozycki, T., Brunette, N. y Tumilty, K. (1999c). Fundamental zonation in elasmobranch oviducal glands. Proc. 5th. Indo-Pac. Fish Conf. Noumea. 1997. Séret B. and J.Y. Sire eds. Paris: Soc. Fr. Ichthyol., 271-280.

Hamlett, W.C., Musick, J.A., Hysell, C.K., y Sever, D.M. (2002). Uterine epithelial-sperm interaction, endometrial cycle and sperm storage in the terminal zone of the oviducal gland in the placental Smoothhound, *Mustelus canis*. *Journal of Experimental Zoology* **292**, 129-144.

Hamlett, W.C., Fishelson, L., Baranes, A., Hysell, C.K., y Sever, D.M. (2002a). Ultrastructural analysis of sperm storage and morphology of the oviducal gland in the Oman shark, *Iago omanensis* (Triakidae). *Marine Freshwater Research* **53**, 601-613.

Hamlett, W.C., Reardon, M., Clark, J. y Walker, T.I. (2002b). Ultrastructure of sperm storage and male genital ducts in a male Holocephalan, the Elephant Fish, *Callorhynchus milli*. *Journal of Experimental Zoology* **292**, 111-128.

Hamlett, W.C., Knight, D.P., Pereira, F.T.V., Steele, J, y Sever, D.M. (2005). Oviducal Glands in Chondrichthyans. En: Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimaeras. (Ed. Hamlett, W.C.) pp301-335 (Ed. Science Publ., USA).

Heithaus, M.R. (2004). Predator-prey interactions. En: Biology of sharks and their relatives. (Ed. Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R.) pp486-521 (Boca Ratón, Florida: CRC).

Holt, W.V. (2009). Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? *Reproduction in Domestic Animals* **44**, 31-38.

Holt, W.V., y Lloyd, R.E. (2010). Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well? *Theriogenology* **73**, 713-722.

Holt, W.V. (2011). Mechanism of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reproduction in Domestic Animals* **46** (Suppl.2), 68-74.

Hurley, D.A., y Fischer, K.C. (1966). The structure and development of the external membrane in young eggs of the brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Canadian Journal of Zoology* **44**, 173-190.

Hyder, S. L., Cayer, M. L., y Pettey, C. L. (1983). Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tissue & Cell* **15**, 437-55.

Johnson, M.R., y Snelson, F.F. (1996). Reproductive life history of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina* (Pisces, Dasyatidae) in the fresh water St. Johns River, Florida. *Bulletin of Marine Science* **59**, 74-88.

Jollie, W.P. y Jollie, L.G. (1964). The fine structure of the ovarian follicle of the ovoviviparous poeciliid fish, *Lehistes reticulatus* I. Maturation of follicular epithelium. *Journal of Morphology*. **114**, 479-502.

Jollie, W.P., y Jollie, L.G. (1967). Electron microscopic observations on accommodations to pregnancy in the uterus of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *Journal of Ultrastructural Research* **20**, 161-178.

Jones, T.S. y Ugland, K.I. (2001). Reproduction of female spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in the Oslofjord. *Fishery Bulletin* **99**, 685-690.

Knight, D.P., Feng, D. and Stewart, M., 1996. Structure and function of the Selachian egg case. *Biological Reviews* **71**, 81-111.

Knupp, C., Chew, M., Morris, E., y Squire, J. (1996). Three-dimensional reconstruction of a collagen IV analogue in the dogfish egg case wall. *Journal of Structural Biology* **117**, 209-221.

Knupp, C., y Squire, J. (1998). X-ray diffraction analysis of the 3D organization of collagen fibrils in the wall of the dogfish egg case. *Proceedings of Royal Society of London B* **265**, 2177-2186.

Knupp, C., Chew, M., y Squire, J. (1998). Collagen packing in the dogfish egg case wall. *Journal of Structural Biology* **122**, 101-110.

Koob, T.J. y Cox, D.L. (1988). Egg Capsule Catechol Oxidase from the Little Skate *Raja erinacea* Mitchill, 1825. *The Biological Bulletin* **175**, 202-211.

Koob, T.J., y Hamlett, W.C. (1998). Microscopic structure of the gravid uterus in the little skate, *Raja erinacea*. *The journal of Experimental Zoology* **282**, 421-437.

Koob, T.J. and Callard, I.P. (1991). Reproduction in female elasmobranchs. In: *Comparative Physiology*. (Ed. Kinne, R.K.H.) pp 155-209 (Karger: Basel).

Koob, T. J., y Callard, I.P. (1999). Reproductive endocrinology of Female Elasmobranchs: Lessons from the little skate (*Raja erinacea*) and spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Experimental Zoology* **284**, 557-574.

