

Laboratorio de Histología Animal  
Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional del Sur

ESTUDIO CITOLÓGICO Y MICROANATÓMICO DE LA  
ESPERMATOGÉNESIS EN MACHOS DE *ZEARAJA CHILENSIS*  
(GUICHENOT, 1848) (CHONDRICHTHYES; RAJIDAE)



Alumna: Agustina Laura Lafuente  
Directora: Dra. María Constanza Díaz Andrade

Agosto 2021



Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional del Sur

**ESTUDIO CITOLÓGICO Y MICROANATÓMICO DE LA  
ESPERMATOGÉNESIS EN MACHOS DE *ZEARAJA CHILENSIS*  
(GUICHENOT, 1848) (CHONDRICHTHYES; RAJIDAE)**

Tesis de grado presentada como requisito para optar por el grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas.

Agosto 2021

Alumna  
Lafuente, Agustina Laura  
LU: 108218

.....

Directora  
Dra. María Constanza Díaz Andrade

## Agradecimientos

Esta tesis representa el cierre de una etapa de mi vida que me es imposible describir en pocas palabras. Pero lo que sí me resulta fácil hacer es agradecerles a las instituciones y a las personitas que permitieron que haya llegado hasta acá.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, por permitirme desarrollar toda mi carrera, la tesis de grado y por darme la oportunidad de ser ayudante alumna.

Al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN), por otorgarme la beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC-CIN).

A la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur por el PGI 24/B286, dirigido por la Dra. Elena J. Galíndez, que subvencionó los muestreos de esta tesis.

A la Planta Pesquera Río Salado (PPRS) en San Antonio Este, por facilitar los ejemplares para la obtención de muestras.

A Connie, por todos los años histológicos compartidos, tanto en CHEA como siendo mi profesora consejera y directora de tesis. Gracias por las charlas acompañadas de los infaltables mates! Por brindarme parte de tu tiempo cada vez que lo necesitaba.

A Elena, Caro y Anahí, por estar siempre dispuestas a ayudarme durante todo el tiempo que pasé en el Laboratorio de Histología Animal. En particular a Caro, por los recuerdos compartidos durante el viaje hacia mi primer Congreso. Gracias por invitarme a participar de tus muestreos!

A Gachu y Sil, por los lindos momentos compartidos en los laboratorios de CHEA.

A Anita, por todos los años de CHEA, y por las eternas horas de videollamada durante nuestro último año de cursada. Gracias por estar siempre para hacer catarsis!

A Nahue, por el reencuentro inesperado en la última materia de la carrera. Gracias por las charlas en la previa a la defensa de esta tesis!

A mis queridos Bichólogos (Jere, Ayli, Estefi, Anto, Mari N., Mari P., Pau V., Pau M., Jessi, Gabi, Ainho, Eve, Lu, Jona, Ger, Eze y Fran) por los momentos compartidos tanto dentro como fuera de la universidad. Por los mates, las risas, las salidas de campo, las juntadas. Gracias por haber sido mi desconexión de todas las preocupaciones que acompañan a la vida universitaria! Los quiero un montón!

A Dianita, alias "Cuca", por no dejar de hablarme desde que llegué a Bahía, allá por el 2011. Gracias por ser mi amiga desde entonces, compartiendo tanto buenos momentos como otros no tanto. Por los desayunos con polvorones en la rambla de Monte. Por disfrutar y saltar conmigo en cada recital de Ciro. Te quiero muchísimo!

A mis papás, Nancy y Ricardo, por el esfuerzo realizado para que pudiera estudiar la carrera que amo. Por estar siempre, ya sea celebrando o impulsándome a seguir cuando se ponía complicado. Por aguantar mi humor y locura cada vez que estaba por rendir un final. Por creer en mi mucho más de lo que yo lo hago. Sin duda, no hubiera llegado hasta acá sin ustedes. GRACIAS!!! LOS QUIERO INMENSAMENTE!

A Gonza, por ser el mejor hermano del mundo. Por llenar mi vida de música. GRACIAS por el aguante a lo largo de todos estos años! No habría sido lo mismo sin tu apoyo. TE QUIERO INFINITAMENTE!

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2. Materiales y métodos</b>	
2.1 Área de muestreo	7
2.2 Obtención del material y determinación macroscópica de la madurez	7
2.3 Procesamiento histológico del material	8
2.4 Observación microscópica, determinación de la madurez y registro de datos	9
<b>3. Resultados</b>	
3.1 Madurez de los ejemplares según criterio macroscópico	10
3.2 Descripción de la microanatomía testicular y de la espermatogénesis	10
3.3 Descripción de los conductos intratesticulares y eferentes	12
3.4 Madurez de los ejemplares según criterio microscópico	13
3.5 Validación de la determinación macroscópica de la madurez utilizando como herramienta la histología	13
<b>4. Discusión</b>	<b>14</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>22</b>
<b>Tabla y láminas</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>30</b>

## RESUMEN

Los peces cartilagosos son considerados los representantes más antiguos de los Gnatostomados. Dentro de este grupo se destacan mecanismos reproductivos sumamente variados y conservados. Asimismo, estos peces se caracterizan por presentar crecimiento lento, madurez tardía y baja fecundidad. En su conjunto, dichas características definen a los tiburones y rayas como peces particularmente vulnerables a la sobrepesca. Debido a esto, se han implementado distintos planes de manejo para su conservación. *Zearaja chilensis* es una raya ovípara de gran tamaño, considerada uno de los predadores superiores del Atlántico sudoccidental. En Argentina, su valor económico se destaca entre los batoideos. Los estudios reproductivos y poblacionales de esta especie sugieren que su vulnerabilidad a la sobrepesca sería mayor que la del resto de los elasmobranquios. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de *Z. chilensis*, a través del análisis de la microarquitectura testicular y de la espermatogénesis. Se analizaron 11 individuos, los cuales fueron clasificados en maduros e inmaduros a partir de la longitud y grado de calcificación de los *claspers*. En función de la observación microscópica, se estableció que el modelo estructural del testículo de *Z. chilensis* es de tipo compuesto. A su vez, se determinó que el testículo presenta una zonificación, de hasta 6 regiones, que coinciden con las fases de la espermatogénesis y se describió cada una de ellas. Por último, se comprobó que el grado de madurez de los ejemplares, determinado a partir de criterios macroscópicos coincide con el determinado a nivel microscópico en los testículos de *Z. chilensis*.

# 1. Introducción

El ambiente acuático es un sistema complejo donde interactúan parámetros físicos, químicos y biológicos, los cuales determinan una gran variedad de hábitats. Esta diversidad se ve reflejada en las adaptaciones morfológicas, comportamentales y fisiológicas de los animales que viven allí (Pough *et al.*, 2005; Tarifeño, 2005). En particular, los peces presentan un gran espectro de estrategias reproductivas, cuya variedad los distingue del resto de los vertebrados (Bone y Moore, 2008). A su vez, en el caso de los peces cartilagosos, los mecanismos reproductivos, sumamente conservados, han contribuido a la supervivencia del grupo desde hace aproximadamente 400 millones de años (Hamlett, 1999; Grogan *et al.*, 2012).

Los peces cartilagosos constituyen la **Clase Chondrichthyes** y son considerados los representantes más antiguos de la **Superclase Gnathostomata** (Hamlett, 1999; Nelson *et al.*, 2016). Evolutivamente, una de las sinapomorfías que define a esta Clase como grupo monofilético es un rasgo reproductivo: la presencia de *claspers* o mixopterigios. Los mismos son órganos utilizados durante la cópula, que surgen a partir de modificaciones de las aletas pélvicas de los machos (Grogan *et al.*, 2012). Su principal ventaja radica en facilitar que la fertilización sea interna, evitando el gasto inútil de espermatozoides (energéticamente costoso) y la depredación de los ovocitos sin fecundar (Carrier *et al.*, 2004).

La **Clase Chondrichthyes** está constituida por:

- **Subclase Holocephali**, cuyos únicos representantes actuales son las quimeras. Cuentan con un pseudo-opérculo carnoso y su cuerpo se encuentra desprovisto de escamas. Sumado a esto, los machos presentan un *tenaculum* frontal en la parte media de la cabeza, que ayuda a inmovilizar a la hembra durante la cópula (Kardong, 1999; Pough *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2016).
- **Subclase Euselachii**, que incluye a los tiburones (**División Selachii**) y a las rayas (**División Batomorphi**), ambos reunidos en la **Infraclase Elasmobranchii**. A diferencia de los holocéfalos, los elasmobranquios presentan el cuerpo cubierto por escamas placoides y carecen de pseudo-opérculo carnoso. En líneas generales, los tiburones se caracterizan por la forma fusiforme de su cuerpo. A sus laterales se extienden aletas pectorales y en su extremo caudal presentan una aleta heterocerca. Las hendiduras branquiales son laterales. Por el contrario, las rayas se caracterizan por tener un cuerpo comprimido dorsoventralmente. Las aletas pectorales presentan un gran desarrollo y se encuentran fusionadas, formando una estructura a modo de disco. Presentan una cola reducida y las hendiduras branquiales tienen disposición ventral (Kardong, 1999; Pough *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2016).

Dentro de los condrictios es posible identificar numerosos modelos reproductivos. En lo que respecta al desarrollo embrionario, se pueden mencionar dos estrategias. Por un lado la **oviparidad**, en la cual los huevos quedan encerrados dentro de cápsulas resistentes que son liberadas al medio. Dentro de estas estructuras, los embriones completan su desarrollo. Posteriormente, de cada cápsula emerge un individuo de apariencia similar a un adulto. En contraposición, la estrategia conocida como **viviparidad** se caracteriza por la retención de los embriones dentro del útero. Finalmente, al momento del nacimiento, el aspecto de los individuos es similar al de un adulto de tamaño reducido (Carrier *et al.*, 2004; Conrath, 2005; Awruch, 2015).

Por otra parte, la nutrición de los embriones durante su desarrollo, puede provenir de dos fuentes distintas (Carrier *et al.*, 2004; Conrath, 2005; Awruch, 2015). En el caso de la nutrición **lecitotrófica** los embriones obtienen los nutrientes necesarios, ya sea para todo su desarrollo o solo una parte de él, de las reservas de vitelo del huevo. Por otra parte, en la nutrición **matrotrofica** el embrión depende en principio de las reservas vitelinas, pero al avanzar el desarrollo la nutrición es complementada con otras fuentes de nutrientes, aportadas por la madre. Estas fuentes pueden ser de distintos tipos, dependiendo de la especie: secreciones del epitelio uterino, ingestión de óvulos no fertilizados u otros embriones y a partir del desarrollo de una estructura “placentaria” (Galíndez, 2016).

Otro aspecto importante de la biología reproductiva de los condrictios es la anatomía del sistema reproductor de ambos sexos. En las hembras se identifican uno o dos ovarios, que pueden ser simétricos o no. Los folículos maduros son liberados a la cavidad abdominal, donde son recogidos por los oviductos, que son pares. Estas estructuras inician en la zona proximal a los ovarios, como una especie de embudo, denominado *ostium*, que puede ser simple o par. A los oviductos continúan las glándulas oviductales, que secretan las envolturas de los huevos y que se continúan por su extremo distal con los úteros, también pares (Díaz Andrade, 2010; Klimley, 2013).

Por otro lado, el sistema reproductor masculino está formado por dos testículos. Cada uno se encuentra asociado a un sistema de conductos genitales (conductos intratesticulares, conductos eferentes, epidídimos y conductos deferentes), que cumplen la función de conducir el esperma hacia los *claspers*. Sumado a las estructuras anteriores existen dos glándulas anexas: las vesículas seminales y las glándulas de Leydig (Díaz Andrade, 2010; Klimley, 2013; Moya, 2017).

Más allá de contar con una amplia diversidad de estrategias reproductivas, los condrictios se caracterizan por un crecimiento lento, madurez tardía y baja fecundidad (Bone y Moore, 2008; Klimley, 2013). Estas características de su historia de vida diferencian a los peces cartilaginosos de los óseos y, a su vez, permiten comprender la gran susceptibilidad de los condrictios a la sobrepesca (Stevens *et al.*, 2000). La captura de estos peces puede deberse a la pesca dirigida a especies consideradas *target* o, más frecuentemente, a capturas incidentales (*bycatch*) (Dulvy *et al.*, 2014). En

este último caso, los individuos capturados pueden ser retenidos, o descartados al mar muertos o heridos por el arte de pesca (Crowder y Murawski, 1998). Es prudente aclarar que el *bycatch* representa un grave problema en lo que refiere al manejo de recursos, ya que gran parte de lo descartado no es registrado. Por lo tanto, la desaparición de las especies capturadas incidentalmente ocurre sin ser percibida (Myers y Worm, 2005).

La presión pesquera que existe sobre los condriictios provoca tanto efectos directos, como indirectos. Dentro de los directos, se encuentran la disminución de la talla poblacional, la depreciación de la fecundidad, la reducción del tamaño de la población y la extinción. Por otra parte, uno de los efectos indirectos más importante, es la eliminación de especies que pueden actuar como depredadores, presas o competidores, alterando las relaciones tróficas (Stevens *et al.*, 2000; Myers y Worm, 2005).

Con el objetivo de implementar estrategias para garantizar una pesca sustentable de los peces cartilagosos, se han analizado parámetros para definir la vulnerabilidad de las distintas especies. Es así como se identificó el tamaño corporal como uno de los principales indicadores de riesgo, siendo las especies de mayor tamaño las más afectadas por la pesca (Stevens *et al.*, 2000; Dulvy y Reynolds, 2002). A su vez, se han determinado a nivel global áreas fuertemente amenazadas, cuya consideración dentro de un plan de manejo debe ser prioritaria. Algunos de estos “*hotspots*” involucran a las aguas del sudeste de Sudamérica (incluyendo la costa argentina), el este del Océano Atlántico y el sudeste de Australia. Allí operan pesquerías que capturan a condriictios que habitan a grandes profundidades (Dulvy *et al.*, 2014).

