



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA

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.

*Lic. Ana Carolina Moya*

Director de Tesis: **Dr. Edgardo E. Di Giácomo**  
Director Asistente de Tesis: **Dra. Elena J. Galíndez**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA

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.

*Lic. Ana Carolina Moya*

Director de Tesis: **Dr. Edgardo E. Di Giácomo**  
Director Asistente de Tesis: **Dra. Elena J. Galíndez**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2017

## Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Citología, Histología y Embriología Animal, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y el Instituto de Biología marina y pesquera Almirante Storni- IBMPAS, durante el periodo comprendido entre Abril de 2012 a Diciembre de 2016, bajo la dirección del Dr. Edgardo Di Giácomo y la Dra. Elena Galíndez.

*Lic. Ana Carolina Moya*

Diciembre de 2016

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La defensa oral de la presente tesis ha sido aprobada el

...../...../....., mereciendo la calificación de .....

(.....)

Dedicada a:

Los “Lolos” que viven en mi corazón

*Para comprender los lazos que nos unen a todos los seres vivos y juzgar mejor el milagro de nuestra propia vida, dejad romper sobre vosotros la primera ola de mar.*

JACQUES-YVES COUSTEAU

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Elena Galíndez por confiar en mí y estar a mi lado en cada momento brindándome su tiempo, dedicación y conocimiento. Por esos consejos y visiones que tanto me ayudan a diario, por darme seguridad y confianza en mí misma todos los días. Gracias por todo Elen, por enseñarme a confiar un poquito más en mí, por esos consejos de profesional y madre y por esas charlas “gourmet” que tanto nos gustan.

A mi director de tesis el Dr. Edgardo Di Giácomo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su calidez y amabilidad desde el primer día que llegué a San Antonio. Gracias, Edgardo y Raquel por confiar en mí, por haberme abierto las puertas de su casa para que pudiera estar más cómoda y a gusto en los viajes de muestreo.

Al Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, por brindarme los medios necesarios para la realización de este trabajo.

A las instituciones que subsidiaron esta tesis: el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca que hizo posible la realización de esta tesis y a la Secretaria General de Ciencia y Técnica (SGCyT) de la Universidad Nacional del Sur, a través del subsidio otorgado a la Dra. Elena Galíndez (PGI 24/B222).

A las plantas pesqueras Río Salado y Perla del Este, por haberme facilitado el material proveniente del desembarque de la flota pesquera y permitirme realizar muestreos en planta. Un agradecimiento especial a Ignacia por su predisposición y calidez a la hora de recibirnos.

Al Instituto de Biología Marina y Pesquera “Alte. Storni” por facilitarme el lugar para los muestreos.

Al INBIOSUR y al Laboratorio de Citología, Histología, Embriología Animal por facilitarme el lugar de trabajo diario.

A Silvia Estecondo, mi “antigua directora” gracias por ser la persona que me abrió la puertas para que me iniciara en este camino tan lindo. Por confiar en mi desde primer momento, por tu alegría y cariño!!

A Connie, mi compañera de trabajo, mi referente, mi amiga. Gracias por todo tu tiempo, tu dedicación y tu ayuda constante no solo en la corrección de esta tesis sino en el aquí y ahora. Por animarme y aconsejarme en esos momentos en los que me ahogaba en un vaso de agua y pensaba que no podía seguir. Por los viajes compartidos, muestreos exitosos y fallidos, mates, risas, por hacer de nuestro trabajo algo especial. Te quiero Connie!

A Anita por todos los momentos hermosos que compartimos, horas de laboratorio, charlas, viajes siempre lleno de risas y alegría. Por tu ayuda y por tener siempre esa palabra justa para calmarme y hacerme ver que todo es más simple y sencillo.

A Mati y Gime por brindarme desinteresadamente su ayuda en todo, por abrirme las puertas de su casa, por acompañarme a todos los muestreos, por esta linda amistad que formamos en estos cinco años. Gracias Mati por tu paciencia, por aguantar mis mensajes y llamados constantes preguntando... ¿¿Entró el barco??.

Al grupo CONDROS, en especial a Marina por su ayuda en los muestreos, por su buena onda y alegría.

Al Dr. Daniel Tanzola, por su calidez, ayuda y dedicación en la identificación de *Anisakis sp.*

Al Lic. Ricardo Camina por su ayuda y asesoramiento en el análisis de los datos.

A las chicas de microscopía electrónica por su tiempo y buena onda.

A mi Papá Néstor, por su apoyo continuo, por confiar en mí y estar siempre dispuesto ayudarme y acompañarme a los viajes “biológicos”.

A mi Mamá Mercedes, por esa visión de madre y maestra que en conjunto me enseñaron lo que es el esfuerzo y la voluntad.

A mi hermana Vico, por el cariño que compartimos y por animarme siempre con esas cosas que solo a las dos nos hacen reír. Te quiero hermanita mala onda!!

A mi abuela Dolly, por su fortaleza y alegría. Gracias por haberme enseñado tantas cosas lindas y ser tan especial para mí.

Al taller Ayen Lihué por ser mi cable a tierra en donde aprendo, disfruto y creo cosas hermosas. Gracias Clau por ser tan divina y enseñarme tanto!!

A Flori, que decirte amiga!!! Gracias por estar siempre en todos los momentos de mi vida...lindos y no tan lindos. Por haber sido uno de los pilares en un momento muy difícil. Gracias por tu energía, tus risas, tu forma de ser... te adoro!!

A Sole mi amiga mi hermana, por haber crecido juntas y haber vivido tantas cosas. Por nuestras charlas que tan bien me hacen y por sobre todo, por esa personita que trajiste al mundo que lleno de alegría mi vida...Juanita mi ahijada.

A Pao mi amiga, por levantarme el ánimo siempre con su manera de ser y sus risas, por conocerme tanto y saber cómo sacarme una sonrisa. Te quiero Pao!

Al grupo de amigos con el que crecí: Silver, Maxi, Ariel, Pao, Sole y al grupo de amigos hermanos: Uri, Moni y Stephi.

A las súper biólogas Andre; Ritu y Carli. Gracias chicas por los momentos tan lindos que pasamos cuando estamos las cuatro juntas!!!

A Flor, Mau, Emmita y Joaco por llenar de alegría mis días!

A Mirta, Nati y Germán tres personas hermosas que conocí en estos últimos años y que siempre estuvieron pendientes de mí apoyándome en esta etapa, haciéndome olvidar de mis problemas. Gracias por hacerme reír y llenar de música mi vida.

A Javi “cartucho” porque sin su ayuda la impresión de esta tesis no hubiera sido posible.

Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo en todo este camino recorrido, a los que estuvieron y ya no están, a los que siempre están y a las nuevas personas que en este tiempo llegaron a mi vida para hacerla más linda!

Gracias!!



## **ÍNDICE**

Resumen.....	I
Abstract.....	IV

### **Capítulo I: Introducción General**

I.1. Ubicación Sistemática y Características Generales.....	01
I.2. Descripción general de las especies en estudio.....	03
- <i>Atlantoraja platana</i> .....	03
- <i>Sympterygia bonapartii</i> .....	05
I.3. Adaptaciones Reproductivas.....	06
I.4. Explotación pesquera de los Condrictios.....	11
I.5. Objetivos y relevancia del presente trabajo.....	13
Láminas.....	15

### **Capítulo II: Materiales y Métodos**

II.1: Descripción del área de estudio.....	18
<i>Recursos ícticos demersales del Golfo San Matías</i> .....	19
<i>Condrictios del golfo San Matías</i> .....	20
II.2: Muestreos.....	21
II.2.1: Origen y procedencia de las muestras.....	22
II.2.2: Determinación del estadio de madurez.....	22
II.3: Procesamiento microscópico.....	24
II.3.1: Microscopía óptica.....	24
I.3.2: Cortes semifinos y microscopía electrónica.....	26
II.4: Aspectos relacionados a la biología reproductiva.....	26
Láminas.....	27

### **Capítulo III: Sistema genital femenino de *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii*.**

#### **III.1: Ovario**

III.1.1: Introducción.....	32
----------------------------	----

III.1.2: Materiales y métodos.....	34
III.1.2.1: Recuento y medición de folículos a nivel Macroscópico.....	35
III.1.2.2: Análisis microscópico: foliculogénesis y morfometría.....	35
III.1.3: Resultados.....	36
III.1.3.1 Descripción macroscópica de los ovarios de <i>A. platana</i> .....	36
III.1.3.2 Medición de folículos a nivel macroscópico de <i>A. platana</i> y <i>S. bonapartii</i> .....	37
III.1.3.3 Descripción microscópica de los ovarios de <i>A. platana</i> .....	38
Generalidades.....	38
Ovogénesis y foliculogénesis.....	39
I    II.1.3.2: Microanatomía ovárica de <i>A. platana</i> .....	42
III.1.4 Discusión.....	44
Láminas.....	54
<b>III.2: Oviducto anterior y Glándula oviductal</b>	
III.2.1: Introducción.....	62
III.2.2: Materiales y métodos.....	65
III.2.3: Resultados.....	65
III.2.3.1 <i>Oviducto anterior</i> .....	65
III.2.3.2 <i>Glándula oviductal</i> .....	66
<i>Descripción macroscópica</i> .....	66
<i>Descripción microscópica</i> .....	67
<i>Zona Club</i> .....	67
<i>Zona Papillary</i> .....	67
<i>Zona Baffle</i> .....	68

<i>Zona terminal</i> .....	68
III.2.3.3 <i>Cápsulas</i> .....	69
III.2.3.4 <i>Reserva espermática</i> .....	69
III.2.3.5 <i>Frotis</i> .....	70
III.2.4 <i>Discusión</i> .....	71
Láminas.....	80

## **Capítulo IV: sistema genital masculino de *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii***

### **IV.1: Testículo**

IV.1.1: <i>Introducción</i> .....	88
IV.1.2: <i>Materiales y métodos</i> .....	91
IV.1.3: <i>Resultados</i> .....	94
IV.1.3.1: <i>Estructura macroscópica del sistema</i> <i>Reproductor masculino</i> .....	94
IV.1.3.2: <i>Estructura microscópica</i> <i>de los testículos</i> .....	95
<i>Generalidades</i> .....	95
<i>Espermatogénesis y espermiogénesis</i> .....	96
<i>Análisis histomorfométrico</i> .....	100
IV.1.4: <i>Discusión</i> .....	101
Láminas.....	109

### **IV.2: Conductos genitales**

IV.2.1: <i>Introducción</i> .....	121
IV.2.2: <i>Materiales y métodos</i> .....	123
IV.2.3: <i>Resultados</i> .....	123

IV.2.3.1: Estructura y organización macroscópica de los conductos genitales en machos de ambas especies.....	123
IV.2.3.2: Estructura y organización microscópica de los conductos genitales en machos de ambas especies.....	124
IV.2.3.3 Larva L <sub>3</sub> de <i>Anisakis sp.</i> .....	126
IV.2.4: Discusión.....	128
Láminas.....	134
<b>Capítulo V: Indicadores relacionados con la biología reproductiva de <i>Atlantoraja platana</i> y <i>Sympterygia bonapartii</i>.</b>	
V.1: Introducción.....	139
V.2.: Materiales y métodos.....	140
V.3: Resultados.....	141
- <i>Atlantoraja platana</i> .....	141
- <i>Sympterygia bonapartii</i> .....	143
V.4 Discusión.....	145
Láminas.....	151
<b>Capítulo VI: Conclusiones Generales.....</b>	<b>159</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>167</b>

## **RESÚMEN**

Los Condrictios son uno de los grupos marinos más vulnerables, con un número creciente de especies listadas “en peligro” o “amenazadas”. La declinación y el colapso global de los stocks pesqueros, debido a la sobreexplotación, va en aumento, con muchas especies cercanas a la extinción. La susceptibilidad de los peces cartilaginosos a la sobrepesca está dada por su bajo potencial de recuperación, debido a la baja fecundidad y crecimiento lento. Es fundamental conocer y comprender su biología reproductiva, para la conservación y manejo de este recurso.

En este trabajo se estudió la morfología del sistema reproductor femenino y masculino de *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii* del golfo San Matías, junto con algunos indicadores biológicos relacionados con la reproducción.

El material analizado se obtuvo de muestreos mensuales de las capturas desembarcadas por los barcos pesqueros de la flota local de San Antonio Oeste (SAO) y San Antonio Este (SAE).

Los animales se clasificaron según su estado de madurez en: inmaduros, en maduración y maduros, siguiendo los criterios propuestos por Stehmann (2002).

Las gónadas de ambas especies y de ambos sexos presentan una íntima asociación con el órgano epigonal (órgano linfomieloide, exclusivo de los peces cartilaginosos).

En *A. platana* se analizó la foliculogénesis ovárica. En los ovarios de hembras adultas se registraron folículos en diferentes etapas de desarrollo. Las

ovogonias, solo se hallaron en ejemplares inmaduros. Histológicamente las etapas del desarrollo folicular, se caracterizan por la presencia de vitelo, el número de capas y tipos de células foliculares y el grado de desarrollo de las tecas. Se determinó la talla microscópica de inicio de vitelogénesis para ambas especies, las cuales son menores a las registradas macroscópicamente.

Los testículos de ambas especies, presentan un modelo de desarrollo testicular compuesto. Los espermatozoides son de forma redondeada y cada uno contiene células germinales en un mismo estadio de desarrollo. En la espermatogénesis de ejemplares adultos se describen 7 estadios bien diferenciados, que abarcan la transformación de espermatogonias en espermatozoides. En juveniles no se han encontrado cistos con espermátides o con espermatozoides. En ejemplares inmaduros se observan solamente cistos con espermatogonias y espermatozoides primarios.

El sistema de conductos genitales femeninos y masculinos de ambas especies, es semejante al observado en otros Rájididos. El diseño funcional de las glándulas oviductales es similar al de otras especies ovíparas y la complejidad estructural de las distintas zonas está relacionada con la función secretora de los diferentes componentes de la cápsula. Se registró la presencia de espermatozoides en ambas especies en distintas estaciones del año, aunque sin evidencia de almacenamiento espermático.

En las dos especies analizadas, los espermatozoides cambian el estado de agrupamiento a lo largo del trayecto por los epidídimos, conductos deferentes y vesículas seminales, dando como resultado final un agrupamiento denominado *espermatozeugmata*.

Se analizaron indicadores relacionados con su biología reproductiva. En ambas especies, se determinó la talla de primera madurez sexual, los índices gonadosomático y hepatosomático, como así también la distribución folicular a lo largo de las estaciones del año, con el fin de relacionarlo con los análisis microanatómicos realizados. En los machos se analizó, estacionalmente, el porcentaje de cobertura de cada estadio espermatogénico.

En los últimos años, los análisis histológicos han sido muy importantes en los estudios reproductivos de peces, permitiendo mejorar la eficacia en el manejo de estos recursos. Los estudios microscópicos y macroscópicos realizados en este trabajo, proporcionan no sólo información más exacta sobre la morfología y dinámica de las gónadas masculinas y femeninas, sino también ha demostrado ser un enfoque complementario que puede contribuir a un mejor conocimiento y cuidado de estas especies de interés comercial.

## **ABSTRACT**

Chondrichthyes are one of the most vulnerable marine groups, with an increasing number of species listed as "endangered" or "threatened". The decline and global collapse of fishing stocks due to overexploitation is increasing, with many species being close to extinction. The high susceptibility of cartilaginous fishes to overfishing is given by its low recovery potential due to a low fecundity and low growth rates. It is crucial to know and understand its reproductive biology for an appropriate conservation and management of this resource.

In this work, the morphology of the females and males reproductive system of *Atlantoraja platana* and *Sympterygia bonapartii* from San Matias Gulf was studied along with some biological indicators related to reproduction.

The analyzed material was obtained from monthly samplings of the catches landed from the fishing boats of the local San Antonio Oeste and San Antonio Este fleets.

Animals were classified according to its maturational state in: immature, maturing and mature, following the Sthemann (2002) criteria.

Gonads from both species and sexes are intimately associated to the epigonal organ (lymphomyeloid organ, exclusive of cartilaginous fishes).

In *Atlantoraja platana* the ovarian folliculogenesis was analyzed. In the ovaries of adult females, follicles in different stages of development were recorded. The oogonias were found only in immature specimens. Histologically the stages of follicular development are characterized by the presence of yolk, the number of layers and types of follicular cells and the degree of development of



the thecae. The microscopic size of vitellogenesis onset was determined for both species and it was inferior to that registered macroscopically in both.

Testicles of both species fit to the compound testicular developmental model. Spermatocysts are rounded and each one contains germinal cells in the same stage of development. During the spermatogenesis of adult specimens, seven well defined stages are described, which encompass the transformation of spermatogonia to spermatozoa. In maturing animals, cysts with spermatids or spermatozoa were not formed. On the other hand, immature specimens show only cysts with spermatogonia and primary spermatocytes.

The female's and male's genital ducts system from both species is similar to the observed in other Rajids. Also, the functional design of the oviductal gland is similar to that from other oviparous species. The structural complexity of the different zones of this gland is related to the secretory function of the various components of the egg capsule. The presence of sperm was registered in both species and in different seasons of the year. However, there was no evidence of sperm storage.

On both species, spermatozooids change its aggregation state along the epididymis, deferent ducts and seminal vesicles. As a result, sperm aggregates forming spermatozeugmata.

On the other hand, some biological indicators related to the reproductive biology were analyzed. On both species, the size at first sexual maturity and the gonadosomatic and hepatosomatic indices were determined. Also, the follicular distribution along the sampled seasons was analyzed in order to relate it to the

microanatomical studies performed. Also, the coverage of each spermatogenic stage was analyzed seasonally for the males of both species.

In the last years, histological analyses have been relevant in reproductive studies of fishes, improving the efficiency in the management of these resources. The microscopical and macroscopic analyzes performed on this work, provide a more accurate information about the morphology and dynamics of the female's and male's gonads, and also has proved to be a complementary approach that could contribute to a better knowledge and care of this species of commercial interest.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1: UBICACIÓN SISTEMÁTICA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

La clase Chondrichthyes agrupa a peces gnatostomados caracterizados por presentar un esqueleto cartilaginoso, dientes duros y mandíbulas bien desarrolladas (Benson *et. al.*, 2001). La mayor parte de las especies son de hábitos marinos, altamente especializados y han demostrado tener un desarrollo evolutivo exitoso. Su presencia se registra desde el Silúrico tardío o principios del Devónico, hace aproximadamente 400 millones de años, hasta la actualidad (Wourms y Demski, 1993; Grogan y Lund, 2004). Dos características importantes contribuyeron al éxito evolutivo del grupo: por un lado, la transformación del primer arco branquial para dar origen a las mandíbulas, lo cual permitió una mayor eficiencia en la obtención de alimento; por otro lado, el desarrollo de la reproducción interna. Este modo reproductivo, produce embriones a término que cuando emergen, ya sea por parición en especies vivíparas o por eclosión en ovíparos, se encuentran adaptados al ambiente externo y son capaces de alimentarse por sus propios medios (Gallegó Castejón, 2006; Long *et. al.*, 2009).

La clase Chondrichthyes comprende dos subclases, Holocephali (quimeras y peces gallo) y Elasmobranchii (tiburones y rayas). Los elasmobranquios se agrupan en la división Neoselachii, que incluye a la subdivisión Selacoidea, la cual comprende 9 ordenes, 34 familias, 106 géneros y 403 especies de tiburones (Compagno, 2005; Nelson, 2006) y a la subdivisión Batoidea (rayas y chuchos), que es el grupo más numeroso, con alrededor de 574 especies descritas (Ebert y Compagno, 2007).

Los peces batoideos presentan el cuerpo comprimido dorso-ventralmente, constituido por un disco y una cola. El disco está formado por la fusión de las aletas pectorales a los lados de la cabeza y se extiende desde la punta del hocico hasta la cloaca. Los ojos son siempre dorsales y próximos a los espiráculos. En la superficie ventral del disco se encuentran de adelante hacia atrás: las narinas, la boca, las hendiduras branquiales y la cloaca (Fig. I.1). Están presentes en todos los mares del mundo y se distribuyen desde la zona pelágica hasta las zonas bentónicas y desde la línea de costa hasta los 3000 m de profundidad. La mayoría de las especies son de hábitat marino, aunque existen especies que habitan zonas estuariales y ambientes dulciacuícolas (Cousseau *et. al.*, 2007).

Desde el punto de vista sistemático, los batoideos son considerados un grupo monofilético (Bone y Moore, 2008). Sin embargo, a nivel de órdenes y familias, las clasificaciones varían según los autores (McEachran y Aschlimann, 2004; Compagno, 2005; Nelson, 2006; Menni y Lucifora, 2007). En este trabajo se utilizará la clasificación propuesta por McEachran y Aschlimann (2004) que divide a este grupo en cuatro órdenes: Torpediniformes (rayas eléctricas); Pristiformes (rayas sierra); Rajiformes (rayas) y Myliobatiformes (chuchos y rayas águila). Los órdenes Rajiformes y Myliobatiformes son los más numerosos, con aproximadamente 280 y 183 especies respectivamente. La familia Rajidae es la más numerosa y comprende 27 géneros con alrededor de 250 especies. La mayoría de los Rájidos son marinos, a excepción de algunas especies del género *Raja* que habitan aguas continentales (Last y Stevens, 1994; McEachran y Dunn, 1998). Sin embargo, aunque el grupo tiene una diversidad específica alta, las rayas presentan una morfología corporal conservada, que

presenta adaptaciones a hábitats bentónicos, en especial a fondos blandos (McEachran y Dunn, 1998; Ebert y Compagno, 2007).

## I.2: DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

### ***Atlantoraja platana***

El género *Atlantoraja* (Menni, 1972) comprende 3 especies: *A. castelnaui* (n.v.: raya moteada) (Ribeiro, 1970), *A. platana* (n.v.: raya oscura, raya platana) (Günther, 1880) y *A. cyclophora* (n.v.: raya ojona, raya de círculos) (Regan, 1902). Todas son especies endémicas del Océano Atlántico Sudoccidental (ASO).

La especie en estudio, *A. platana*, habita desde los 20° S en Espírito Santo en Brasil (Sadowsky y Menni, 1974; Casarini, 2006) hasta los 42° S en el golfo San Matías en Argentina (Zaro, 1979). En el sur de Brasil fue reportada entre los 19 y 231 m de profundidad (Sadowsky y Menni, 1974; Vooren, 1998; Marçal, 2003). En Argentina, su presencia ha sido registrada de manera permanente en la pesquería de arrastre de pequeña escala del golfo San Matías, siendo una de las rayas más desembarcadas por las flotas locales (Perier *et. al.*, 2003; Estalles *et. al.*, 2011; Coller, 2012). La especie está incluida en la categoría de "vulnerable" en la Lista Roja de Especies Amenazadas elaborada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016).

La raya platana presenta un cuerpo de forma romboidal. El dorso es de color marrón oscuro, más acentuado en el borde de las aletas pectorales y la cola, la cual presenta una hilera de espinas. La aleta caudal y las dos aletas

dorsales están bien desarrolladas (Fig. 1.2 a y b). En la zona nucal presenta series bilaterales (6 a 9) de poros mucosos, negros, muy marcados, en forma de "c" (Sadowsky y Menni, 1974) (Fig. 1.3). Poseen un cartílago rostral translúcido y en algunos ejemplares, puede observarse una mancha u ocelo difuso en cada una de las aletas pectorales. En ambos sexos, la faz ventral es de color grisácea a blanquecina, con una gran cantidad de poros mucosos de color negro dispuestos alrededor de la boca y las hendiduras branquiales y en la zona abdominal (Fig. 1.4).

Los machos exhiben órganos copuladores (mixopterigios, agarraderas pélvicas o *claspers*) largos y finos y una serie variable de espinas cerca de los márgenes de las aletas pectorales (McEachman y Dunn, 1998; Coller 2012) (Figs. 1.5). En los ejemplares adultos puede observarse una gran cantidad de espinas dorsales en la región del hocico (Fig. 1.6).

Las hembras son ovíparas. Desarrollan cápsulas coriáceas aproximadamente cuadrangulares, de color marrón-verdoso brillante, con proyecciones largas (cuernos) en cada uno de los ángulos. Los cuernos posteriores son más largos que los anteriores.

Es una especie de hábitos tróficos epibentónicos, con tendencia a la carcinofagia. Los langostinos (*Pleoticus mullieri*) y los estomatópodos (por ejemplo, *Pterygosquilla armata armata*) son las presas más consumidas, tanto por los juveniles como por los adultos de ambos sexos (Coller, 2012).

### ***Sympterygia bonapartii***

El género *Sympterygia* comprende 4 especies: *S. brevicaudata* (n.v.: raya costera del Norte) (Cope, 1877); *S. lima* (n.v.: raya costera chilena) (Poepping, 1835); *S. bonapartii* (n.v.: raya marmorada) (Müller y Henle, 1841) y *S. acuta* (n.v.: raya hocicuda) (Garman, 1877). Las dos primeras especies sólo se encuentran en el Océano Pacífico. *S. bonapartii* y *S. acuta* son endémicas del Océano Atlántico Sur (Figueiredo, 1977; McEachran y Aschliman, 2004) y representan un recurso económico importante en toda su área de distribución (Menni y Stehmann, 2000; Mabragaña *et. al.*, 2002; Paesch y Domingo, 2003).

La especie en estudio, *S. bonapartii*, se distribuye de forma continua desde los 23° S (Rio de Janeiro, Brasil) hasta los 54° S (Santa Cruz, Argentina) siendo habitual en el golfo San Matías (41°-42° S; 64°-65°O) (Figueiredo, 1977; Sánchez y Mabragaña, 2002; Perier *et. al.*, 2011; Estalles *et. al.*, 2016). Es una raya costera y se encuentra hasta los 100 m de profundidad (Menni y Stehmann, 2000; Cousseau *et. al.*, 2007). Las concentraciones mayores de esta especie se han reportado en zonas externas de estuarios y marismas (Mabragaña *et. al.*, 2002; Cousseau *et. al.*, 2007). En el área de estudio del presente trabajo, la raya marmorada es abundante y se ubica en rangos de profundidades mayores a los precisados anteriormente.

*S. bonapartii* está incluida en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN, 2016) en la categoría de "Datos Insuficientes para su Evaluación", lo cual sugiere que se requieren más estudios sobre diferentes aspectos de su historia de vida. La especie se reconoce por poseer el borde anterior del disco más o menos recto y espinulado, con el extremo anterior aguzado. La

coloración del dorso es castaño oscuro, con manchas marmóreas más oscuras y con una mancha negra en forma de reloj de arena en el hocico (Fig. 1.7a).

La faz ventral es blanca y el extremo de la cola, negro (Fig. 1.7b).

Los machos presentan *claspers* largos y robustos (Fig. 1.7b). Las hembras son ovíparas y ponen cápsulas coriáceas de color marrón verdoso, con proyecciones en los cuatro extremos, siendo las posteriores mayores que las anteriores. Estas ovotecas son similares a los de *A. platana* (Cousseau *et. al.*, 2007).

El régimen alimentario es carcinófago. Sus principales presas son cangrejos, en primer lugar y teleósteos en segundo plano. Asimismo consume bivalvos, cefalópodos (pulpo, calamarete) y otros invertebrados (ascidias, poliquetos) (Cousseau y Perrota, 2004; Estalles *et. al.*, 2016).

### **I.3: ADAPTACIONES REPRODUCTIVAS**

El sistema genital de los peces cartilaginosos está adaptado para la fecundación interna, la cual requiere de especializaciones morfofuncionales variadas, tanto en machos como en hembras. La transmisión de esperma es facilitada por la introducción de los *claspers* en el seno urogenital de la hembra, presentando un comportamiento complejo de cópula (Carrier *et. al.*, 1994; Pratt y Carrier, 2001; Piercy *et. al.*, 2003; Jones *et. al.*, 2005; Long *et. al.*, 2009). La microarquitectura de los órganos reproductores, juega un papel crítico que influye en el éxito reproductivo de los Condriictios. La evolución de la fertilización interna y la retención de los huevos, podían haber sido un requisito previo al viviparismo (Blackburn, 2005; Awruch, 2015).



Teniendo en cuenta que la mayoría de los Condrictios son longevos, de crecimiento lento, edad de primera madurez sexual tardía y baja fecundidad (Camhi *et. al.*, 1998; Dulvy *et. al.*, 2014; Awruch, 2015), la fertilización interna asegura el encuentro de las gametas, aumentando las oportunidades de éxito reproductivo. Los peces óseos, por su parte, muestran un modelo reproductivo diferente, donde la fecundación en el medio acuático, se ve compensada por la producción de grandes cantidades de gametas (Bone y Moore, 2008).

Los órganos internos del sistema genital masculino de estos animales incluyen un par de testículos, conductos genitales pares (conducto eferente, conducto epididimario, conducto deferente) y glándulas anexas: vesículas seminales, glándulas de Leydig y glándulas alcalinas. Esta última solo se encuentra presente en rayas (Hamlett, 1999; Walker, 2005). Externamente, presentan un par de *claspers*, los cuales están asociados a las glándulas homónimas. Tanto el semen como la secreción de las glándulas son transferidos a la cloaca de la hembra durante la cópula (Jones y Lin, 1993), a través del conducto longitudinal del *clasper*.

Los órganos internos del sistema genital femenino constan de uno o dos ovarios funcionales, según la especie, uno o dos *ostium*, dos oviductos anteriores, dos glándulas oviductales o nidamentales y dos úteros, que desembocan en un único seno urogenital (Hamlett y Kobb, 1999).

El órgano epigonal es un órgano linfomieloide exclusivo del grupo y presenta una asociación estrecha con las gónadas de ambos sexos (Galíndez y Aggio 2002; Lutton y Callard, 2007).

Los peces cartilaginosos exhiben una gran diversidad de modos reproductivos, que van desde la oviparidad a la viviparidad, placentaria o aplacentaria (Compagno, 1990; Musick y Ellis, 2005; Awruch, 2015). Basándose en la fuente de nutrición que utiliza el embrión en desarrollo, se puede agrupar a las especies en lecitotróficas y matrotroóficas.

Aproximadamente el 42% de los elasmobranquios son ovíparos (Compagno, 1990; Dulvy y Reynolds, 1997). Éste es un modelo reproductivo lecitotrófico, donde el desarrollo es sustentado por el vitelo almacenado en el huevo, sin ningún otro aporte materno durante la embriogénesis (Hamlett y Koob, 1999). Las especies ovíparas, se caracterizan por la producción de huevos relativamente grandes, que una vez fecundados son envueltos por una cápsula coriácea y depositados en el medio externo, donde se produce el desarrollo embrionario (Wourms, 1977; Blackburn, 2005). Existen dos tipos de oviparidad: simple (externa) y múltiple (retenida) (Compagno, 1990; Musick y Ellis, 2005; Awruch, 2015).