Laale, H. (1980). The perivitelline space and egg envelope of bony fishes: A review. *Copeia* **2**, 210-226.

Lance, V. y Callard, I.P. (1969). A histochemical study of ovarian function in the ovoviviparous elasmobranch, *Squalus acanthias*. *General and Comparative Endocrinology* **13**, 255-267.

Leahy, T., y Gadella, B.M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Society for Reproduction and Fertility* **142**, 759-778.

Lopez Cazorla, A.C. (2004). Peces. En: *Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca*. (Eds. Piccolo, M.C. and Hoffmeyer, M.S.) pp191-201 (Instituto Argentino de Oceanografía).

Lucifora, L.O., Menni, R.C., y Escalante, A.H. (2004). Reproductive biology of the school shark, *Galeorhinus galeus*, off Argentina: support for a single

south western Atlantic population with synchronized migratory movements. *Environmental Biology of Fishes* **71**, 199-209.

Lutton, B. y Callard, I.P. (2004). Inhibition of esteroidogenesis by an unique lymphomyeloid tissue in the little skate, *Leucoraja erinacea*. Abstract: Proceedings of the Society for the study of Reproduction.

Lutton, B. V., St. George, J., Murrin, C.R., Fileti, L.A., y Callard, I.P. (2005). The elasmobranch ovary. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimaeras. (Ed. Hamlett, W.C.) 237-281 (Science Publ.,USA).

Maruska, K., Cowie, E.G., y Tricas, T.C. (1996). Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranch fishes. *The Journal of Experimental Zoology* **276**, 219-232.

Martin, A.W. (1950). Some remarks on the blood volume of fish. In: Studies Honouring Trevor Kincaid. (Ed. Hatch, M.H.) 125-140 (Seattle: University of Washington).

Massa, A., Lasta C., y Carozza, C. (2001). Estado actual y explotación de gatuzo (*Mustelus schmitti*) en la Plataforma Argentina. Informe Técnico N 29 del INIDEP, Mar del Plata, Argentina, pp17.

Massa, Ana, Lucifora, L. y Hozbor, N. (2004). Condrictios de la región costera bonaerense y uruguaya. In: El mar argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 4. Los peces de marinos de interés pesquero. Caracterización biológica y evaluación del estado de explotación. Publicaciones especiales. INIDEP. (Eds. Sánchez, R.P.; Bezzi, S.I.).

Matthews, L.H. (1950). Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **243B**, 247-316

McMillan, D.B. (2007). Fish Histology. Female Reproductive Systems. (Ed. Dordrecht) pp67-217 (the Netherlands: Springer Verlag).

Menni, R.C. (1985). Distribución y biología de *Squalus acanthias*, *Mustelus schmitti* y *Galeorhinus vitaminicus* en el Mar Argentino en agosto-setiembre

de 1978 (Chondrichthyes). Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie), Zoología **13**, 151-182.

Menni, R.C., Cousseau, M.B., y Gosztonyi, A.R. (1986). Sobre la biología de los tiburones costeros de la Provincia de Buenos Aires. Anales de la Sociedad Científica Argentina cxxiii, 3-27.

Metten, H. (1939). Studies on the reproduction of the dogfish. Philosophical Transactions of the Royal Society of London **230B**, 217-238.

Minamikawa, S., y Morisawa, M. (1996). Acquisition, Initiation and Maintenance of Sperm Motility in the Shark, *Triakis scyllia*. Comparative Biochemistry and Physiology **113A**, 387-392.

Moura, T., Nunes, C., Bandarra, N., Serrano Gordo, L., y Figueiredo, I. (2011) Embryonic development and maternal-embryo relationships of the Portuguese dogfish *Centroscymnus coelolepis*. Marine Biology **158**, 401-412.

Muñoz, M., Koya, Y., y Casadevall, M. (2002). Histochemical analysis of sperm storage in *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae). Journal of Experimental Zoology **292**, 156-164.

Nalini, K.P. (1940). Structure and function of the nidamental gland of *Chiloscyllium griseum* (Müller and Henle). Proceedings of the Indian Academy of Science. **12B**, 189-214.

Oddone, M.C., Paesch L. y Norbis, W. (2005) Reproductive biology and seasonal distribution of *Mustelus schmitti* (Elasmobranchii: Triakidae) in the Rio de la Plata oceanic front, south-western Atlantic. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **85**, 1193-1198.

Oddone, M.C., Paesch, L. Norbis, W., y Velazco, G. (2007). Population structure, distribution and abundance patterns of the patagonian smoothhound *Mustelus schmitti* Springer, 1939 (Chondrichthyes, Elasmobranchii, Triakidae) in the Rio de la Plata and inner continental shelf, SW Atlantic Ocean (34° 30' - 39° 30' S). Brazilian Journal of Oceanography **55**, 167-177.