En lo que se refiere a la actividad pesquera argentina, se destaca el efecto de la pesca de arrastre, cuya baja selectividad provoca la captura de fauna acompañante (Pettovello, 2016). Esto último, se evidenció al estudiar los desembarcos de flotas que operan en el Puerto Quequén, el Golfo San Matías y el Golfo San Jorge, durante el período 1998-2012. En los mismos, a pesar de existir una especie *target*, como por ejemplo merluza común o gatuzo, se registró la captura de numerosos batoideos, entre los cuales se encontraba muy frecuentemente *Zearaja chilensis* (Tamini *et al.*, 2006; Estalles *et al.*, 2011; Bovcon *et al.*, 2013). Dicha especie presenta un valor comercial mayor en comparación con el resto de los batoideos, debido a la existencia de un mercado asiático que la importa como “raya roja” (Massa *et al.*, 2004). En el año 2020 se registró un desembarco total de *Z. chilensis* de unas 551 toneladas, superando considerablemente las cifras de otros batoideos identificados (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Argentina) [MAGyP], s.f.).

*Zearaja chilensis* (syn. *Dipturus chilensis*) (Guichenot, 1848) es una especie ovípara perteneciente al orden Rajiformes, familia Rajidae, conocida comúnmente como “raya hocicuda” (Massa *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2016). Su distribución geográfica abarca desde Río Grande del Sur (Brasil) hasta

los 35° S en aguas del Pacífico sudoriental (Chile). En el Atlántico se la ha encontrado en un rango de 25 a 350 metros de profundidad, mientras que en el Pacífico se registraron ejemplares desde los 40 hasta los 300 metros de profundidad (Cousseau *et al.*, 2007). Actualmente, la amplia distribución geográfica de *Z. chilensis* se ha puesto en duda. Esto último surge como consecuencia del constante debate que existe sobre el estatus taxonómico de esta especie (Vargas-Caro *et al.*, 2015). En particular, en los últimos años, se ha sumado evidencia genética a la información morfológica ya disponible sobre esta cuestionada especie. A partir de estos nuevos conocimientos, se ha planteado que las dos poblaciones consideradas como *Z. chilensis* (la que habita en las aguas del Atlántico y la del Pacífico) serían, en realidad, dos especies distintas: *Z. brevicaudata* y *Dipturus chilensis*, respectivamente (Naylor *et al.*, 2012; Izzo *et al.*, 2017; Gabbanelli *et al.*, 2018; Concha *et al.*, 2019; Dulvy *et al.*, 2020). Sin embargo, el corriente año, la especie propuesta como *Z. brevicaudata* pasó a denominarse *D. brevicaudatus*, debido al cambio del género *Zearaja* por *Dipturus* (Concha *et al.*, 2019; Pollom *et al.*, 2021). Esta información reciente, pone de manifiesto que el debate taxonómico sobre las rayas hocicudas sigue vigente.

Externamente, *Z. chilensis* se caracteriza por un hocico pronunciado, el cual define al nombre común por el cual se la conoce. Presenta aletas pélvicas pares bilobuladas, aletas dorsales pares, separadas por espinas y una aleta caudal unida por un pliegue a la segunda aleta dorsal. En cuanto a la coloración, se caracteriza por un tono marrón claro en el dorso, destacándose en la base de las aletas pectorales dos manchas ovales. Ventralmente, presenta un color blanco grisáceo (Cousseau *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la alimentación, se ha establecido que *Z. chilensis* experimenta cambios de dieta a lo largo de su desarrollo. Es así como individuos pequeños se alimentan de crustáceos, mientras que al aumentar de tamaño sus principales presas son los peces. Dentro de estos últimos, se destacan la nototenia *Patagonotothen ramsayi* y la merluza común *Merluccius hubbsi*. A pesar de estos cambios de dieta, todos los estadios de vida presentan un elevado nivel trófico, lo que define a *Z. chilensis* como un depredador superior del Atlántico sudoccidental (Lucifora *et al.*, 2000; Koen Alonso *et al.*, 2001; Bellegia *et al.*, 2016).

En lo que refiere a la biología reproductiva, el ciclo de *Z. chilensis* se caracterizaría por carecer de picos de actividad reproductiva. Los individuos presentan una talla de primera madurez (LT<sub>50</sub>) de 780 mm de largo total para los machos y de 908 mm para las hembras (Colonello y Cortés, 2014). Asimismo, los machos alcanzarían la madurez a los 14,7 años y las hembras a los 17,8 años. Por otra parte, se han observado machos y hembras con edades máximas de 21 y 25 años, respectivamente (Zavatteri, 2010). En su conjunto, estas características de la historia de vida de *Z. chilensis* permiten inferir que la especie presenta una extensa etapa juvenil que impide su rápida reproducción. Sumado a esto, la fecundidad potencial máxima y el número de temporadas reproductivas estimadas para las

hembras, revelaron que la especie presenta un bajo potencial reproductivo. Como consecuencia, *Z. chilensis* sería un especie altamente vulnerable a la sobrepesca (Zavatteri, 2010; Colonello y Cortés, 2014).

A pesar de la importancia económica de *Z. chilensis*, sólo existe un estudio histológico en la literatura, sobre las gónadas, en las hembras de esta especie (Wehitt *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no se ha realizado un estudio de la misma índole en machos de *Z. chilensis*, que permita describir la espermatógenesis y validar los criterios macroscópicos de madurez sexual, los cuales son ampliamente utilizados en estudios reproductivos y poblacionales.

### **Objetivos**

En este contexto, dado el valor biológico y económico que presenta *Z. chilensis*, se plantearon los siguientes objetivos:

- Realizar el estudio morfológico y citológico de los testículos de *Z. chilensis* en distintas etapas de la madurez sexual, a partir de ejemplares obtenidos en el área del golfo San Matías (Río Negro).
- Verificar la escala macroscópica de madurez sexual mediante el análisis de la concordancia entre el aspecto macroscópico de los *claspers* y las características microscópicas testiculares.
- Analizar la microarquitectura testicular de *Z. chilensis* y determinar su modelo estructural.
- Comparar los resultados obtenidos con lo observado en otras especies de condriictios.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Área de muestreo**

La región de los golfos Norpatagónicos está constituida por los golfos San Matías, Nuevo y San José. Los mismos dan reparo de las corrientes y del oleaje del mar abierto, originando sitios protegidos a lo largo de sus costas (Irigoyen *et al.*, 2018).

El golfo San Matías es una cuenca semicerrada que se extiende desde “Punta Bermeja” (Río Negro), hasta “Punta Norte” (Península Valdés, Chubut) (**Figura 1**). Su topografía submarina permite identificar distintas áreas con características propias (Mouzo y Paterlini, 2017). Es así como, a pesar de que la mayor parte del golfo presenta grandes profundidades, se distingue una porción central de 200 m de profundidad (Piola y Scasso, 1988).

Al igual que el resto de la Plataforma Continental Argentina, el golfo San Matías recibe aguas de origen subantártico. Sin embargo, debido a la geometría de la boca de este golfo, el intercambio con el mar abierto se ve restringido (Piola y Rivas, 1997). Esto provoca que el agua de esta cuenca semicerrada presente características localmente modificadas; entre ellas, se destaca una elevada salinidad en la zona norte del golfo, en comparación con la porción sur (Piola y Scasso, 1988; Guerrero y Piola, 1997; Coller *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2005).

En verano, el golfo San Matías se caracteriza por una temperatura media del agua superficial de 18°C y vientos predominando del noreste. Por otro lado, en invierno el agua superficial alcanza una temperatura media de 11°C, con vientos incidiendo desde el noroeste (Piola y Scasso, 1988; Lucas *et al.*, 2005).

La biodiversidad del golfo San Matías incluye más de 150 especies de moluscos, crustáceos y peces (Coller *et al.*, 2004). En particular, dentro de estos últimos, se incluyen 13 especies de tiburones, 19 especies de rayas y una especie de holocéfalo (Perier *et al.*, 2011). Esta gran diversidad biológica permite que, en prácticamente toda la extensión del golfo, se desarrolle la actividad pesquera (Coller *et al.*, 2004), destacándose las pesquerías de arrastre, con la merluza común *Merluccius hubbsi* como especie objetivo (Romero *et al.*, 2008).

### **2.2 Obtención del material y determinación macroscópica de la madurez**

El material utilizado para desarrollar la siguiente tesis provino de capturas de red arrastre, realizadas por la flota pesquera que opera en el golfo San Matías, durante los meses de marzo de 2011 y abril, junio, agosto, octubre y diciembre de 2012.

Cabe aclarar que, a pesar del debate taxonómico mencionado anteriormente, en esta tesis se optó por continuar denominando a la especie del Atlántico sudoccidental como *Z. chilensis*, con el fin de facilitar la comparación con la bibliografía disponible hasta el momento.

Los animales utilizados en este estudio fueron obtenidos y manejados de acuerdo a los Protocolos de Bioética aprobados oportunamente por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, DBByF – UNS).

El material se obtuvo en la Planta Pesquera Río Salado (PPRS), en San Antonio Este. Se registraron el largo total (LT) y ancho del disco (AD), al milímetro inferior (**Figura 2**). A su vez, se determinó el estadio de madurez sexual de los ejemplares siguiendo los criterios planteados por Stehmann (2002), que considera el largo y consistencia de los *claspers*. Se clasificó a los machos como:

- *Inmaduros o juveniles (estadio I)*. Presentan *claspers* poco desarrollados y flexibles. Su extensión es menor que las aletas pélvicas.
- *En maduración, adolescente o subadulto (estadio II)*. La longitud de los *claspers* se asemeja al de las aletas pélvicas. Su región terminal presenta un mayor desarrollo. Sin embargo, su estructura sigue siendo flexible.
- *Maduro o adulto (estadio III)*. Presentan *claspers* rígidos, que alcanzan el extremo terminal de las aletas pélvicas, e incluso, pueden sobrepasarlo. Su región terminal se encuentra completamente formada.

Los testículos fueron extraídos y fraccionados en pequeñas porciones y se fijaron en una mezcla de Bouin en agua de mar, con el fin de mantener la osmolaridad tisular.

### **2.3 Procesamiento histológico del material**

El material fijado fue deshidratado en una serie de alcoholes de concentración creciente, infiltrado en Paraplast® e incluido en anillos plásticos. Los tacos obtenidos de testículo de *Z. chilensis* se cortaron con un micrótopo rotatorio Leica RM 2145, en láminas de 5 µm de espesor. Las mismas fueron colocadas en portaobjetos con albúmina y se los dejó secar en posición vertical, a temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. Una vez secos, los cortes fueron desparafinados en Pathoclear®, dentro de una estufa a 60 °C durante 25 a 30 minutos. Luego, se rehidrataron en una

serie de alcoholes de concentración decreciente. Finalmente, se procedió a su coloración con Tricrómico de Masson, y montaje en medio sintético.

#### **2.4 Observación microscópica, determinación de la madurez y registro de datos**

Se realizaron observaciones sobre la microarquitectura del testículo y la espermatogénesis, utilizando un microscopio óptico Nikon AFM. Para determinar microscópicamente el estadio de madurez sexual de los ejemplares, se utilizó como referencia la escala planteada por Serra-Pereira *et al.* (2011), ya que la misma fue elaborada para la especie *Raja clavata*, perteneciente a la familia Rajidae.

Dicha escala microscópica define el grado de madurez de los individuos de acuerdo a los siguientes criterios:

- *Inmaduros*: en los testículos se identifica una zona germinal y cistos con espermatogonias y espermátocitos I.
- *Maduros*: se observan cistos en distinto grado de maduración, predominando los que presentan espermátides y espermatozoides.

El registro de los datos se realizó mediante la toma de fotografías, utilizando una cámara digital Olympus Camedia Mod. C-7070, Wide Zoom, adosada a un microscopio óptico Olympus BX51.

### 3. Resultados

#### 3.1 Madurez de los ejemplares según criterio macroscópico

De los 11 ejemplares analizados de *Z. chilensis*, el grado de madurez pudo ser determinado macroscópicamente en siete individuos, perteneciendo al grupo de maduros (estadio III) e inmaduros (estadio I). En el caso de los cuatro individuos restantes, no se contaba con ese dato o el resultado obtenido había sido dudoso (**Tabla 1**).

#### 3.2 Descripción de la microanatomía testicular y de la espermatogénesis

El testículo de *Z. chilensis* presenta una organización lobular y está asociado al órgano epigonal. El grado de desarrollo de este último, varía dependiendo el estadio de madurez del individuo (**Figura 3**). Cada uno de los lóbulos testiculares está constituido por una zona germinal y espermatocistos (cistos) de diferentes tamaños (**Figura 4**). A su vez, cada cisto es delimitado por una membrana basal acelular, y está integrado por clones de células germinales, asociadas a células de Sertoli (**Figura 5**). Por otro lado, el espacio intersticial entre los cistos está ocupado por tejido conectivo escaso, vasos sanguíneos y un reducido número de células con características similares a las células de Leydig. Las mismas presentan un núcleo redondeado, eucromático, con parches de heterocromatina y escaso citoplasma (**Figuras 5 y 6**).

El epitelio de revestimiento del órgano es simple y sus células pueden ser tanto escamosas, como cuboidales. Por debajo del epitelio se localiza una capa de tejido conectivo denso, denominada túnica albugínea (**Figura 7**).

A lo largo de la espermatogénesis, se observan cambios morfológicos y citológicos en las células germinales y de Sertoli, que se reflejan también en la estructura de los cistos. Debido a estas variaciones y, teniendo en cuenta que la espermatogénesis es un proceso continuo, se puede apreciar una zonación en los lóbulos testiculares. La misma refleja una onda madurativa, que progresa desde la zona germinal del lóbulo, hacia la periferia del mismo (**Figura 4**). En el caso de *Z. chilensis*, los lóbulos testiculares presentan seis zonas diferentes, las cuales se detallan a continuación.

**Zona germinal o primaria:** integrada por células germinales, denominadas espermatogonias primarias (**Figuras 4 y 8**). Estas células se caracterizan por tener un núcleo esférico y una alta relación núcleo-citoplasma (**Figura 9**). Las espermatogonias primarias se encuentran acompañadas por las células de Sertoli, que se reconocen por su núcleo ovalado, heterocromático y más pequeño que el de las células germinales. (**Figura 9**).