En la simple o externa, las cápsulas son liberadas al medio y el embrión completa su desarrollo en el interior de la misma, consumiendo los nutrientes acumulados. La cría resultante, emerge totalmente desarrollada y con la apariencia de un adulto en miniatura (Hamlett y Koob 1999; Musick y Ellis, 2005). Entre los elasmobranquios, el oviparismo está representado solo en cuatro familias (Heterodontidae, Scyliorhinidae, Hemiscylliidae y Rajidae) (Compagno, 1999; Musick y Ellis, 2005; Luer *et. al.*, 2007). *A. platana* y *S. bonapartii* constituyen un ejemplo de este modo reproductivo (Oddone y Velasco, 2004; Oddone y Amorin, 2008).

Por otra parte, la oviparidad múltiple o retenida, se caracteriza por la retención de las cápsulas en el tracto genital femenino. Los huevos eclosionan antes de la puesta (Wourms y Demski, 1993). Esta modalidad se presenta en nueve especies de Charchariniformes: cinco del género *Halaelurus* (Francis, 2006), dos del género *Galeus* (Compagno, 2005), una especie de la familia Proscyllidae, (Dodd y Dodd, 1986) y una especie Orectolobiforme (Goto, 2001; Musick y Ellis 2005).

El viviparismo, por su parte, es un modo reproductivo altamente exitoso que se encuentra en el 58% de los elasmobranquios (Wourms, 1981; Compagno 1990). En todas las especies de elasmobranquios vivíparas, la embriogénesis se lleva a cabo en el interior del cuerpo materno. Inicialmente, el embrión se aloja en una cápsula secretada por la glándula oviductal que se ubica en el útero, donde los fetos continúan su desarrollo. Finalmente, en la parición, surgen individuos de vida libre (Wourms *et. al.*, 1981). Estas especies pueden sostener la gestación en forma tanto lecitotrófica como matrotrófica, con o sin formación de placenta (Compagno, 1990; Musick y Ellis, 2005; Mc Millan, 2007; Awruch, 2015; Galíndez, 2016).

En el matrotrofismo, el desarrollo embrionario, o al menos parte del mismo, es suplementado por aportes nutricionales de la madre (Compagno, 1990; Wourms y Demski, 1993; Hamlett y Koob, 1999; Musick y Ellis, 2005; Mc Millan, 2007; Awruch, 2015). Esta adaptación se presenta de distintas formas:

- **Histotrofismo** (secreciones uterinas): los embriones reciben nutrientes derivados de los tejidos de la madre (Hamlett *et. al*, 2005b; Musick y Ellis, 2005). Esta adaptación implica la formación de pliegues

de la mucosa uterina (*trophonemata*), que producen una sustancia rica en lípidos y proteínas denominada histotrofo ("leche uterina"). Este modo reproductivo es característico de los Myliobatiformes, como *Myliobatis goodei* (Colonello *et. al.*, 2013) y de, al menos, un Rajiforme, *Dasyatis americana* (Hamlett *et. al.*, 1996).

- **Oofagia** (ovocitos anembrionados): en esta modalidad, una vez agotado el contenido del saco vitelino, los embriones se alimentan de otros ovocitos ovulados. Esta adaptación es característica de los Lamniformes, por ejemplo *Lamna ditropis* (Gallucci *et. al.*, 2008).
- **Adelfofagia** (embriones con desarrollo detenido): es una modificación de la oofagia, donde los embriones más desarrollados se alimentan de huevos anembrionados y de embriones cuyo desarrollo está detenido. Una adaptación extrema a este modelo se da en *Carcharias taurus*, (canibalismo intrauterino o adelfofagia) (Gilmore *et. al.*, 1993).
- **Placentotróficas** (formación de una pseudoplacenta): se desarrolla una pseudoplacenta a partir de la unión del saco vitelino (ya sin reservas) y las paredes uterinas. Los embriones se alimentan de secreciones producidas por la hembra (Musick y Ellis, 2005). Este tipo de viviparidad placentaria se encuentra en cinco familias de tiburones Carcharhiniformes, por ejemplo *Sphyrna lewini* (Compagno, 1990).
- **Matrotrofismo parcial**: el aporte nutricional materno es absorbido por el embrión a través de la cápsula que lo envuelve, la cual se encuentra yuxtapuesta a la mucosa uterina. Ejemplos de esta modalidad son: *Mustelus antarticus* (Storrie *et. al.*, 2009) y *M. schmitti* (Galíndez *et. al.*, 2014).

Esta serie de estrategias reproductivas se reflejan en los ciclos de vida, los cuales son regulados por una combinación de variables fisiológicas y biológicas que aseguran que la puesta se produzca en un ambiente favorable para la supervivencia (Bromage *et. al.*, 2001; Pankhurst y Porter, 2003).

#### **I.4: EXPLOTACIÓN PESQUERA DE LOS CONDRICTIOS**

Las pesquerías de Condrictios se han extendido en tamaño e importancia en respuesta a la disminución de los stocks (McCauley *et. al.*, 2015). Consecuentemente, las poblaciones de tiburones, rayas y holocéfalos exhiben actualmente su mayor tasa de reducción histórica a causa de la pesca, en cualquiera de sus formas (arrastre, pelágicas, artesanales y/o recreativas) (Bonfil, 1994; Stevens *et. al.*, 2000). Las capturas de Condrictios no se encuentran, en su mayor parte, reguladas y los registros de captura, cuando existen, están incompletos o son generalizados. Se estima que el 50% de la captura global de peces cartilaginosos, considerada como *by-catch*, no es registrada en las estadísticas pesqueras oficiales y no existen medidas de manejo adecuadas para estas especies (Compagno, 1990; Stevens *et. al.*, 2000; Musick y Musick, 2011).

Las capturas mundiales de Condrictios muestran una tendencia creciente hasta el año 2003. En el año 1950, la captura fue de 270.000 t y los máximos alcanzados se produjeron en el año 2003, con aproximadamente 900.000 t. Durante el último periodo reportado, entre el 2003 y 2012, se produjo un descenso de alrededor de 200.000 t (FAO, 2014). Sin embargo, las estimaciones realizadas indican que los desembarques podrían duplicarse si se considera la pesca ilegal, no declarada ni reglamentada (Bonfil, 1994; Field *et. al.*, 2009).

Por otra parte, deben también considerarse los ejemplares que mueren al ser descartados, debido a las prácticas post-captura o por no alcanzar la talla "económicamente viable" (Field *et. al.*, 2009).

Uno de los factores principales del incremento en la captura de Condriictios es la fuerte demanda del mercado, debido a la amplia gama de productos que se extraen de ellos: carne, aletas, piel y dientes, cartílago, aceites, entre otros (Bonfil, 1994; Vannuccini, 1999; Musick y Ellis, 2005).

Argentina es uno de los países donde se desembarcan más Condriictios (gatuzo (*M. schmittii*), pez ángel (*Squatina sp.*) y pez gallo (*Callorhynchus callorhynchus*) (FAO, 2014) y ocupa el tercer lugar entre los que desembarcan rayas (Familia Rajidae, Bernasconi y Navarro, 2014). Cabe destacar que estas especies reflejan un ritmo creciente de capturas en las estadísticas nacionales, desde que se inició su aprovechamiento comercial en el año 1996 (Massa y Hozbor, 2003; Massa *et. al.*, 2007).

Los efectos de la pesca sobre las poblaciones y la ausencia de pautas de manejo para la mayoría de las especies, llevaron a la FAO a elaborar un plan de acción de manejo de estas especies a nivel mundial. En la Argentina, el Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de Condriictios (PAN-TIBURONES), tiene el objetivo de garantizar la conservación y la explotación sustentable de estos peces, instando a los participantes a "profundizar el conocimiento de las pesquerías de Condriictios y otras pesquerías que afecten a estas especies".

La vulnerabilidad de los peces cartilaginosos a la explotación pesquera radica, en gran parte, en sus adaptaciones reproductivas las cuales, paradójicamente, contribuyeron en parte a la supervivencia a lo largo de más de 400 millones de años. Si a esto se suma el incremento en las capturas y la escasez de medidas de manejo, es posible llegar a disminuciones drásticas en las poblaciones e incluso a extinciones locales (Stevens *et. al.*, 2000; Ward-Paige *et. al.*, 2012; Mc Clenachan *et. al.*, 2016).

## **I.5: OBJETIVOS Y RELEVANCIA DEL PRESENTE TRABAJO**

El plan de trabajo propuesto pretende brindar información, tanto biológica como morfológica, de dos especies comercialmente importantes del golfo San Matías: *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii*. El conocimiento morfofuncional y de la biología reproductiva de ambas especies, procura brindar información necesaria para el diseño de políticas de manejo del recurso en forma sustentable y se inserta, claramente, dentro de los objetivos establecidos para el PAN-TIBURONES de Argentina.

### **OBJETIVOS GENERALES**

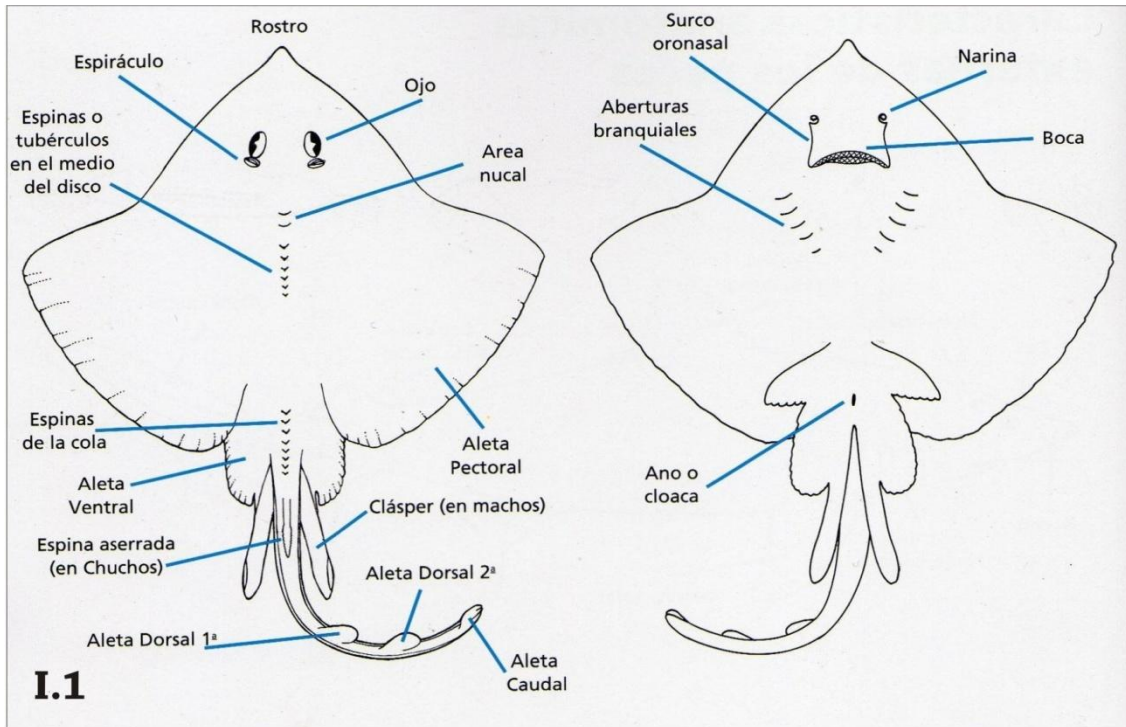
- Analizar y comparar aspectos biológicos y morfológicos del ciclo reproductivo de dos especies de Condriactios: *S. bonapartii* y *A. platana*, del golfo San Matías (Río Negro).

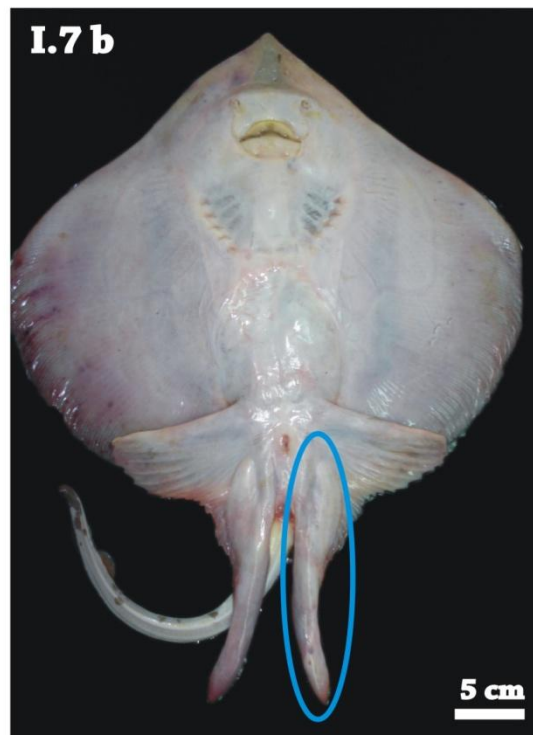
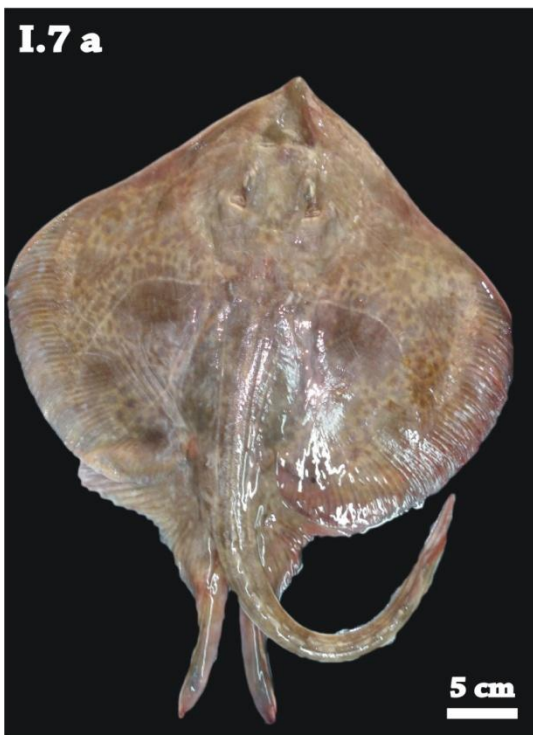
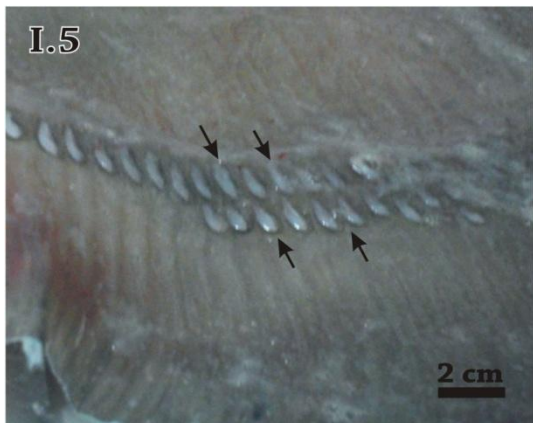
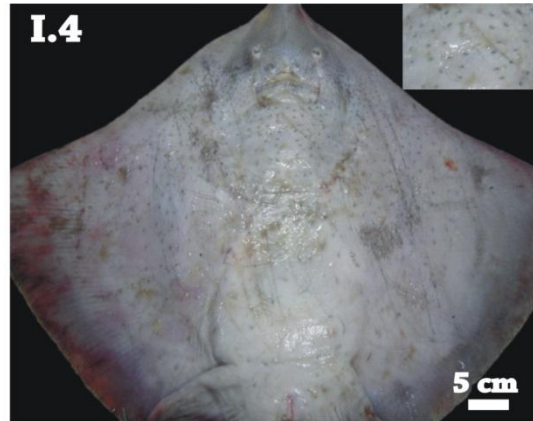
## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los estadios de madurez de machos y hembras de *S. bonapartii* y *A. platana* mediante el análisis morfométrico y el aspecto macroscópico del tracto genital.
- Analizar la estructura histológica del testículo y del ovario en cada estadio madurativo, para verificar la escala macroscópica de madurez.
- Determinar y cuantificar las variaciones temporales de la espermatogénesis y la producción de óvulos, a lo largo del ciclo reproductivo.
- Relacionar los resultados obtenidos histológicamente con diferentes índices de actividad reproductiva, para evaluar su concordancia.
- Determinar la fluctuación temporal de esperma en el tracto reproductor femenino (cloaca y glándula oviductal).
- Determinar la existencia de almacenamiento espermático en el epidídimo y/o la vesícula seminal.
- Determinar el período del año en el que se concentra la actividad reproductiva principal de cada especie.



# Láminas





**Figura I.1:** Características generales de los Rájidos (Cousseau y Perrota, 2004).

**Figura I.2:** *Atlantoraja platana*: a) vista dorsal b) vista ventral.

**Figura I.3:** Detalle de los poros mucosos dorsales de *A. platana*.

**Figura I.4:** Vista general de la distribución de los poros mucosos en la faz ventral de un ejemplar adulto de *A. platana*. **Inserto:** Detalle de los poros mucosos ventrales.

**Figura I.5:** Detalle de las hileras de espinas alares en los márgenes de las aletas pectorales de un macho maduro de *A. platana*.

**Figura I.6:** Detalle de las espinas dorsales en el hocico de un macho maduro de *A. platana*.

**Figura I.7:** *Sympterygia bonapartii*: a) vista dorsal b) vista ventral.

**Referencias:** círculo rojo: poros mucosos; flechas rojas: espiráculos; flechas negras: espinas alares; óvalo azul: clasper.

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el área de estudio de donde provienen los ejemplares de *Atlantoraja platana* y de *Sympterygia bonapartii* y se describen los métodos comunes a los restantes capítulos. Las metodologías específicas para cada tema serán abordadas individualmente en cada sección.

### II.1: DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El golfo San Matías (GSM) se encuentra localizado entre los 41° y 42° S y los 64° y 65° O. Es el más extenso de los golfos norpatagónicos (Piola y Scasso, 1988) y es el segundo golfo más grande de Argentina, después del golfo San Jorge. Tiene una superficie de aproximadamente 19.700 km<sup>2</sup> (Mazio y Vara, 1983; Gangliardini y Rivas, 2004; Di Giácomo *et. al.*, 2005) (Fig. II.1).

Se reconoce como un ambiente semicerrado, con temperaturas superficiales entre los 11 y 18 °C y temperaturas de fondo entre los 10,4 y 11,3 °C (Piola y Rivas, 1997; Perier y Di Giácomo, 2002). Está separado de la plataforma continental por un zócalo, con profundidades que promedian los 80 metros y presenta, en su parte central, fondos que rondan los 200 m. Existen depresiones máximas de hasta 219 m (Di Giácomo *et. al.*, 2005).

Hidrográficamente, el golfo revela dos masas de agua que están separadas estacionalmente, por un frente oceanográfico de dirección suroeste-nordeste y divide al mismo en dos zonas. Éstas se corresponden con características de temperatura, salinidad y biota particulares (Piola y Scasso, 1988; Perier y Di Giácomo, 2002). La presencia de este frente ha sido

relacionada con los patrones de distribución y reproducción en algunas especies de peces, como la merluza común, *Merluccius hubbsi*.

La zona costera del golfo (Figs. II.2 y II.3), presenta tres accidentes geográficos destacados: el golfo San José, la bahía San Antonio y la caleta de Los Loros (Di Giácomo *et. al.*, 2005) y está claramente influenciada por la dinámica de las mareas (2 ciclos de mareas diurnos).

El golfo San Matías es considerado un ambiente que ofrece una importante diversidad biológica. Existen comunidades de macro y microalgas, macrófitas, moluscos, crustáceos, peces, aves y mamíferos (Di Giácomo *et. al.*, 2005; Marcos y Mancini, 2012).

La actividad extractiva comprende tanto la pesca artesanal como la industrial. En la pesca artesanal, se incluye a los recolectores costeros, los pescadores con bote y red playera, los pescadores de palangre o espinel y los buzos marisqueros. La pesca industrial se efectúa a través de buques pesqueros que componen una flota local que opera en San Antonio Oeste (SAO) y San Antonio Este (SAE). Históricamente, esta flota utiliza artes de pesca como rastras, redes de arrastre y palangre o espinel.

### **Recursos ícticos demersales del Golfo San Matías**

Dentro de estos recursos, *M. hubbsi* es una de las especies blanco en la pesquería del golfo San Matías y contribuye con más del 60% de la captura desembarcada (Millán, 2010). Existen otros peces óseos que se destacan por su contribución en los desembarques (Perier y Di Giácomo, 2002); estos son: los lenguados *Paralichthys isoceles*, *P. patagonicus* y *Xustreurus rasile*; el mero

*Acantisthius patachonicus*; el abadejo *Genypterus blacodes* y el salmón de mar, *Pseudoperca semifasciata*.

### **Condrictios del golfo San Matías**

En el GSM se han registrado, hasta el presente, 33 especies de peces cartilaginosos, de los cuales 13 corresponden a Selacoideos (tiburones), 19 a Batoideos (rayas) y un Holocéfalo (pez gallo). Las especies de Condrictios con mayor abundancia y frecuencia de ocurrencia están representadas por: *Callorhynchus callorhynchus* (pez gallo, una de las más desembarcadas en el golfo) (Di Giácomo y Perier, 1991; Perier *et. al.*, 2011), *Mustelus schmitti* (gatuzo); *Galeorhinus galeus* (cazón), *Squatina guggenheim* (pez ángel), *Notorynchus cepedianus* (gatopardo), *Carcharhinus brachyurus* (bacota), *Squalus acanthias* (espinillo); *Myliobatis goodei* (chucho), *Discopyge tschudii* (raya eléctrica); *Atlantoraja castelnaui* (raya a lunares); *A. platana* (raya platana); *A. cyclophora* (raya ojona); *Psammobatis lentiginosa* (raya lentiginosa); *Rioraja agassizii* (raya lisa), *Sympterygia bonapartii* (raya marmorada); *S. acuta* (raya picuda), *Zearaja trachyderma* (raya de vientre áspero) y *Z. chilensis* (raya hocicuda).

## II.2: MUESTREOS

### II.2.1: Origen y procedencia de las muestras

El material proveniente del golfo San Matías, fue recolectado durante muestreos mensuales sobre las capturas desembarcadas, provenientes de una pesquería de arrastre de pequeña escala, que tiene como especie blanco a la merluza común, *M. hubbsi* (muestreos de desembarque), durante los años 2012 al 2016. Los muestreos de desembarque se realizaron en dos plantas pesqueras: "Río Salado" (San Antonio Oeste) (Figs. II.4 y II.6) y "Perla del Este" (San Antonio Este) (Fig. II.5 y II.7)

El material procesado se hallaba en buen estado, ya que la flota trabaja con bodegas refrigeradas y además, cada cajón es cubierto con hielo en escamas. El material obtenido en los muestreos de planta (Figs. II.6 y II.7), se utilizó para microscopía óptica. Las muestras que se procesaron para microscopía electrónica de transmisión provinieron de un muestreo especial, realizado en el marco del programa de observadores a bordo (POB) de la provincia de Río Negro (Febrero de 2016) (Figs. II.8 y II.9).

A todos los ejemplares se les registró el largo total, desde la punta del rostro hasta el extremo de la cola (Lt), el ancho del disco, definido como la distancia máxima entre los extremos de las aletas pectorales (Fig. II.10) (Ad); el peso total (Pt), el peso del hígado (Ph) y peso de las gónadas derecha e izquierda (ovarios o testículos) (Pg). Todas las medidas se registraron en centímetros, utilizando un ictiómetro, o en gramos, empleando una balanza digital colgante de 10 gr. de precisión. Por otra parte, en los machos se registró



el número de hileras de espinas alares y se midió el largo de ambos *claspers* (CId) e (CII), en centímetros, iniciando el registro desde su inserción debajo de la aleta pélvica (Compagno, 1984). Asimismo, en las hembras se registró la presencia de cápsulas, se pesó y se midió el ancho y alto de las glándulas oviductales derecha (OGd) e izquierda (OGi) en gramos y milímetros respectivamente. Por último, se realizaron *frotis* cloacales de las hembras maduras, para determinar presencia de esperma.

Durante el año 2013 e inicios de 2014, se modificó la dinámica de la pesquería de arrastre del golfo San Matías, con un cambio de la especie blanco de la pesquería (el langostino, *Pleoticus muelleri*), lo que condujo a un descenso del número de ejemplares estudiados.

### **II.2.2: Determinación del estadio de madurez**

Los estadios de madurez sexual de machos y hembras se determinaron de acuerdo a los criterios propuestos por Sthemann (2002), basados en el aspecto general del sistema reproductivo.

En los **machos** se determinaron 3 estadios de madurez:

- *Estadio I o inmaduros*
- *Estadio II o en maduración*
- *Estadio III o maduros*

Se clasificaron como **inmaduros** a los ejemplares que presentaban testículos poco desarrollados, homogéneos y sin lóbulos distinguibles a simple vista. Los conductos eran delgados, transparentes e indiferenciados. En este estadio los *claspers*, son blandos y no sobrepasaban el extremo de las aletas

pélvicas (Figs. II.11 y II.12). Los machos **en maduración** presentaban los testículos más desarrollados, pudiéndose diferenciar, en la región craneal, el comienzo de la formación de los lóbulos testiculares. Los conductos estaban más desarrollados, blanquecinos y levemente enrollados. Los *claspers* eran semirígidos y sobrepasaban las aletas pélvicas (Figs. II.13 y II.14). Los ejemplares **maduros** presentaban un desarrollo completo del testículo, con los lóbulos bien diferenciados y los cistos apreciables a ojo desnudo. Los conductos, dilatados y contorneados, así como las glándulas anexas, se diferenciaban claramente (conductos epididimarios, conductos deferentes, vesículas seminales y glándulas de Leydig) Los *claspers* se presentaban completamente rígidos, superando el largo de las aletas pélvicas (Figs. II.15 y II.16).

En las **hembras** se determinaron 3 estadios de madurez:

- *Estadio I o inmaduras*
- *Estadio II o en maduración*
- *Estadio III o maduras (con y sin cápsulas en los úteros)*

Se clasificaron como **inmaduras** aquellas hembras que presentaban los ovarios blanquecinos, sin folículos visibles macroscópicamente. Los oviductos anteriores presentaban aspecto filiforme y eran translúcidos. Las glándulas oviductales estaban poco desarrolladas y los úteros delgados (Fig. II.17). Las hembras **en maduración** presentaban los ovarios más desarrollados, con folículos pequeños, blanquecinos, apreciables a simple vista. Las glándulas oviductales se comenzaban a diferenciar claramente y los úteros se encontraban parcialmente dilatados (Fig. II.18). Las hembras **maduras** tenían los ovarios totalmente desarrollados, con folículos de diferentes tamaños y los

mayores, claramente vitelados (color amarillo). Las glándulas oviductales estaban completamente expandidas (Fig. II.19). En las hembras maduras grávidas, las cápsulas podían presentarse completas, o en formación (Fig. II.20).

### **II.3: PROCESAMIENTO MICROSCÓPICO**

#### **II.3.1: Microscopía óptica**

Luego del muestreo en planta, el material se trasladó, en frío, hasta el Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni- IBMPAS (Fig. II.21). En esa Institución, se realizó la disección de los sistemas genitales masculinos y femeninos. Cada pieza obtenida se colocó en *cassettes* histológicos y se fijó. El fijador utilizado fue la mezcla de Bouin, en agua de mar, a fin de conservar la osmolaridad tisular que, en los peces cartilaginosos es de alrededor de 1040 mosm (Schmit-Nielsen, 1984). El material fijado se trasladó al Laboratorio de Citología, Histología y Embriología de la Universidad Nacional del Sur- UNS- INBIOSUR (Fig. II.22).

Posteriormente, las muestras se procesaron de acuerdo a las técnicas histológicas de rutina. Se deshidrataron en una serie alcohólica (etanol) de concentración creciente (70°, 80°, 90° y 96°) a temperatura ambiente, durante 2 a 3 horas en cada uno, dependiendo del tamaño de las piezas. Luego se pasaron a una mezcla 1:1 de etanol: N-butanol, durante 2 a 3 horas, finalizando con un baño de N-butanol 100% durante una noche. La inclusión se realizó en estufa, con un primer paso en Paraplast® con 5% de N-butanol y dos baños de Paraplast® puro. La inclusión definitiva se realizó en anillos plásticos.

Para la confección de los cortes (3-5  $\mu\text{m}$ ) se usó un micrótomo rotatorio Leica RM 2145. Se seleccionaron cortes de todos los tacos y se realizaron coloraciones topográficas generales: Tricrómico de Masson y Hematoxilina-Eosina.

Luego de la revisión de los cortes coloreados, se eligieron algunas secciones, en las que se emplearon las siguientes técnicas:

Técnicas histoquímicas:

- ✓ Reacción del ácido periódico de Schiff (PAS) (Mc Manus, 1946; Hotchkiss, 1948), para la detección de glicoconjugados.
  - ✓ Técnica de Azul Alcian (AB) (pH 2.5) (Steedman, 1950; Mowry, 1956), para detectar glucosaminoglicanos ácidos.
  - ✓ Sudán Black (Sheehan y Storey, 1947), para poner de manifiesto la presencia de fosfolipoproteínas.
- Coloraciones específicas para elementos conectivos:
- ✓ Técnica de Gomori, para evidenciar fibras reticulares (Gomori, 1937)

Los cortes histológicos coloreados se observaron con un microscopio óptico Nikon AFM.

Los registros fotográficos se realizaron con un microscopio óptico Olympus BX5, equipado con una cámara digital Olympus Camedia Mod. C-7070, Wide Zoom.

### **II.3.2: Cortes semifinos y microscopía electrónica**

Al material destinado a microscopía electrónica, se le realizó una primera fijación en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato 0,05 M, con 12% de sacarosa y trazas de cloruro de magnesio (Hyder *et. al.*, 1983), a 4 °C durante 12 horas. Posteriormente se realizó una segunda fijación con OsO<sub>4</sub> al 1%, en el mismo buffer y a 4°C, por 90 minutos. Luego de varios lavados, se realizó la deshidratación con concentraciones crecientes de acetona, para finalizar infiltrando el material en resina Spurr de baja densidad. La polimerización se llevó a cabo a 60°C, durante 12 hs. Se realizaron cortes semifinos (0,5 µm) y ultrafinos (70-100 nm) con un ultramicrótomo Supernova, Reichert-Jung.