Oddone, M.C., Mesa, A. y Ferreira de Amorim, A. (2008). Description of the egg capsule of *Atlantoraja castelnaui* (Elasmobranchii, Rajidae). Brazilian Journal of Oceanography **56**, 65-68.

Ohta, H., y Teramishi, T. (1982). Ultrastructure and histochemistry of granulosa and micropylar cells in the ovary of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University **33**, 1-8.

Parker, G.A., Immler, S., Pitnick, S., and Birkhead, T.R. (2010). Sperm competition games: Sperm size (mass) and number under raffle and displacement, and the evolution of P_2 . Journal of Theoretical Biology **264**, 1003-1023.

Patiño, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strüssmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A., y Goudie, C.A. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. Journal of Experimental Zoology **276**, 209-218.

Pérez, M., Massa, A., y Cordo, H.D. (2011). Estimación de un índice de abundancia anual de gatuzo (*Mustelus schmitti*) a partir de datos de la flota comercial argentina. Período 1992-2008. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, Argentina. Informe técnico **79**, 1-41.

Pérez, M., y Massa, A. (2011). Plan de marcación de gatuzo (*Mustelus schmitti*) en el Ecosistema Costero Bonarense. Frente Marítimo **22**, 207-212.

Polder, J.J.W. (1961). Cyclical changes in testes and ovary related to maturity stages in the North Sea herring, *Clupea harengus*. Archives Neerlandaises de Zoologie **14**, 45-60

Prasad, R.R. (1945). The structure, phylogenetic significance and function of the nidamental glands of some elasmobranchs of the Madras Coast. Proceedings of the National Institute of Sciences of India **11**, 282-302.

Pratt, H.L. (1988). Elasmobranch Gonad Structure: A description and survey. Copeia **3**, 719-729.

Pratt, H.L. (1993). The storage of spermatozoa in the oviducal glands of western North Atlantic sharks. Environmental Biology of Fishes **38**, 139-149.

Pratt, H.L., y Carrier, J.C. (2001). A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Environmental Biology of Fishes **60**, 157-188.

Prisco, M., Romano, M., Ricchiari, L., Limatola, E., y Andreucetti, P. (2002a). An ultrastructural study on the vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *General and Comparative Endocrinology* **128**, 171-179.

Prisco, M., Ricchiari, L., y Andreucetti P. (2002b). Ultrastructural studies on developing follicles of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Molecular reproduction and development* **61**, 78-86.

Prisco, M., Liguoro, A., Ricchiari, L., Del Giudice, G., y Andreucetti, P. (2007). Oogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **17**, 1-10.

Ranzi, S. (1934). Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parte I. *Pubbl. Sta. Zool. (Naples)* **13**, 331-437.

Ravaglia, M.A., y Maggese, M.C. (2002). Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. *Biocell* **26**, 325-337.

Ravaglia, M.A., y Maggese, M.C. (2003). Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. *Tissue and Cell* **35**, 9-17.

Rusaoüen, M., Pujol, P.J., Bocquet, J., Veillard, A., y Borel, J.P. (1976). Evidence of collagen in the egg capsule of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **53**, 539-543.

Saunders, M.W., y McFarlane, G.A. (1993). Age and length at maturity of the female spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environmental Biology of Fishes* **38**, 49-57.

Saville, K.J., Lindley, A.M., Maries, E.G., Carrier, J.C., y Pratt, H.L., Jr. (2002). Multiple paternity in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes* **63**, 347-351.

Selman, K., y Wallace, R. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoology* **26**, 173-192.

Selman, K., y Wallace, R. (1989). Cellular aspects in oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* **6**, 211-231.

Serra-Pereira, B., Alfonso, F. Farias, I., Joyce, P. Ellis, M., Figueiredo, I., Serrano Gordo, L. (2011). The development of the oviducal gland in the rajid thornback ray, *Raja clavata*. *Helgoland Marine Research* **65**, 399-411.

Sidders, M.A., Tamini, L.L. Perez, J.E., y Chiaramonte, G.E. (2005). Biología reproductiva del gatuzo *Mustelus schmitti* Springer, 1939 (Chondrichthyes, Triakidae) en el área de Puerto Quequén, provincia de Buenos Aires. *Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales* **7**, 89-101.

Smale, M.J., y Compagno, L.J.V. (1997). Life history diet of two southern African smoothhound sharks, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) and *Mustelus palumbes* Smith, 1957 (Pisces, Triakidae). *South African Journal of Marine Science* **18**, 229-248.