**Zona de cistos con espermatogonias:** se identifica la presencia de cistos ya formados, conteniendo espermatogonias primarias y células de Sertoli. Ambas poblaciones celulares se disponen en un único estrato (cisto unilaminar) (**Figura 10**). A medida que progresa la espermatogénesis, tanto las células germinales como las somáticas se dividen mitóticamente. Debido a esto, los cistos se transforman en multilaminares y aumentan progresivamente de tamaño. No obstante, el lumen de los cistos se visualiza con facilidad (**Figura 11**). Como consecuencia de la mitosis, las espermatogonias primarias se transforman en secundarias y se ubican hacia la membrana basal del cisto. A su vez, los núcleos de las células de Sertoli se orientan hacia el lumen y adoptan un aspecto más alargado y eucromático (**Figura 12**).

Al avanzar la espermatogénesis, los núcleos de las células de Sertoli comienzan a migrar hacia la región basal del cisto, mientras que las células germinales son desplazadas progresivamente hacia el lumen (**Figura 13**).

A partir de esta zona, en el espacio intersticial entre los cistos, se observa un número reducido de células similares a las de Leydig, ya descritas. (**Figura 6**). Estas células están presentes tanto en el testículo de individuos inmaduros, como maduros.

**Zona de cistos con espermatocitos:** conforme progresa la espermatogénesis, las espermatogonias secundarias dan lugar a numerosos espermatocitos I. Ésto conlleva un aumento en el tamaño del cisto, el cual pasa a estar completamente ocupado por células, sin un lumen visible. En esta instancia, todos los núcleos de las células de Sertoli se encuentran en posición basal. Los núcleos de los espermatocitos, por su parte, son esféricos, de mayor tamaño que los de las espermatogonias secundarias y se observan “en fase” (**Figura 14**).

Asimismo, en esta zona se visualiza una cantidad reducida de cistos, cuya única diferencia con los anteriores es la presencia de espermatocitos II. Estos surgen como resultado de la meiosis I que experimentan los espermatocitos I, diferenciándose de los mismos por la presencia de un núcleo de menor tamaño y el mayor grado de condensación de la cromatina (**Figura 14**).

**Zona de cistos con espermátides:** al completarse la división meiótica de los espermatocitos II, surgen las espermátides, que integran junto con las células de Sertoli, los cistos de esta zona. A partir de las diferentes transformaciones que sufren las espermátides (espermiogénesis), se definieron cuatro fases:

1. *Espermátides I:* presentan un núcleo redondeado, fuertemente heterocromático. Los cistos en los que estas células están presentes, contienen abundantes restos citoplasmáticos (**Figuras 15 y 16**).
2. *Espermátides II:* en estas células, el núcleo se observa más ovalado y excéntrico (**Figura 16**).

3. *Espermátides III*: los núcleos de estas células adoptan una forma más elongada, y la cromatina se condensa progresivamente (**Figura 17**). A su vez, se evidencia un esbozo de flagelo orientado hacia el lumen del cisto.

4. *Espermátides IV*: si bien no se observan muchos cambios respecto a la forma de las células, las mismas se disponen en manojos y orientados paralelamente (**Figura 18**).

**Zona de cistos con espermatozoides**: la misma está integrada por cistos en los que se pueden identificar:

1. *Espermatozoides inmaduros* organizados en paquetes no muy compactos. Su núcleo se visualiza condensado y se comienzan a diferenciar tres regiones:

- una cabeza, embebida en el citoplasma de las células de Sertoli;
- una porción media o cuello;
- un flagelo extenso y ondulado, orientado hacia el lumen (**Figura 19**).

2. *Espermatozoides maduros* con el núcleo muy condensado, constituyendo paquetes definidos de células yuxtapuestas. Las tres regiones anteriormente descritas se diferencian fácilmente (**Figura 20**).

**Zona de cistos en degeneración**: esta región se localiza cerca de los cistos con espermatozoides (**Figura 21**). Los cistos en degeneración se observan desorganizados y con restos celulares. Se destacan las células de Sertoli, con la cromatina fragmentada, característico de células apoptóticas. También se pueden ver algunos espermatozoides aislados (**Figura 22**).

### **3.3 Descripción de los conductos intratesticulares y eferentes**

En la zona germinal se pudieron identificar conductos intratesticulares en el espacio intersticial, entre las células germinales y somáticas (**Figura 23**), tanto en ejemplares maduros como inmaduros. Estas estructuras están tapizadas por un epitelio simple cúbico, con tejido conectivo subyacente (**Figura 24**). Sin embargo, conforme se avanza en sentido de la onda madurativa, los conductos intratesticulares son más difíciles de visualizar y están presionados entre los cistos de mayor tamaño (**Figura 25**). Por otro lado, los conductos eferentes se ubican inmersos en el tejido linfomieloide del órgano epigonal (**Figura 26**). Estos conductos están revestidos por un epitelio simple cúbico con estereocilios y rodeados por una delgada capa de tejido conectivo denso y escasas fibras musculares lisas, de disposición circular (**Figura 27**).

### **3.4 Madurez de los ejemplares según criterio microscópico**

A partir de la observación microscópica de los 11 ejemplares de *Z. chilensis*, fue posible clasificar a los individuos dentro de dos grupos: inmaduros y maduros, que responden a las siguientes características:

- **Inmaduros:** se observa una alta relación entre el órgano epigonal y el testículo, reflejada en el escaso desarrollo de los lóbulos testiculares. Hacia la periferia de los mismos se visualiza una zona de cistos con espermatogonias con un grado de desarrollo avanzado.
- **Maduros:** se evidencia una marcada reducción del órgano epigonal y un gran desarrollo de los lóbulos testiculares, en los que se observan las 6 zonas descriptas previamente (ver sección 3.2).

### **3.5 Validación de la determinación macroscópica de la madurez utilizando como herramienta la histología**

Al comparar la información referida al estadio de madurez de los ejemplares utilizando los criterios macroscópicos y microscópicos, se observó que ambos datos coincidían. Por otra parte, en el caso de los individuos en los que no se contaba con la determinación macroscópica, la información histológica permitió determinar su grado de madurez. Por último, en el caso de los animales en donde la clasificación basada en criterios macroscópicos resultó dudosa, las herramientas microscópicas permitieron confirmar el estadio de madurez (**Tabla 1**).

#### 4. Discusión

Las gónadas de los cordados cumplen funciones tanto reproductivas, como endocrinas (Blüm, 1986; Loir *et al.*, 1995; Engel y Callard, 2005). Asimismo, presentan una organización variable entre los vertebrados. En particular, el testículo en los machos de amniotas (reptiles, aves y mamíferos) presenta como unidad morfofuncional los túbulos seminíferos, mientras que las gónadas masculinas de los anamniotas (peces y anfibios) presentan una estructura cística (Blüm 1986; Kardong, 1999). Sin embargo, pese a esta diversidad estructural, el testículo es el sitio en el cual se produce la espermatogénesis. Es así como en base a este proceso, células germinales diploides dan lugar a espermatozoides maduros haploides (Hess y de Franca, 2008).

En los elasmobranquios, la mayoría de los estudios morfológicos sobre reproducción están centrados en la gónada femenina (Díaz Andrade, 2010; Moya, 2017; Wehitt, 2019). Sin embargo, el conocimiento sobre la dinámica y morfología testicular también es valioso y sumamente importante para la conservación de estas especies (Moya *et al.*, 2015).

Al igual que en otros rájidos, el testículo de *Zearaja chilensis* está revestido por un epitelio simple. Sin embargo, dentro del grupo, e incluso en un mismo individuo, las células epiteliales pueden ser planas, cúbicas o cilíndricas (Moya, 2017; Wehitt, 2019). De todas maneras, no se encontró relación entre las características del epitelio testicular y el estadio madurativo de los individuos, que permita explicar estas variaciones. Más allá del tipo del epitelio que reviste a la gónada, el mismo apoya siempre sobre una túnica albugínea de tejido conectivo (Moya, 2017; Wehitt, 2019).

La íntima asociación observada entre el órgano epigonal y el testículo de *Z. chilensis* ha sido registrada en la mayoría de los elasmobranquios (Maruska *et al.*, 1996; Poulakis y Grier, 2014; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Moya, 2017; Wehitt, 2019). Este órgano linfomieloide es exclusivo del grupo y se encuentra asociado a las gónadas de ambos sexos, e incluso, puede estar rodeando órganos del sistema digestivo (Honma *et al.*, 1984). Su función es similar a la de la médula ósea de mamíferos, permitiendo la proliferación de células sanguíneas (hemopoyesis), que son liberadas a la circulación general (Galíndez y Aggio, 2002; Bircan-Yildirim *et al.*, 2011).

Algunos autores sugieren que el vínculo existente entre el órgano epigonal y las gónadas no sería sólo anatómico, sino que probablemente incluye una relación funcional. Por ejemplo, Piferrer y Callard (1995) describieron la presencia de una sustancia producida en el órgano epigonal que inhibía la mitosis en la región inmadura del testículo de *Squalus acanthias*. Por otro lado, Lutton y Callard (2008) sugieren que la presencia de esteroides ováricos durante el período reproductivo de *Leucoraja erinacea*, regularía la renovación de las células epigonales. Estas observaciones, plantean una interesante línea de trabajo poco explorada hasta la fecha.

Al igual que otros batoideos, el órgano epigonal de *Z. chilensis* experimenta una disminución en su abundancia relativa al avanzar la madurez testicular (Maruska *et al.*, 1996; Poulakis y Grier, 2014; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Moya, 2017; Basallo *et al.*, 2018). Esta variación también se observó en hembras de *Z. chilensis*, en las que el órgano epigonal se retrae hacia una zona caudal al avanzar la maduración ovárica (Wehitt *et al.*, 2015).

El testículo de *Z. chilensis* está formado por lóbulos, lo que concuerda con las observaciones realizadas en otras especies de batoideos (Maruska *et al.*, 1996; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Moya, 2017; Wehitt, 2019). Dichos lóbulos están integrados por cistos, que contienen a las células de Sertoli (somáticas) y a las células germinales en un mismo grado de desarrollo (Loir *et al.*, 1995; Kardong, 1999). Algunos autores sostienen que la maduración coordinada se produce como consecuencia de una citocinesis incompleta, que provoca que las células se mantengan conectadas por puentes citoplasmáticos (Billard, 1984; Hamlett, 1999; Almeida *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no pudo ser corroborado en este trabajo, debido a las limitaciones del poder de resolución de la microscopía óptica.

Como consecuencia del arreglo cístico, es posible observar una “onda madurativa” en el testículo de *Z. chilensis*, en la cual los cistos ocupan una región distintiva del lóbulo testicular, dependiendo su grado de desarrollo. El mismo evento ha sido registrado en otras especies de condrictios (Callard *et al.*, 1989; Bouma y Cloud, 2005). Este ordenamiento espacial pone de manifiesto que, al igual que en el resto de los vertebrados, la espermatogénesis sigue un orden temporal (Engel y Callard, 2005). La extensión de la “onda madurativa” junto con las dimensiones de los lóbulos, aumentan al progresar la espermatogénesis conjuntamente con la madurez del individuo. Dicho ordenamiento espacio-temporal se debe a la continua formación de nuevos cistos durante el proceso, lo que provoca el desplazamiento de los más maduros a través del diámetro del lóbulo (Pudney, 1995; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Engel y Callard, 2005; Poulakis y Grier, 2014; Moya *et al.*, 2015).

Pratt (1988) postuló que la localización de la zona germinal y la observación de la “onda madurativa” son fundamentales para determinar el modelo estructural del testículo de los elasmobranquios. En función de estas características, estableció distintos modelos, a los que definió como radial, diamétrico o compuesto. En el modelo radial, la zona germinal se localiza en las cercanías del centro de cada lóbulo testicular. A partir de esta zona, la maduración de los cistos continúa hacia la periferia del lóbulo. Por otro lado, en el modelo diamétrico la zona germinal es única y, a su vez, el desarrollo de los cistos se produce atravesando el diámetro del testículo. La combinación de ambos patrones estructurales (radial y diamétrico), da como resultado el modelo testicular compuesto, donde cada lóbulo presenta una zona germinal, de posición dorsal. Este último modelo es el que se observa en *Z. chilensis*, al igual que en otras especies de batoideos (Kume *et al.*, 2009; Serra-Pereira *et al.*, 2011; Settembrino, 2013; Henderson *et al.*, 2014; Moya, 2017; Wehitt,

2019). Cabe aclarar, que el escaso desarrollo testicular en los individuos inmaduros de *Z. chilensis* fue lo que facilitó la tarea de distinguir los límites entre los lóbulos y sus respectivas zonas germinales. Sin embargo, el progreso de la espermatogénesis a lo largo del diámetro del testículo se visualiza con mayor claridad en los individuos maduros, ya que todas las fases espermatogénicas están presentes. De esta manera, se pone en evidencia que en los estudios sobre la microanatomía del testículo de elasmobranquios, lo ideal sería contar con material de individuos con distinto grado de madurez sexual.

Gracias a la particular zonación de los lóbulos testiculares, el estudio de la espermatogénesis puede realizarse con facilidad (McClusky, 2012). Históricamente, los trabajos sobre la estructura testicular en elasmobranquios definen distintos estadios de la espermatogénesis. Sin embargo, lo que luego se desarrolla, es la organización de las células germinales dentro del cisto, el grado de diferenciación de las mismas y su relación con las células de Sertoli. Sumado a esto, esta división en estadios muchas veces sólo tiene un fin organizativo y depende en gran parte del criterio del investigador. Como consecuencia, se produce una discordancia entre distintos autores sobre cuáles cistos deben ser considerados dentro de un mismo estadio, de forma tal que se han descrito entre 7 y 18 estadios diferentes (Hamlett, 1999). Es así como, por ejemplo, Barone *et al.* (2007), Serra-Pereira *et al.* (2011) y Park *et al.* (2013) plantean que los cistos con espermatoцитos I definen al Estadio III, mientras que la presencia de espermatoцитos II determinan al Estadio IV. En contraposición, Maruska *et al.* (1996) y Burgos-Vázquez *et al.* (2019), establecen que tanto los cistos con espermatoцитos I como II forman parte del Estadio III. A pesar de estas diferencias de criterio, es importante destacar que el proceso de transformación celular presenta características que son comunes para todos los elasmobranquios. Teniendo esto en cuenta, en este trabajo de tesis se decidió usar una nomenclatura diferente, basada en las características de los cistos y en la zonación que se produce en el testículo.