Los cortes semifinos, se colorearon con azul de metileno-azur II- fucsina básica. Los cortes ultrafinos, se montaron sobre grillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo (Reynolds, 1963). La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Jeol CX II, ubicado en el Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca (CCT-CONICET-BB).

### **II.4: INDICADORES RELACIONADOS CON LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA**

La metodología detallada de este inciso puede verse en el *Capítulo V*.

# Láminas

**Figura II.1:** Golfo San Matías. Fuente: Google maps. *Inserto:* ubicación geográfica del golfo.

**Figura II.2:** Zona costera de San Antonio Oeste (SAO) (pleamar).

**Figura II.3:** Zona costera de San Antonio Este (SAE), “Playa de las Conchillas”.

**Figura II.4:** Planta pesquera Río Salado (SAO).

**Figura II.5:** Planta pesquera Perla del Este (SAE).



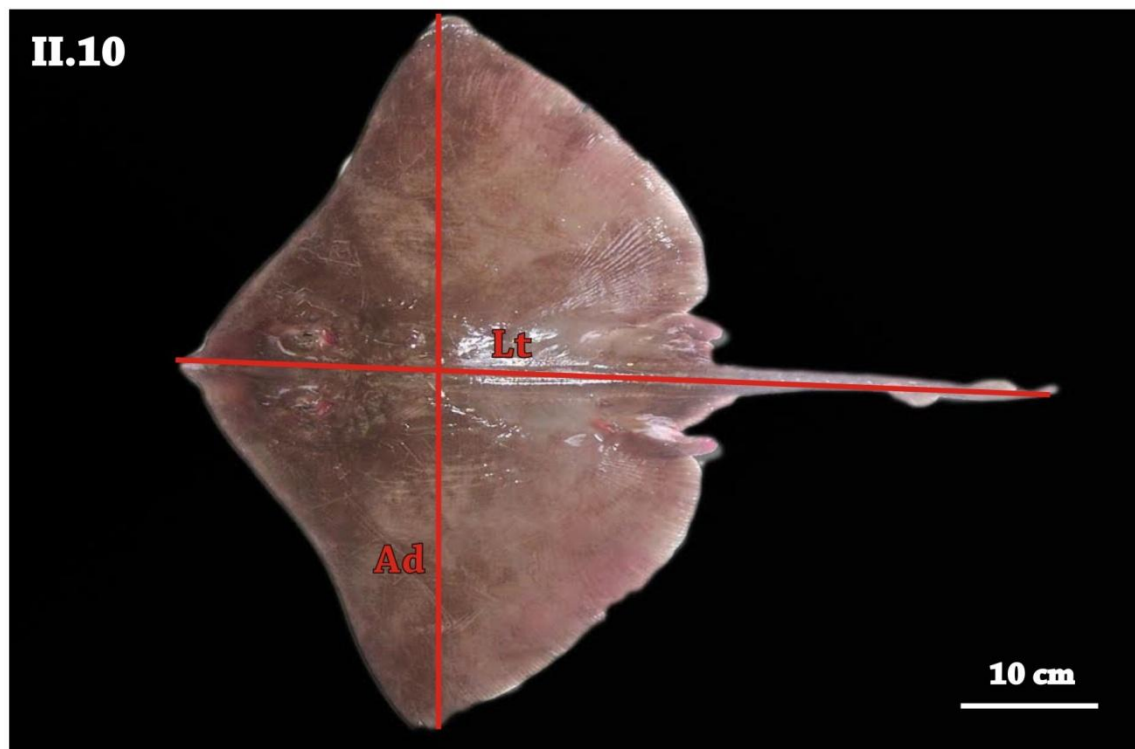
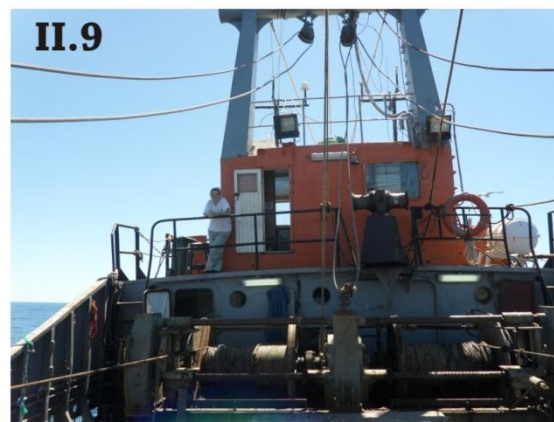


Figuras II.6 y II.7: Muestreos. II.6) Planta pesquera Río Salado II.7) Planta pesquera Perla del Este.

Figuras II.8 y II.9: Embarcación “Viernes Santo”.

Figura II.10: Ejemplar maduro de *A. platana* en el que se indica como fueron tomadas las medidas morfométricas.

**Referencias:** Ad: ancho de disco; Lt: largo total (desde la punta del hocico hasta el extremo de la cola).

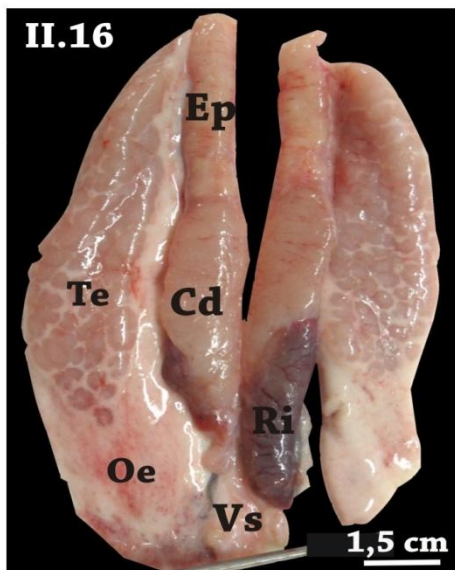
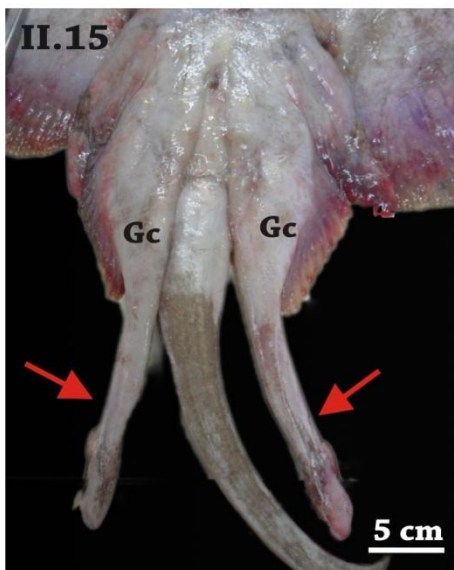
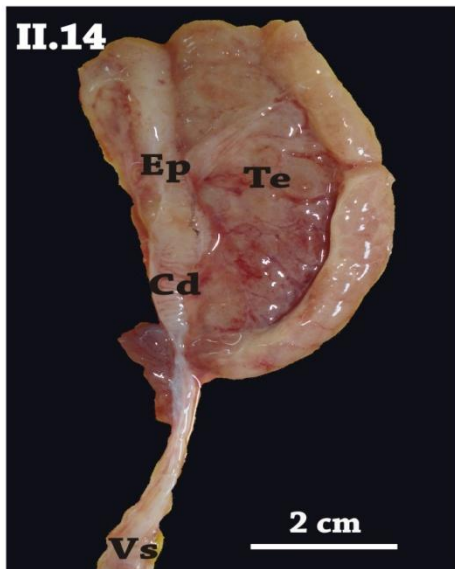
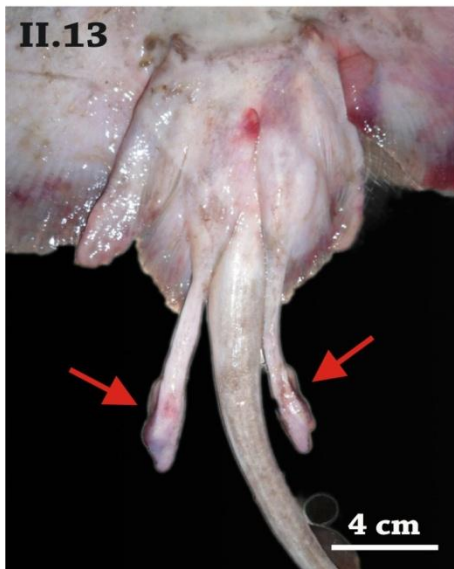
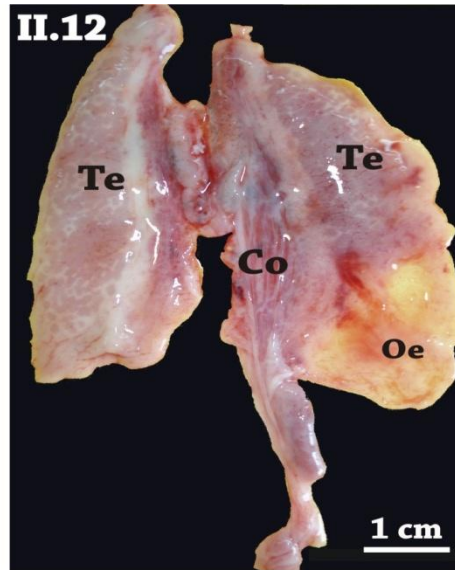


**Figuras II.11 y II.12:** Machos inmaduros. II.11: detalle de los *claspers* (*A. platana*). II.12: sistema genital masculino (*S. bonapartii*).

**Figuras II.13 y II.14:** Machos en maduración. II.13: *claspers* (*A. platana*). II.14: Sistema genital masculino (*S. bonapartii*).

**Figuras II.15 y II.16:** Machos maduros. II.15: *claspers* bien desarrollados (*A. platana*) II.16: sistema genital masculino (*A. platana*).

**Referencias:** Cd: conducto deferente; Co: conductos; Ep: epidídimo; Flechas rojas: *claspers*; Gc: glándula del *clasper*; Oe: órgano epigonal; Ri: riñón; Te: testículo; Vs: vesícula seminal.



**Figura II.17:** Sistema genital de una hembra inmadura de *A. platana*.

**Figura II.18:** Sistema genital de una hembra en maduración de *A. platana*.

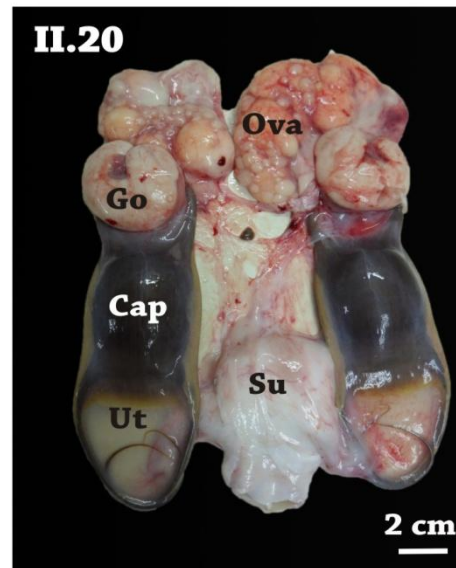
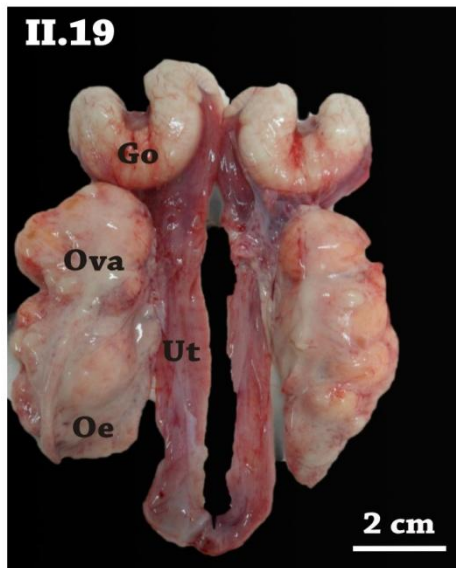
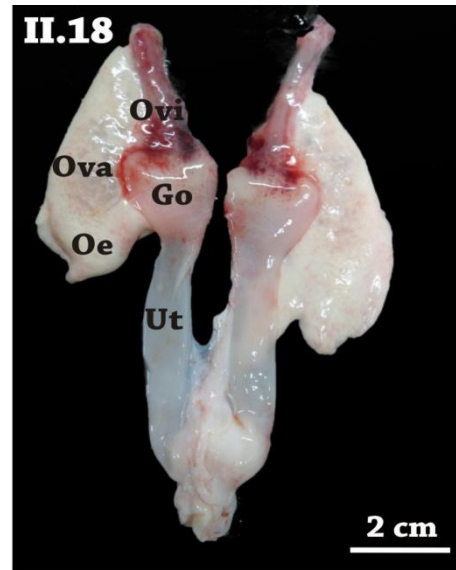
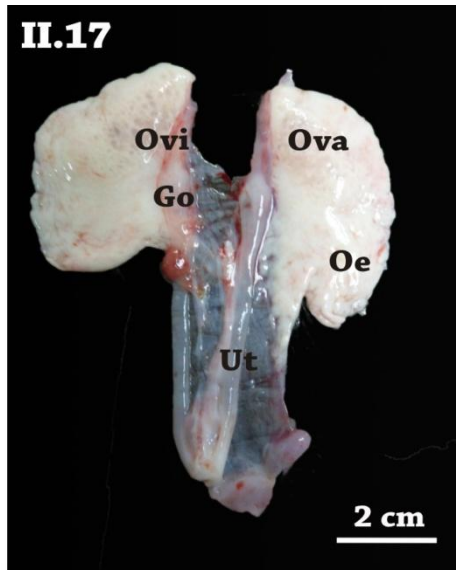
**Figuras II.19 y II.20:** Sistemas genitales de hembras maduras de *A. platana*. II.20)

Hembra grávida con presencia de cápsulas completamente formadas en el interior de los úteros.

**Figura II.21:** Sala de muestreo del Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni (IBMPAS).

**Figura II.22:** Laboratorio de Citología, Histología y Embriología Animal (UNS-INBIOSUR).

**Referencias:** Cap: cápsula; Go: glándula oviductal; Ova: ovario; Oe: órgano epigonal; Ovi: oviducto anterior; Su: seno urogenital; Ut: útero.



### **CAPÍTULO III: SISTEMA GENITAL FEMENINO DE *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii*.**

En este capítulo solo se estudia la morfología e histología de las hembras de *Atlantoraja platana*. La morfología e histología de las hembras de *Sympterygia bonapartii* fue realizada por Díaz Andrade (2010). Por otra parte, el análisis de talla macroscópica y microscópica de inicio vitelogénesis se estimó para ambas especies.

#### **III.1: OVARIO**

##### **III.1.1: INTRODUCCIÓN**

Los condrictios exhiben una gran diversidad de modos reproductivos, que van desde la oviparidad a la viviparidad, ya sea placentaria o no (Compango, 1990; Musick y Ellis, 2005; Awruch, 2015; Galíndez, 2016) (véase *Cap I: Introducción general*).

Los ovarios y testículos se desarrollan a partir de masas pares de tejido mesodérmico y están ubicados a cada lado del mesenterio dorsal, dentro de la cavidad peritoneal (Wourms, 1977; Dodd, 1983; Callard *et. al.*, 1989; Hamlett y Koob, 1999). Estas "masas indiferenciadas" crecen dentro del celoma en desarrollo y luego son invadidas por células germinales primordiales, que con el tiempo, darán lugar a ovogonias o espermatogonias (Mc Millan, 2007).

En la mayoría de los vertebrados, el tejido somático de cada gónada tiene un origen doble, ya que se desarrolla a partir de dos fuentes mesenquimáticas distintas, pero estrechamente asociadas. Por un lado, está la corteza, que deriva de una proliferación del epitelio celómico y su destino es

convertirse en el ovario y por otro lado está la médula, que proviene de una proliferación celular medial y origina el testículo. Normalmente, una de estas porciones crece rápidamente, mientras que la otra no se desarrolla, por lo que el sexo del individuo se expresa fenotípicamente en un estadio embriológico muy temprano. Este patrón de diferenciación gonadal es característico de los elasmobranquios y de los tetrápodos (Hoar y Randall, 1969; Wourms 1977; Mc Millan, 2007).

Como se mencionó anteriormente, los ovarios de los peces cartilaginosos se desarrollan como estructuras pares a lo largo de la pared dorsal del celoma. En varias especies, uno de los ovarios, ya sea el derecho o el izquierdo, deja de madurar. El ovario funcional puede ser el derecho, como ocurre en la mayoría de los tiburones vivíparos (ej. *Mustelus schmitti*, Galíndez *et. al.*, 2014) o el izquierdo, como en algunas especies de rayas vivíparas (ej. *Myliobatis goodei*, Colonello *et. al.*, 2013).

Desde el punto de vista anatómico, los ovarios pueden ser de dos tipos: compactos o desnudos (Nelsen, 1953). El primer tipo de ovario produce pocos folículos de gran tamaño, normalmente de 20 a 60 mm de diámetro. La otra variante, produce muchos folículos pequeños que rondan entre los 3 y 5 mm de diámetro (Mattheus, 1950; Pratt, 1988).

El ovario de estos peces, como el de todos los vertebrados, cumple tres funciones principales: formación de gametas; transferencia y acumulación de vitelo y síntesis y secreción de hormonas.



Los objetivos del presente capítulo fueron:

- ✓ Analizar las características histológicas, citológicas y ultraestructurales del ovario de *A. platana* y su variación según el estadio de madurez.
- ✓ Analizar las relaciones morfométricas microscópicas de los diferentes componentes foliculares en *A. platana*.
- ✓ Analizar la dinámica estacional de los folículos a nivel macroscópico para ambas especies.
- ✓ Determinar la talla macroscópica y microscópica de inicio de vitelogénesis de ambas especies.

### III.1.2: MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis microscópico se trabajó con 53 hembras de *A. platana* y 45 ejemplares de *S. bonapartii*, de los tres estadios madurativos determinados de acuerdo al criterio de Stehmann (2002) (véase capítulo II: Determinación del estadio de madurez)

Las disecciones se realizaron abriendo la cavidad abdominal de las hembras, desde la apertura de la cloaca, siguiendo un trayecto circular. Una vez abierta esta cavidad, se extrajo el hígado y el tubo digestivo a fin de que quedaran expuestos los órganos genitales (Figs. III.1.1 y III.1.2). Estos últimos se extrajeron completos, separándolos cuidadosamente de la cavidad del cuerpo y cortando los mesenterios (véase capítulo II: Figs. II.17, II.18, II.19 y II.20).

### **III.1.2.1: Medición de folículos a nivel macroscópico**

Los ovarios de ambas especies se fijaron en formol al 10% en agua de mar. Luego, en el laboratorio, se divulsionaron cuidadosamente, separando los ovocitos de diferente tamaño. El diámetro y la coloración de cada uno de ellos (blanco, amarillento y amarillo) fueron registradas. El diámetro se midió en milímetros, utilizando un calibre digital marca SOMET con precisión de 1/20 mm. Los resultados se tabularon para su posterior análisis. Los ovocitos se agruparon por estaciones del año y de acuerdo a su coloración. Se realizó un diagrama de cajas y brazos para evaluar su distribución temporal.

### **III.1.2.2: Análisis microscópico: foliculogénesis y morfometría**

Para la interpretación de la foliculogénesis, los folículos se clasificaron en 5 estadios de desarrollo: 1: *folículos primordiales*; 2: *folículos primarios*; 3: *folículos en desarrollo sin indicio de vitelogénesis*; 4: *folículos en desarrollo con indicio de vitelogénesis (gránulos de vitelo)*; 5: *folículos vitelados (con placas de vitelo)*.

Una vez coloreados los cortes de ovario, se observó la estructura general y se registraron las siguientes medidas en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), utilizando para ello un ocular micrométrico (Fig. III.1.3):

- Diámetro folicular
- Diámetro del ovocito
- Diámetro del núcleo
- Espesor de la zona pelúcida
- Espesor del epitelio folicular o granulosa

- Espesor de las tecas

En cada folículo observado, se registró la presencia o no de vitelo a fin de determinar la talla microscópica de inicio de vitelogénesis (diámetro menor en el que el citoplasma del ovocito comienza a acumular vitelo en forma de pequeños gránulos suboolémicos). Al tomar estos datos, se tuvo la precaución de medir sólo aquellos folículos cortados en el plano medio, con el fin de asegurar el registro de la talla real. En el caso de ovocitos de forma irregular, se realizó un promedio entre el diámetro mayor y el diámetro menor.

Los datos fueron tabulados para, posteriormente, realizar diferentes análisis. Por un lado, se estudió la representatividad de cada una de las estructuras que componen el folículo, según el estadio de madurez de los mismos. Por otro lado, se estudio la dinámica de la zona pelúcida en relación al epitelio folicular y al diámetro del ovocito. Todos estos análisis se realizaron utilizando el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et. al.*, 2011).

Además, se interpretó la reacción de los tejidos a las coloraciones específicas y técnicas histoquímicas. Todo lo observado se registró fotográficamente.

### **III.1.3: RESULTADOS**

#### **III.1.3.1 Descripción macroscópica de los ovarios de *A. platana*.**

El sistema reproductor de las hembras se encuentra suspendido de la pared dorsal del cuerpo por mesenterios delgados de tejido conectivo laxo.

Está formado por un par de ovarios, un *ostium*, un par de oviductos anteriores, un par de glándulas oviductales o nidamentales y un par de úteros, los cuales desembocan en un único seno urogenital (Fig. III.1.2).

Ambos ovarios son funcionales y están comprimidos dorsoventralmente. Los mismos se encuentran asociados al órgano epigonal (órgano linfomieloide exclusivo de los peces cartilagosos). La relación entre ambas estructuras es inversa, por lo cual, en hembras inmaduras, predomina el parénquima linfomieloide, en tanto que en las maduras, éste queda relegado a una estructura blanquecina bordeando el ovario (Figs. III.1.2; III.1.4; III.1.5; III.1.6)

Dentro de los diferentes estadios de madurez, las **hembras inmaduras** presentaron ovarios blanquecinos y homogéneos aplanados dorsoventralmente. El tejido ovárico es casi imperceptible a ojo desnudo, observándose indicios del mismo en la zona craneal del órgano epigonal (Fig.III.1.4).

En las **hembras en maduración**, el tejido germinal presenta un aspecto granular por la presencia de ovocitos pequeños blanquecinos o translucidos (Fig. III.1.5). Las **hembras maduras**, exhiben ovarios más grandes, con ovocitos de diferente tamaño y grado de vitelación (Fig. III.1.6). El color amarillento en los folículos es un indicio macroscópico de presencia de vitelo.

### III.1.3.2: Medición de folículos a nivel macroscópico de *A. platana* y *S.*

#### *bonapartii*.

En *A. platana*, la variación del diámetro de los distintos tipos foliculares, a lo largo de las cuatro estaciones, pueden observarse en la (Fig.III.1.7a). Los diámetros promedio para los folículos amarillentos (n: 32) y amarillos (n: 91) fue de 7,58 mm (DE: 0,46) y 18,22 mm (DE: 0,81), respectivamente. El diámetro máximo registrado fue de 44 mm (folículo amarillo) y el menor diámetro registrado para los folículos que inician la vitelogénesis (amarillento) fue de 3,4 mm.

En *S. bonapartii*, la variación del diámetro de los distintos tipos foliculares, a lo largo de las cuatro estaciones puede observarse en la (Fig. III.1.7b) Los diámetros promedio para los folículos amarillentos (n: 103) y amarillos (n: 100) fue de 4,96 mm (DE: 1,97) y 14,62 mm (DE: 6,31), respectivamente. El diámetro máximo registrado fue de 28 mm (folículo amarillo) y el menor diámetro registrado para los folículos que inician la vitelogénesis (amarillento) fue de 1,58 mm.

### III.1.3.3 Descripción microscópica de los ovarios de *A. platana*

#### Generalidades

El ovario se encuentra tapizado por un epitelio cilíndrico simple ciliado que, al plegarse en ciertos sectores, adopta el aspecto de pseudoestratificado. Por debajo, se encuentra una delgada túnica albugínea de tejido conectivo denso muy vascularizado (Figs. III.1.8a y III.1.8b). En las

hembras inmaduras, los folículos se ubican inmediatamente por debajo de la albugínea (Figs. III.1.9a), en tanto que en las maduras, éstos se internalizan y ocupan la mayor parte del parénquima, desplazando el tejido linfomieloide hacia la región caudal (Fig. III.1.9b). La organización del parénquima ovárico no muestra ninguna segregación en corteza y médula.

Cada folículo consta, desde adentro hacia afuera, de: un ovocito, una zona pelúcida, un epitelio folicular o granulosa y dos tecas (Fig. III.1.3).

A medida que los folículos maduran y aumentan de diámetro, estos componentes se mantienen, variando estructuralmente en su participación relativa en relación al tamaño total del folículo.

### **Ovogénesis y Foliculogénesis**

- **Ovogonias**

Estas células pudieron identificarse en solo dos ovarios de hembras inmaduras, en muy escasa cantidad y ubicadas por debajo del epitelio ovárico. Las ovogonias se caracterizan por presentar un núcleo grande y eucromático (relación núcleo: citoplasma alta) y un nucléolo evidente. Se aprecia una íntima relación con las células pre-foliculares que la rodean (Fig. III.1.10). Siempre se encontraron en forma aislada, sin formar "nidos".

- **Folículos Primordiales (estadio I)**

A medida que las ovogonias aumentan de tamaño, las células foliculares se tornan planas y se disponen alrededor, definiendo el folículo primordial. El oocito muestra el citoplasma levemente acidófilo, con cuerpos

de Balbiani, que se pueden ver como agregaciones intensamente coloreadas cercanas al núcleo. Éste es grande, con acúmulos de cromatina ("*lampbrush chromosomes*") y con un nucléolo evidente. En esta etapa, se produce el inicio de la formación de la zona pelúcida, que se observa como una delgada línea difusa. Por fuera, se encuentra tejido conectivo moderadamente denso, pero aún no se pueden diferenciar las tecas (Fig. III.1.11).

- **Folículos Primarios (estadio II)**

A medida que la foliculogénesis avanza, los folículos primordiales atraviesan cambios que desembocan en la formación del folículo primario. En esta etapa, las células foliculares planas se tornan poliédricas, con un núcleo redondo y heterocromático. Las células foliculares son numerosas y se disponen en un solo estrato. Entre ellas, comienza a diferenciarse otro tipo celular: las *células foliculares globosas*, las cuales presentan un citoplasma acidófilo y un núcleo eucromático (Figs. III.1.12 y III.1.13a). En el citoplasma ovocitario se siguen observando cuerpos de Balbiani. La zona pelúcida circunscribe por completo al ovocito. Ésta se observa como una delgada capa hialina irregular, que reacciona positivamente al PAS y al AB pH 2,5 (Figs. III.1.13 a y b). Por último, comienza a diferenciarse la zona externa, pero aún no se distinguen claramente las tecas (Fig. III.1.12).

- **Folículos en desarrollo sin y con indicio de vitelogénesis (estadio III y IV)**

A medida que los ovocitos incrementan su tamaño, las células foliculares cúbicas crecen en altura y se tornan columnares (Fig. III.1.14). Cuando los folículos alcanzan las 600  $\mu\text{m}$  (0,6 mm) de diámetro, el epitelio

folicular comienza a estratificarse (Fig. III.1.15). Cuando llegan a una talla promedio de 2,12 mm de diámetro, se inicia la acumulación de vitelo, en forma de pequeños gránulos con escasa afinidad tintorial (Fig. III.1.15). El folículo más pequeño encontrado en *A. platana*, donde se observaron indicios del comienzo de la vitelación medía 0,8 mm de diámetro. Las células foliculares columnares y las globosas, se encuentran entremezcladas (Figs. III.1.15 y III.1.16).

En esta etapa del desarrollo, además, se puede observar una clara interacción entre el oocito y las células foliculares: por un lado, el oolema se pliega formando un borde refringente y por otro lado, las células foliculares emiten proyecciones que atraviesan la zona pelúcida (Fig. III.1.17). Las tecas están totalmente diferenciadas, en una teca interna fibrosa muy vascularizada y una teca externa de aspecto glandular, con células cúbicas bajas, de núcleo esférico y eucromático (Fig. III.1.18).

- **Folículos vitelados (vitelo en placas) (estadio V)**

El diámetro medio, estimado microscópicamente, para los folículos que presentaban placas de vitelo, fue de 4,15 mm (4150  $\mu\text{m}$ , ES=197,8) y la talla más pequeña registrada fue de 2,5 mm (2500  $\mu\text{m}$ , ES= 82,3). Las placas vitelínicas son ovaladas y aumentan de tamaño en forma centrípeta (Figs. III.1.16 y III.1.19). La túnica folicular presenta gránulos Sudán B (+), tanto en el citoplasma de las células, como en los espacios intercelulares dilatados (Fig. III.1.19). Ambos tipos de células foliculares tienden a segregarse, ubicándose las columnares más cerca de la membrana basal folicular y las globosas más cercanas al ovocito. A medida que el folículo aumenta de diámetro, los



diferentes componentes disminuyen su espesor y la granulosa se torna, nuevamente, unilaminar ("efecto globo") (Fig. III.1.19).

- **Cuerpo lúteo**

Una vez que los oocitos son liberados, las células foliculares permanecen en el ovario para formar el cuerpo lúteo (Fig. III.1.20a). Las células luteínicas son altas, con citoplasma eosinófilo, núcleo basal heterocromático y la superficie apical irregular (Fig. III.1.20b). Entre estas células pueden observarse, en escasa cantidad, células globosas hipertrofiadas (Fig. III.1.20c). En un estado más avanzado, el cuerpo lúteo se retrae cada vez más y va siendo invadido progresivamente por tejido conectivo denso. En algunos casos, los cuerpos lúteos presentan una gran infiltración linfocitaria, formando una capa entre las células luteínicas y el tejido conectivo (Figs. III.1.21 a y b).

- **Cuerpos atrésicos**

Cuerpos atrésicos de diferentes tamaños fueron encontrados en todos los estadios madurativos de las hembras. En este proceso, las células mueren y el espacio es rellenado por tejido conectivo denso, el cual finalmente adquiere el aspecto de una cicatriz (Fig. III.1.22).

#### **III.1.3.4: Micromorfometría ovárica de *A. platana***

En la Fig. III.1.23 se representan los diámetros foliculares a lo largo de la foliculogénesis. En el gráfico puede observarse un aumento exponencial del diámetro folicular hasta el comienzo de la meiosis.