Smith, J.W., y Merriner, J.V. (1986). Observations on the reproductive biology of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in Chesapeake Bay. *Fishery Bulletin* **84**, 871-877.

Smith, R.M., Walker T.I., y Hamlett, W.C. (2004). Microscopic organization of the oviducal gland of the holocephalan elephant fish, *Callorhynchus milli*. *Marine and Freshwater Research* **55**, 155-164.

Sorbera, L.A., y Callard, I.P. (1995). Myometrium of the spiny dogfish *Squalus acanthias*: Peptide and steroid regulation. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **269**: R389-R307.

Stanley, H.P. (1963) Urogenital morphology in the chimaeroid fish, *Hydrolagus collie* (Lay and Bennet). *Journal of Morphology* **112**, 99-127.

Stevens, B. (2002). Uterine and oviducal mechanisms for gestation in the common sawshark, *Pristiophorus cirratus*. Thesis of Bachelor of Science. 43pp. Department of Zoology. University of Melbourne, Australia.

Storrie, M.T. (2004). Microscopic Modifications of the Female Reproductive Tissues of *Mustelus antarticus*. Ph D Thesis, 153pp. (Deakin University).

Storrie, M.T., Walker, T.I., Laurenson, L.J., y Hamlett W.C. (2008). Microscopic organization of the sperm storage tubules in the oviducal gland of the female gummy shark (*Mustelus antarticus*), with observations on sperm distribution and storage. *Journal of Morphology* **269**, 1308-1324.

Storrie, M.T., Walker, T.I., Laurenson, L.J., y Hamlett, W.C. (2009). Gestational Morphogenesis of the Uterine Epithelium of the Gummy Shark (*Mustelus antarticus*). *Journal of Morphology*, **270**: 319-336.

Stribling, M.D., Hamlett, W.C. y Wourms, J.P. (1980). Developmental efficiency of oophagy, a method of viviparous embryonic nutrition displayed by the sand tiger shark (*Eugomphodus taurus*). *Proceedings North Carolina Academy of Sciences* **42**, 111 (Abstract).

Tabares, C.J., Tarazona, A.M., y Olivera Ángel, M. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista colombiana de ciencias pecuarias* **18**, 149-161.

Teshima, K. (1975). Studies on sharks-VIII. Placentation in *Mustelus griseus*. *Japanese Journal of Ichthyology* **22**, 7-12.

Treasure, J.W., y Holliday, F.G.T. (1981). Some aspects of the reproductive biology of perch, *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. *Journal Fish of Biology* **18**, 359-376.

Tota, B. (1999). Heart. En: *Sharks, Skates, and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes.* (Ed. Hamlett, W. C.) pp238-269 (The Johns Hopkins University Press).

Van der Molen, S., y Caille, G. (2001). Bahía Engaño: a north Patagonian nursery area for the smoothhound shark *Mustelus schmitti* (Carcharhiniformes: Triakidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **81**, 851-855.

Van der Molen, S., Caille, G., y González, R. (1998). By-catch of sharks in Patagonian coastal trawl fisheries. *Marine and Freshwater Research* **49**, 641-644.

Veríssimo, A., Grubbs, D., McDowell, J., Musick, J., y Portnoy, D. (2011). Frequency of Multiple Paternity in the Spiny Dogfish *Squalus acanthias* in the

Western North Atlantic. *Journal of Heredity* **102**, 88-93.

Vooren, C.M., Klippel, S., y Galina, A.B. (2005). Os elasmobrânquios das águas costeiras da Plataforma Sul. Capítulo 7. In: Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil. (Ed. Vooren Carolus and Klippel Sandro) pp114-120 (Instituto Igaré. Porto Alegre).

Wallace, R.A., y Selman, K. (1981). Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoology* **21**, 325-343

White, W.T., Platell, M.E., y Potter, I.C. (2001). Relationship between reproductive biology and age composition and growth in *Urolophus lobatus* (Batoidea: Urolophidae). *Marine Biology* **138**, 135-147.

Wourms, J.P., y Sheldon, H. (1976). Annual fish oogenesis. II. Formation of the secondary egg envelope. *Developmental Biology* **50**, 355–366.

Yano, K., Yabumoto, Y., Tanaka, S., Tsukada, O., y Furuta, M. (1999). Capture of a mature female megamouth shark, *Megachasma pelagios*, from Mie, Japan. Proceedings of the 5th. Indo-Pacific Fish Conference, Nouméa, 1997. Serét B. & J.-Y. Sire, eds. Paris: Soc. Fr. Ichtyol., 335-349.

Young, J.Z. (1995). Physiology and pharmacology of the oviducts of *Raja* and *Scyliorhinus*. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B* **350**, 143-151.