La espermatogénesis inicia en la zona germinal, localizada en la región dorsal del testículo de *Z. chilensis*. Allí, las prolongaciones citoplasmáticas de una única célula de Sertoli envuelven a una espermatogonia primaria (Billard, 1984; Bouma y Cloud, 2005). Posteriormente, varias de estas asociaciones, denominadas espermatoblastos, quedan rodeadas por una membrana basal. Es así como se forma la unidad estructural y funcional del testículo de los elasmobranquios: el espermatoцisto (Hamlett, 1999). En el caso de *Z. chilensis* estos cistos pudieron diferenciarse claramente en la transición entre la zona germinal y la zona de cistos con espermatogonias.

Numerosos autores mencionan la presencia de una proyección de la pared dorsal del testículo en distintas especies de batoideos, denominada papila germinal. En la misma se localizan células indiferenciadas, espermatogonias primarias y precursores de las células de Sertoli (Maruska *et al.*, 1996; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Zaiden *et al.*, 2010; Settembrino, 2013; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Wehitt, 2019). Sin embargo, en este trabajo no pudo diferenciarse dicha

estructura, lo que coincide con lo registrado en otras especies, tales como *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii* (Moya, 2017).

En la zona de cistos con espermatogonias, se observa un notable aumento en el tamaño de los cistos y en el número de células en su interior, lo que pone en evidencia las sucesivas divisiones mitóticas que experimentan, tanto las espermatogonias primarias como las células de Sertoli. Al mismo tiempo, las dos poblaciones celulares crecen y se diferencian (Wourms, 1977; Engel y Callard, 2005). En esta instancia, los espermatoblastos están constituidos por los clones de cada célula germinal, que inicialmente se había asociado a una célula de Sertoli (Hamlett, 1999). Las características de las células germinales y somáticas observadas en esta zona en *Z. chilensis* coinciden con lo descrito en otros batoideos (Maruska *et al.*, 1996; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015).

A pesar de que la espermatogénesis tiene como protagonistas a las células germinales, el estudio del comportamiento de las células de Sertoli a lo largo de este proceso es fundamental (McClusky, 2003). En este trabajo, se pudo observar claramente que los núcleos de estas células se tornan eucromáticos a partir de la zona de cistos con espermatogonias, lo que indicaría que la célula es metabólicamente activa (Ross y Pawlina, 2007). Esto coincide con estudios ultraestructurales de las células de Sertoli en otras especies de condriictos, en los que se identificó que, conforme avanza la espermatogénesis, se incrementa la cantidad de retículo endoplasmático liso asociado a inclusiones lipídicas, así como el número de mitocondrias con crestas tubulares. Dichas organelas son típicas de las células productoras de esteroides (Pudney y Callard, 1984a; Callard *et al.*, 1989; Prisco *et al.*, 2002).

Sumado a los cambios en el grado de condensación de la cromatina en las células de Sertoli, también se observaron diferencias en la posición de los núcleos dentro del cisto de *Z. chilensis*. Las mismas eran evidentes en la zona de cistos con espermatogonias, específicamente en los cistos multilaminares. Este fenómeno ha sido reportado en otras especies de elasmobranquios (Maruska *et al.*, 1996; Chatchavalvanich *et al.*, 2004) y podría llevar a pensar que las células de Sertoli migran dentro del cisto. Sin embargo, estudios a nivel ultraestructural en otras especies, revelaron que, en este punto, las células de Sertoli, al ser ramificadas, ocupan prácticamente todo el radio del cisto (Prisco *et al.*, 2002; McClusky, 2003), por lo que serían los núcleos de estas células los que experimentarían la migración observada a nivel óptico.

En el espacio intersticial de la zona de cistos con espermatogonias, se registró una escasa población de células, cuyas características nucleares eran similares a las células de Leydig descritas por Prisco *et al.* (2002) y Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla (2015). Estudios realizados en la raya *Torpedo marmorata* (Prisco *et al.*, 2002) y el tiburón *Squalus acanthias* (Pudney y Callard, 1984b),

plantean que estas células presentan organelas que les permitirían sintetizar esteroides, aunque el grado de diferenciación de las mismas puede variar según la especie o el grado de madurez del individuo. En función de esto, queda en claro la importancia de realizar estudios ultraestructurales en *Z. chilensis* para caracterizar más precisamente a estas células “del tipo Leydig”.

Tanto las células de Sertoli como las células de Leydig tienen la capacidad de sintetizar esteroides (Pudney y Callard, 1984a; Pudney y Callard, 1984b; Callard *et al.*, 1989; Prisco *et al.*, 2002). No obstante, algunos autores sostienen, a partir de la abundancia y los cambios estructurales que experimentan las células de Sertoli a lo largo de la espermatogénesis, que su producción hormonal sería cuantitativamente mayor. Debido a esto, esta población celular cumpliría un rol más importante en la regulación del desarrollo de las células germinales (Pudney y Callard, 1984a; Callard *et al.*, 1989; Loir *et al.*, 1995; Zaiden *et al.*, 2010). Esto último, pareciera ser así en un gran número de elasmobranchios, por lo que podría cumplirse también en el caso de *Z. chilensis*. Cabe aclarar que, si bien los estudios endocrinológicos resultan herramientas prometedoras para comprender de forma más integral la biología reproductiva de los condrictios, es un campo de estudio que aún presenta escaso desarrollo (Maruska y Gelsleichter, 2011; Awruch, 2015; Becerril-García *et al.*, 2020).

La zona del testículo con espermatoцитos está definida por la presencia de cistos conteniendo espermatoцитos I y II. En este trabajo, se observó que los cistos con espermatoцитos II eran menos abundantes que los que contenían espermatoцитos I. Esto indicaría que esa fase de la espermatogénesis sería más rápida, en comparación con el resto del proceso celular (Engel y Callard, 2005). Existen distintos posicionamientos en la bibliografía respecto a esta etapa de la espermatogénesis. Algunos autores consideran a los cistos con espermatoцитos I y II dentro de un mismo estadio y plantean que la única diferencia es el tamaño celular, siendo los espermatoцитos I mayores (Maruska *et al.*, 1996 y Burgos-Vázquez *et al.*, 2019). Otros autores, como Barone *et al.* (2007), Serra-Pereira *et al.* (2011) y Park *et al.* (2013) postulan que deben considerarse por separado, ya que pueden diferenciarse citológicamente. En esta tesis, se adoptó como criterio considerar a los cistos con ambos tipos celulares dentro de una misma zona. Esto se debe a que estos cistos representan un mismo proceso celular: la fase meiótica de la espermatogénesis. Por tanto, no tendría sentido biológico una subdivisión en zonas.

Al completarse la segunda división meiótica de las células germinales, surgen las espermátides (Schulz *et al.*, 2010). Esta transición hacia la formación de espermatozoides, establece el punto de inicio de la fase postmeiótica de la espermatogénesis. A lo largo de su desarrollo, los cistos se reestructuran mediante la subdivisión de los mismos en espermatoblastos (McClusky, 2003). Al mismo tiempo, las espermátides experimentan una serie de cambios morfológicos, que en su conjunto reciben el nombre de espermiogénesis (Hamlett, 1999). Tales transformaciones fueron observadas en *Z. chilensis*, pudiéndose describir cuatro fases fácilmente reconocibles. A pesar de esto último, se

consideraron dentro de una misma zona. La espermiogénesis es un proceso continuo y complejo, que puede presentar algunas variaciones dentro de los elasmobranquios (Moya *et al.*, 2015). Sin embargo, tienen ciertas características compartidas entre las distintas especies.

Los cambios morfológicos observados mediante microscopía óptica en las espermátides de *Z. chilensis*, reflejan las variaciones ultraestructurales que experimentan dichas células y que han sido documentadas por Stanley (1971) y Chatchavalvanich *et al.* (2005). De acuerdo con estos autores, las espermátides I, de núcleo redondeado, atraviesan modificaciones de la envoltura nuclear y un aumento de la condensación de la cromatina. Este proceso continuaría con el desarrollo de una vesícula acrosomal, que se une al sitio modificado de la membrana nuclear. Dicha estructura sufre un alargamiento anteroposterior, provocando que el perfil del núcleo de estas células sea redondeado, a oval. En el caso de *Z. chilensis*, este cambio fue identificado como la fase de espermátides II. Al mismo tiempo, a partir del centrosoma localizado en el citoplasma yuxtannuclear de las espermátides, se forma un cuerpo basal. Esta estructura migra hacia la periferia celular donde comenzará a formarse el corpúsculo basal. Desde allí, surgen los microtúbulos que formarán al axonema del flagelo, provocando que las espermátides adopten un aspecto sumamente elongado, que permite distinguir a la fase III de la espermiogénesis. Acompañando al proceso de elongación, las cabezas de las espermátides se comienzan a acomodar hacia las células de Sertoli, entrando en contacto con ellas. Asimismo, los microfilamentos de actina del citoesqueleto de las células somáticas se orientan en paralelo al eje longitudinal de las espermátides, permitiendo la agrupación de las últimas (Stanley y Lambert, 1985; Hamlett, 1999). Debido a esto, se observan manojos de espermátides, que caracterizan a la fase IV de la espermiogénesis de *Z. chilensis*.

El inicio de la formación de los espermatozoides como tales, marca el límite entre la zona de espermátides y la zona de espermatozoides. Durante la maduración de estas células, se van conformando las tres regiones características del espermatozoide (cabeza, cuello y flagelo) y se organizan en paquetes, reflejando aún más la subdivisión en espermatoblastos que habían experimentado los cistos con espermátides (McClusky, 2003). A medida que se produce la maduración de los espermatozoides, la compactación de los paquetes de células es cada vez mayor. Esto coincide tanto espacial como temporalmente con el desarrollo de una proyección en la región del acrosoma de los espermatozoides que está en contacto con una célula de Sertoli (Stanley y Lambert, 1985; Hamlett, 1999). Stanley y Lambert (1985) describen que “en la cresta de la proyección, la membrana de la célula de Sertoli presenta evidencia de endocitosis ya que, en su citoplasma, se observan numerosas vesículas membranosas proyectándose”. Como consecuencia de las modificaciones que experimenta la membrana de la célula somática, los espermatozoides se aproximan entre sí, incrementando la compactación de los paquetes que integran (Stanley y Lambert, 1985; Hamlett, 1999). El empaquetamiento de los espermatozoides se refleja a nivel óptico y pudo ser

registrado en el presente trabajo, así como en otras especies de condrictios (Maruska *et al.*, 1996; Serra-Pereira *et al.*, 2011; Moya, 2017; Wehitt, 2019).

La espermiación ocurre cuando los espermatozoides maduros son liberados desde los cistos, por ruptura, hacia el sistema de conductos (Pudney, 1995; Hamlett, 1999). Las células de Sertoli y remanentes de los espermatocistos, incluyendo aquellos espermatozoides que no fueron evacuados, permanecen dentro de estos cistos y atraviesan un proceso de apoptosis y reabsorción (Callard *et al.*, 1989; Prisco *et al.*, 2003; Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Poulakis y Grier, 2014). En *Z. chilensis* estos procesos pudieron observarse claramente en la zona de cistos en degeneración, lo cual coincide con lo registrado en otras especies de batoideos (Zaiden *et al.*, 2010; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Moya, 2017; Basallo *et al.*, 2018; Wehitt, 2019).

Los conductos intratesticulares, hacia donde es liberado el esperma maduro, son estructuras que se forman durante el desarrollo embrionario y se definen como una compleja red de conductos, íntimamente asociada a los cistos (Park *et al.*, 2013; Poulakis y Grier, 2014). En *Z. chilensis*, el epitelio que los reviste es similar al descrito en *Himantura signifer* (Chatchavalvanich *et al.*, 2004), *A. platana* y *S. bonapartii* (Moya, 2017). Sin embargo, la altura de las células epiteliales puede variar entre las distintas especies de condrictios, al igual que la presencia de especializaciones de su superficie apical (Zaiden *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2014; Wehitt, 2019).

La red de conductos intratesticulares se continúa en los conductos eferentes. Estos se observan inmersos en el tejido epigonal que bordea al testículo de *Z. chilensis*, al igual que se ha registrado en otros batoideos (Moya, 2017; Wehitt, 2019). Si bien el epitelio que lo reviste es similar al observado en *A. cyclophora* (Wehitt, 2019), pareciera que esta característica es variable entre los condrictios (Chatchavalvanich *et al.*, 2004; Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015; Moya, 2017). Sin embargo, existe una coincidencia en la presencia de tejido conectivo denso con células musculares lisas aisladas de disposición circular, por debajo del epitelio, al igual que se ha registrado en *Z. chilensis*.

A partir del conocimiento sobre la microanatomía testicular y la espermatogénesis, es posible determinar si un ejemplar es inmaduro o maduro. En las especies *Urotrygon venezuelae* (Acero *et al.*, 2008), *Potamotrygon magdaleane* (Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015), *A. platana* y *S. bonapartii* (Moya, 2017), los ejemplares inmaduros presentan abundante órgano epigonal y testículos poco desarrollados. Tal descripción coincide con lo observado en los ejemplares inmaduros de *Z. chilensis*. No obstante, a diferencia de los trabajos mencionados y del criterio planteado por Serra-Pereira *et al.* (2011), en los individuos inmaduros de *Z. chilensis* no se observaron cistos con espermatocitos I, sino una zona de cistos con espermatogonias de avanzado desarrollo. Este resultado se suma a otros ejemplos de elasmobranchios, en donde individuos inmaduros exhiben etapas muy tempranas de la espermatogénesis. Entre ellos se pueden mencionar las especies *Narcine bancroftii*,

*Rhinobatos percellens*, *Dasyatis guttata* (Acero *et al.*, 2008) y *Sympterygia acuta* (Basallo *et al.*, 2018), donde sólo se identifican cistos con espermatogonias. Por otra parte, en los testículos de los ejemplares maduros de *Z. chilensis*, los lóbulos presentaban seis zonas, así como una reducción de la relación entre el órgano epigonal y el testículo, lo que coincide con los registros en otros elasmobranquios (Serra-Pereira *et al.*, 2011; Poulakis y Grier, 2014; Rego *et al.*, 2014; Moya, 2017; Basallo *et al.*, 2018). Esto pone de manifiesto la continuidad de eventos que subyacen al proceso de maduración sexual en los vertebrados.