A medida que el ovocito aumenta en diámetro, cada uno de los componentes que forman el folículo (tecas, granulosa y zona pelúcida) disminuyen su espesor (Fig. III.I.24).

Existe una correlación (Coeficiente de correlación de Pearson: 0.592,  $p < 0.0001$ ) entre el patrón de crecimiento de la zona pelúcida y la capa folicular (Fig. III.I.25).

Por otro lado, el grosor de la zona pelúcida se incrementa a lo largo de las etapas previtelogénicas y vitelogénicas, para disminuir notablemente cuando el folículo llega a etapas más avanzadas del desarrollo (Fig. III.I.26).

### III.1.4 DISCUSIÓN

El plan de organización de los peces cartilaginosos es un modelo sumamente conservado a lo largo de más de 400 millones de años (McEachran y Dunn, 1998; Musick y Ellis, 2005). En este contexto, la morfología general del sistema reproductor de *A. platana* concuerda con lo observado para la mayoría de los Rájidos (Maruska *et.al.*, 1996; Chatchavalvanich y Visuttiapat, 1997; Acero *et. al.*, 2008; Díaz Andrade *et. al.*, 2011; Wehitt *et. al.*, 2015), así como también la relación existente entre el órgano epigonal y el ovario a lo largo de la ontogenia (Koob y Callard, 1991; Maruska *et. al.* 1996, Chatchavalvanich y Visuttiapat, 1997; Galíndez y Aggio, 2002; Acero *et. al.*, 2008; Díaz Andrade *et. al.*, 2009; 2011; Serra Pereira *et. al.*, 2011; Wehitt *et. al.*, 2015). Esta estructura es el principal órgano granulopoyético de los Condrictios. Está íntimamente asociado a las gónadas y su relación varía con la madurez sexual y con la especie (Galíndez y Aggio, 2002). En la raya platana, el órgano epigonal es notorio en todas las hembras, aunque menos representado, proporcionalmente, en las maduras.

En todos los vertebrados los ovarios cumplen un rol predominante en la fisiología reproductiva: producción de gametas, transferencia y acumulación de vitelo, biosíntesis y secreción de hormonas (Storrie, 2004). El ovario de *A. platana* presenta, en líneas generales, folículos en desarrollo de varios tamaños, folículos atrésicos y cuerpos lúteos, todos embebidos en una matriz conectiva. Este patrón de distribución se observa en otros Batoideos (Chatchavalvanich y Visuttiapat, 1997; Hamlett y Koob, 1999; Barone *et. al.*, 2007; Díaz Andrade *et. al.*, 2011).

El epitelio cilíndrico simple ciliado que recubre el ovario es común en Rájidos (Barone *et. al.*, 2007; Díaz Andrade *et. al.*, 2009; 2011; Wehitt *et. al.*, 2015). La presencia de especializaciones en la membrana apical pueden asociarse con el movimiento del óvulo hacia el oviducto (Metten, 1944). Por otra parte, la existencia de fibras conectivas y células musculares lisas en la túnica albugínea, se correlacionarían con los grandes cambios de volumen que muestra el órgano a lo largo del ciclo reproductivo y con la capacidad de generar una red de contención estructural, que sostenga a los numerosos folículos de tamaño importante y mediano, que se encuentran en hembras reproductivas.

El reclutamiento de los folículos esta mediado por la relaciones establecidas entre la oogonia, las células pre-foliculares y los factores de crecimiento (Hutt y Albertini, 2007; Oktem y Oktay, 2008). Durante el desarrollo embrionario, las células germinativas primordiales se originan en el endodermo y migran al cordón germinativo, en donde se asocian a células pre-foliculares para finalmente transformarse en una oogonia (Motova y Cooley, 2001). En la raya platana, las oogonias se encontraron, en escasa cantidad, aisladas y solo en ejemplares inmaduros. El mismo patrón ha sido registrado en *Zearaja chilensis* (Wehitt *et. al.*, 2015). En la raya *Torpedo marmorata*, en cambio, la ovogénesis ocurre muy temprano en la vida y continua incluso hasta después del nacimiento (Prisco *et. al.*, 2001). La presencia de ovogonias en etapas iniciales del desarrollo de los individuos es común en otros condriactos como *Mustelus antarcticus* (Storrie, 2004). Sin embargo, existen ejemplos de peces cartilaginosos en los cuales estas células están presentes en hembras en maduración (*S. bonapartii*, Díaz Andrade *et. al.*, 2011) e incluso en hembras

gestantes (*Mustelus schmitti*, Galíndez *et. al.*, 2014). Existen especies, incluso, en las cuales no se registró la presencia de ovogonias en ninguno de los ejemplares estudiados (*Raja clavata*; Serra Pereira *et. al.*, 2011). Todas estas diferencias podrían estar asociadas a la capacidad reproductiva de cada especie, que depende, entre otras cosas, del número de células inmaduras de las que pueden reclutarse las gametas (Mc Millan, 2007). De esta manera, la presencia de ovogonias sólo en etapas tempranas del desarrollo, como ocurre en este caso, podrían asociarse a una menor capacidad reproductiva. Esta situación soporta la categorización de la especie como “vulnerable”, realizada por la IUCN.

El estudio histológico realizado en este trabajo mostró en los ovarios de *A. platana*, folículos en diferentes etapas de desarrollo en todos los estadios madurativos de las hembras. Estas estructuras están conformadas por un epitelio folicular asociado a su lámina basal y un revestimiento tecal, tal como ha sido observado para la mayoría de los condricios (Walker, 2005) y de los vertebrados, en general (Mc Millan, 2007).

El proceso de desarrollo y maduración de los folículos se denomina foliculogénesis y puede dividirse en dos etapas consecutivas: previtelina y vitelina. En la primera, los ovocitos experimentan un incremento progresivo de tamaño debido a la acumulación de precursores de ADN, ARN y proteínas, seguido por un aumento del número de organelas subcelulares (Davidson, 1994; Barone *et. al.*, 2007; Beyo *et. al.*, 2008). En *A. platana* se observó el incremento progresivo del diámetro folicular, a medida que se avanza en las etapas de la foliculogénesis. A nivel citológico, la presencia de “*lampbrush*

cromosomas" o cromosomas en escobilla, pone en evidencia la actividad metabólica del ADN. Por otra parte, en los folículos primordiales, como en los folículos en desarrollo, se observaron cuerpos de Balbiani, los cuales están asociados a la biosíntesis de proteínas y serían claves para la actividad metabólica que antecede a la acumulación de vitelo (Brusle *et. al.*, 1989)

La foliculogénesis en los batoideos ha sido estudiada en un número reducido de especies, tales como *Atlantoraja castelnaui* y *Z. chilensis* (Oddone *et. al.*, 2005; Wehitt *et. al.*, 2015), *Raja asterias* (Andreucetti *et. al.*, 1999), *T. marmorata* (Prisco *et. al.*, 2001; 2002), *Urolophus jamaicensis* (Hamlett *et. al.*, 1999), *Raja clavata* (Serra Pereira *et. al.*, 2011) y *Sympterygia acuta* y *S. bonapartii* (Díaz Andrade *et. al.*, 2009; 2011).

En los ovarios de todos los vertebrados se ha observado que existe una relación muy estrecha entre el ovocito en crecimiento y las células foliculares que lo rodean (Andreucetti *et. al.*, 1999). En los condricios, en un principio, la capa folicular o granulosa está compuesta por una sola capa de células que pueden presentar cambios en la forma, tamaño y arquitectura a lo largo del crecimiento y maduración (Graçan *et. al.*, 2013). Mientras que en algunas especies, esta capa puede presentarse unilaminar y monofípica, en otras puede estratificarse y diferenciarse en varios tipos celulares (Guraya, 1986; Mc Millan, 2007). En *A. platana* el epitelio folicular comienza como una capa simple y a medida que avanza el proceso de foliculogénesis, se estratifica para terminar, nuevamente, en una monocapa en los folículos a término. En otros batoideos, estas células se estratifican pero nunca retornan al estado de monocapa (Prisco *et. al.*, 2002; Barone *et. al.*, 2007). El aumento del tamaño de

la granulosa a expensas de la estratificación celular, puede atribuirse a un incremento de la producción intrínseca de hormonas esteroideas (Hamlett y Koob, 1999; Cavanagh y Gibson, 2007).

En la mayoría de los rájidos, como por ejemplo en *T. marmorata*, se observaron distintos tipos celulares conformando la granulosa (Guraya, 1978; Pratt, 1988; Prisco *et. al.*, 2001). En *A. platana* se distinguieron dos tipos celulares, al igual que en *S. acuta* y *S. bonapartii* (Díaz Andrade *et. al.*, 2009; 2011). Esta diversidad de morfotipos requiere de un abordaje multidisciplinario y será objeto de estudios posteriores.

La vitelación es el proceso por el cual se acumula vitelo en el ooplasma. La acumulación de este "plasma germinativo" contribuye, en gran medida, al incremento del diámetro folicular y es básico para el posterior desarrollo embrionario (Mannire *et. al.*, 2004; Barone *et. al.*, 2007). En el comienzo del proceso, los folículos se caracterizan por la presencia de pequeños glóbulos de vitelo dispersos en la periferia del citoplasma. En los folículos más grandes, los precursores tienden a empaquetarse, formando discos elípticos (Prisco *et. al.*, 2002; 2007). La maduración de los precursores vitelínicos en forma centrípeta es un aspecto común en otros elasmobranquios (M. schmitti, Galíndez *et al.*, 2014).

En *A. platana*, así como en otros elasmobranquios (Galíndez *et. al.*, 2014; Wehitt *et. al.*, 2015), se observó en los espacios intercelulares y en el citoplasma de las células de la granulosa de los folículos vitelados, la presencia de gránulos Sudán B positivos. Los precursores del vitelo son sintetizados por el hígado y transportados por los vasos sanguíneos al folículo, para luego ingresar

al ooplasma. (Prisco *et. al.*, 2002). En esta especie, así como en *M. schmitti* (Galíndez *et. al.*, 2014), existe evidencia de que no solo hay translocación a través de los espacios intercelulares, sino que existiría, paralelamente, un transporte transcitoplasmático.

La zona pelúcida es una delgada capa acelular que rodea al ovocito de los vertebrados (Mc Millan, 2007). Algunas de las funciones que se le han atribuido son: la contribución a la reacción acrosómica, la provisión de lugares de anclaje para receptores de superficie del espermatozoide, la prevención de la poliespermia y la participación en la supervivencia embrionaria (Ravaglia y Maggese, 2003; Modig *et. al.*, 2007). Es probable que esta estructura cumpla las mismas funciones en los peces cartilaginosos. En los condriictios se presenta como una capa dinámica atípica, que incrementa su espesor drásticamente, alcanzando anchos extremos (Davenport *et. al.*, 2011). En *A. platana* la deposición de la zona pelúcida comienza a observarse en los folículos primordiales. El grosor de esta región mostró un marcado incremento durante la etapa previtelogénica y un posterior adelgazamiento durante la vitelogénica. Esto último podría deberse a un aumento del diámetro folicular. En cuanto a la histoquímica, se observó la presencia de glucoproteínas ácidas y neutras, al igual que en *S. acuta* y *S. bonapartii* (Díaz Andrade *et. al.*, 2008; 2011).

*A. platana*, como otros rájidos (Díaz Andrade *et. al.*, 2008; 2011; Wehitt *et. al.*, 2015), tiene dos tecas por fuera de la granulosa. La interna incrementa su vascularización en el comienzo de la vitelación. Esto puede interpretarse como una adaptación para optimizar el flujo de precursores vitelinos. La teca



externa, por su parte, es de naturaleza glandular y se le atribuyen funciones esteroideogénicas, que contribuirían con dicho proceso (Prisco *et. al.*, 2002).

En los elasmobranquios, los cuerpos lúteos se forman como resultado de dos procesos diferentes: la ovulación en sí misma y la atresia folicular. Este fenómeno puede ocurrir tanto en especies ovíparas, como *A. platana*, o en especies vivíparas, como *Squalus acanthias* y *M. schmitti* (Jones y Ugland, 2001; Galíndez *et. al.*, 2014). Por lo tanto, la presencia de estas estructuras no estaría necesariamente asociada a condiciones de gestación (Hisaw y Hisaw, 1959; Galíndez *et. al.*, 2014). En algunas especies, los cuerpos lúteos accesorios se forman por luteinización de folículos que no ovularon y se denominan “*corpora lutea atretica*” (Callard *et. al.*, 1992). Esto podría ser la causa de la infiltración linfocitaria observada en los cuerpos lúteos de la raya platana. Sin embargo, se requieren más estudios a nivel molecular para elucidar la participación de estas células inmunocompetentes y de esta manera ver si están asociadas a una respuesta inflamatoria.

La atresia es un evento muy frecuente en los condriictios y puede desencadenarse en cualquier etapa del desarrollo folicular (Hisaw y Hisaw, 1959; Hamlett y Kobb, 1999). En *A. platana*, los folículos atrésicos se observaron en hembras de diferente estadio madurativo y en folículos en cualquier etapa de desarrollo. Puede considerarse que es un mecanismo regulador adaptativo, en función de las condiciones ambientales que prevalecen en la temporada de puesta o un mecanismo regulador intrínseco que modula el número final de folículos a reclutar y, por lo tanto, definiría la fecundidad de la hembra. De cualquier forma, el abordaje del estudio de fecundidad en peces

cartilagosos ovíparos es muy complejo y dificultoso de realizar en poblaciones naturales. Tal vez un acercamiento al mismo, a través de estudios en ambientes controlados, podría esclarecer el papel de la atresia y establecer la fecundidad de cada especie.

La continua actividad reproductiva de *A. platana*, presupone una alta tasa de desarrollo de folículos ováricos. En esta especie, se observó la presencia de ovocitos pre-vitelogénicos (blancos) a lo largo de todo el año, al igual que en *S. bonapartii*. Estos ovocitos pueden ser considerados como un grupo de reserva. También se observaron ovocitos vitelogénicos (amarillentos y amarillos) a lo largo de las cuatro estaciones. Los diámetros mayores de los ovocitos vitelados se encontraron en primavera. Coller (2012) registró, para la misma especie, diámetros mayores en las estaciones de otoño y verano. Probablemente, esta diferencia se deba a un mayor número de ejemplares analizados. En *S. bonapartii* se observó que los diámetros mayores se registraron en verano, coincidiendo en parte con los valores hallados por Estalles (2012) para la misma especie.

*A. platana* presentó una diferencia notable entre el diámetro folicular de inicio de la vitelogénesis a nivel microscópico y macroscópico (aproximadamente de 2 mm y 7,8 mm, respectivamente). Para esta misma especie en la población de Brasil, Oddone *et. al.* (2008), estimaron macroscópicamente el inicio de la vitelogénesis cuando los folículos alcanzan los 7 mm, coincidiendo con los hallazgos de este trabajo, pero no da ninguna referencia a valores microscópicos. La confirmación del inicio del compromiso reproductivo de la hembra en tallas foliculares menores que las observadas a

ojo desnudo, podría conducir a una subestimación del número de folículos vitelados y, por ende, a una sobrestimación de la talla de primera madurez. Todo ello conlleva a subestimar el potencial del recurso. En este trabajo, se plantea por primera vez la talla microscópica de inicio de vitelogénesis para *A. platana*. Si bien no se realizó el estudio detallado de la morfología ovárica de *S. bonapartii*, se determinó el valor medio de inicio de vitelogénesis microscópico y macroscópico (aproximadamente 1,58 mm y 4,96 mm, respetivamente), en la población del Golfo. Éste es cercano al registrado por Díaz Andrade (2010) (1,2 mm), para la población del estuario de Bahía Blanca. Es probable que el comienzo y la dinámica de la vitelogénesis sean propias de cada especie y estén modeladas por las condiciones ambientales y hormonales.

Por otro lado, la talla folicular máxima registrada en este trabajo para *A. platana* fue de 44 mm, lo que difiere del valor reportado por Oddone y Amorim (2008) (25 mm), pero está cerca de la talla registrada por Coller (2012) (47 mm) para la misma especie. Estas diferencias podrían deberse a que provienen de poblaciones distintas, que se encuentran separadas por unos 20° de latitud y que, en el caso de los ejemplares empleados en este trabajo, provienen de una zona más protegida, como es el golfo San Matías, en tanto que las muestreadas en Brasil, son de mar abierto.

En *S. bonapartii* la talla folicular máxima registrada fue de 27,5 mm. Esta talla de asemeja a la reportada por Díaz Andrade (2010) (26,30 mm) en el estuario de Bahía Blanca y difiere de la registrada para la misma especie en el golfo (38 mm; Estalles, 2012). La diversidad en las tallas puede atribuirse, ya sea

a diferencias ambientales y/o climáticas entre los años muestreados en los dos trabajos, como a la cantidad de ejemplares muestreados.

En los últimos años, los instrumentos histológicos han sido reconocidos como cruciales para los estudios reproductivos, permitiendo mejorar la eficacia de las opciones de manejo (Alonso Fernández *et. al.*, 2011). En este sentido, el análisis microscópico realizado en esta sección del capítulo, proporciona no solo información más precisa sobre la morfología y la dinámica de las gónadas femeninas, sino que también demuestra un enfoque complementario que puede contribuir a un mayor conocimiento y cuidado de la especie.

# Láminas

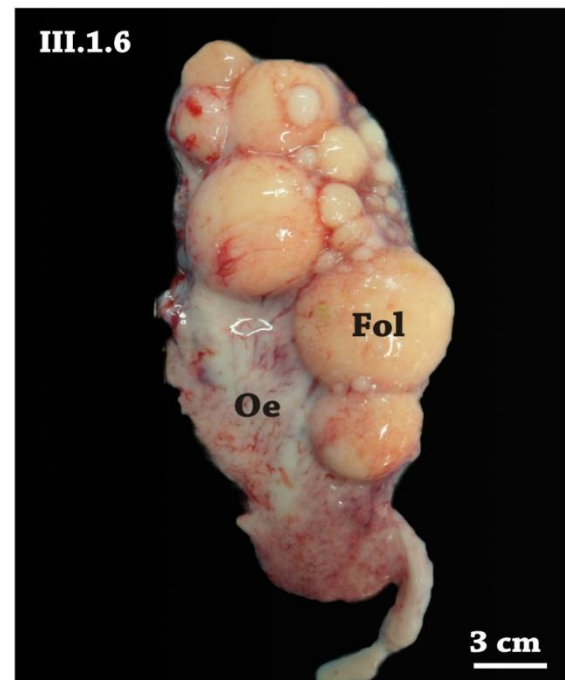
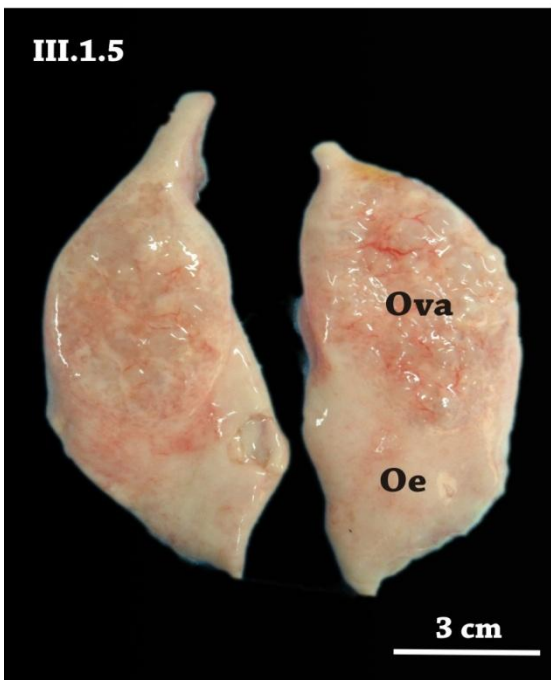
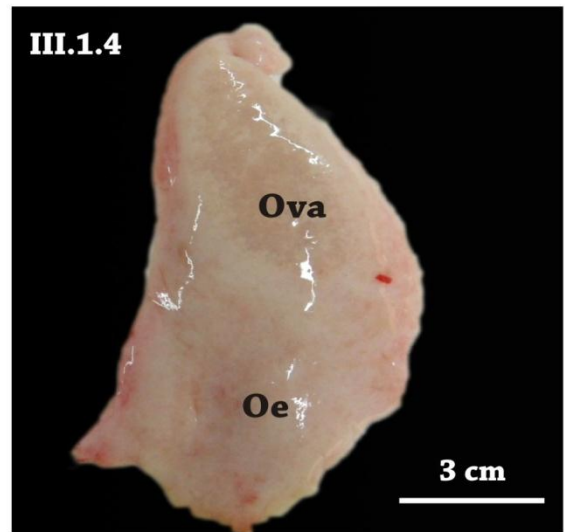
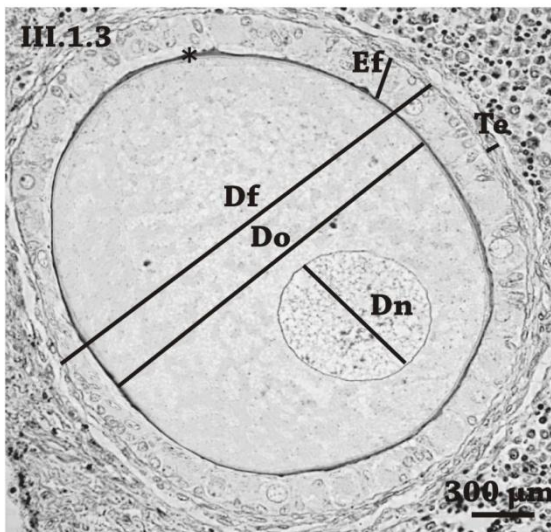
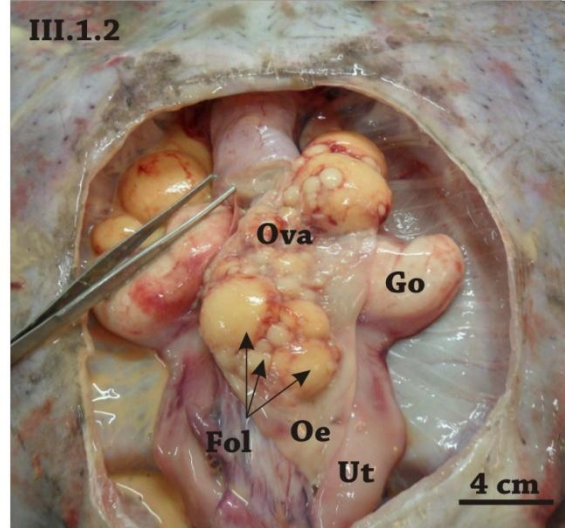
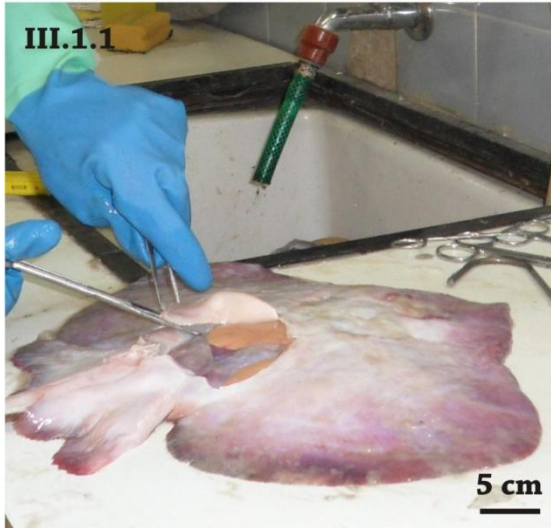
**Figura III.1.1:** Apertura de la cavidad abdominal de una hembra madura de *A. platana*.

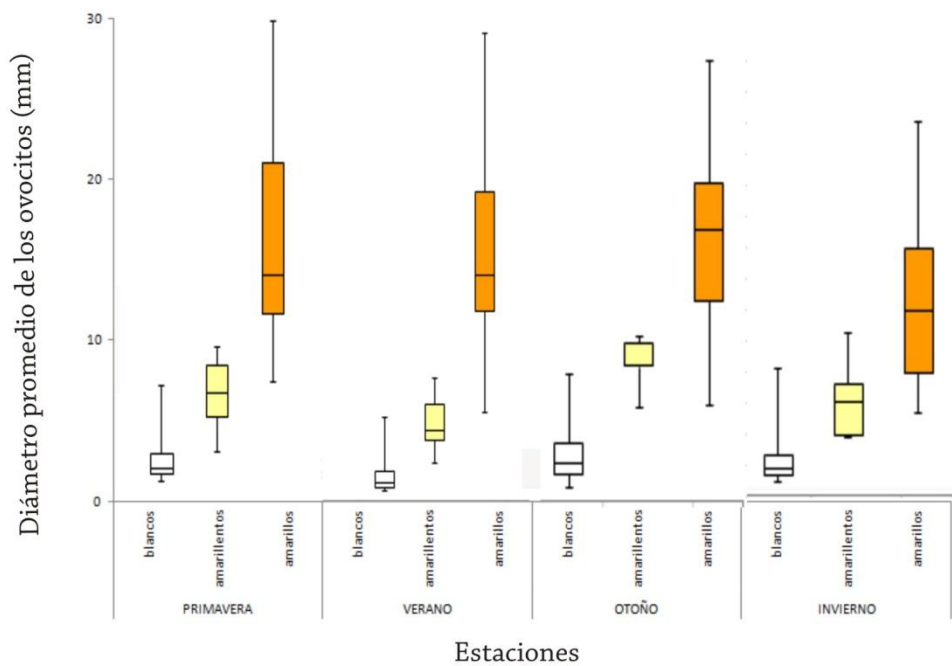
**Figura III.1.2:** Ubicación de los órganos genitales de una hembra madura de *A. platana*.

**Figura III.1.3:** Folículo en desarrollo en donde se indican las medidas registradas para el análisis morfométrico.

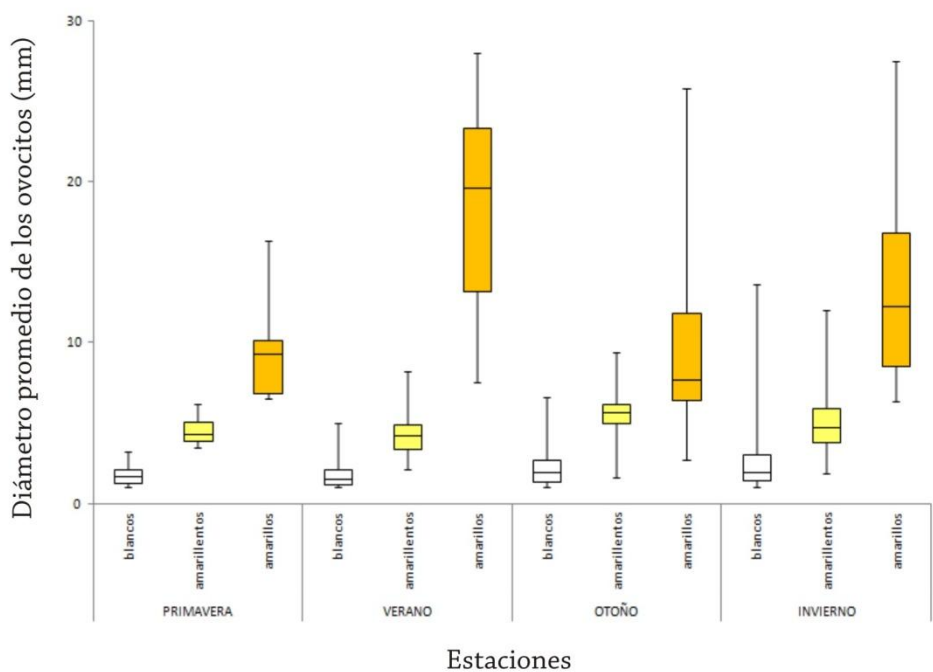
**Figuras III.1.4; III.1.5 y III.1.6:** Ovarios de una hembra de *A. platana* inmadura, en maduración y madura respectivamente.

**Referencias:** **Oe:** órgano epigonal; **Go:** glándula oviductal; **Ova:** ovario; **Fol:** folículos; **Ut:** útero; **Ef:** ancho del epitelio folicular; **Te:** ancho de las tecas; **Df:** diámetro folicular; **Do:** diámetro del ovocito; **Dn:** diámetro del núcleo.





**Fig. 7 a.** *A. platana*. Diámetro promedio de los previtelogénicos (blancos n:352 ) y vitelogénicos (amarillentos n: 91) y (amarillos n:32)



**Fig. 7 b.** *S. bonapartii*. Diámetro promedio de los previtelogénicos (blancos n: 405 ) y vitelogénicos (amarillentos n: 103 ) y (amarillos n:100)



**Figuras III.1.7:** Epitelio ovárico de *A. platana*. **a)** no plegado. *Coloración: Tricrómico de Masson* **b)** plegado. *Coloración: Sudán B*. Por debajo de ambos epitelios, puede observarse la túnica albugínea.

**Figuras III.1.8:** vista general del ovario de *A. platana* donde se puede observar la distribución folicular. **a)** ovario inmaduro **b)** ovario maduro. *Coloración: Tricrómico de Masson*.