El conocimiento sobre la biología reproductiva de los elasmobranquios es fundamental para su conservación. En este contexto, un punto clave es la correcta determinación del estadio de madurez sexual de los ejemplares. La contrastación entre el grado de madurez determinado a partir de los criterios macroscópico y microscópico ha sido analizada en distintas especies de elasmobranquios. Tales estudios demostraron que en *Centrophorus squamosus* (Girard *et al.*, 2000), *P. magdalenae* (Pedreros-Sierra y Ramírez-Pinilla, 2015) y *Rhinoptera bonasus* (Poulakis y Grier, 2014), así como en algunos ejemplares de *Myliobatis goodei* (Settembrino, 2013) y *A. cyclophora* (Wehitt, 2019), la madurez testicular era alcanzada antes de que los *claspers* estuviesen completamente calcificados. A diferencia de los resultados anteriores, en la mayoría de los ejemplares analizados de *Z. chilensis*, al igual que en *S. bonapartii* (Moya *et al.*, 2015), la longitud y el grado de calcificación de los *claspers* refleja el grado de desarrollo testicular. Esto permite inferir que la maduración de ambas estructuras se produce de manera relativamente sincrónica. Por lo tanto, se podría sugerir que el criterio macroscópico sería adecuado para determinar el grado de madurez sexual de los machos de esta especie. Este resultado difiere del obtenido a partir del análisis histológico de los ovarios de *Z. chilensis*, donde se demostró que existen discordancias entre el grado de madurez sexual determinado a partir de herramientas macroscópicas y microscópicas (Wehitt *et al.*, 2015). No obstante, es importante destacar que las observaciones realizadas en esta tesis deben ser consideradas como preliminares, debido al bajo número de ejemplares analizados.

En los machos de las distintas especies de elasmobranquios, un apareamiento exitoso implica la presencia de *claspers* completamente desarrollados y funcionales, junto con la disponibilidad de espermatozoides maduros (Conrath, 2005). Esto pone de manifiesto que los criterios histológicos complementan los parámetros utilizados en los estudios poblacionales y, por lo tanto, deberían ser considerados de manera conjunta. En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo, no solo constituyen el primer registro sobre la espermatogénesis en esta especie de importancia económica, sino que también plantean algunas incógnitas que podrían servir de sustrato para nuevas líneas de trabajo.

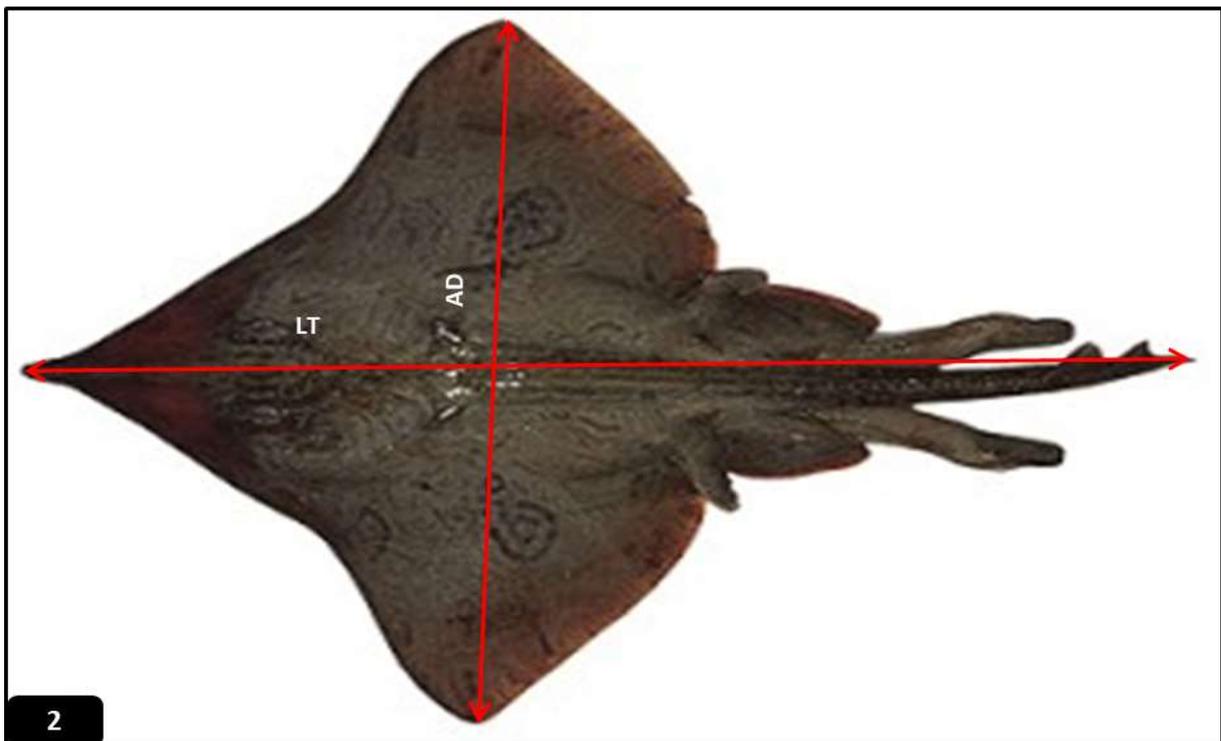
## 5. Conclusiones

- El modelo estructural del testículo de *Z. chilensis* es de tipo compuesto.
- Existe una relación entre el tejido testicular y el órgano epigonal, que es variable a lo largo del desarrollo del animal.
- Se propone que el testículo maduro de *Z. chilensis* puede dividirse en seis zonas funcionales, que se corresponderían con las distintas fases de la espermatogénesis.
- No se identificó la presencia de una papila germinal.
- A lo largo de la espermatogénesis, varían las características citológicas de las células germinales y de las células de Sertoli, así como su disposición dentro del cisto.
- Se observó un número reducido de células similares a las células de Leydig, en el espacio intersticial entre los cistos de todas las zonas.
- En la espermiogénesis pudieron reconocerse cuatro fases distintas.
- Se registró la presencia de cistos en degeneración, formados a partir de la espermiación.
- La descripción microscópica del testículo de *Z. chilensis* coincide con la de otros batoideos.
- El análisis histológico del testículo de *Z. chilensis* permitió confirmar los estadios de madurez establecidos a partir de criterios macroscópicos.

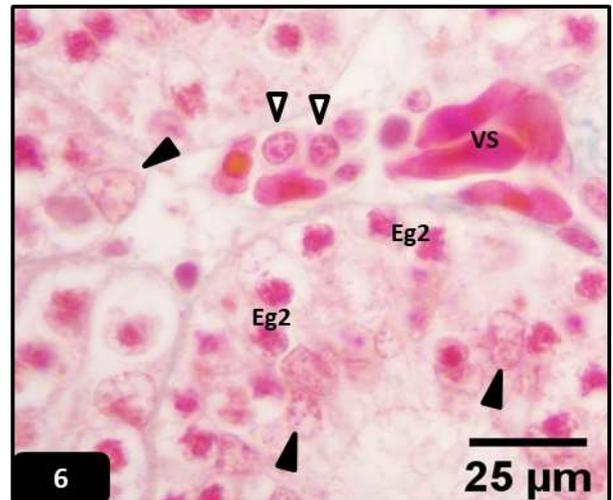
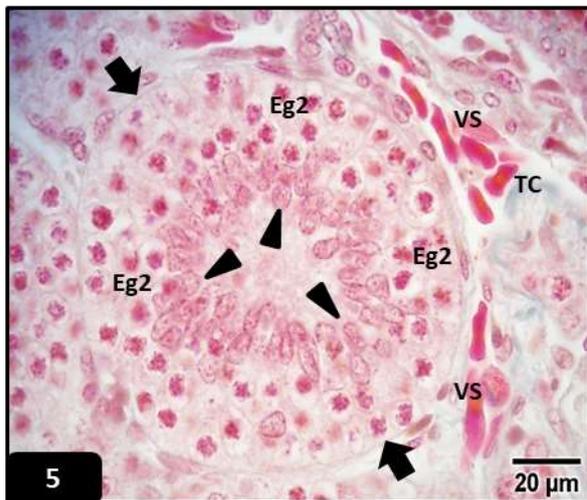
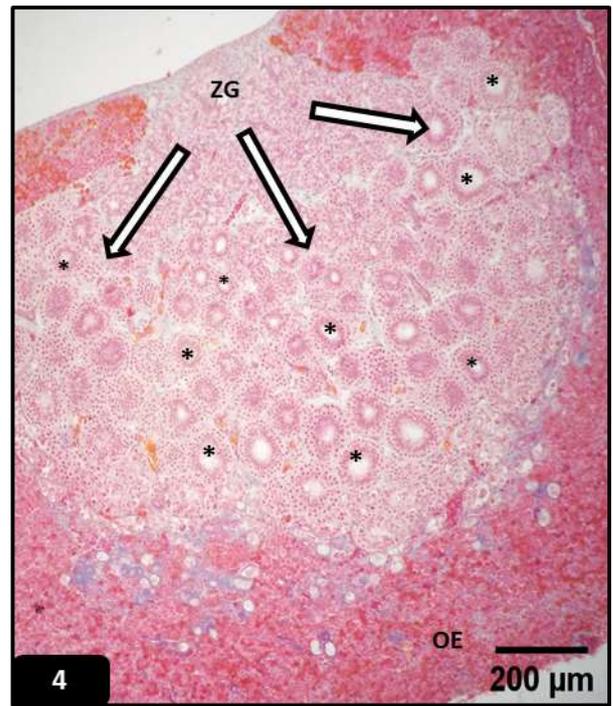
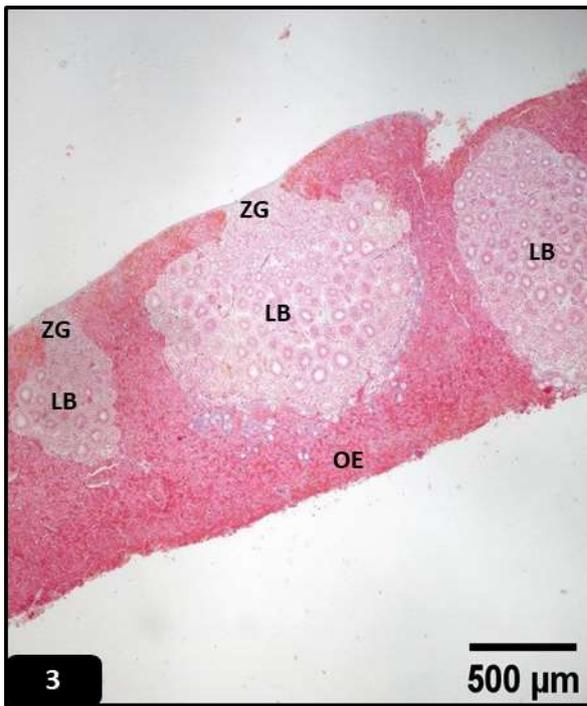
Número de ejemplar	Madurez macroscópica	LT (cm)	AD (cm)	Madurez microscópica
1	Estadio III	87,5	66,5	Maduro
2	Estadio III	88	66	Maduro
3	Estadio III	87,5	66,5	Maduro
4	Estadio III	82	62	Maduro
5	Estadio I	58,5	43	Inmaduro
6	Estadio I	58	44	Inmaduro
7	Estadio I	55	42	Inmaduro
8	No determinada	53	41,5	Inmaduro
9	No determinada	73	45,5	Maduro
10	Dudosa (posible Estadio III)	86	66	Maduro
11	Dudosa (Estadio I/II)	52	42	Inmaduro

**Tabla 1:** Datos morfométricos y de madurez sexual, determinados macro y microscópicamente, de los ejemplares de *Zearaja chilensis* utilizados en este estudio. Se utilizó el criterio macroscópico propuesto por Stehmann (2002), según el cual el **estadio I** corresponde a ejemplares inmaduros, el **estadio II** a individuos en maduración y el **estadio III** a animales maduros.