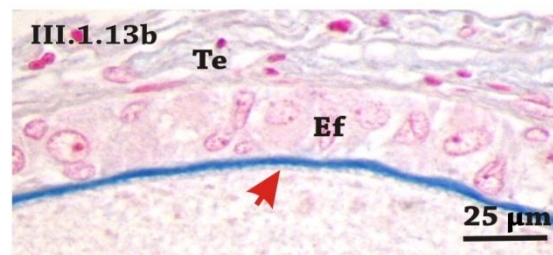
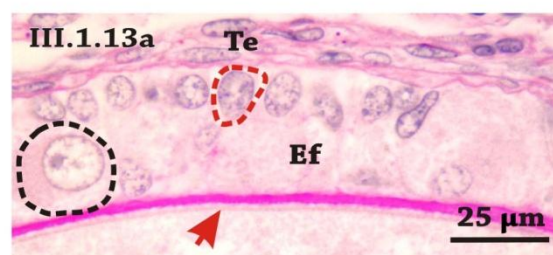
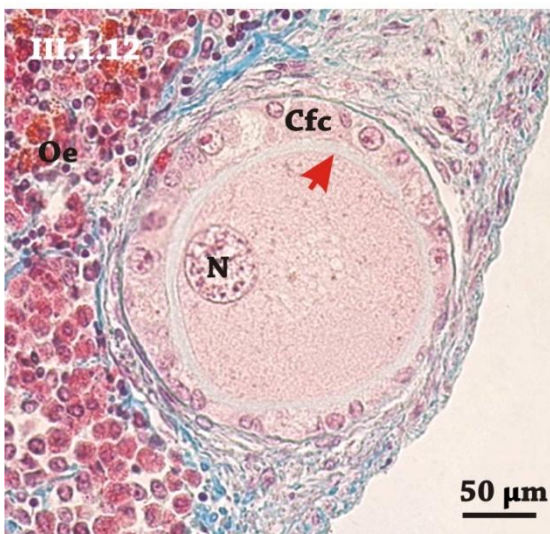
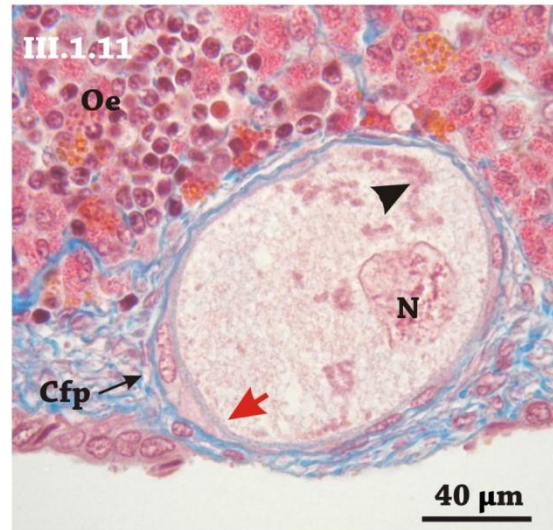
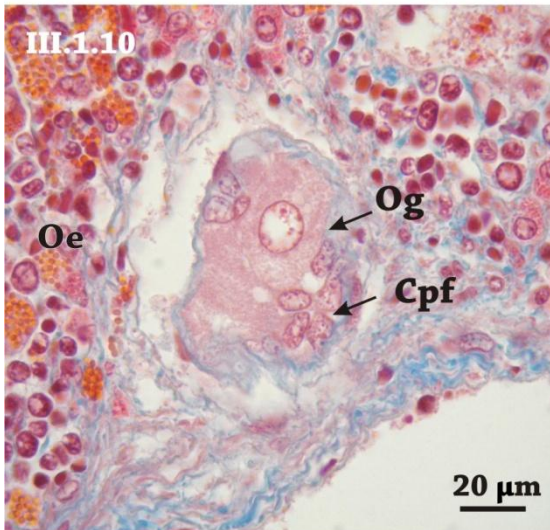
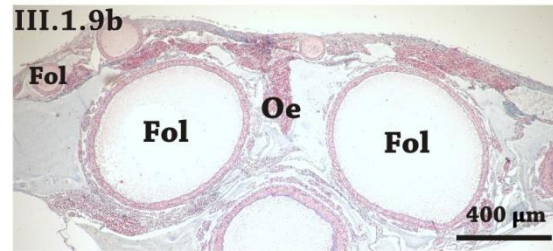
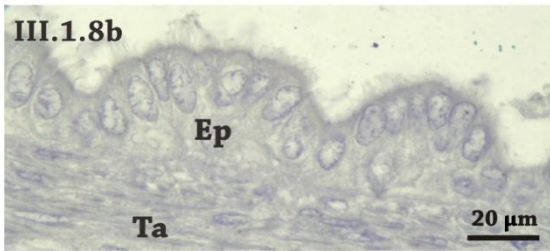
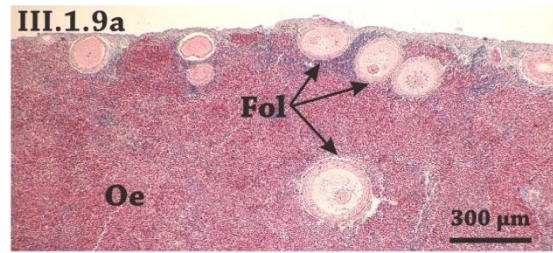
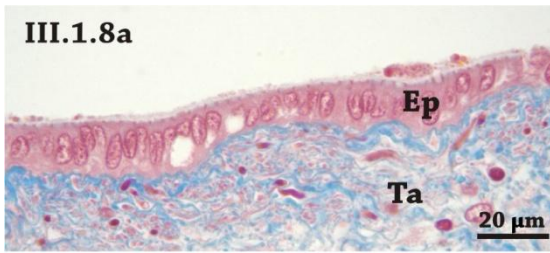
**Figura III.1.9:** Ovogonia presente en el ovario inmaduro. *Coloración: Tricrómico de Masson*.

**Figura III.1.10:** Folículo primordial. *Coloración: Tricrómico de Masson*.

**Figura III.1.11:** Folículo primario. *Coloración: Tricrómico de Masson*.

**Figuras III.1.12:** Detalle del epitelio folicular y la zona pelúcida **a)** PAS (+). **b)** AB pH 2,5 (+).

**Referencias:** **Oe:** órgano epigonal; **Fol:** folículos; **Ef:** epitelio folicular; **Te:** tecas; **Cpf:** células pre-foliculares; **N:** núcleo; **Cfp:** célula folicular plana; **Cfc:** célula folicular cúbica; **Flecha roja:** zona pelúcida; **Cabeza de flecha negra:** cuerpos de Balbiani; **Línea punteada negra:** célula folicular globosa; **Línea punteada roja:** célula folicular cúbica.



**Figura. III.1.13:** Folículo en desarrollo sin indicio de vitelogénesis. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura. III.1.14:** Folículo en desarrollo con indicio de vitelogénesis. Nótese el vitelo en forma de pequeños gránulos y la estratificación del epitelio folicular. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

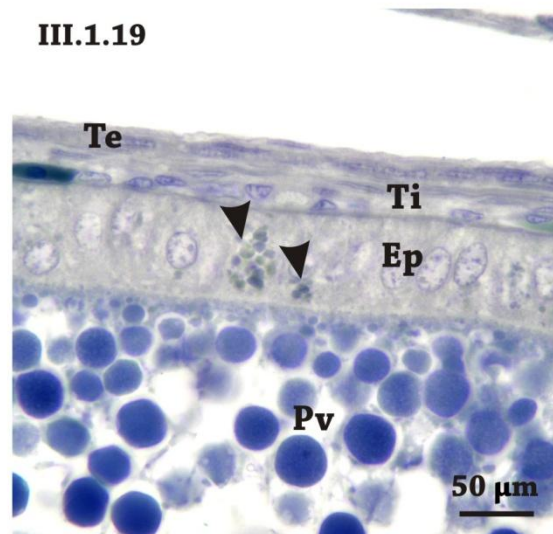
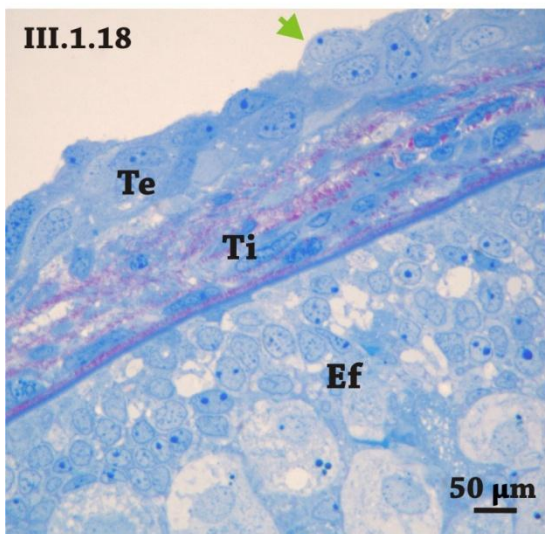
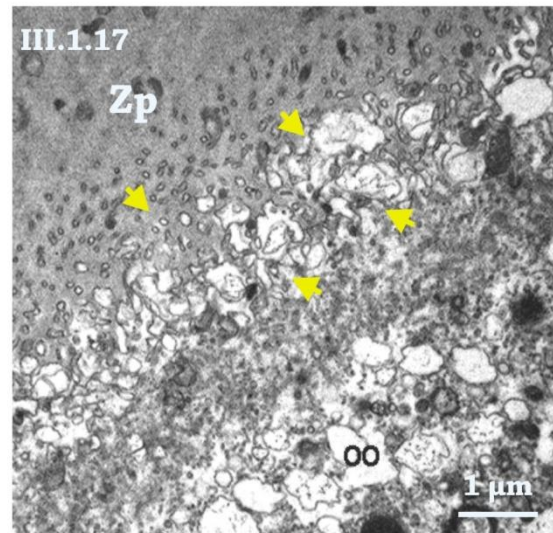
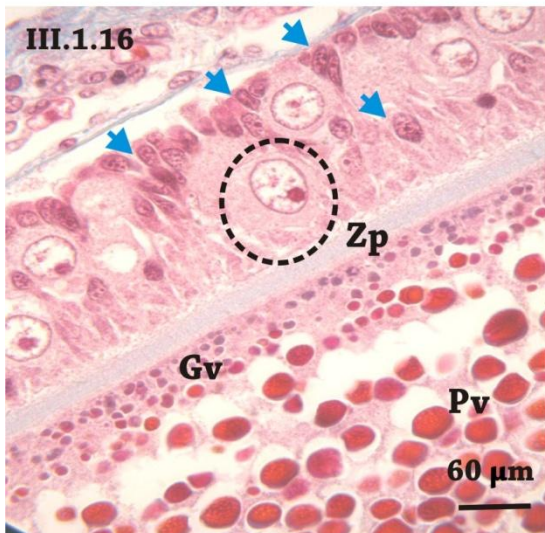
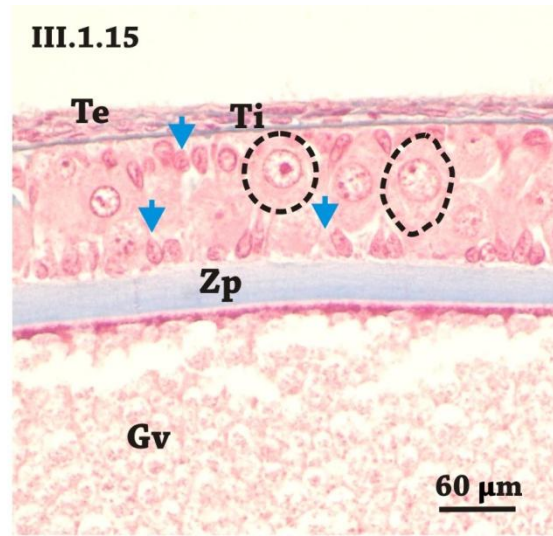
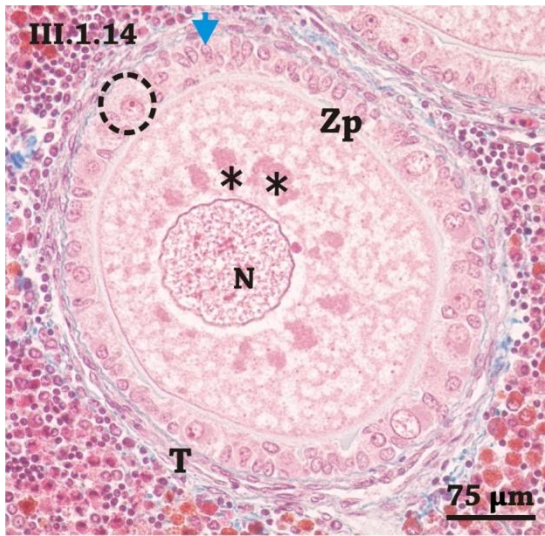
**Figura. III.1.15:** Folículo en desarrollo más avanzado, observándose granulos de vitelo en la periferia y placas hacia el interior del mismo. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura. III.1.16:** Microfotografía electrónica de la membrana del ovocito en un folículo en desarrollo mostrando las prolongaciones hacia la zona pelúcida.

**Figura. III.1.17:** Corte semifino de un folículo en desarrollo en donde se pueden observar en detalle las tecas interna y externa. *Coloración: azul de metileno-azur II-fucsina básica.*

**Figura. III.1.18:** Folículo vitelado, en donde se pueden observar las placas vitelínicas. Nótese los gránulos Sudán B (+) en el epitelio folicular. *Coloración: Sudán black.*

**Referencias:** Zp: zona pelúcida; N: núcleo; asteriscos: cuerpos de Balbiani; **Círculo líneas punteadas:** célula globosa; **Flechas azules:** células cilíndricas; T: tecas; **Te:** teca externa; **Ti:** teca interna; **Gv:** gránulos de vitelo; **Pv:** placas de vitelo; **Oo:** oolema; **Flechas amarillas:** pliegues y proyecciones de los ovocitos; **Cabezas de flechas negras:** gránulos Sudan B (+).



**Figura III.1.19 a:** Vista general de un cuerpo lúteo de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura III.1.19 b:** Detalle de las células luteínicas. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

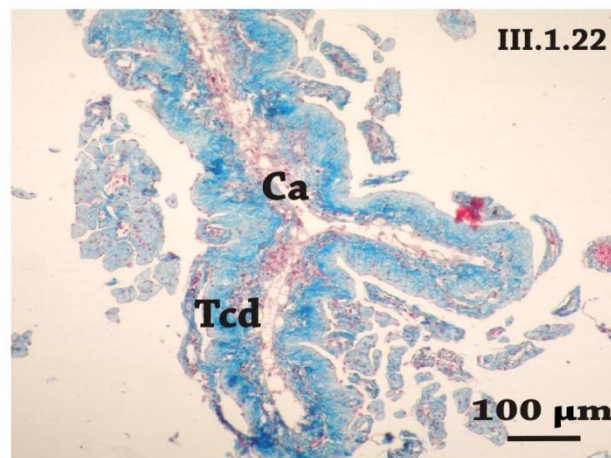
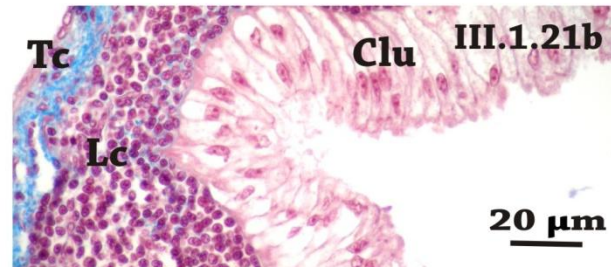
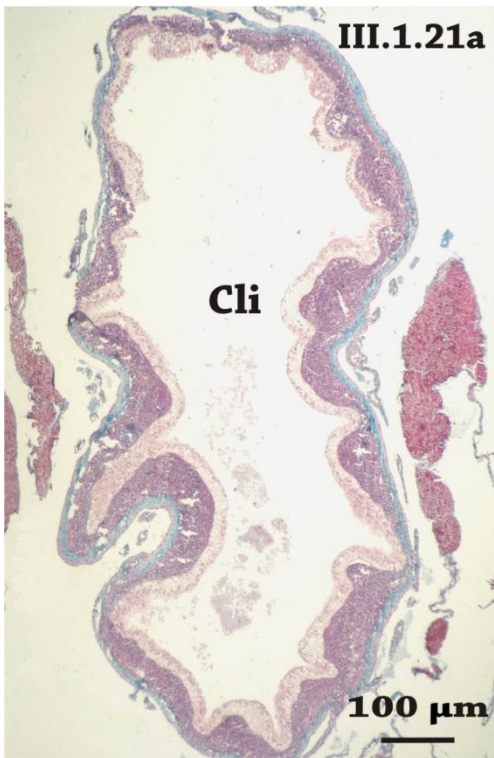
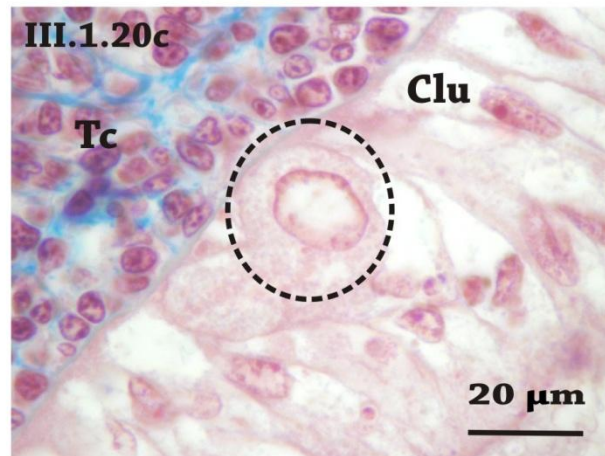
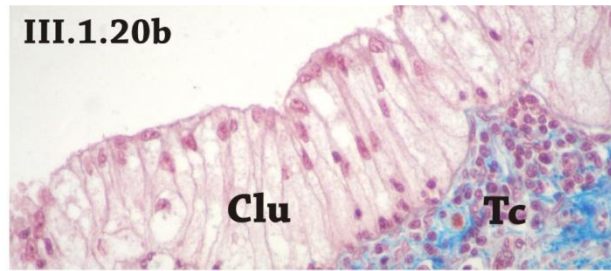
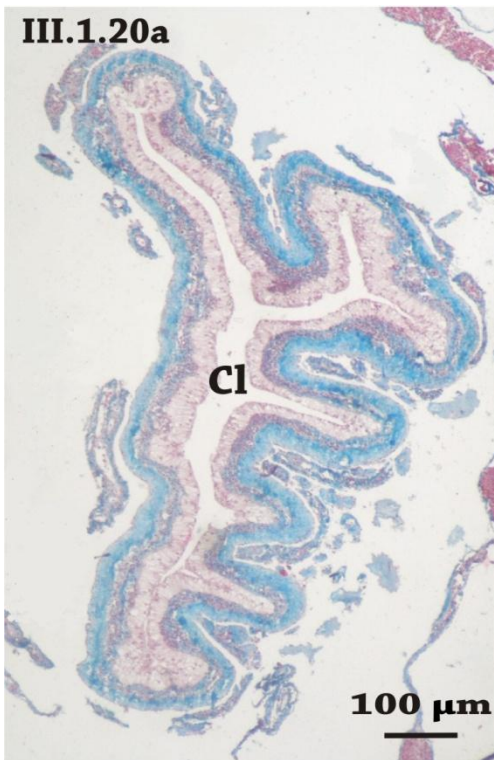
**Figura III.1.19 c:** Detalle de una célula globosa hipertrofiada entre las células luteínicas. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

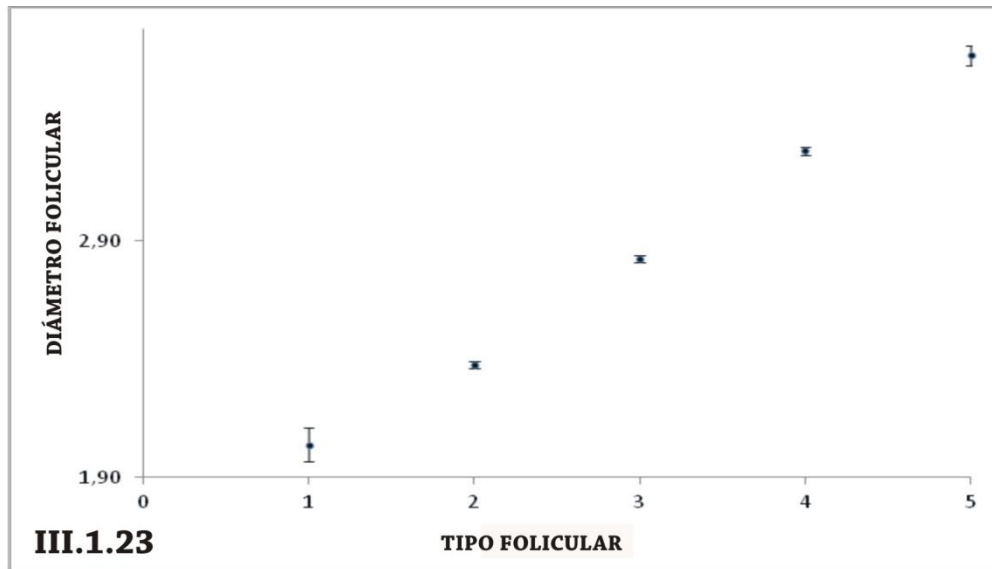
**Figura III.1.20 a:** Vista general de un cuerpo lúteo con una gran infiltración de linfocitos. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura III.1.20 b:** Detalle de los linfocitos presentes entre las células luteínicas y el tejido conectivo. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

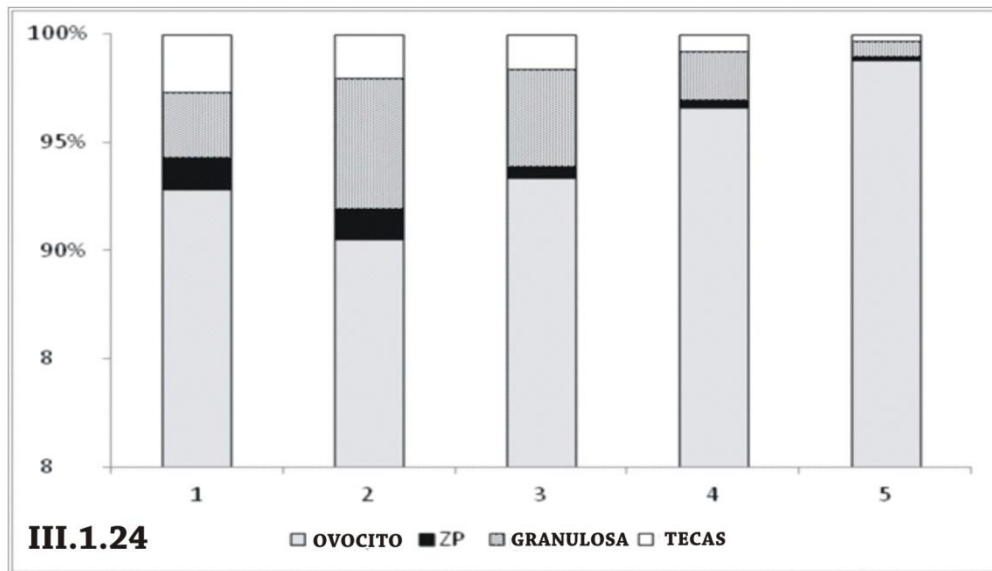
**Figura III.1.21:** Vista general de un cuerpo atrésico. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** Cl: cuerpo lúteo; Clu: células luteínicas; Cli: cuerpo lúteo con infiltración de linfocitos; Lc: linfocitos; Ca: cuerpo atrésico; Tcd: tejido conectivo denso; **Círculo negro punteado:** célula globosa hipertrofiada.





III.1.23

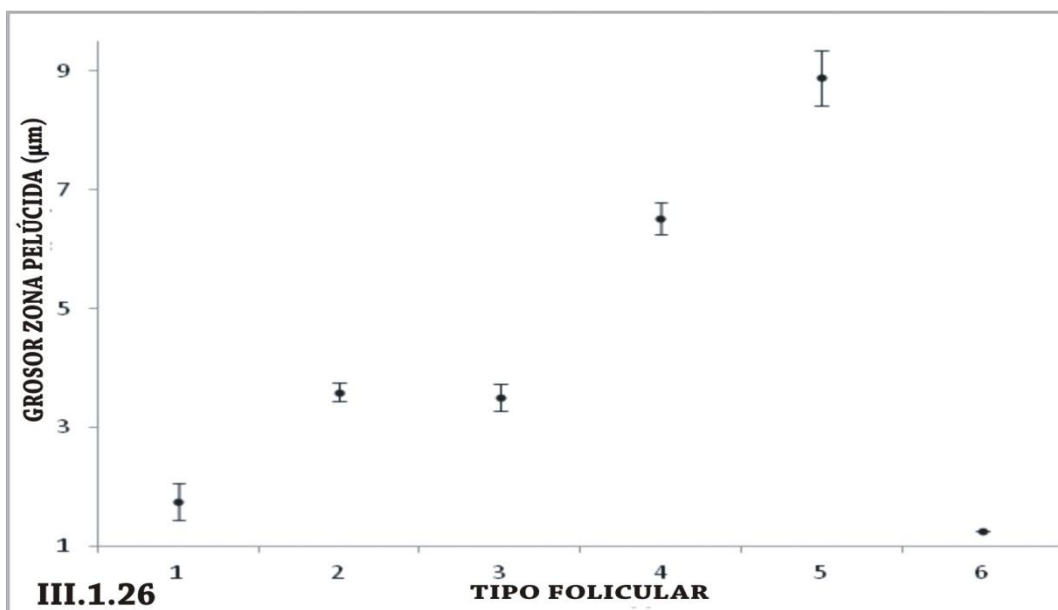
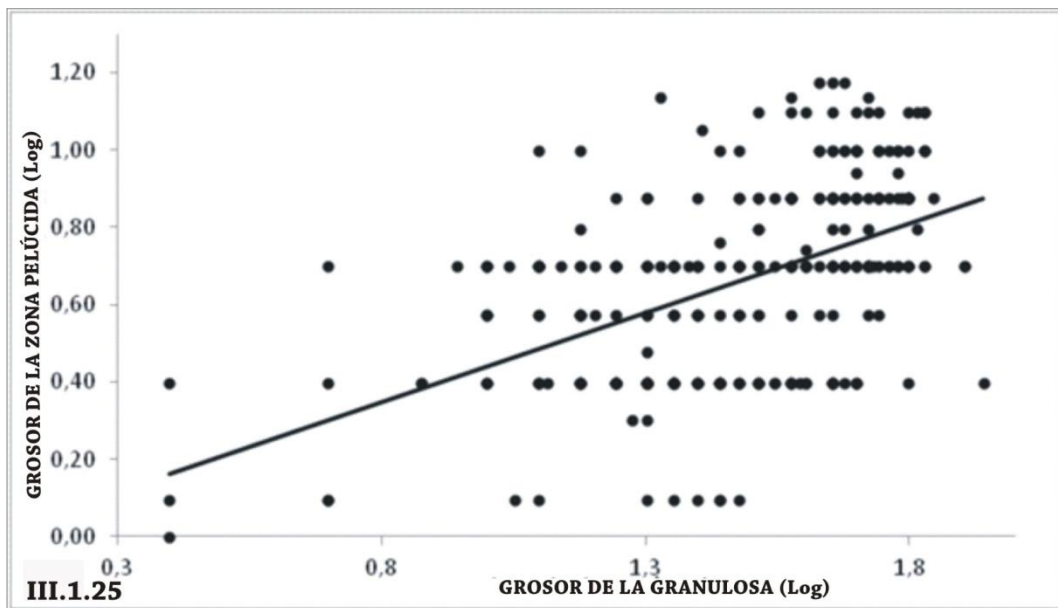


III.1.24

**Figura III.1.23:** Diámetro de los distintos tipos foliculares de *A. platana*. Obsérvese el crecimiento exponencial y la escasa dispersión.

**Figura III.1.24:** Representatividad de las diferentes zonas foliculares en *A. platana*.

**Referencias:** 1: folículos primordiales; 2: folículos primarios; 3: folículos en desarrollo sin inicio de vitelogénesis; 4: folículos en desarrollo con inicio de vitelogénesis (gránulos de vitelo); 5: folículos vitelados (placas de vitelo).



**Figura III.1.25:** Patrón de crecimiento de la zona pelúcida vs. Granulosa en *A. platana*.

**Figura III.1.26:** Variación del espesor de la zona pelúcida para cada tipo folicular en *A. Platana*.

**Referencias:**

- 1: folículos primordiales; 2: folículos primarios;
- 3: folículos en desarrollo sin inicio de vitelogénesis;
- 4: folículos en desarrollo con inicio de vitelogénesis (gránulos de vitelo);
- 5: folículos vitelados (placas de vitelo); 6: folículo a término.



## **III.2: OVIDUCTO ANTERIOR Y GLÁNDULA OVIDUCTAL**

### **III.2.1: INTRODUCCIÓN**

Los condrictios presentan un sistema de conductos genitales que derivan de los conductos de Müller y comparten varias características con los de otros vertebrados (Musick y Ellis, 2005; Mc Millan, 2007).

Estos conductos son pares y se presentan distintas regiones funcionales: el *ostium* (puede ser par o impar), los oviductos, las glándulas oviductales y los úteros (Koob y Callard, 1991; Hamlett y Koob, 1999). Durante la ovulación, los ovocitos son liberados a la cavidad peritoneal, donde son recogidos por una estructura en forma de embudo, que se encuentra al comienzo del oviducto: *el ostium*. Luego pasan a través del oviducto anterior, donde son fecundados y de allí van hacia las glándulas oviductales, en donde se producen las envolturas terciarias del huevo (Mc Millan, 2007). Finalmente, llegan al útero. Ambos úteros desembocan de forma separada en un seno urogenital único. En las especies ovíparas, este último se presenta como un saco, que puede contener las cápsulas por tiempo variable, antes de ser depositadas en el medio (Hamlett y Koob, 1999; Galíndez y Estecondo, 2008; Díaz Andrade *et. al.*, 2013).

La glándula oviductal (denominada también glándula nidamental, glándula del albumen o *shell gland*), es una glándula especializada, única entre los vertebrados. Cumple varias funciones importantes:

- Formación de la envolturas terciarias, incluyendo la cápsula coriácea de las especies ovíparas (las envolturas primarias y secundarias son

producidas por el oocito (zona pelúcida) y por el epitelio folicular del ovocito (túnica granulosa), respectivamente (Hamlett *et. al.*, 1998; Smith *et. al.*, 2004; Maia *et. al.*, 2015).

- Transporte de los huevos fertilizados.
- Reserva espermática (Pratt Jr., 1993; Hamlett *et. al.*, 2002; Smith *et. al.*, 2004; Serra Pereira *et. al.*, 2010; Moura *et. al.*, 2011; Maia *et. al.*, 2015; Marongiu *et. al.*, 2015).

Pratt (1993), describió las características típicas que presenta el espermatozoide cuando se almacena en el interior de las glándulas oviductales, determinando de esta manera, diferentes patrones de almacenamiento:

- *No-almacenamiento (días)*: espermatozoide densamente empaquetado en el lumen o túbulos superficiales, ubicados al azar.
- *Almacenamiento a corto plazo (semanas a meses)*: espermatozoide poco empaquetado en los túbulos alejados del lumen.
- *Almacenamiento de largo plazo (meses a años)*: espermatozoide densamente empaquetado, formando masas en los túbulos profundos de las glándulas.

La glándula oviductal se encuentra presente en todos los peces cartilaginosos estudiados, a excepción de la familia Narcinidae (Prasad, 1945). Es un órgano par, formado por numerosas glándulas tubulares. Su desarrollo y complejidad estructural se relacionan con el modo reproductivo de la especie (Hamlett y Koob, 1999; Stevens, 2001; Storrie, 2004; Díaz Andrade *et. al.*, 2008; Galíndez y Estecondo, 2008; Galíndez *et. al.*, 2010; Moura *et. al.*, 2010; Serra

**Oviducto anterior y Glándula oviductal**

Pereira *et. al.*, 2010; Maia *et. al.*, 2015; Marongiu *et. al.*, 2015; Wehitt *et. al.*, 2015). Su tamaño varía a lo largo del ciclo reproductivo, siendo máximo en hembras maduras y en el momento previo a la ovulación (Braccini *et. al.*, 2006; Mabragaña, 2007; Colonello, 2009; Moura *et. al.*, 2010).

Los estudios sobre esta glándula se realizaron principalmente, en especies del Hemisferio Norte y Australia (Hamlett *et. al.*, 1999a; Stevens, 2001; Smith *et. al.*, 2004; Storrie *et. al.*, 2008; Moura *et. al.*, 2010; Serra Pereira *et. al.*, 2010; Maia *et. al.*, 2015; Marongiu *et. al.*, 2015). En Argentina, los estudios estructurales se realizaron en pocas especies, de los géneros *Sympterygia*, *Mustelus* y *Zearaja* (Díaz Andrade *et. al.*, 2008; Galíndez y Estecondo, 2008; Galíndez *et. al.*, 2010; Wehitt *et. al.*, 2015).

La terminología utilizada para la caracterización de la glándula oviductal en este trabajo es la propuesta por Hamlett y Koob (1999). De acuerdo a estos autores, se diferencian 4 zonas en base a sus características microestructurales. Estas zonas, de anterior a posterior, son: *Club*, *Papillary*, *Baffle* y *Terminal*.

Los objetivos de esta sección fueron:

- ✓ Analizar las características histológicas e histoquímicas del oviducto anterior y la glándula oviductal de *A. platana*.
- ✓ Registrar la presencia de esperma en la glándula oviductal y en los *frotis* de las cloacas en ambas especies.

### **III.2.2: MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el estudio histológico de la glándula oviductal se analizaron ejemplares maduros de *A. platana* (n: 40) y de *S. bonapartii* (n: 33), en forma estacional. Para el análisis morfológico e histológico, las glándulas se cortaron sagitalmente.

En ambas especies, se registró la presencia de esperma a lo largo del año. Asimismo, se realizaron *frotis* cloacales de hembras maduras, a fin de detectar presencia de esperma post-copula. Éstos se colorearon con Hematoxilina y Eosina.

### **III.2.3: RESULTADOS**

#### **III.2.3.1 OVIDUCTO ANTERIOR**

En *A. platana* los oviductos son pares, tubulares y se extienden hasta la glándula oviductal. En animales inmaduros son translúcidos y casi imperceptibles, finos y frágiles. A medida que la hembra madura, el oviducto se va ensanchando y engrosando (véase Cap. II: Materiales y métodos, Figs. II.17 y II.18).

A nivel histológico se pueden observar 3 túnicas: mucosa, muscular y serosa (Fig. III.2.1). La túnica mucosa presenta pliegues longitudinales que forman glándulas tubulares ramificadas (Fig. III.2.2). El epitelio que reviste estas glándulas es cilíndrico simple, con dos tipos celulares intercalados: células mucosas grandes, con núcleos basales heterocromáticos y células piriformes ciliadas, con núcleos grandes, eucromáticos y apicales (Figs. III.2.3 y III.2.4). Las

células ciliadas, ubicadas en el fondo de los pliegues, son más altas (Fig. III.2.4) y las mucosas tienen gránulos citoplasmáticos apicales, PAS (+) y AB pH 2,5 (+) (Figs. III.2.5 a y b). Por debajo se encuentra tejido conectivo laxo, muy vascularizado y con fibras musculares dispersas (Fig. III.2.6). La túnica muscular, de fibras musculares lisas, presenta disposición circular. Todo el órgano está rodeado por una serosa típica, de tejido conectivo laxo tapizada por un epitelio simple plano. No se encontró presencia de espermatozoides en esta región.

### **III.2.3.2 GLÁNDULA OVIDUCTAL**

#### ***Descripción macroscópica***

Estas glándulas están suspendidas en la cavidad corporal por mesenterios (Fig. III.2.7). En los animales inmaduros, se pueden diferenciar como un pequeño engrosamiento de los oviductos. En animales en maduración, comienza su ensanchamiento y va adquiriendo la forma acorazonada característica (véase *Cap. II: Materiales y métodos, Figs. II.17 y II.18*).

Las hembras maduras de *A. platana* presentan las glándulas bien desarrolladas (Fig. III.2.8). La mitad dorsal es levemente más corta que la ventral (Fig. III.2.9). En el material fresco pueden diferenciarse, a ojo desnudo, las distintas zonas (Figs. III.2.9 y III.2.10). Por otra parte, en hembras grávidas se destacan zonas pigmentadas en los márgenes laterales (región terminal) (Fig. III.2.11).

### **Descripción microscópica**

Histológicamente, la glándula oviductal está compuesta por tres tunicas: mucosa, muscular y una serosa delgada. En ejemplares maduros, la mucosa se presenta muy plegada, la cual presenta variaciones morfológicas e histoquímicas que permiten caracterizar las zonas (Fig. III.2.12a).

- **Zona Club**

Se caracteriza por presentar pliegues en forma de "T" (*club-shaped lamelle*), revestidos por un epitelio cilíndrico simple ciliado, donde desembocan glándulas tubulares simples (Fig. III.2.12b). Los túbulos glandulares presentan dos tipos de células, ciliadas, con núcleo apical y secretoras, con núcleo grande y basal. Estas últimas tienen gránulos PAS (+) (Fig. III.2.13). El corion es de tejido conectivo laxo vascularizado.

- **Zona Papillary**

La *zona papillary*, presenta pliegues en "forma de dedo" más numerosos y bajos que los de la *zona Club* (Fig. III.2.12c). En el fondo de los pliegues desembocan glándulas tubulares ramificadas de naturaleza mucosa (Fig. III.2.14). Los adenómeros proximales reaccionan positivamente al PAS y al AB, pH 2.5, en tanto que los distales, solo reaccionan al AB (Fig. III.2.15). El epitelio superficial es similar al de la zona anterior.

- **Zona Baffle**

Es la zona más extensa. La mucosa de esta región está compuesta por lamelas, que forman placas, rodeadas por pliegues bajos llamados *spinnerets*. Las lamelas aumentan su altura hacia caudal (Figs. III.2.12 d y III.2.16). El epitelio que las recubre, es cilíndrico bajo ciliado, con células mucosas PAS (-) y AB (-). Las *spinnerets* presentan un epitelio más bajo, cuboidal, ciliado (Fig. III.2.16). Entre las lamelas y los *spinnerets*, desembocan glándulas tubulares simples con células ciliadas y secretoras. Estas últimas exhiben gránulos citoplasmáticos (1,5-2,5  $\mu\text{m}$ ) PAS y AB (-), cuyo número aumenta hacia caudal (Figs. III.2.17 y III.2.18). Entre los adenómeros glandulares se pudo observar acumulaciones de un material rojizo de aspecto vítreo (Figs. III.2.19 a y b).

- **Zona Terminal**

La mucosa se invagina formando criptas y el epitelio de revestimiento es cilíndrico, simple, ciliado (Fig. III.2.12 e). Hay glándulas tubulares simples de diferente naturaleza: mucosas, serosas y mixtas (Figs. III.2.20 y III.2.21). Los adenómeros que se encuentran cerca del lumen de la glándula son mucosos y los más profundos son serosos, similares a los de la zona *Baffle* (Fig. III.2.20). Intercalados entre ambos se encuentran acinos mixtos (Figs. III.2.21 y III.2.22). Se observó acumulación del mismo material encontrado en la zona *Baffle* (Fig. III.2.23).

### **III.2.3.3 CÁPSULAS**

En *A. platana* se registró la presencia de cápsulas durante todas las estaciones del año: verano (n: 4); otoño (n: 10); invierno (n: 7) y primavera (n: 5) y en distintas etapas de formación (Figs. III.2.24 a-h). En *S. bonapartii* se registraron cápsulas totalmente formadas, sólo en los meses de agosto y noviembre.

En la cápsula en formación de *A. platana*, se observó que la región anterior (recientemente secretada) se encontraba adherida a la glándula oviductal (Figs. III.2.24 a-c). En un estado un poco más avanzado de desarrollo, la zona craneal es aún blanda y blanquecina, en tanto que la caudal, ya ingresada en el útero, se presentaba más gruesa y de color verde amarronado iridiscente (Figs. III.2.24 c y d). En el interior de las cápsulas se encontraban huevos (ovocitos fecundados) rodeados por una sustancia gelatinosa transparente (Figs. III.2.15 e y h). En un ejemplar se registró la presencia de dos huevos en la misma cápsula (Figs. III.2.15 e y h). En ninguna de las cápsulas examinadas se observaron, a simple vista, embriones.

### **III.2.3.4 RESERVA ESPERMÁTICA**

Se registró presencia de esperma en dos ejemplares de *A. platana* en el mes de febrero y en uno de *S. bonapartii* en el mes de julio.

En *A. platana* se halló esperma en el lumen glandular y entre las prolongaciones de la zona *Baffle*. Los espermatozoides se encontraban desagregados e inmersos en una matriz amorfa (Fig. III.2.25). En *S. bonapartii* se



encontraron en la luz de los túbulos de la región *Baffle*, también de forma desagregada y en menor cantidad (Fig. III.2.26).

### **III.2.3.5 FROTIS**

Se registró la presencia de espermatozoides en el 2% de los ejemplares de ambas especies, correspondientes a los meses de agosto y septiembre para *A. platana* y de julio para *S. bonapartii*. En la raya platana, los espermatozoides se encontraron de forma agregada en un ejemplar y de forma desagregada en el otro (Figs. III.2.27 a y b). En *S. bonapartii* se observaron en forma agregada, con la estructura característica de *espermatozeugmata* (Fig. III.2.28 a) y en algunos lugares, formando "cúmulos" muy concentrados (Fig. III.2.28 b). En todos los preparados se observaron células "endocloacales" muy similares a las endocervicales de los vertebrados superiores (Fig. III.27a).

### III.2.4 DISCUSIÓN

El sistema de conductos genitales presente en los elasmobranquios sigue patrones semejantes a los observados en vertebrados superiores (Nelson, 2006; Mc Millan, 2007). Presentan diferentes especializaciones en función del modo reproductivo de cada especie.

Una de las funciones más conocidas que se le atribuyen a los oviductos anteriores es el transporte del ovocito. Según Metten (1939), este transporte se da exclusivamente por la acción de las cilias, ayudado por la secreción de las células glandulares, que actúa como lubricante.

Asimismo, Hamlett y Koob (1999) sostienen que la ausencia de una capa muscular importante en la pared del oviducto, sustentaría la teoría del movimiento ciliar como motor del transporte de los ovocitos hacia la glándula oviductal. Sin embargo, en *A. platana* la túnica muscular se presenta bastante desarrollada y podría contribuir, junto a las especializaciones del epitelio, en el transporte. Teniendo en cuenta el diámetro de los folículos a término en esta especie, no sería extraño que el movimiento ciliar solo no sea suficiente y necesite el auxilio de contracciones musculares. Existen otras especies de rájidos como *Sympterygia acuta* y *S. bonapartii*, donde esta túnica está poco desarrollada, por lo que las especializaciones del epitelio tendrían el papel principal en el transporte del ovocito (Díaz Andrade, 2010).

Otra función atribuida al oviducto anterior, es la de ser el sitio donde se produce la fertilización (Metten, 1939; Hamlett *et. al.*, 2002; Smith, 2004; Storrie, 2008). Existen especies en las que se observó esperma en esta región

(*Scyliorhinus canicula*, Metten 1939; *Carcharias taurus*, Gilmore, 1993; *Mustelus antarcticus*, Storrie et. al., 2008; *Hydrolagus collei*, Storrie et. al., 2008). En los ejemplares analizados de *A. platana* y *S. bonapartii* no se observaron espermatozoides en el oviducto. Dado que en el siguiente tramo, la glándula oviductal, se produce la formación de las cubiertas del huevo y éste no presenta micropilo, es muy probable que la fecundación tenga lugar en el corto trayecto del oviducto anterior (Galíndez, 2016).

A pesar de la diversidad de modos reproductivos que presentan los peces cartilagosos, la glándula oviductal es una estructura que se ha conservado a lo largo de la radiación evolutiva del grupo. Muestra características histoquímicas, morfológicas y fisiológicas típicas en cada especie, variando básicamente en la representatividad de las distintas zonas (Galíndez y Estecondo, 2008).

El diseño funcional, en *A. platana*, concuerda con lo observado en la mayoría de los elasmobranquios (Díaz Andrade, 2010; Serra Pereira et. al., 2010; Maia et. al., 2015; Marongiu et. al., 2015; Wehitt et. al., 2015).

Las especializaciones (cilias y células secretoras) que presenta el epitelio en toda su superficie, ayudarían al movimiento del ovocito en sentido anteroposterior (Hamlett et. al., 2002).

En estas glándulas, las diferentes zonas pueden reconocerse y diferenciarse según su morfología y afinidad tintorial. Anteriormente, las cuatro zonas descritas por Hamlett et. al. (1999<sup>a</sup>), recibían diferente nomenclatura, esencialmente relacionada a su función (Metten 1939; Prasad, 1945). La zona

*Club* y *Papillary*, en conjunto, se denominaban "zona del albumen". Si bien no se conoce la naturaleza exacta de las secreciones de esta zona, es claro que esta región es la encargada de producir la parte gelatinosa (*jelly*) de las envolturas terciarias del huevo. Esta "gelatina", puede presentar distintos grados de viscosidad, siendo más densa en el interior de los cuernos capsulares (gelatina producida por la zona *Papillary*) y menos viscosa en cercanías de la cápsula (gelatina producida por la zona *Club*) (Serra Pereira *et. al.*, 2010). La presencia de glucosaminoglicanos ácidos solo en la última hilera de adenómeros de la zona *Papillary* se reportó, también, en especies ovíparas como *Callorhynchus milli* (Smith *et. al.*, 2004) y *Raja clavata* (Serra Pereira *et. al.*, 2010) y especies vivíparas como *M. antarcticus* (Storrie, 2004). Las secreciones de ambas zonas son críticas en el desarrollo embrionario, ya que funcionarían como un método de soporte hidrodinámico del huevo, además de contribuir con la nutrición del embrión (Koob y Straus, 1998; Smith *et. al.*, 2004).

La zona *Baffle* produce los distintos tipos de cápsulas que se observan en los condriictios. Es la que mas varía en función y tamaño y su complejidad se relaciona con la morfología de la cápsula (Marongiu *et. al.*, 2015). En las especies ovíparas está altamente especializada y mucho más desarrollada (*S. acuta* y *S. bonapartii*, Díaz Andrade, 2010; *Raja clavata*, Serra Pereira *et. al.*, 2010; *A. platana*, este estudio). En las especies vivíparas, puede estar ausente o reducida (*M. schmitti*, Díaz Andrade *et. al.*, 2008; *Urobatris halleri* y *U. jamaicensis*, Hamlett *et. al.*, 2005).

En *A. platana*, las glándulas que componen esta región producen un material proteico que podría analogarse al "cristal líquido" y que no reacciona ni al PAS ni al AB (Knight *et. al.*, 1996). En *A. platana*, la zona *Baffle* ocupa la mayor proporción de la glándula y es similar a la de otras especies ovíparas como *S. bonapartii* y *S. acuta* (Díaz Andrade, 2010); *R. clavata* (Serra Pereira *et. al.*, 2010); *R. miraletus* y *Dipturus oxyrinchus* (Marongiu *et. al.*, 2015). Los gránulos de secreción observados en las células glandulares son similares a los de otras especies (Serra Pereira *et. al.*, 2010; Maurongiu *et. al.*, 2015). Estos gránulos, se liberan al lumen y son transportados por el movimiento ciliar del epitelio que tapiza los túbulos. Asimismo, las placas y los *spinnerets* direccionan la secreción, de manera tal que se forma una red de fibras empaquetadas, en diferentes direcciones, que formarán el cuerpo y las ornamentaciones capsulares (Knight *et. al.*, 1996). La consolidación y el oscurecimiento (taninización) de la misma, finalizan en el útero y, en las especies ovíparas, se termina de reforzar en el agua de mar, luego de la puesta (Koob y Cox, 1990; Knight *et. al.*, 1996) La mayor extensión de la zona serosa está asociada no solo a la producción de la cápsula, sino que podría relacionarse con la cantidad y frecuencia de puesta de la especie.

La zona *Terminal* es la responsable de la formación de los cuernos, proyecciones y pelos que ornamentan la cápsula, que en las especies ovíparas, les permite adherirse al sustrato. Otra función que se le adjudica a esta zona es la de almacenamiento de esperma (Smith *et. al.*, 2004; Hamlett *et. al.*, 2005). Los acinos serosos de esta zona son similares a los de la zona *Baffle* y producen las proyecciones de la cápsula, mientras que los acinos mucosos generan una capa de material pegajoso, permitiendo que, una vez

depositada en el fondo marino, la cápsula quede cubierta de arena y/o detritos (Smith, *et. al.*, 2004; Hamlett *et. al.*, 2005). Este mecanismo constituye una excelente adaptación, ya que permite un óptimo camuflaje de los huevos y una disminución de la depredación (Hamlett *et. al.*, 2005; Hoff, 2009). La presencia de tres tipos acinares no es común a todos los condriictios. En *A. platana*, la disposición de los acinos serosos, mucosos y mixtos es similar a la observada en *R. clavata* (Serra Pereira *et. al.*, 2010), en tanto que en *D. oxyrinchus* solo se diferencian acinos mucosos y serosos (Maroungiu *et. al.*, 2015).

La encapsulación de los huevos es un proceso que se da de manera diferente, dependiendo de la modalidad reproductiva. En las especies vivíparas, se forman envolturas terciarias transparentes y delgadas (*candle cases*), que pueden englobar múltiples huevos, como es el caso de *Squalus acanthias*, o contener uno solo, como sucede en *Pristiophorus cirratus* (Stevens, 2002; Hamlett *et. al.*, 2005; Galíndez *et al.*, 2010). En las especies ovíparas, como es el caso de las especies en estudio, forman cápsulas rígidas que protegen el huevo y pueden variar en tamaño, color y forma (Oddone *et. al.*, 2006; Galíndez y Estecondo, 2008). Las glándulas oviductales sintetizan los precursores de la cápsula previamente a la ovulación. Luego del estímulo apropiado, las células secretan y ensamblan los precursores almacenados. Las bandas proteicas que forman la estructura de las fibrillas, permiten que la pared de la cápsula actúe como una membrana semipermeable (Knight y Feng, 1994), manteniendo el gradiente osmótico y iónico y la difusión pasiva de agua (Kormanik, 1993; Leonard *et. al.*, 1999).

Los depósitos de material rojizo-amarronado encontrados en el lumen glandular de hembras con cápsulas en formación, podrían corresponder a secreciones para la formación de la futura cápsula. En cambio, los registrados entre las glándulas tubulares, corresponderían a material extruido de los adenómeros y que no alcanzaría la superficie libre. Este tipo de "incrustaciones" fueron registradas en las mismas zonas en *R. clavata* (Serra Pereira *et. al.*, 2010).

En *A. platana*, la cápsulas estuvieron presentes durante todo el año y en diferentes etapas de desarrollo. Se observó que el mayor portaje de formación de la cápsula se realiza antes de recibir al ovocito fecundado y que en ciertas ocasiones, pueden alojar más de uno (Oddone *et. al.*, 2008 y Coller, 2012). Este hecho es congruente con un ciclo continuo a lo largo del año.

En *S. bonapartii* se registraron cápsulas sólo en dos meses del año. Esto podría deberse a que: a) durante la época de puesta, la especie migra a regiones costeras poco profundas y cercanas a estuarios, las cuales utiliza como zona de puesta (Mabragaña *et. al.*, 2002; Díaz Andrade, 2010); b) el desplazamiento de la flota pesquera en el golfo durante el periodo de puesta de la especie, a regiones de mayor profundidad (125-135m), impide un muestreo correcto sobre la población reproductiva, que se ubica preferentemente a profundidades menores (Estalles, 2012). Sea cual sea el motivo, el número de ejemplares colectados es insuficiente para postular una posible razón a este fenómeno.

El almacenamiento de esperma en la glándula oviductal fue propuesto por primera vez por Lo Bianco en 1909, para muchas especies de holocéfalos y

elasmobranquios de varias familias: Alopiidae, Lamnidae, Carcharhinidae, Triakidae, Sphyrnidae y Callorhynchidae (Metten, 1939; Prasad, 1945; Pratt, 1993; Hamlett *et. al.*, 1998; Conrath y Musick, 2002; Hamlett, 2002; Smith *et. al.* 2004; Storrie *et. al.*, 2008). Este evento no es exclusivo de los elasmobranquios y se presenta en un rango amplio de otros vertebrados (peces óseos, reptiles, anfibios y mamíferos) y en diferentes órganos (Birkhead y Moller, 1993; Sever *et. al.*, 2001; Sever y Hamlett, 2002; Holt y Lloyd, 2009). Es un mecanismo evolutivamente conservado, destinado a asegurar la fertilización exitosa, en especies migratorias o en aquellas con baja densidad poblacional (Pratt, 1993; Holt y Lloyd, 2009).

El almacenamiento de esperma en hembras de condriictios, en especial tiburones y holocéfalos, fue confirmado por análisis histológicos (ej. *C. milli*, Smith *et. al.*, 2004; *M. antarcticus*, Storrie *et. al.*, 2008). Generalmente, ocurre en el interior de túbulos especializados, localizados en la zona *terminal* (Pratt, 1993; Hamlett *et. al.*, 2002; Smith *et. al.*, 2004; Mora *et. al.*, 2011; Porcu *et. al.*, 2014). Las células que conforman estos túbulos producen secreciones que contribuyen al sostén, cuidado y mantenimiento del esperma durante el periodo de almacenamiento. Asimismo, sus células presentan cilias, que son responsables del transporte de esperma fuera de ellos (Hamlett *et. al.*, 2002; Storrie *et. al.*, 2002; 2008). En el caso de los rájidos, ha sido detectado histológicamente, de forma desagregada, cerca del lumen de la zona *Baffle* y más raramente en regiones profundas de la glándula (Hamlett *et. al.*, 1998).

Se ha confirmado la presencia de esperma en el útero y en la glándula oviductal en algunas especies de peces cartilaginosos, tales como *M. canis*



(Hamlett, 2002); *Iago omanensis* (Hamlett et. al., 2002a); *M. antarcticus* (Storrie, 2004; Storrie et. al., 2008); *R. miraletus* y *D. oxyrinchus* (Marongiu et. al., 2015). Estos autores postulan que en dichas especies no tiene lugar un verdadero almacenaje, sino que la presencia de esperma es incidental y correspondería a espermatozoides en tránsito. En base a lo anteriormente expuesto, ninguna de las dos especies aquí estudiadas preservaría el esperma por mucho tiempo, por lo que el semen hallado, provendría de un apareamiento reciente. Sin embargo, el registro de esperma en el interior de los túbulos de la región *Baffle* en *S. bonapartii*, podría asociarse a un tiempo de conservación más largo, como sucede con *R. clavata* (Serra Pereira et. al., 2010). Por otra parte, las observaciones en *A. platana*, concuerdan con las de otros rájidos (*R. agassizi* y *A. castelnaui*, Colonello, 2009). El esperma "almacenado" en las glándulas oviductales de ambas especies estudiadas, se correspondería parcialmente con el patrón de "No-almacenamiento", descrito por Pratt (1993), pero con esperma desagregado.

No existe registro en la literatura del análisis de *frotis* cloacales en condictios. El esperma encontrado correspondería a "esperma post-cópula". En *S. bonapartii* se halló en forma concordante con la época de apareamiento en el golfo (Estalles, 2012). En *A. platana*, en cambio, se registró en los meses de agosto-septiembre, que son previos a unos de los picos de actividad reproductiva (diciembre; Coller, 2012).

La glándula oviductal es una estructura que se ha conservado a lo largo de la evolución de los Condictios. Su función, al envolver a los huevos, a través de estructuras que los protegen y asientan en un determinado sustrato

***Oviducto anterior y Glándula oviductal***

(especies ovíparas), o que los envuelven delicadamente y muchas veces participan en el desarrollo embrionario en sí mismo (especies vivíparas), hacen que esta estructura sea clave para el éxito de las especies.

# Láminas

**Figura III.2.1:** Vista general de un corte transversal del oviducto anterior de una hembra madura de *A. platana*, en el cual se pueden visualizar las cuatro tunicas. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura III.2.2:** Detalle de las glándulas tubulares simples ramificadas de la mucosa. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura III.2.3:** Detalle del epitelio de la mucosa superficial. Se pueden observar las células ciliadas y mucosas intercaladas. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

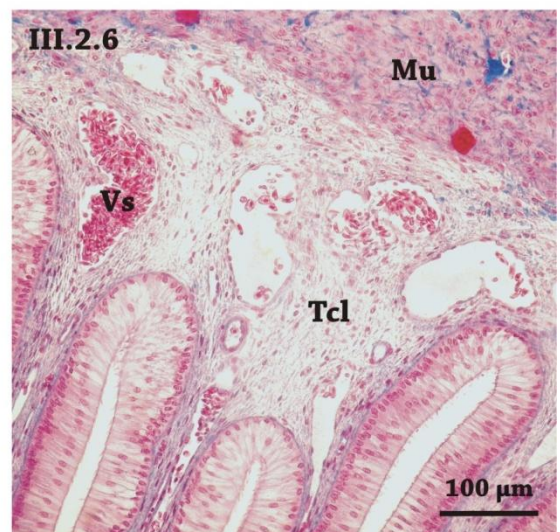
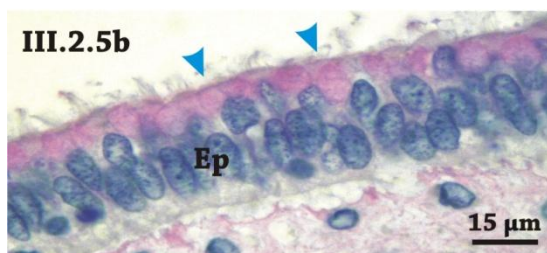
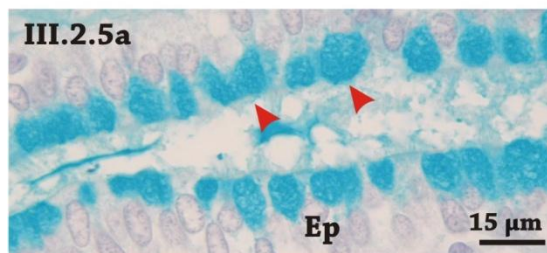
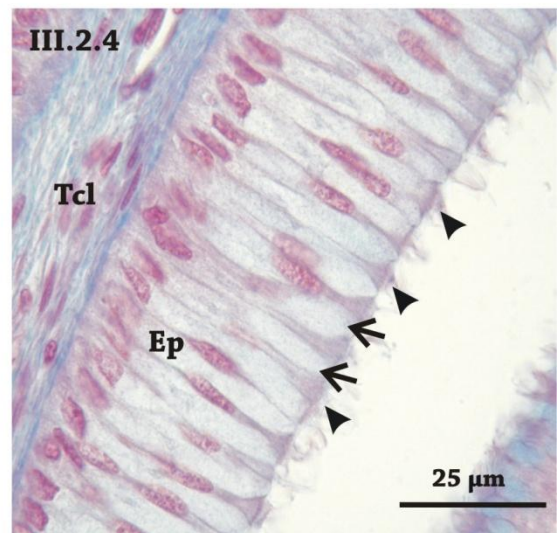
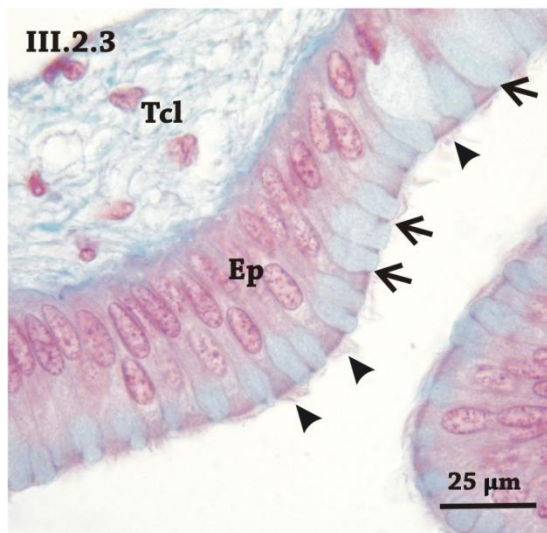
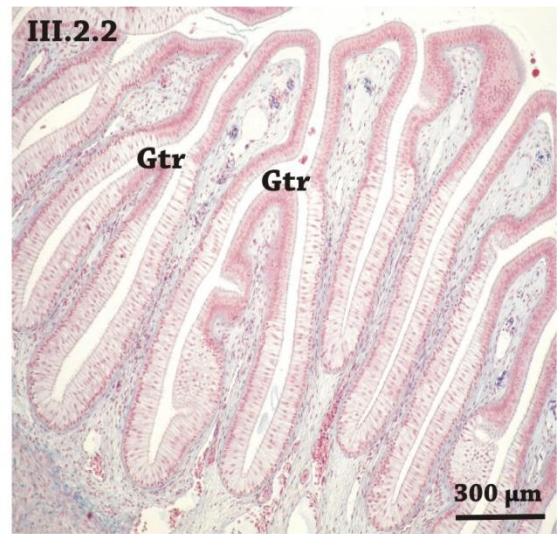
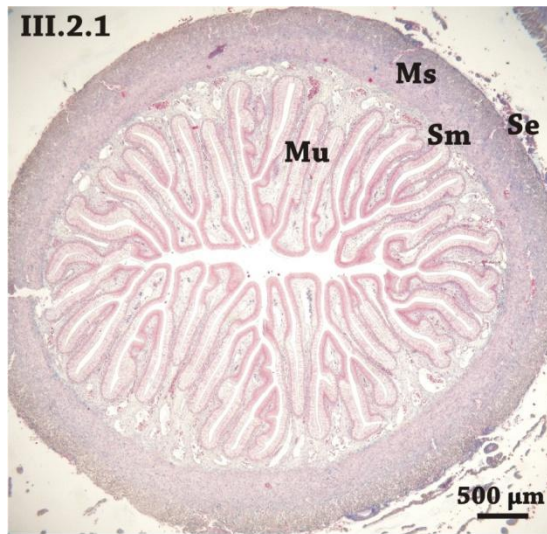
**Figura III.2.4:** Detalle del epitelio de la mucosa profundo. Se pueden observar las células ciliadas y mucosas intercaladas. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura III.2.5:** Epitelio de la mucosa. **a)** células mucosas AB pH 2,5 (+) **b)** células mucosas PAS (+). *Coloraciones: Azul alcian y PAS.*

**Figura III.2.6:** Detalle de la submucosa. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** **Mu:** mucosa; **Sm:** submucosa; **Ms:** muscular; **Se:** serosa; **Gtr:** glándula tubular ramificada; **Tcl:** tejido conectivo laxo; **Ep:** epitelio; **Vs:** vaso sanguíneo; **Flechas negras:** células mucosas; **Cabezas de flecha negras:** células ciliadas; **Cabezas de flecha rojas:** secreción AB pH 2,5 (+); **Cabezas de flecha azul:** secreción PAS (+).