**Referencias:** **AD:** ancho de disco; **LT:** longitud total.



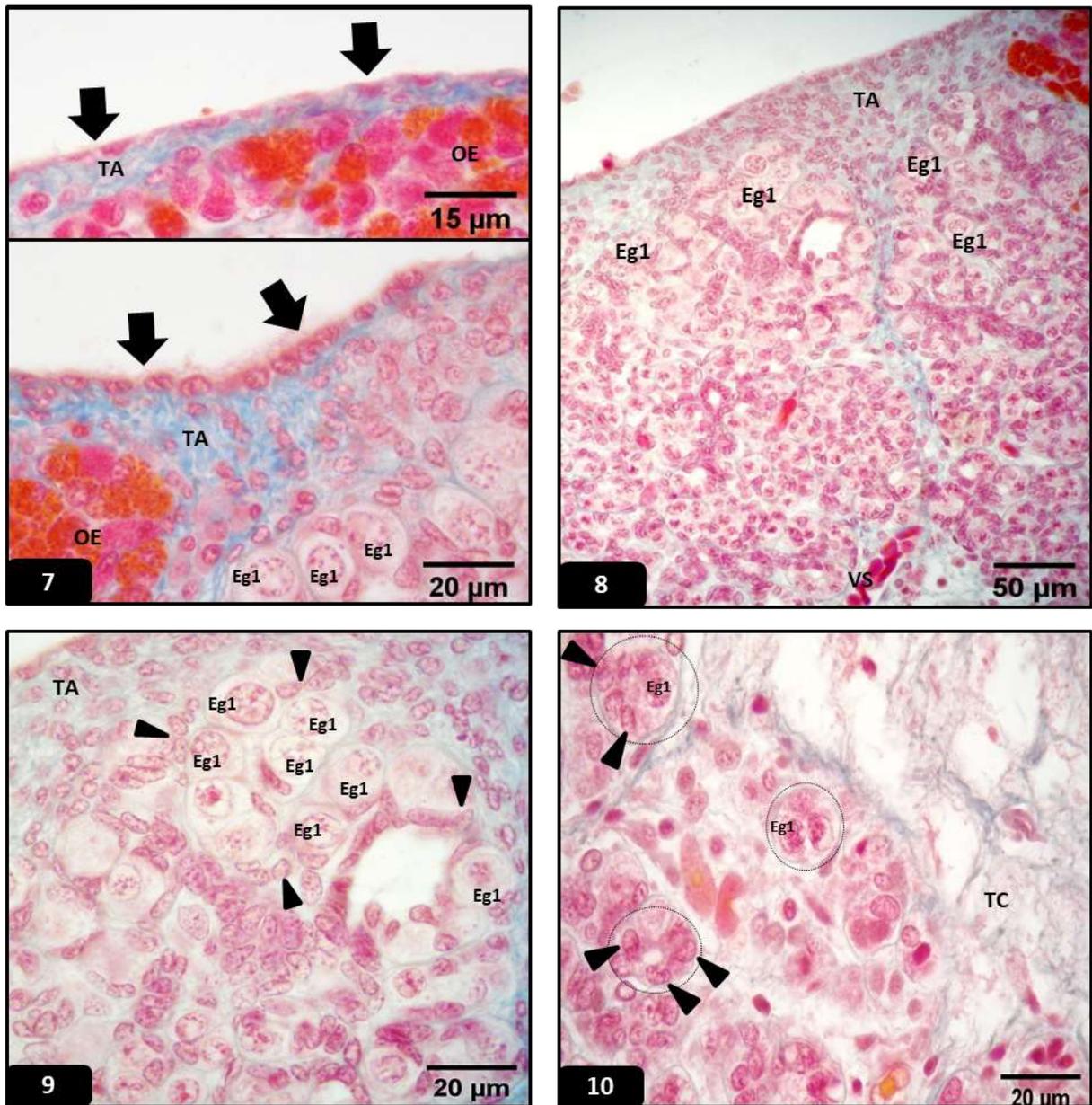
**Figura 1.** Golfo San Matías (Fuente: Google Maps). **Figura 2.** Ejemplar macho maduro de *Zearaja chilensis*, haciendo énfasis en las medidas de ancho de disco (AD) y longitud total (LT) (extraído de Cousseau *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Vista general del testículo inmaduro de *Z. chilensis*, donde se observa su organización lobular y la asociación con el órgano epigonal. **Figura 4.** Detalle de un lóbulo testicular en un macho inmaduro de *Z. chilensis*, indicando el sentido en que maduran los cistos. **Figura 5.** Detalle de un espermatocisto y del espacio intersticial en el testículo inmaduro de *Z. chilensis*. **Figura 6.** Detalle del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se indican las células con características similares a las células de Leydig en el espacio intersticial, entre los cistos con espermatogonias.

**Tinción:** Tricrómico de Masson.

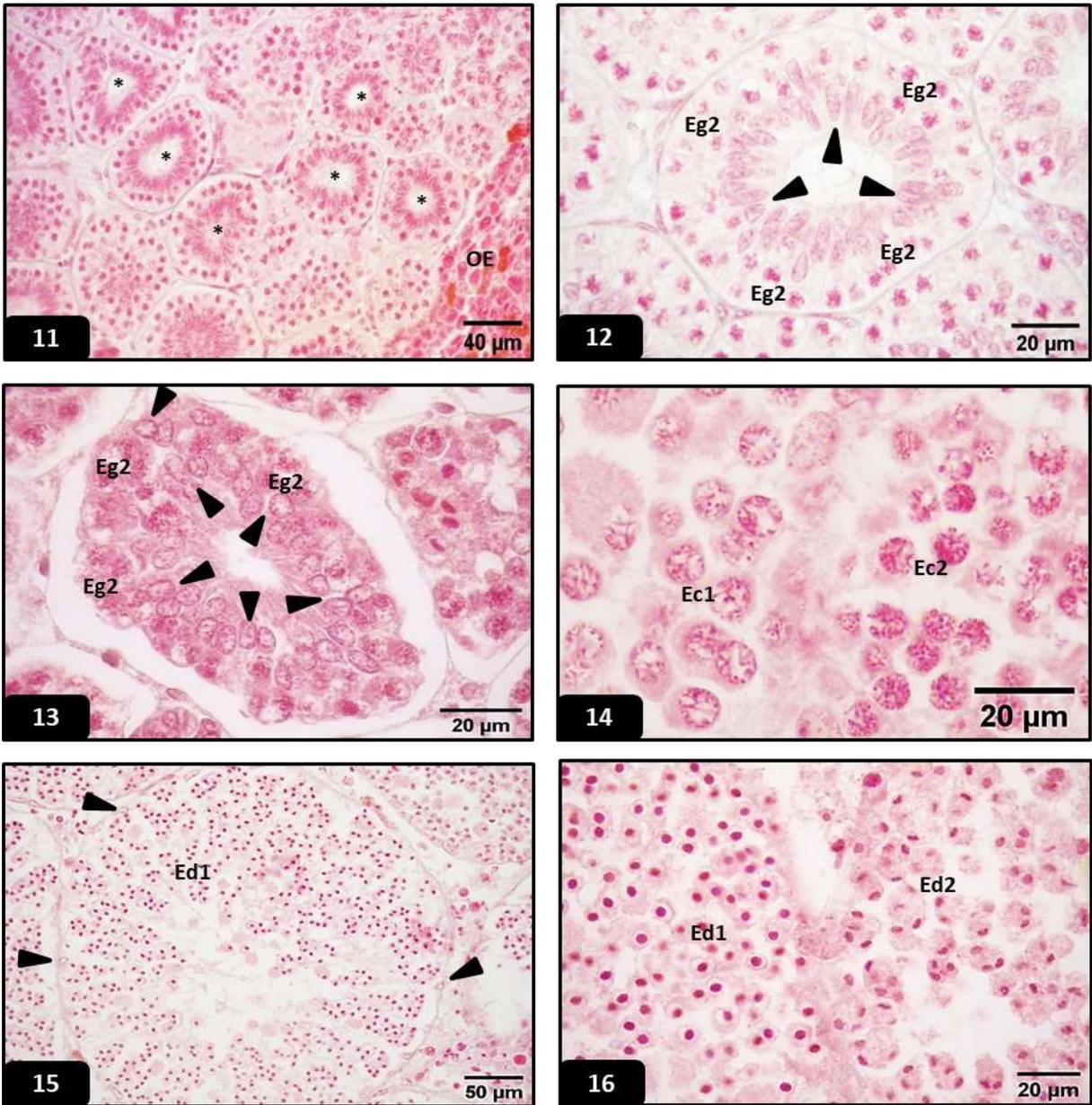
**Referencias:** Eg2: espermatogonias secundarias; LB: lóbulo testicular; OE: órgano epigonal; TC: tejido conectivo; VS: vasos sanguíneos; ZG: zona germinal; **Asterisco negro:** cistos; **Flecha blanca delineada:** progresión de la espermatogénesis; **Flecha negra:** membrana basal acelular; **Punta de flecha blanca delineada:** células tipo Leydig; **Punta de flecha negra:** núcleos de células de Sertoli.



**Figura 7.** Detalle del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se muestra el epitelio de revestimiento y la túnica albugínea. **Figura 8.** Vista general de la zona germinal de un lóbulo del testículo inmaduro de *Z. chilensis*. **Figura 9.** Detalle de la zona germinal en el testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se observan las espermatogonias primarias y su relación con las células de Sertoli. **Figura 10.** Detalle del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se muestra la formación de los cistos unilaminares.

**Tinción:** Tricrómico de Masson.

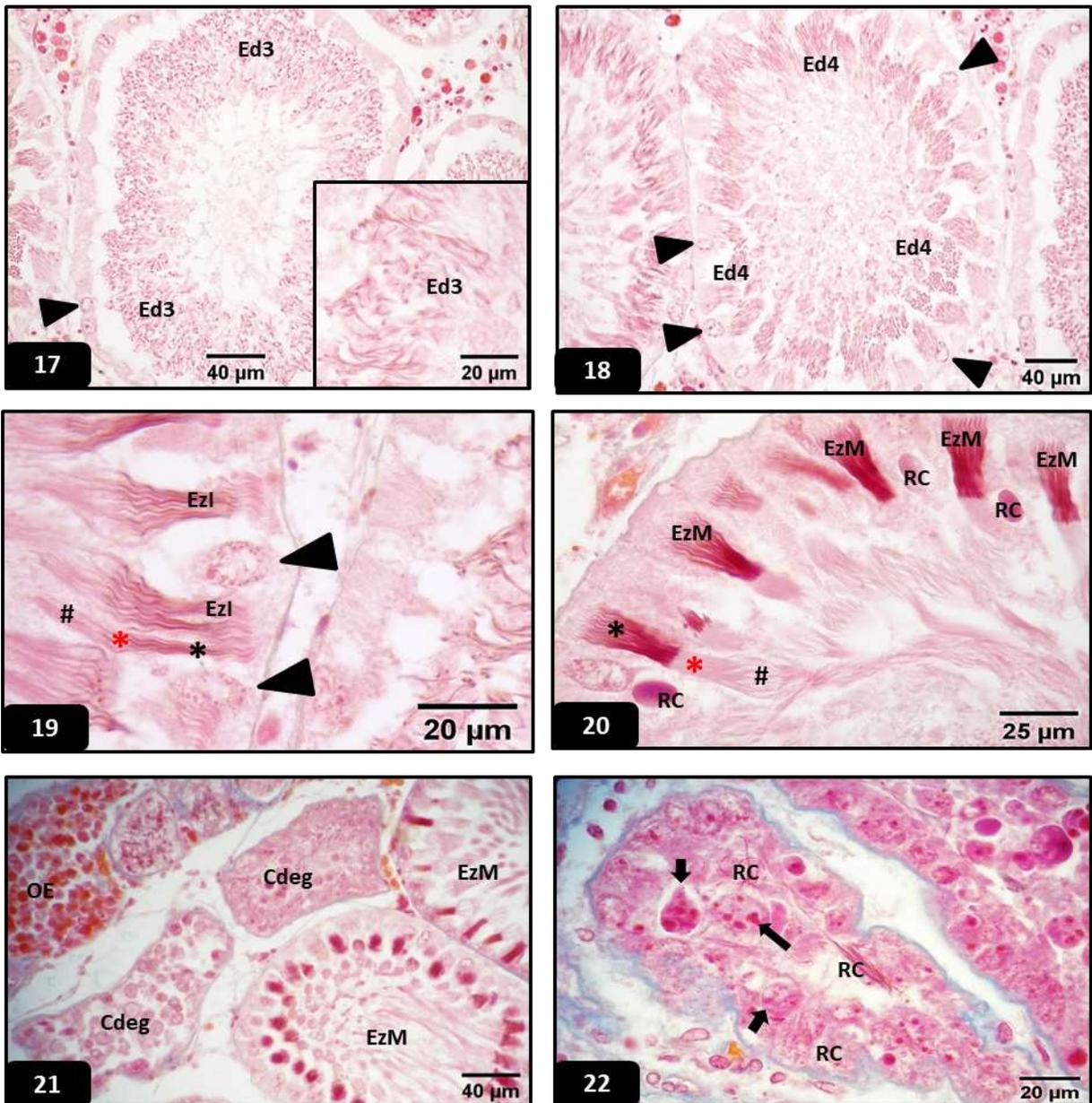
**Referencias:** Eg1: espermatogonias primarias; OE: órgano epigonal; TA: túnica albugínea; TC: tejido conectivo; VS: vaso sanguíneo; **Círculo negro punteado:** cistos unilaminares; **Flecha negra:** epitelio testicular; **Punta de flecha negra:** núcleos de células de Sertoli.