Oviducto anterior y Glándula oviductal



**Figura III.2.7:** Cavidad abdominal de una hembra madura no grávida, donde se puede observar la localización de las glándulas oviductales.

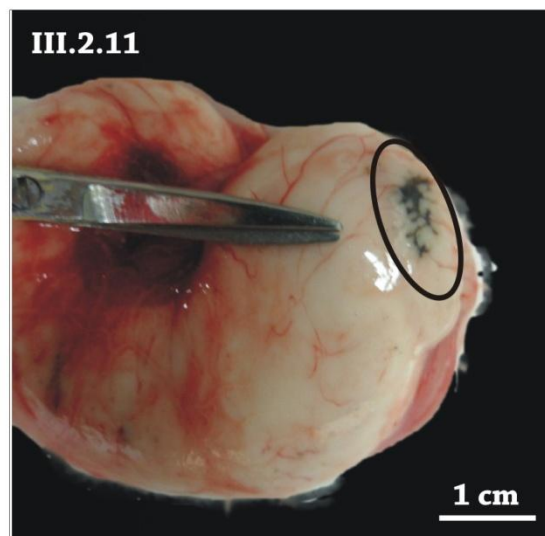
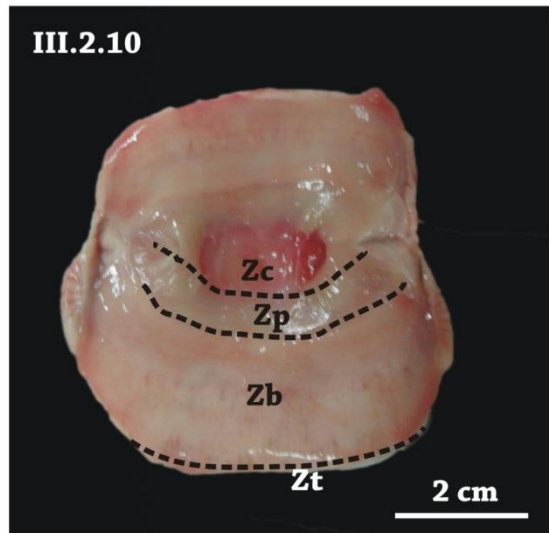
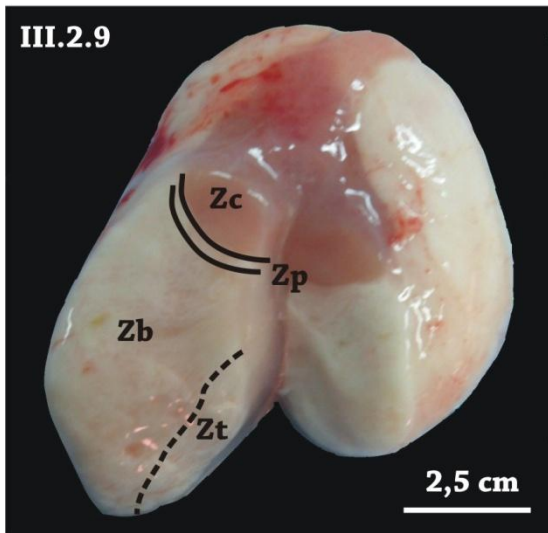
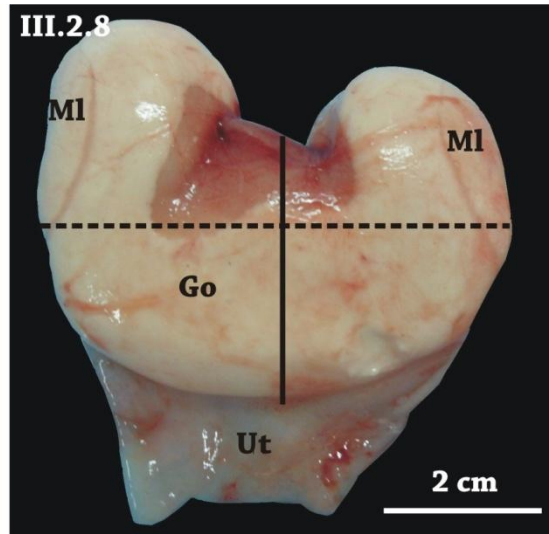
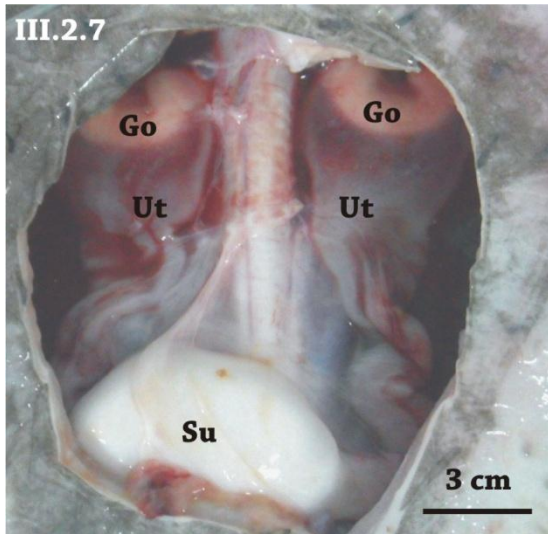
**Figura III.2.8:** Glándula oviductal de un ejemplar maduro de *A. platana*.

**Figura III.2.9:** Corte sagital de la glándula oviductal de una hembra madura de *A. platana* en el que se pueden visualizar las cuatro zonas que la componen.

**Figura III.2.10:** Vista de las dos valvas que conforman la glándula. Nótese que la dorsal es menor que la ventral.

**Figura III.2.11:** Glándula oviductal de una hembra grávida en la que se puede observar el depósito de pigmento en los márgenes laterales.

**Referencias:** **Go:** glándula oviductal; **Ut:** útero; **Su:** seno urogenital; **Ml:** márgenes laterales; **Zc:** zona *club*; **Zp:** zona *papillary*; **Zb:** zona *baffle*; **Zt:** zona *terminal*; **Línea negra sólida:** alto de la glándula oviductal; **Línea negra punteada:** ancho de la glándula oviductal; **Óvalo negro:** depósito de pigmento en el margen lateral.

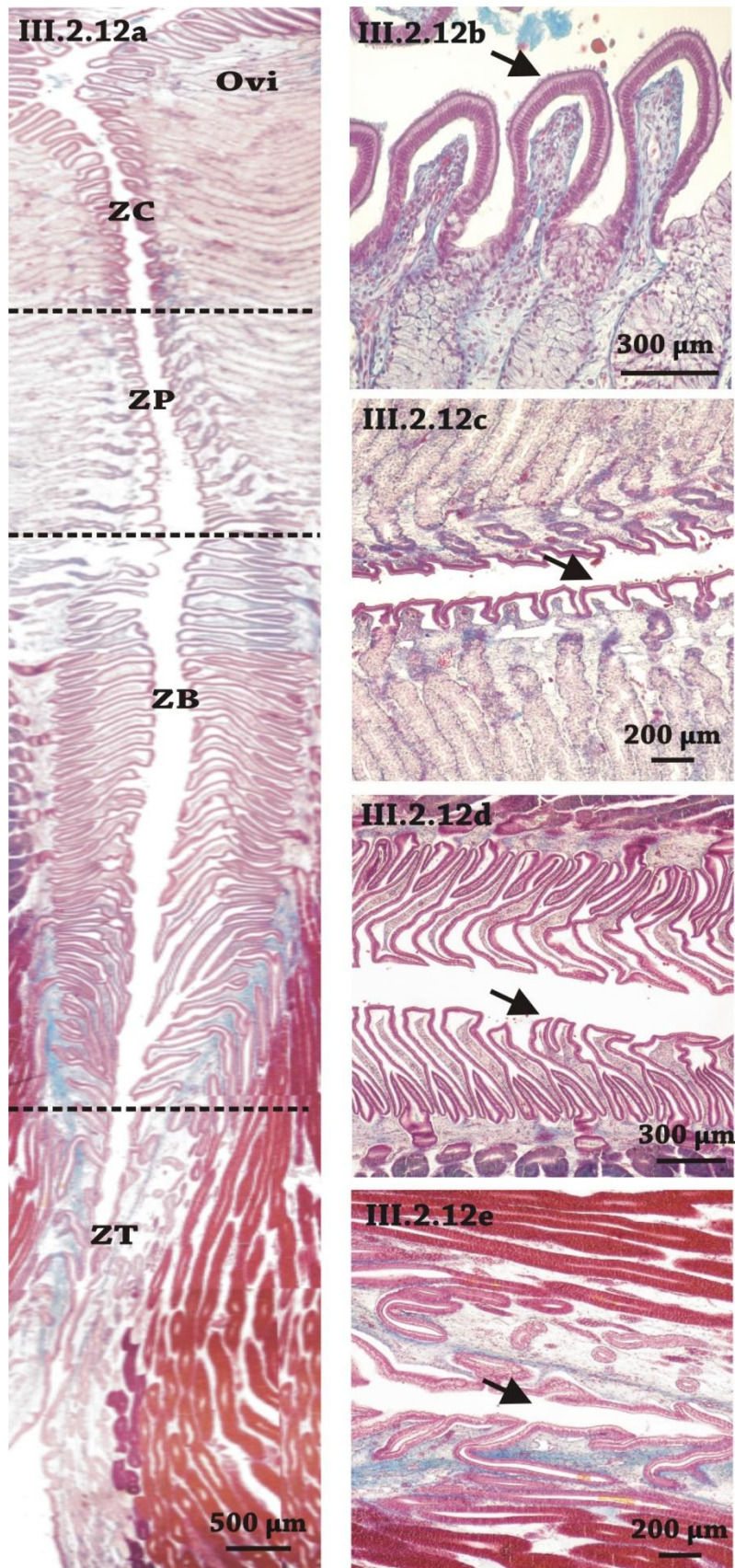


**Figura III.2.12:** a) Vista general de la mucosa de la glándula oviductal de una hembra madura de *A. platana*, en donde se pueden apreciar las diferentes zonas. b) Detalle del epitelio de la zona *Club* c) Detalle del epitelio de la zona *Baffle*. d) Detalle del epitelio de la zona *Terminal*. *Coloración:* Tricómico de Masson.

**Referencias:** Flechas negras: señalización del epitelio; Ovi: oviducto; ZC: zona *Club*; ZP: zona *Papillary*; ZB: zona *Baffle*; ZT: zona *Terminal*.



Oviducto anterior y Glándula oviductal



**Figura III.2.13:** Detalle de los túbulos glandulares de la zona *Club*, donde pueden observarse los distintos tipos celulares. *Coloración:* PAS.

**Figura III.2.14:** Glándulas tubulares mucosas de la zona *Papillary*. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura III.2.15:** Adenómeros distales de la región *Papillary* AB pH 2,5 (+). *Coloración:* Azul Alcian.

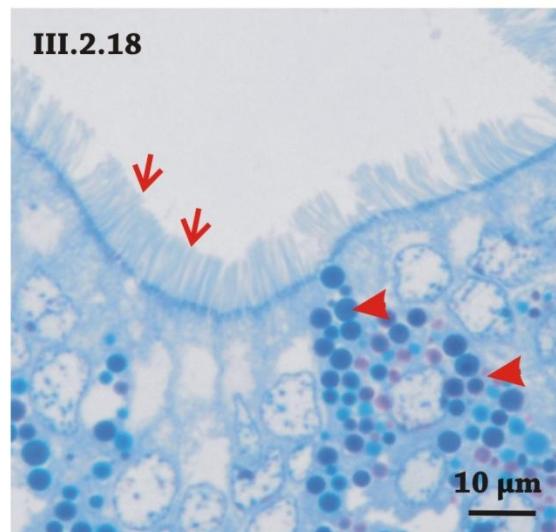
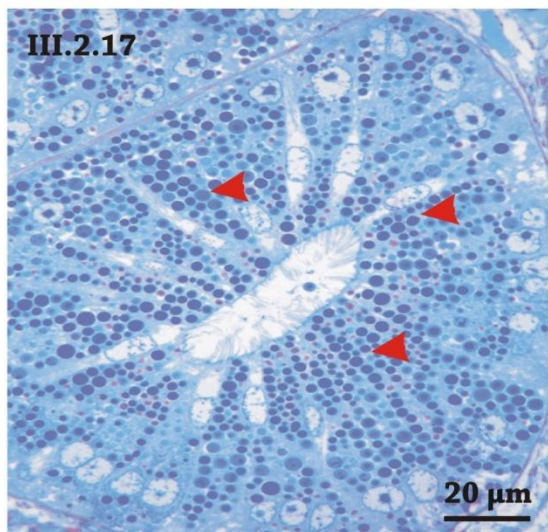
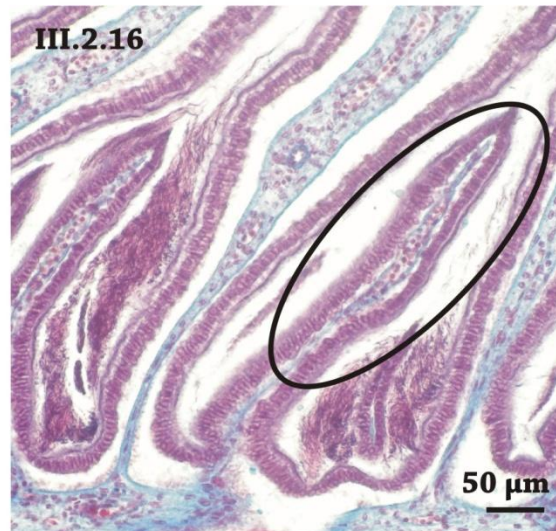
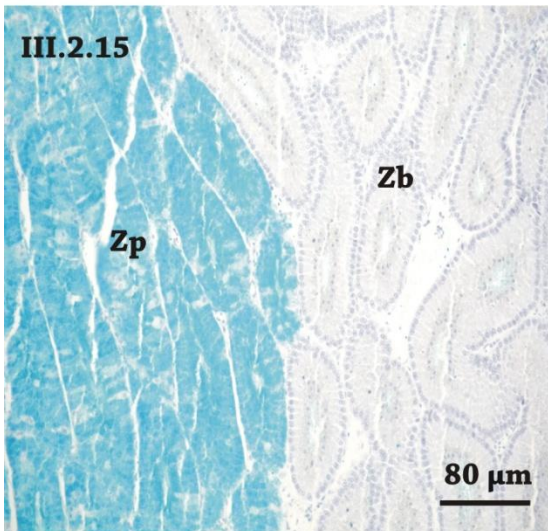
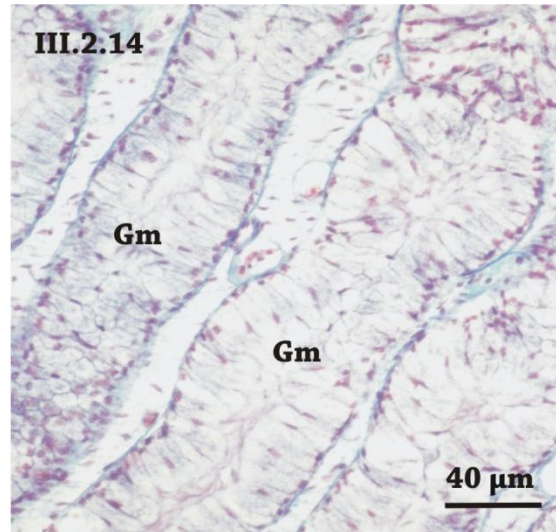
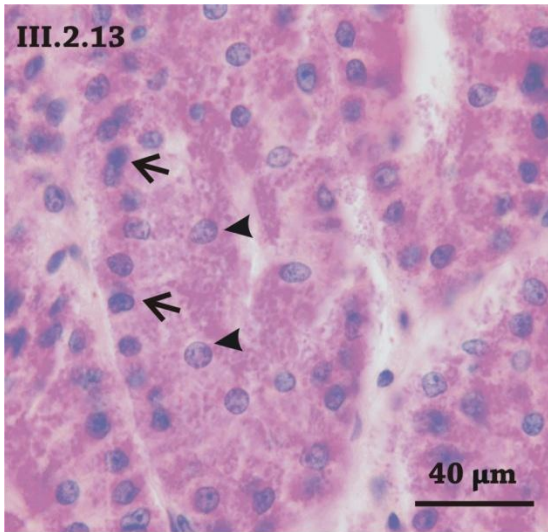
**Figura III.2.16:** Detalle de las *spinnerets* en la mucosa de la zona *Baffle*. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura III.2.17:** Corte semifino de un adenómero de la zona *Baffle*, con gránulos citoplasmáticos. *Coloración:* azul de metileno-azur II-fucsina básica.

**Figura III.2.18:** Detalle del epitelio ciliado que tapiza los túbulos de la región *Baffle*. *Coloración:* azul de metileno-azur II-fucsina básica.

**Referencias:** Cabezas de flecha negras: núcleos apicales; Cabezas de flecha rojas: gránulos; Flechas negras: núcleos basales; Flechas rojas: cilias del epitelio; Gm: glándulas mucosas; Óvalo negro: *Spinnerets*; Zp: zona *Papillary*; Zb: zona *Baffle*.

Oviducto anterior y Glándula oviductal



**Figura III.2.19 a y b:** Acumulaciones de material rojizo con aspecto vítreo en la zona *Baffle*. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

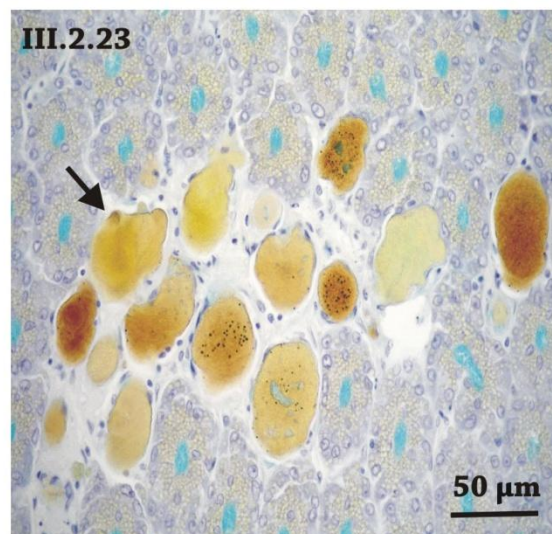
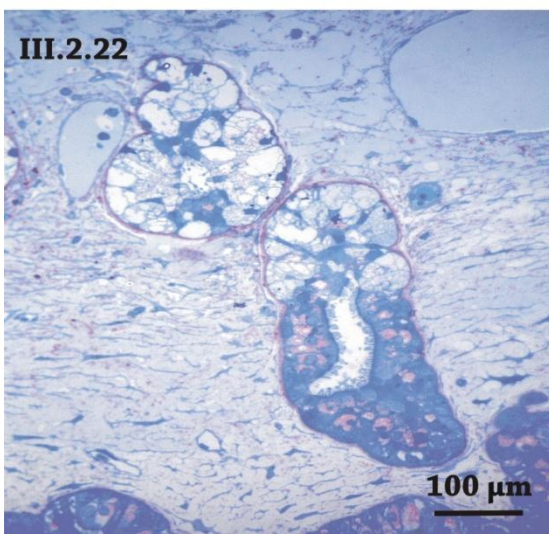
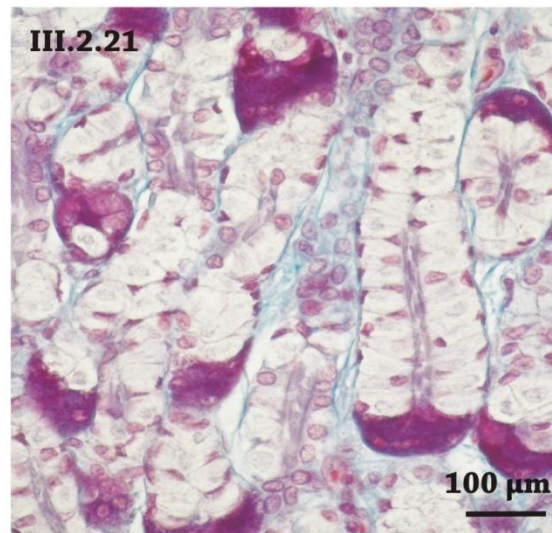
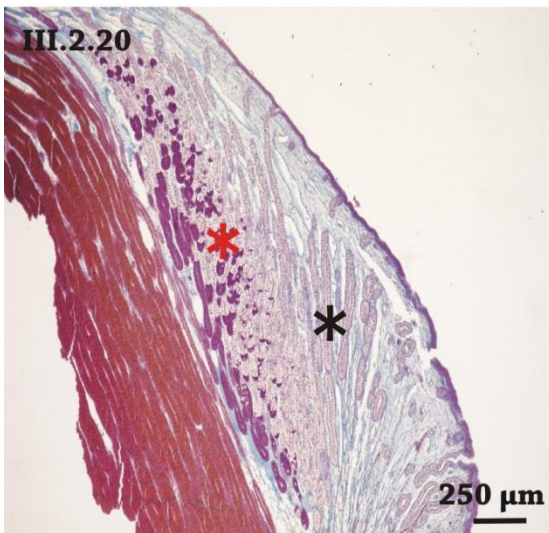
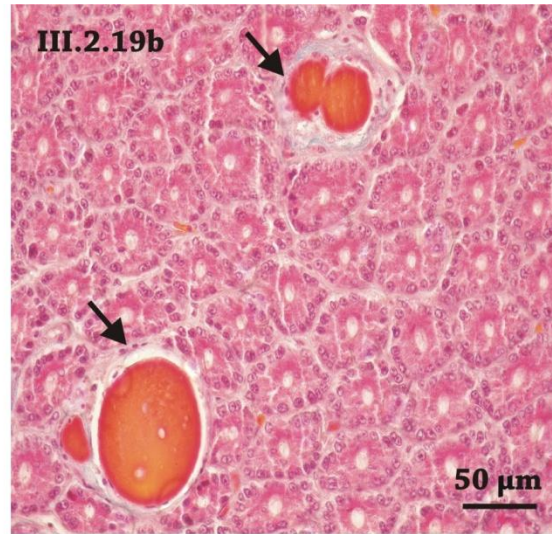
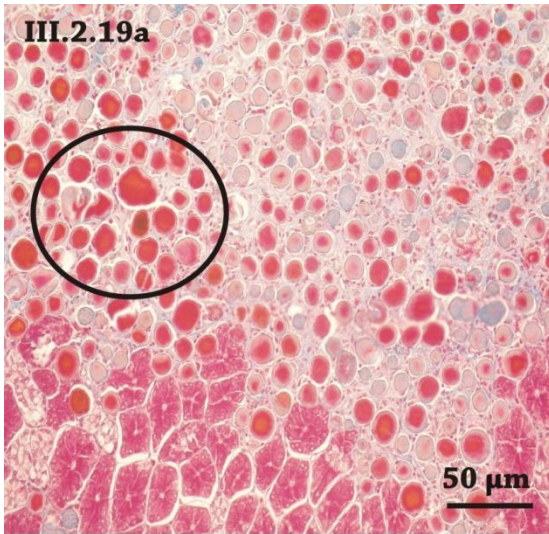
**Figura III.2.20:** Vista general de la zona *Terminal*. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura III.2.21:** Detalle de los acinos mixtos de la zona *Terminal*. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura III.2.22:** Corte semifino en donde se observa una glándula mixta de la zona *Terminal*. *Coloración:* azul de metileno-azur II-fucsina básica.

**Figura III.2.23:** Acumulación de material marrón similar al de la zona *Baffle*, en la zona *Terminal*. *Coloración:* azul alcian.

**Referencias:** **Asterisco negro:** glándulas tubulares mucosas; **Asterisco rojo:** glándulas tubulares mixtas; **Círculo negro:** incrustaciones de material amarronado en zona *Terminal*; **Flechas negras:** incrustaciones de material rojizo en la zona *Baffle*.



**Figuras III. 2. 24 a-h:** Cápsulas en distintas etapas de desarrollo de *A. platana*.

**a, b, c)** Comienzo de la secreción de la cápsula.

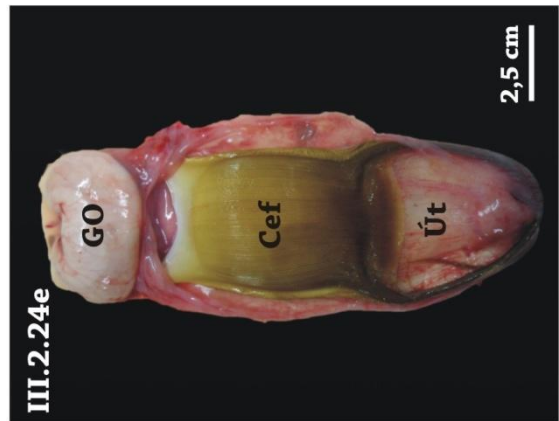
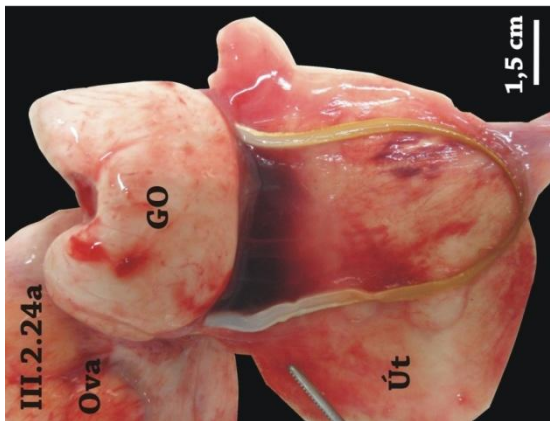
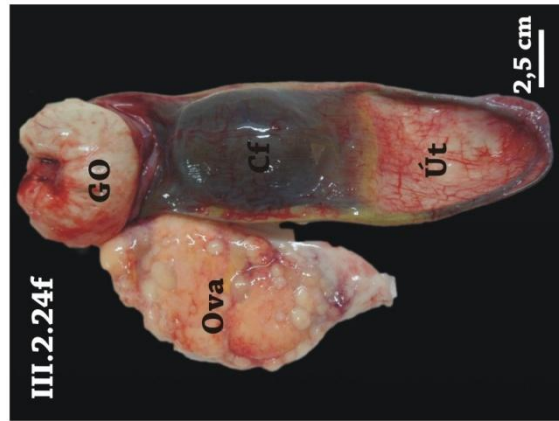
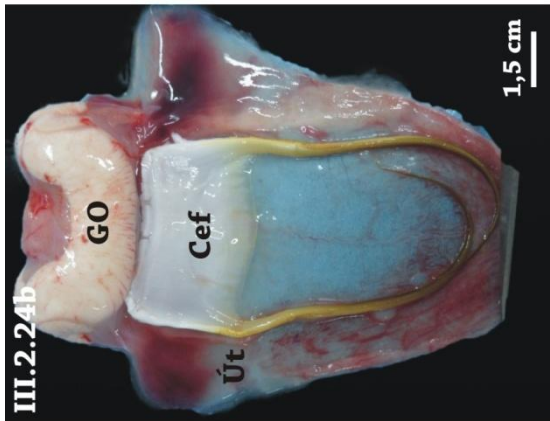
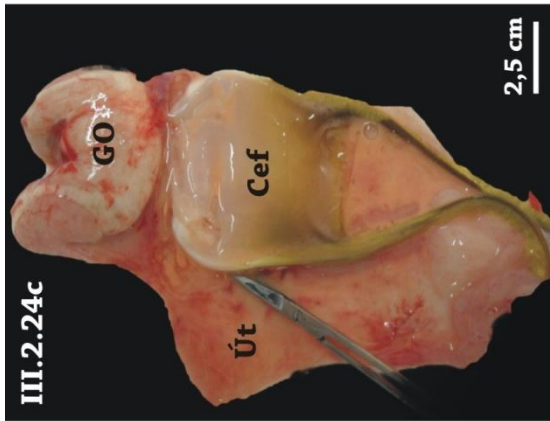
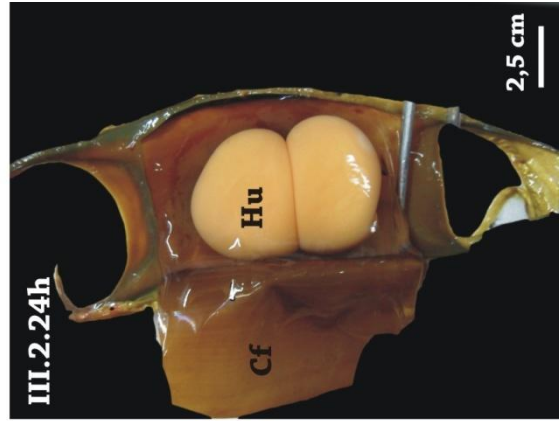
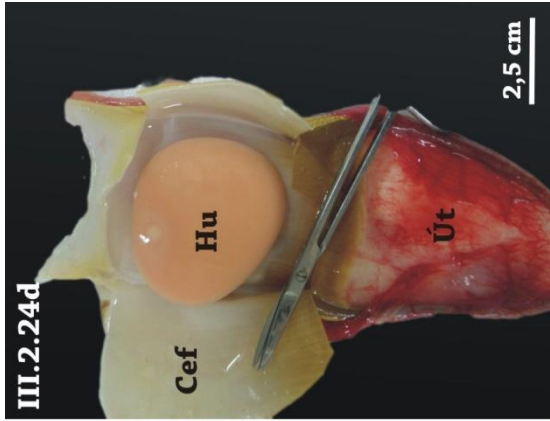
**d y e)** Detalle de la cápsula en desarrollo avanzado, en donde puede observarse el huevo en su interior.