**Figura 11.** Vista general del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se observan cistos multilaminares. **Figura 12.** Detalle de un cisto multilaminar en el testículo inmaduro de *Z. chilensis*. Nótese la posición luminal de los núcleos de las células de Sertoli. **Figura 13.** Detalle de un cisto multilaminar en el testículo inmaduro de *Z. chilensis*, en el que se observa el proceso de migración de los núcleos de las células de Sertoli hacia la región basal del cisto. **Figura 14.** Características nucleares de los espermatocitos I y II. **Figura 15.** Detalle del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se puede ver un cisto con espermátides en fase I. **Figura 16.** Detalle del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se pueden ver espermátides en fase I y II

**Tinción:** Tricrómico de Masson.

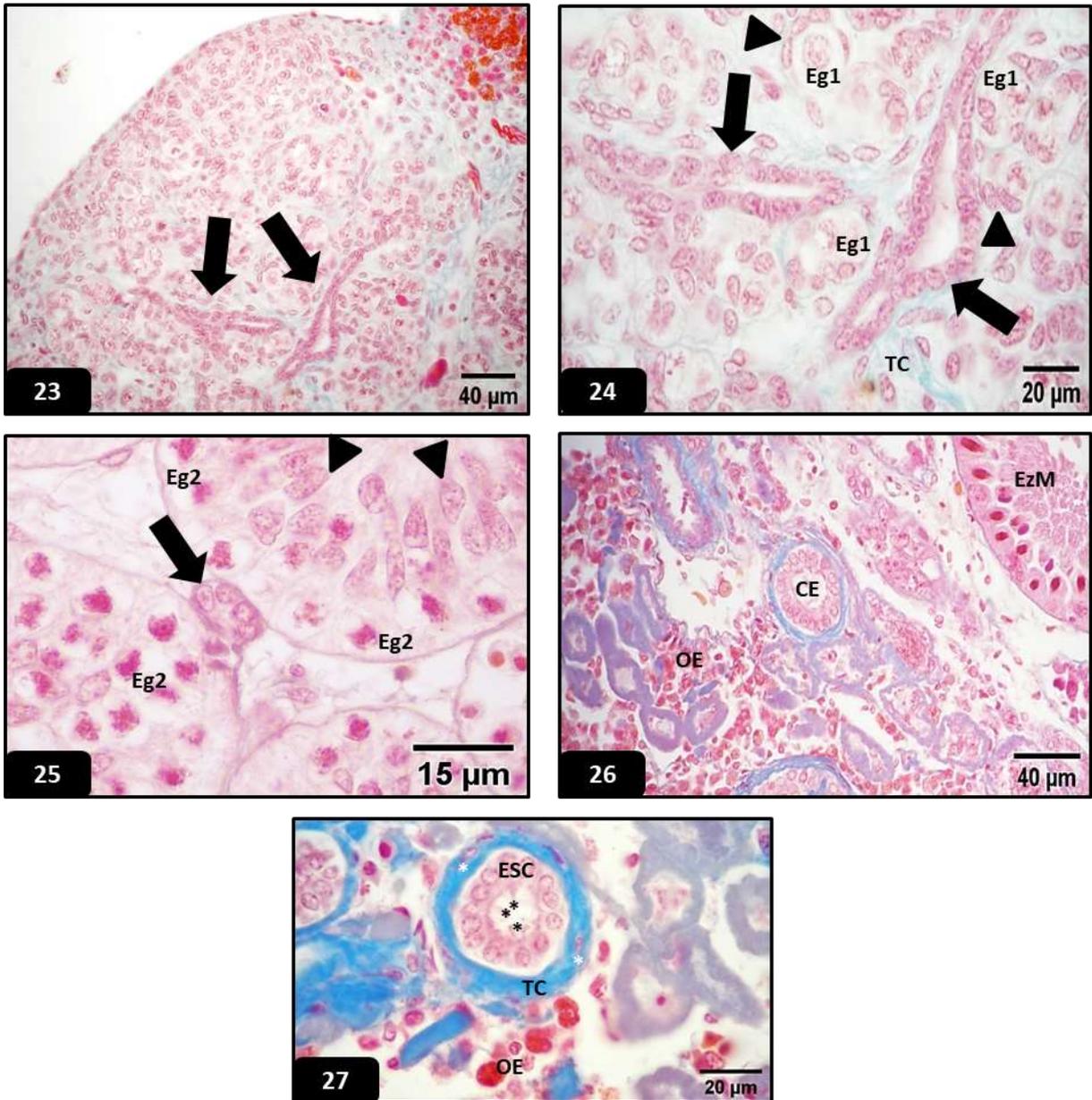
**Referencias:** **Ec1:** espermatocitos primarios; **Ec2:** espermatocitos secundarios; **Ed1:** espermátides en fase I; **Ed2:** espermátides en fase II; **Eg2:** espermatogonias secundarias; **OE:** órgano epigonal; **Asterisco negro:** cistos multilaminares; **Punta de flecha negra:** núcleos de células de Sertoli.



**Figura 17.** Detalle del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se muestra un cisto con espermátides en fase III. **Inserto:** Detalle de espermátides en fase III en el testículo maduro de *Z. chilensis*. **Figura 18.** Detalle del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se puede ver un cisto con espermátides en fase IV. **Figura 19.** Detalle de un cisto con espermatozoides inmaduros en el testículo maduro de *Z. chilensis*. Nótese las regiones características de los espermatozoides. **Figura 20.** Detalle de un cisto con espermatozoides maduros en el testículo maduro de *Z. chilensis*. Nótese la mayor claridad con la cual se visualizan las regiones de los espermatozoides. **Figura 21.** Vista general de los cistos en degeneración dentro del lóbulo testicular en el testículo maduro de *Z. chilensis*. **Figura 22.** Detalle de un cisto en degeneración en el testículo maduro de *Z. chilensis*. Nótese las figuras apoptóticas de las células de Sertoli.

**Tinción:** Tricrómico de Masson.

**Referencias:** **Cdeg:** cistos en degeneración; **Ed3:** espermátides en fase III; **Ed4:** espermátides en fase IV; **EzI:** espermatozoides inmaduros; **EzM:** espermatozoides maduros; **OE:** órgano epigonal; **RC:** restos celulares; **Asterisco negro:** cabezas de los espermatozoides; **Asterisco rojo:** cuellos de los espermatozoides; **Flecha negra:** células de Sertoli apoptóticas; **Numeral negro:** flagelos de los espermatozoides; **Punta de flecha negra:** núcleos de células de Sertoli.



**Figura 23.** Vista general de la zona germinal del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se muestran los conductos intratesticulares. **Figura 24.** Detalle de la zona germinal del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se muestran los conductos intratesticulares. **Figura 25.** Detalle del testículo inmaduro de *Z. chilensis* en el que se puede observar un conducto intratesticular entre los cistos con espermatogonias secundarias. **Figura 26.** Vista general de la zona periférica del testículo maduro de *Z. chilensis* en el que se puede observar un conducto eferente. **Figura 27.** Detalle de un conducto eferente en el testículo maduro de *Z. chilensis*.

**Tinción:** Tricrómico de Masson.

**Referencias:** CE: conducto eferente; Eg1: espermatogonias primarias; Eg2: espermatogonias secundarias; ESC: epitelio simple cúbico; EzM: cisto con espermatozoides maduros; OE: órgano epigonal; TC: tejido conectivo; Asterisco blanco: fibra muscular lisa; Asterisco negro: estereocilios; Flecha negra: conducto intratesticular; Punta de flecha negra: núcleos de células de Sertoli.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Acero, A., Grijalba-Bendeck, M., Moreno, F., Acevedo, K y González E.** (2008). Histología comparada del sistema reproductivo de cuatro especies de rayas caribeñas (Chondrichthyes: Batoidea). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 32(125), 571-586.
- **Almeida, F. F. L., Kristoffersen, C., Taranger, G. L. y Schulz, R. W.** (2008). Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): A Novel Model of Cystic Germ Cell Development. *Biology of Reproduction*, 78, 27-34.
- **Awruch, C. A.** (2015). Reproduction strategies. En Shadwick, R. E., Farrell, A. P. y Brauner, C. J. (Eds.), *Physiology of Elasmobranch Fishes: Structure and Interaction with Environment* (Volumen 34, Parte A, pp. 255-310). Academic Press.
- **Barone, M., De Ranieri, S., Fabiani, O., Pirone, A. y Serena, F.** (2007). Gametogenesis and maturity stages scale of *Raja asterias* Delaroché, 1809 (Chondrichthyes, Rajidae) from the South Ligurian Sea. *Hydrobiologia*, 580, 245-254.
- **Basallo, A., Varela, A. S. y Oddone, M. C.** (2018). Histology of the testicles and male reproductive tract of the skates *Sympterygia acuta* Garman, 1877 and *S. bonapartii* Muller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Rajoidei) in the Western South Atlantic Ocean. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13(2), 148-161.
- **Becerril-García, E. E., Arellano-Martínez, M., Bernot-Simon, D., Hoyos-Padilla, E. M., Galván-Magaña, F. y Godard-Codding, C.** (2020). Steroid hormones and chondrichthyan reproduction: physiological functions, scientific research, and implications for conservation. *PeerJ* 8:e9686 DOI: 10.7717/peerj.9686.
- **Belleggia, M., Andrada, N., Paglieri, S., Cortés, F., Massa, A. M., Figueroa, D. E. y Bremec, C.** (2016). Trophic ecology of yellownose skate *Zearaja chilensis*, a top predator in the south-western Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 88, 1070-1087.
- **Billard, R.** (1984). Ultrastructural changes in spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*, 237, 219-226.
- **Bircan-Yildirim, Y., Cek, S., Basusta, N. y Atik, E.** (2011). Histology and Morphology of The Epigonal Organ with Special Referance to the Lymphomyeloid System in *Rhinobatos rhinobatos*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 351-358.
- **Blüm, V.** (1986). Comparative Anatomy of the Urogenital System. En Blüm, V. (Ed.), *Vertebrate Reproduction* (pp. 43-74). Springer.
- **Bone, Q. y Moore, R. H.** (2008). Reproduction, and Life Histories. En Owen, E. (Ed.), *Biology of Fishes* (3° Edición, pp. 217-254). Taylor & Francis Group.

- **Bouma, J y Cloud, J. G.** (2005). Sertoli Cell Biology in Fishes and Amphibians. En Skinner M. D. y Griswold M. K. (Eds.), *Sertoli Cell Biology* (pp. 71-79). Elsevier Academic Press.
- **Bovcon, N. D., Góngora, M. E., Marinao, C. y González-Zevallos, D.** (2013). Composición de las capturas y descartes generados en la pesca de merluza común *Merluccius hubbsi* y langostino patagónico *Pleoticus muelleri*: un caso de estudio en la flota fresquera de alturas del Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(2), 303-319.
- **Burgos-Vázquez, M. I., Galván-Magaña, F., Carrera-Fernández, M., Ochoa-Báez, R. I. y Oddone, M. C.** (2019). Reproductive characteristics and reproductive tract anatomy of the California butterfly ray *Gymnura marmorata* (Myliobatiformes: Gymnuridae). *Journal of Fish Biology*, 95, 490-501.
- **Callard, G., Mak, P., DuBois, W. y Cuevas, M. E.** (1989). Regulation of Spermatogenesis: The Shark Testis Model. *The Journal of Experimental Zoology Supplement*, 2, 23-34.
- **Carrier, J. C., Pratt, H. L. y Castro, J. I.** (2004). Reproductive Biology of Elasmobranchs. En Carrier, J. C., Musick, J. A. y Heithaus, M. R. (Eds.), *Biology of sharks and their relatives* (1° Edición, pp. 269-286). CRC Press.
- **Chatchavalvanich, K., Thongpan, A. y Nakai, M.** (2004). Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifier* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyological Research*, 52, 123-131.
- **Chatchavalvanich, K., Thongpan, A. y Nakai, M.** (2005). Ultrastructure of spermiogenesis in a freshwater stingray, *Himantura signifier*. *Ichthyological Research*, 52, 379-385.
- **Coller, M., Osovnikar, P., Narvarte, M., Perier, R., González, R. A., Di Giácomo, E., Morsan, E. M., Braicovich, P., Curtolo, L. y Ocampo, M.** (2004). *Estado de situación de los recursos pesqueros del Golfo San Matías, sus pesquerías, especies asociadas y ambiente: informe ad hoc para la evaluación preliminar de las pesquerías marinas de Río Negro con vistas a la certificación de su sustentabilidad* (Informe técnico interno N° 03/04). Instituto de Biología Marina y Pesquera “Atte. Storni”.
- **Colonello, J. H. y Cortés, F.** (2014). Parámetros reproductivos de la raya *Dipturus chilensis* en el Atlántico sudoccidental (34°S-48°S) (Informe Técnico 92). INIDEP.
- **Concha, F. J., Caira, J. N., Ebert, D. A. y Pompert, J. H. W.** (2019). Redescription and taxonomic status of *Dipturus chilensis* (Guichenot, 1848), and description of *Dipturus lamillai* sp. nov. (Rajiformes: Rajidae), a new species of long-snout skate from the Falkland Islands. *Zootaxa*, 5, 501-524.
- **Conrath, C. L.** (2005). Reproductive Biology. En Musick, J. A. y Bonfil, R. (Eds.), *Management Techniques for Elasmobranch Fisheries* (pp. 103-126). FAO Fisheries Technical Paper.

- **Cousseau, M. B., Figueroa, D. E., Díaz de Astarloa, J. M., Mabragna, E. y Lucifora, L. O.** (2007). Rayas, chuchos y otros batoideos del Atlántico sudoccidental (34°S-55°S). INIDEP.
- **Crowder, L. B. y Murawski, S. A.** (1998). Fisheries Bycatch: Implications for Management. *Fisheries*, 23(6), 8-17.
- **Díaz Andrade, M. C.** (2010). Morfofisiología de la biología reproductiva de las especies del género *Sympterygia* que habitan el estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral. Dto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 281 pp.
- **Dulvy, N. K. y Reynolds, J. D.** (2002). Predicting Extinction Vulnerability in Skates. *Conservation Biology*, 16(2), 440-450.
- **Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. A., Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., Carlson, J. K., Davidson, L. N. K., Fordham, S. V., Francis, M. P., Pollock, C. M., Simpfendorfer, C. A., Burgess, G. H., Carpenter, K. E., Compagno, L. J. V., Ebert, D. A., Gibson, C., Heupel, M. R., Livingstone, S. R., Sanciangco, J. C., Stevens, J. D., Valenti, S. y White, W. T.** (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife*, 3:e00590 DOI: 10.7554/eLife.00590.
- **Dulvy, N. K., Acuña, E., Bustamante, C., Concha, F., Herman, K., y Velez-Zuazo, X.** (2020). *Dipturus chilensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2020*: e.T144159779A124463114.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T144159779A124463114.en>. Descargado el 3 de Agosto, 2021.
- **Ebert, D. A., Smith, W. D. y Cailliet, G. M.** (2008). Reproductive biology of two commercially exploited skates, *Raja binoculata* and *R. rhina*, in the western Gulf of Alaska. *Fisheries Research*, 94, 48-57.
- **Engel, K. B. y Callard, G. V.** (2005). The Testis and Spermatogenesis. En Hamlett, W. C (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (pp. 171-200). Science Publishers, Inc.
- **Estalles, M., Coller, N. M., Perier, M. R. y Di Giacomo, E. E.** (2011). Skates in the demersal trawl fishery of San Matías Gulf, Patagonia: species composition, relative abundance and maturity stages. *Aquatic Living Resources*, 24, 193-199.
- **Gabbanelli, V., Díaz de Astarloa, J. M., González-Castro, M., Vázquez, D. M. y Mabragna, E.** (2018). Almost a century of oblivion: Integrative taxonomy allows the resurrection of the longnose skate *Zearaja brevicaudata* (Marini, 1933) (Rajiformes; Rajidae). *Comptes Rendus Biologies*, 341, 454-470.
- **Galíndez, E. J.** (2016). Reproducción de peces cartilaginosos. Una revisión de algunas adaptaciones reproductivas. *Ciencias Morfológicas*, 18(1), 20-33.

- **Galíndez, E. J. y Aggio, M. C.** (2002). The granulopoietic organs of the narrow nose smooth hound *Mustelus schmitti* (Chondrichthyes, Triakidae). A light and electron microscopic study. *Revista Chilena de Anatomía*, 20(1), 49-54.
- **Girard, M., Rivalan, P. y Siquin, G.** (2000). Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscymnus coelolepis* and *Centrophorus squamosus*. *Journal of Fish Biology*, 57, 1575-1589.
- **Grogan, E. D., Lund, R. y Greenfest-Allen, E.** (2012). The Origin and Relationships of Early Chondrichthyans. En Carrier, J. C., Musick, J. A. y Heithaus, M. R. (Eds.), *Biology of Sharks and Their Relatives* (2° Edición, pp. 3-29). CRC Press.
- **Guerrero, R. A. y Piola, A. R.** (1997). Masas de agua en la plataforma continental. En Boschi, E. E. (Ed.). *El mar argentino y sus recursos pesqueros* (Tomo 1, pp. 107-118). Publicaciones especiales INIDEP.
- **Hamlett, W. C.** (1999). Male Reproductive System. En Hamlett, W. C. (Ed.), *Sharks, Skates and Rays: the biology of Elasmobranch Fishes* (pp. 444-470). The Johns Hopkins University Press.
- **Henderson, A. C., Reeve, A. J. y Ambu-Ali, A.** (2014). Microanatomy of the male and female reproductive tracts in the long-tailed butterfly ray *Gymnura poecilura*, an elasmobranch with unusual characteristics. *Journal of Fish Biology*, 84(2), 297-313.
- **Hess, R. A. y de Franca, L. R.** (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. En Crusio, W. E., Radeke, H. H. y Rezaei (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 1-15). Landes Bioscience.
- **Honma, Y., Okabe, K. y Chiba, A.** (1984). Comparative Histology of the Leydig and Epigonal Organs in some Elasmobranchs. *Japanese Journal of Ichthyology*, 31(3), 47-54.
- **Irigoyen, A., Trobbiani, G., y Galván, D.** (2018). *Peces de arrecife y ambientes de buceo argentinos* (2° Edición). Remitente Patagonia.
- **Izzo, S., Andreoli, G., Figueroa, D. E. y Costagliola, M.** (2017). Caracterización molecular de rayas simpátricas de los géneros *Dipturus* y *Zearaja* en el Mar Argentino por DNA barcode. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 31, 55-74.
- **Kardong, K. V.** (1999). El sistema urogenital. En Pardos Martínez, F. (Ed.), *Vertebrados: Anatomía comparada, función y evolución* (pp. 504-549). McGraw-Hill, Interamericana.
- **Klimley, A. P.** (2013). *The Biology of Sharks and Rays*. The University of Chicago Press.
- **Koen Alonso, M., Crespo, E. A., García, N. A., Pedraza, S. N., Mariotti, P. A., Berón Vera, B. y Mora, N. J.** (2001). Food habits of *Dipturus chilensis* (Pisces: Rajidae) off Patagonia, Argentina. *ICES Journal of Marine Science*, 58, 288-297.

- **Kume, G., Furumitsu, K., Tanaka, S. y Yamaguchi, A.** (2009). Reproductive biology of the guitarfish *Rhinobatos hynnicephalus* (Batoidea: Rhinobatidae) in Ariake Bay, Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 82, 289-298.
- **Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S. M. L. C. y Jegou, B.** (1995). Cell-Cell Interactions in the Testis of Teleosts and Elasmobranchs. *Microscopy Research and Technique*, 32, 533-552.
- **Lucas, A. J., Guerrero, R. A., Mianzán, H. W., Acha, E. M. y Lasta, C. A.** (2005). Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine Continental Shelf (34-43°S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, 405-420.
- **Lucifora, L. O., Valero, J. L., Bremec, C. S. y Lasta, M. L.** (2000). Feeding habits and prey selection by the skate *Dipturus chilensis* (Elasmobranchii: Rajidae) from the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80, 953-954.
- **Lutton, B. V. y Callard, I. P.** (2008). Influence of reproductive activity, sex steroids, and seasonality on epigonal organ cellular proliferation in the skate (*Leucoraja erinacea*). *General and Comparative Endocrinology*, 155, 116-125.
- **Maruska, K. P., 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.
- **Maruska, K. P. y Gelsleichter, J.** (2011). Hormones and Reproduction in Chondrichthyan Fishes. En Norris, D. O. y Lopez, K. H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (Volumen 1, pp. 209-237). Academic Press.
- **Massa, A. M., Lucifora, L. O. y Hozbor, N. M.** (2004). Condrictios de las regiones costeras bonaerense y uruguaya. En Sánchez, R. P. y Bezzi, S. I. (Eds.), *El mar argentino y sus recursos pesqueros* (Tomo 4, pp. 85-99). Publicaciones especiales INIDEP.
- **McClusky, L. M.** (2003). A scanning electron microscopic study of germ cell maturation in the reproductive tract of the male soupfin shark (*Galeorhinus galeus*). *Acta Zoológica (Stockholm)*, 84, 69-76.
- **McClusky, L. M.** (2012). Coordination of spermatogenic processes in the testis: lessons from cystic spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*, 349, 703-715.
- **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Argentina).** (s.f.). *Desembarques de capturas marítimas totales*. Recuperado el 16 de Abril de 2021 de [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca\\_maritima/desembarques/](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca_maritima/desembarques/)
- **Mouzo, F. H. y Paterlini, C. M.** (2017). Geología submarina del golfo norpatagónico San Matías. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 74(4), 553-569.

- **Moya, A. C., Díaz Andrade, M. C. y Galíndez, E. J.** (2015). Morphology and dynamics of male gametogenesis in *Sympterygia bonapartii* (Chondrichthyes, Rajidae) from Northern Patagonia. *Iheringia. Série Zoologia*, 105(3), 316-324.
- **Moya, A.C.** (2017). Biología reproductiva de dos especies de rayas del golfo San Matías: la raya platana *Atlantoraja platana* y la raya marmorada *Sympterygia bonapartii*. Un enfoque morfofuncional. Tesis Doctoral. Dto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 250 pp.
- **Myers, R. A. y Worm, B.** (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 360, 13-20.
- **Naylor, G. J. P., Caira, J. N., Jensen, K., Rosana, K. A. M., White, W. T. y Last, P. R.** (2012). A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 367, 1-262.
- **Nelson, J. S., Grande, T. C. y Wilson, M. V. H.** (2016). *Fishes of the World* (5° Edición). Wiley.
- **Park, J. C., Lee, J. H., Kodama, K., Urushitani, H., Ohta, Y. y Horiguchi, T.** (2013). Structure of the intratesticular duct system for sperm emission in the starspotted smoothhound *Mustelus manazo*. *Fisheries Science*, 79, 203-211.
- **Pedrerros-Sierra, T. M. y Ramírez-Pinilla, M. P.** (2015). Morphology of the Reproductive Tract and Acquisition of Sexual Maturity in Males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Journal of Morphology*, 276, 273-289.
- **Perier, M. R., Estalles, M., Coller, N. M., Suarez, M. N., Mora, G. J. y Di Giácomo, E. E.** (2011). Chondrichthyans of the San Matías Gulf, Patagonia, Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 13(2), 213-220.
- **Pettovello, A. D.** (2016). La fauna acompañante del langostino patagónico (*Pleoticus muelleri*) en el Golfo San Jorge y adyacencias: análisis de alternativas de manejo. En Boschi, E. E. (Ed.), *El mar argentino y sus recursos pesqueros* (Tomo 6, pp. 89-94). Publicaciones especiales INIDEP.
- **Piferrer, F. C. y Callard, G. V.** (1995). Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis during Premeiotic Stages of Spermatogenesis by a Factor from Testis-Associated Lymphomyeloid Tissue in the Dogfish Shark (*Squalus acanthias*). *Biology of Reproduction*, 53, 390-398.
- **Piola, A. R. y Scasso, L. M.** (1988). Circulación en el golfo San Matías. *Geoacta*, 15(1), 33-51.

- **Piola, A. R. y Rivas, A. L.** (1997). Corrientes en la Plataforma Continental. En Boschi, E. E. (Ed.), *El mar argentino y sus recursos pesqueros* (Tomo 1, pp. 119-132). Publicaciones especiales INIDEP.
- **Pollom, R., Charvet, P., Chiaramonte, G. E., Cuevas, J. M., Derrick, D. y Paesch, L.** (2021). *Dipturus breviceaudatus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T144161826A144161921.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T144161826A144161921.en>. Descargado el 3 de Agosto, 2021.
- **Pough, F. H., Janis, C. M. y Heiser, J. B.** (2005). *Vertebrate Life* (7° Edición). Pearson Education, Inc.
- **Poulakis, G. R. y Grier, H. J.** (2014). Ontogenetic testicular development and spermatogenesis in rays: the Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, as a model. *Environmental Biology of Fishes*, 97, 1013-1029.
- **Pratt, H. L.** (1988). Elasmobranch Gonad Structure: A description and Survey. *Copeia*, 1988(3), 719-729.
- **Prisco, M., Liguoro, A., D'Onghia, B., Ricchiari, L., Andreuccetti, P. y Angelini, F.** (2002). Fine Structure of Leydig and Sertoli Cells in the Testis of Immature and Mature Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 192-201.
- **Prisco, M., Liguoro, A., Comitato, R., Cardone, A., D'Onghia, B., Ricchiari, L., Angelini, F. y Andreuccetti, P.** (2003). Apoptosis During Spermatogenesis in the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development*, 64, 341-348.
- **Pudney, J.** (1995). Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 32, 459-497.
- **Pudney, J. y Callard, G. V.** (1984a). Development of Agranular Reticulum in Sertoli Cells of the Testis of the Dogfish *Squalus acanthias* During Spermatogenesis. *The Anatomical Record*, 209, 311-321.
- **Pudney, J. y Callard, G. V.** (1984b). Identification of Leydig-like Cells in the Testis of the Dogfish *Squalus acanthias*. *The Anatomical Record*, 209, 323-330.
- **Rego, M. G., Fitzpatrick, J., Hazin, F. H. V., Góes de Araújo, M. L., Morais da Silveira, L., Oliveira, P. G. V. y Evencio-Neto, J.** (2014). Characterization of testicular morphology and spermatogenesis in the nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788). *Zoomorphology*, 134, 117-123.
- **Romero, M. A., González, R. y Ocampo-Reinaldo, M.** (2008). Patrón temporal en la composición específica de los desembarcos de la pesquerías de arrastre demersal del Golfo San Matías. *IBMP- Serie Publicaciones*, 7, 27-37.

- **Ross, M. H. y Pawlina, W.** (2007). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (5° edición). Editorial Médica Panamericana.
- **Schulz, R. W., Franca, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. y Miura, T.** (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 390-411.
- **Serra-Pereira, B., Figueiredo, I. y Serrano Gordo, L.** (2011). Maturation of the Gonads and Reproductive Tracts of the Thornback Ray *Raja clavata*, with Comments on the Development of a Standardized Reproductive Terminology for Oviparous Elasmobranchs. *Marine and Coastal Fisheries Dynamics Management, and Ecosystem Science*, 3, 160-175.
- **Settembrino, C. S.** (2013). Morfología microscópica testicular de *Myliobatis goodei* (Garman, 1855) (Chondrichthyes, Dasyatidae). Tesis de grado. Dto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 42 pp.
- **Stanley, H. P.** (1971). Fine Structure of Spermiogenesis in the Elasmobranch Fish *Squalus suckleyi*. I. Acrosome Formation, Nuclear Elongation and Differentiation of the Midpiece Axis. *Journal of Ultrastructure Research*, 36, 86-102.
- **Stanley, H. P. y Labert, C. C.** (1985). The Role of a Sertoli Cell Actin-Myosin System in Sperm Bundle Formation in the Ratfish, *Hydrolagus colliei* (Chondrichthyes, Holocephali). *Journal of Morphology*, 186, 223-236.
- **Stehmann, M. F. W.** (2002). Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). *Archive of Fishery and Marine Research*, 50(1), 23-48.
- **Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K. y Walker, P. A.** (2000). The effects of fishing on sharks, rays and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57, 476-494.
- **Tamini, L. L., Chiaramonte, G. E., Pérez, J. E. y Cappozzo, H. L.** (2006). Batoids in a coastal trawl fishery of Argentina. *Fisheries Research*, 77, 326-332.
- **Tarifeño, E.** (2005). Adaptaciones fisiológicas de animales marinos. En Werlinger, C. I. (Ed.), *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y procesos* (Tomo I, pp. 363-390). Departamento de Oceanografía Universidad de Concepción.
- **Vargas-Caro, C., Bustamante, C., Lamilla, J. y Bennett, M. B.** (2015). A review of longnose skates *Zearaja chilensis* and *Dipturus trachyderma* (Rajiformes: Rajidae). *Universitas Scientiarum*, 20(3), 321-359.
- **Wehitt, A., Di Giacomo, E. E. y Galíndez, E. J.** (2015). The Female Reproductive System of *Zearaja chilensis* (Guichenot, 1848) (Chondrichthyes, Rajidae). Gametogenesis and Microscopic Validation of Maturity Criteria. *International Journal of Morphology*, 33(1), 309-317.

- **Wehitt, A.** (2019). Ecología reproductiva de la raya de círculos *Atlantoraja cyclophora* en el área costera bonaerense. Tesis doctoral. Dto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 141 pp.
- **Wourms, J. P.** (1977). Reproduction and Development in Chondrichthyan Fishes. *American Zoologist*, 17, 379-410.
- **Zaiden, S. F., Brinn, R. P., Marcon, J. L. y Criscuolo Urbinati, E.** (2010). Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon cf. hystrix*. *Zygote*, 19(3), 245-253.
- **Zavatteri, A.** (2010). Estudio de edad y crecimiento de la raya hocicuda *Dipturus chilensis* (Guichenot, 1848) en el Atlántico sudoccidental (34°-55°LS y 52°-69°LW). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata. 62 pp.