**f y g)** Cápsulas completamente desarrolladas.

**h)** Detalle de una cápsula con dos huevos en su interior.

**Referencias:** **Cef:** cápsula en formación; **Cf:** cápsula formada; **Go:** glándula oviductal; **Hu:** huevo; **Ova:** ovario; **Ut:** útero.

Oviducto anterior y Glándula oviductal



**Figura III.2.25:** *A. platana*. Espermatozoides desagregados ubicados en las prolongaciones de la zona *Baffle*.

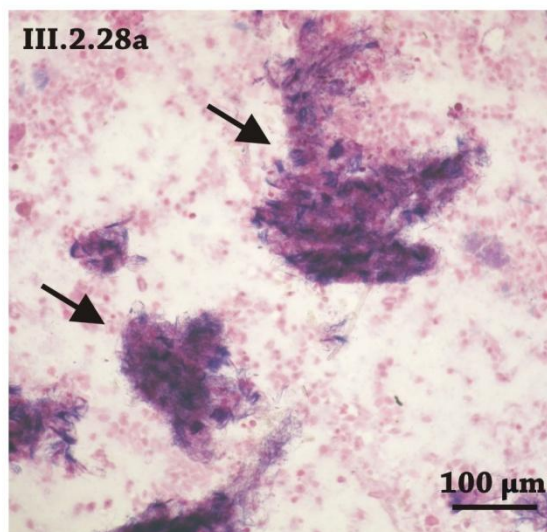
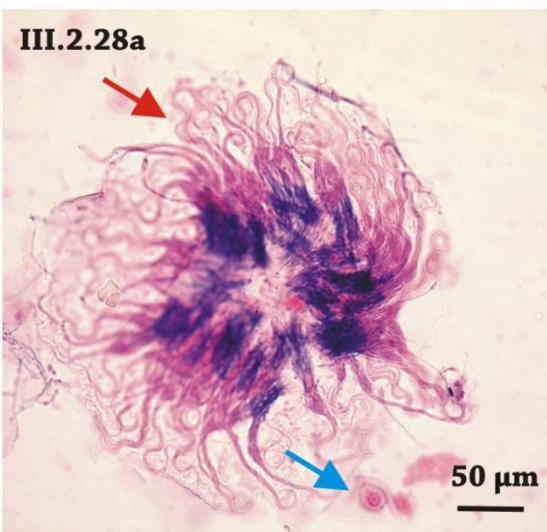
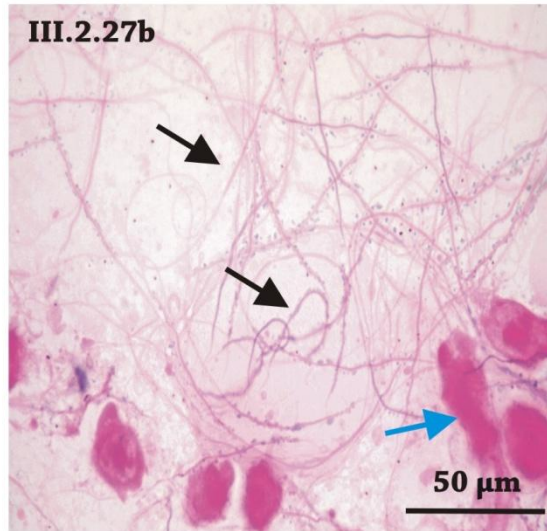
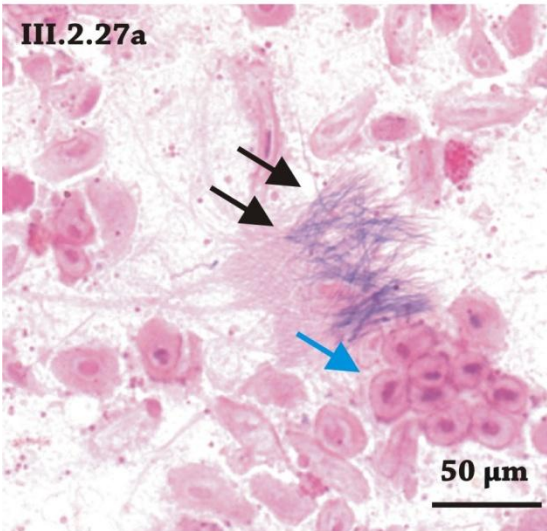
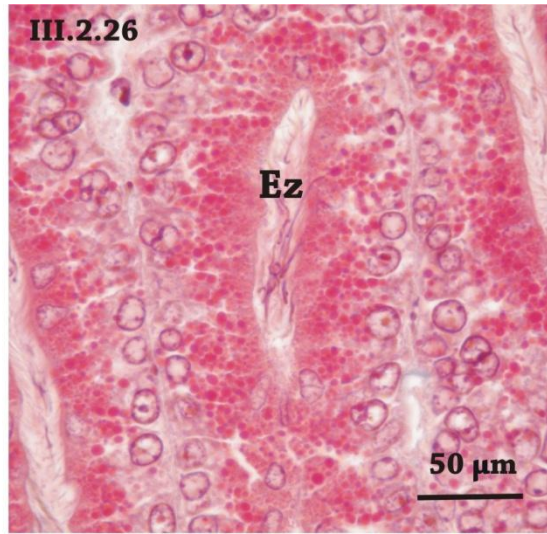
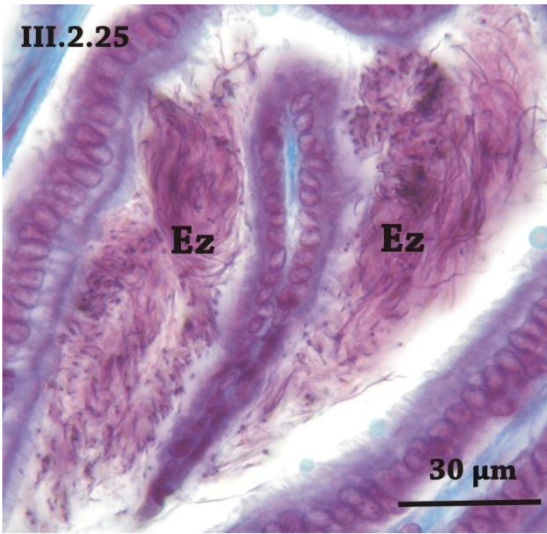
**Figura III.2.26:** *S. bonapartii*. Espermatozoides desagregados ubicados en la luz de los túbulos de la zona *Baffle*.

**Figuras III.2.27:** Frotis de la cloaca de una hembra madura de *A. platana*. **a)** espermatozoides agregados **b)** espermatozoides desagregados.

**Figuras III.2.28:** Frotis de la cloaca de una hembra madura de *S. bonapartii*. **a)** *espermatozeugmata* **b)** “cúmulos” de espermatozoides.

**Referencias:** Flechas azules: células “endocloacales”; Flechas negras: espermatozoides; Flecha roja: *espermatozeugmata*.





## CAPÍTULO IV: SISTEMA GENITAL MASCULINO DE *Atlantoraja platana* y

### *Sympterygia bonapartii*.

#### IV.1: TESTÍCULO

##### IV.1.1: INTRODUCCIÓN

Los machos de los elasmobranquios han desarrollado especializaciones anatómicas y fisiológicas complejas, como parte de sus estrategias reproductivas. Todos ellos presentan fecundación interna y el sistema de reproducción está adaptado para ello. Durante la cópula, el macho inserta solo uno de los *claspers* en el orificio urogenital de la hembra y el espermatozoide se moviliza a través del surco dorsal del mismo (Compagno, 1999; Mc Millan, 2007). Al igual que el esqueleto cartilaginoso, los *claspers* son una característica sinapomórfica que define a los condriictios (Grogan y Lund, 2004).

En estos peces, los testículos son órganos pares y simétricos que están situados en la parte anterior de la cavidad abdominal, sostenidos por mesenterios. En los animales inmaduros, los testículos se aprecian como masas inconspicuas, blanquecinas, en la zona craneal del órgano epigonal. En ejemplares adultos, el tamaño del testículo puede variar a lo largo del año (Carrier *et. al.*, 2004; Awruch, 2015), siendo proporcionalmente mayor que el órgano epigonal (Galíndez, 2016).

El testículo presenta dos tipos celulares: las células germinales y las células somáticas. Las células germinales o espermatogonias derivan de una población de células madres pluripotenciales (*stem cells*) que se

autorrenuevan. Estas células se originan en el saco vitelino embrionario, luego migran a la gónada y permanecen en la zona germinal del testículo. A pesar de su escasa cantidad, son la fuente de las oleadas sucesivas de división y diferenciación durante la espermatogénesis (Engle y Callard, 2005). Las células somáticas o de Sertoli comparten el mismo origen de la células destinadas a formar el sistema de conductos colectores intratesticulares (Callard *et. al.* 1994).

La espermatogénesis se lleva a cabo en el espermatocisto o cisto, que es la unidad estructural y funcional del testículo. Stanley (1966) lo describió como una estructura esférica, que comprende varios espermatoblastos, los cuales están formados por células de Sertoli asociadas a células germinales (Parsons y Grier, 1992). Las células germinales maduran formando clones isogénicos asociados a las células de Sertoli, que más tarde originarán el espermatocisto. Éstos por su parte, pueden organizarse en lóbulos separados por tejido conectivo, los cuales se ven, a ojo desnudo, en algunas especies (Engel y Callard, 2005).

Pese a la homogeneidad en la arquitectura tisular, los testículos de estos peces pueden organizarse de tres formas diferentes, en base al modelo de origen y propagación de los espermatocistos, a partir de una zona germinal (Pratt, 1988) (Fig. IV.1.1)

- *Testículos radiales*: la zona germinal se encuentra en el centro de cada lóbulo testicular, desde donde comienza el desarrollo de los espermatocistos en un patrón radial. Este modelo testicular es característico de los Lamniformes (Matthews, 1950).

- *Testículos diamétricos*: la zona germinal consiste en una franja a lo largo de la superficie distolateral y el desarrollo de los espermatocistos procede diamétricamente, hacia los conductos eferentes. Este tipo de organización se encuentra en los escualomorfos, galeomorfos y carcharinidos (Stanley, 1963).
- *Testículos compuestos*: combinan la forma radial y diamétrica. La zona germinal está en la superficie dorsal. Los lóbulos se desarrollan radialmente y migran diamétricamente. Este modelo se encuentra en los batoideos (Pratt, 1988).

Además, la producción de esperma en los machos puede presentar variaciones:

- *Producción continua*: esta estrategia reproductiva se caracteriza por presentar poco o ningún cambio estacional en el desarrollo testicular y la producción espermática. La producción continua de espermatocistos maduros se observó en varias especies de elasmobranquios como: *Leucoraja ocellata*, *Amblyraja radiata* (Sulikowski et. al., 2005); *Prionace glauca* (Pratt, 1979) y *Cephaloscyllium laticeps* (Awruch et. al., 2009).
- *Producción estacional de esperma*: esta estrategia se caracteriza por marcados cambios estacionales en la producción de esperma.

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- ✓ Analizar las características histológicas y citológicas del testículo de *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii* y su variación según el estadio de madurez.
- ✓ Describir y determinar las diferentes etapas de la espermatogénesis en ambas especies.
- ✓ Realizar un análisis cuantitativo de las etapas de la espermatogénesis a lo largo de las estaciones del año.
- ✓ Determinar el tipo de modelo testicular y comparar los resultados con otras especies de condriictios.

#### **IV.1.2: MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el análisis microscópico se trabajó con 50 machos de *A. platana* y 20 ejemplares de *S. bonapartii*, de los tres estadios madurativos, determinados de acuerdo al criterio de Stehmann (2002) (véase *Cap. II: II.2.2 Determinación del estadio de madurez*).

Las disecciones se realizaron abriendo la cavidad, desde la apertura de la cloaca, siguiendo un trayecto circular. Una vez abierta la cavidad abdominal, se extrajo el hígado y el tubo digestivo a fin de que quedaran expuestos los órganos genitales. Estos últimos se extrajeron completos, separándolos cuidadosamente de la cavidad del cuerpo y cortando los mesenterios.

El estudio histológico, citológico e histoquímico se realizó mediante microscopía óptica, usando cortes en Paraplast® y cortes semifinos de material incluido en resina Spurr. Los protocolos de las técnicas se encuentran detallados en el Capítulo II.2.3: Procesamiento microscópico.

Se corroboró la estructura macroscópica del testículo y conductos genitales con la histología testicular a fin de dar una información más precisa del estadio madurativo de ambas especies.

### **Análisis microscópico: Espermatogénesis e histomorfometría**

Para el estudio de la espermatogénesis se determinaron siete etapas de desarrollo:

- 1: *zona germinal o primaria;*
- 2: *espermatoцитos con espermatogonias;*
- 3: *espermatoцитos con espermatoцитos;*
- 4: *espermatoцитos con espermátides;*
- 5: *espermatoцитos con espermatozoides inmaduros;*
- 6: *espermatoцитos con espermatozoides maduros;*
- 7: *espermatoцитos en degeneración.*

En la etapa 2 de desarrollo de la espermatogénesis, se diferenciaron cistos uni y multilaminares, en la etapa 3 se diferenciaron espermatoцитos primarios de secundarios y en la etapa 4 se diferenciaron dos estadios de desarrollo de las espermátides: inmaduras y maduras.

Una vez coloreados, los cortes de testículo se observaron bajo microscopio óptico Nikon AFM. Se observó la estructura general y se registraron los diámetros, con un ocular micrométrico, de los diferentes cistos en micrómetros. Los datos fueron tabulados para, posteriormente, analizarlos.

Se realizó un análisis estacional del porcentaje del área de cobertura de los diferentes estadios espermatogénicos. Se trabajó con animales sexualmente maduros. Para esto se eligió, en cada corte, un lóbulo en el que estuvieran representados todos los estadios de desarrollo. Estos estadios se agruparon, a fin de facilitar el análisis de la cobertura de los mismos. Esto se debe a que puede ser dificultoso establecer el límite morfológico entre un estadio y otro. Por lo tanto, para este análisis, los estadios que se establecieron fueron:

*1: zona germinal;*

*2: cistos inmaduros;*

*3: cistos con espermatoцитos primarios y secundarios;*

*4: cistos con espermátides inmaduras y maduras;*

*5: cistos con espermatozoides inmaduros y maduros*

*6: zona de degeneración.*

El análisis se realizó por medio de fotografías. De cada lóbulo estudiado se tomaron una serie de fotografías sucesivas, desde la región dorsal a la ventral del lóbulo, las cuales se unieron para obtener una imagen completa

(Véase Figs. IV.1.11 y IV.1.14). Para el análisis se usó el programa de análisis de imágenes UTHSCSA ImageTool V 3.0,

Además, se interpretó la reacción de los tejidos a las coloraciones específicas y técnicas histoquímicas. Todo lo observado se registró fotográficamente con una cámara digital Olympus Camedia Mod. C7070, widezoom, en un microscopio óptico Olympus BX51.

### IV.1.3: RESULTADOS

#### IV.1.3.1: ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino de ambas especies, está formado internamente por un par de testículos, conductos intratesticulares y conductos extratesticulares pares. Estos últimos, comprenden los conductos eferentes, el epidídimo y conducto deferente. Externamente, comprende los *claspers*, que, en machos adultos, se presentaron calcificados. En ejemplares maduros de *S. bonapartii*, los *claspers* se observan más robustos que en *A. platana* (Figs. IV.1.2 y IV.1.3).

En las dos especies, los testículos se presentaron como órganos pares, funcionales, elongados y levemente comprimidos dorsoventralmente. Los mismos se encuentran localizados en la cavidad celómica, suspendidos de la pared dorsal por el mesorquio y asociados al órgano epigonal (Figs. IV.1.4 y IV.1.5). La superficie dorsal es levemente convexa y la ventral levemente cóncava, con gran vascularización.

En ambas especies, los **machos inmaduros** (estadio I), se caracterizan por poseer los testículos poco desarrollados, predominando el tejido



linfomieloide. El tejido testicular es apenas distinguible, ubicándose cerca de la región craneal (Fig. IV.1.6). En los **machos en maduración** (estadio II), los testículos aumentan de tamaño y el tejido testicular ocupa más espacio, observándose el desarrollo de algunos lóbulos aislados (Fig. IV.1.7). En los **machos maduros** (estadio III), los testículos son de gran tamaño, macizos y, por transparencia, pueden observarse los lóbulos uno al lado del otro, con sus respectivas zonas germinales de una tonalidad más oscura (Figs. IV.1.8 a; IV.1.8 b y IV.1.9).

### IV.1.3.2: ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LOS TESTÍCULOS

#### GENERALIDADES

El testículo se encuentra tapizado por un epitelio simple cúbico ciliado, que puede tornarse cilíndrico. Por debajo, se encuentra una delgada túnica de tejido conectivo denso, la albugínea (Figs. IV.1.10 a y IV.1.10 b). Ésta emite trabéculas de fibras colágenas y reticulares, que dividen el parénquima testicular en lóbulos o "islotes" (Figs. IV.1.11 y IV.1.12). Asociado al tejido testicular, se encuentra el órgano epigonal, que se infiltra entre los lóbulos y en ejemplares maduros, se retrae hacia la región caudal (Fig. IV.1.13). Cada lóbulo contiene una gran cantidad de espermatocistos redondeados (Fig. IV.1.11). Todas las células espermatogénicas de cada cisto se encuentran en el mismo estado de desarrollo. En la superficie dorsal de cada lóbulo se ubica la zona germinal (Figs. IV.1.11 y IV.1.14). Los cistos se desarrollan en esta zona, migran radialmente hacia la periferia del lóbulo y diametralmente hacia la parte ventral del testículo, como un "abanico abierto" (Fig. IV.1.14).

### **ESPERMATOGÉNESIS Y ESPERMIOGÉNESIS**

En base a las características citológicas y a la organización interna de los cistos, se pueden reconocer siete estadios bien diferenciados, similares en ambas especies y desarrollados en ejemplares *maduros*.

- **Zona germinal o primaria (estadio I)**

El proceso de espermatogénesis se inicia en esta zona, la cual se presenta muy reducida en ejemplares adultos. Se observan espermatogonias primarias, con núcleos esféricos, grandes, con parches de heterocromatina y células de Sertoli con núcleos alargados, ovales, heterocromáticos, y con nucléolos conspicuos. En un principio estas células están aisladas y posteriormente se agrupan (Figs. IV.1.15 y IV.1.16).

- **Espermatocistos con espermatogonias (estadio II)**

La formación de los espermatocistos comienza con la organización de un epitelio germinal y la secreción de la membrana basal que lo rodea (Fig IV.1.16). Las sucesivas divisiones mitóticas de las células germinales dan lugar a las espermatogonias.

En un principio se forman cistos unilaminares, constituidos por una sola capa de espermatogonias y las células de Sertoli entremezcladas, alrededor de un lumen. A medida que la espermatogénesis procede, el cisto se estratifica, dando lugar a cistos multilaminares donde las espermatogonias proliferan, empujando los núcleos de las células de Sertoli hacia el lumen (Figs. IV.1.17; IV.1.18; IV.1.19). En la superficie apical de las células que bordean el lumen se observó reactividad PAS (+) y AB pH 2,5 (+) (Figs. IV.1.20 y IV.1.21).

Los cistos aumentan de diámetro y hacia el final de este periodo se observa una reducción notoria del diámetro luminal. Los núcleos de las células de Sertoli se localizan contra la membrana basal del cisto, manteniendo esta localización durante el posterior desarrollo espermatogénico (Fig. IV.1.22).

- **Espermatocistos con espermatocitos (estadio III)**

En esta etapa, las espermatogonias, por mitosis, se han transformado en espermatocitos primarios.

Los espermatocitos primarios son células esféricas con núcleos grandes, heterocromáticos, con un patrón de cromatina característico de la profase I. En esta etapa, el lumen es completamente ocupado por las células en proliferación (Figs. IV.1.23; IV.1.24 y IV.1.25 a). Los espermatocitos I completan la primera división meiótica y se transforman en espermatocitos II, de tamaño menor y núcleos fuertemente heterocromáticos (Figs. IV.1.23; IV.1.24 y IV.1.25 b). En esta etapa se produce la segunda división meiótica. Este último proceso es muy breve.

- **Espermatocistos con espermátides (estadio IV)**

La aparición de los cistos con espermátides inmaduras marca el comienzo de la espermiogénesis. Las espermátides son células pequeñas y, microscópicamente, pueden diferenciarse dos etapas madurativas sucesivas: inmaduras y maduras (Figs. IV.1.23; IV.1.26 y IV.1.27). Las espermátides inmaduras rellenan completamente el cisto, son más pequeñas que los espermatocitos y presentan un núcleo esférico (Fig. IV.1.23). En las espermátides maduras, el núcleo se empieza a alargar y a condensar (Fig.

IV.1.26). A medida que avanza el desarrollo, estas células se agrupan en manojos laxos, con los núcleos celulares dispuestos hacia la membrana basal y los esbozos flagelares, hacia el lumen (Fig. IV.1.27). Entre estos dos extremos podemos encontrar varias morfologías celulares diferentes.

- **Espermatocistos con espermatozoides inmaduros**

Esta etapa transicional se reconoce por una mayor condensación cromatínica y por una clara diferenciación de la cabeza, el cuello y la cola de los espermatozoides. En los espermatozoides inmaduros, la heterocromatina no alcanza aún su máxima compactación y quedan pequeños restos de citoplasma rodeando el núcleo. Las colas no se ven tan largas y los paquetes espermáticos son laxos. La posición de las células es la misma que en la etapa anterior (Figs. IV.1.28 y IV.1.29).

- **Espermatocistos con espermatozoides maduros**

Los espermatozoides completan el proceso de maduración y se organizan en paquetes compactos, cuyas cabezas están inmersas en el citoplasma apical de las células de Sertoli y las colas se orientan hacia el lumen (Figs. IV.1.28; IV.1.30 y VI.1.32). Cada paquete está asociado a una sola célula somática (Fig. IV.1.31). Estos cistos se encuentran en la periferia del lóbulo testicular y entre ellos se observan algunos cistos del estadio anterior.

En los cistos más avanzados, listos para evacuar su contenido, presentaron reactividad positiva al PAS y al AB pH 2,5 (Figs. IV.1.33 y IV.1.34).

- **Espermatocistos en degeneración**

Esta región presenta una población de cistos con restos de espermatozoides y células de Sertoli en degeneración, producto de la espermiación. Este evento ocurre cuando el esperma maduro es evacuado del cisto al sistema de conductos intratesticulares. (Fig. IV.1.35). Los cistos vacíos de la zona de degeneración presentaron una fuerte reactividad al PAS (Fig. IV.1.36).

En el espacio intersticial del testículo de ambas especies, se observaron células con núcleos grandes, con heterocromatina marginal marcada, redondos y escaso citoplasma levemente acidófilo. Estas características concuerdan con la morfología de las células de Leydig (Fig. IV.1.37).

En los testículos de ejemplares *inmaduros* de ambas especies, se pudo observar una zona germinal en cada lóbulo y cistos de diferentes diámetros pertenecientes a los estadios I, II y III del desarrollo espermatogénico explicitado en adultos (Fig. IV.1.38). A diferencia de lo observado en ejemplares adultos, en el estadio III de la espermatogénesis no se observaron espermatocistos secundarios. Se pudo evidenciar una zona de degeneración muy reducida con abundante tejido conectivo denso y cistos vacíos con restos celulares (Fig. IV.1.39).

En los ejemplares *en maduración* de las dos rayas en estudio, se diferenció una zona germinal y cistos pertenecientes a los estadios I, II, III y IV de los descritos para adultos. En el estadio IV, sólo se observaron espermátides inmaduras (Fig. IV.40). Cabe destacar, que en dos ejemplares de

*A. platana* clasificados como "en maduración" se encontraron cistos con espermatozoides maduros.

### **ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO**

Los diámetros de cada uno de los distintos espermatozoides medidos, en machos maduros de ambas especies, se observan en las Figs. IV.1.41 y IV.1.42. En ambas especies, el diámetro de los cistos aumenta a medida que avanza el proceso de espermatogénesis. En *S. bonapartii* el diámetro de los cistos aumenta hasta los cistos con espermatozoides maduros disminuyendo en los cistos en degeneración. En *A. platana*, en cambio, el aumento se da hasta los cistos con espermatozoides inmaduros. En líneas generales, el diámetro de los cistos de *A. platana* es mayor que en *S. bonapartii*.

En el análisis estacional del porcentaje de cobertura de los diferentes estadios espermatogénicos, se hallaron diferencias entre ambas especies,

En *A. platana*, los estadios IV (cistos con espermátides) y V (cistos con espermatozoides) fueron los que presentaron un mayor porcentaje de cobertura durante las cuatro estaciones (Figs. IV.1.43 a-d).

En *S. bonapartii*, a diferencia de lo registrado en *A. platana*, el estadio IV fue el más representado en verano y otoño, en tanto que el V lo fue en invierno y primavera. En invierno, a su vez, un gran porcentaje del área total, estaba cubierta por cistos en degeneración (Figs. IV.1.44 a-d).

#### IV.1.4: DISCUSIÓN

La estructura anatómica testicular de *A. platana* y *S. bonapartii*, coincide con lo observado en la mayoría de los batoideos (Walker, 2005). Los testículos son pares y aplanados dorsoventralmente, acorde con la morfología general de las rayas (*Dasyatis sabina*, Maruska *et. al.*, 1996; *Himantura signifer*, Chatchavalvanich *et. al.*, 2005).

En ambas especies, las observaciones microscópicas mostraron que la relación órgano epigonal/tejido testicular disminuyó gradual y considerablemente con la maduración sexual. La relación existente entre estos dos órganos a lo largo de la ontogenia, concuerda con lo observado en otras especies de batoideos (Pratt, 1988; Walsh y Luer, 2004; Lutton y Callard, 2007).

La espermatogénesis es un proceso complejo, altamente organizado y coordinado, que involucra interacciones morfológicas y funcionales entre las células germinales y algunos tipos de células somáticas y sus secreciones (Skinner, 1991; Pieratoni *et. al.*, 2009; McClusky, 2012).

En los condricios estudiados hasta el momento, se observó que las espermatogonias y las células de Sertoli asociadas a ellas, son circunscriptas por la membrana basal, antes de la meiosis. Las lampreas, mixinos y los peces cartilagosos, son considerados "poliespermatocísticos" porque numerosos cistos forman sus testículos durante espermatogénesis (Pratt, 1988; Stanley, 1990; Grier, 1992).

La producción y maduración de los espermatocistos en el testículo, puede seguir patrones diferentes. Estos patrones definen los modelos

testiculares radiales, diamétricos y compuestos (Pratt ,1988). Los dos primeros no parecen presentar diferencias en cuanto a la cantidad de espermatozoides que producen (Stanley, 1963). El desarrollo radial, no solo está adaptado al cuerpo chato de los batoides, sino que esto hace que sea menor la distancia que deben atravesar los cistos, hacia los conductos seminales. En las dos especies en estudio, la arquitectura testicular lobular y el tipo de desarrollo de los cistos, se corresponde con el modelo de testículo compuesto y se encuentra referido en otros batoides (*D. americana* y *M. californica* , Pratt 1988; *H. signifer*, Chatchavalvanich *et. al.*, 2005; *Narcine bancroftii*, *Rhinobatos percelles*, *Urotrygon venezuelae* y *D. guttata*, Acero *et al.*, 2008; *Rhinoptera bonasus*, Poulakis y Grier, 2013).

En los peces cartilaginosos, las etapas sucesivas de la espermatogénesis se organizan en un estricto orden temporal y espacial, manifestándose una clara zonación. En los amniotas y algunos teleósteos, la espermatogénesis no está contenida en cistos sino en túbulos seminíferos (*Bryconops affinis*, Andrade *et. al.*, 2001). En los anamniotas, como es el caso de los condictios, la espermatogénesis es de tipo cística (Callard, 1996; Batlouni *et. al.*, 2009). Los cistos o espermatocistos constituyen la unidad funcional y estructural del testículo y en su interior se encuentran células de Sertoli y células germinales, sincronizadas en la misma etapa de desarrollo (Pratt, 1988; Callard, 1996). El incremento en el número de ambos tipos celulares también ocurre en forma sincronizada (Schulz *et. al.*, 2010).

En *A. platana* y *S. bonapartii*, el proceso de espermatogénesis es similar al estudiado en otros elasmobranquios (Maruska *et. al.*, 1996; Girard *et. al.*,



2000; Conrath y Musick, 2002; Chatchavalvanich *et. al.*, 2005; Engel y Callard, 2005; Barone *et. al.*, 2007).

Si bien las clasificaciones son siempre arbitrarias, constituyen un modo efectivo para sistematizar los distintos procesos continuos. En los peces cartilaginosos, existen diferentes maneras de encuadrar cada una de las fases de la espermatogénesis. Roosen-Runge (1977) reconoce tres grandes estadios: una primera fase o estadio mitótico al que denominan espermatocitogénesis, una segunda fase o estadio meiótico, denominado fase espermatocística y una tercera etapa o estadio espermiogénico o espermiogénesis. Por otra parte, Teshima (1981), considera solo dos etapas: una primera o espermiocitogénesis, la cual comprende tanto la fase mitótica como la meiótica y una espermiogénesis, o diferenciación de las espermátides. Para este estudio y a fin de poder comparar los resultados con los de otras especies afines, se emplearon los criterios más comunes actualmente (Maruska *et. al.*, 1996; Girard *et. al.*, 2000; Chatchavalvaich *et. al.*, 2005; Engel y Callard, 2005). En este trabajo, se identificaron 7 estadios de desarrollo, contenidos en cistos con características estructurales diferentes.

La primera etapa (estadio I) es precística y tiene lugar en la zona germinal del testículo, cuya localización varía, dependiendo del modelo testicular. En ambas especies en estudio, existe una zona germinal en la superficie dorsal de cada lóbulo. Esta zona se registró en ejemplares inmaduros, en maduración y maduros. En algunas especies se exhibe un ensanchamiento de esta zona denominado "papila germinal" (Stanley, 1966; Maruska *et. al.*, 1996; Chatchavalanich *et. al.*, 2004). Dicha papila está ausente

tanto en *A. platana* como en *S. bonapartii*, pero la zona germinal si se encuentra presente en los testículos maduros de ambas especies, a lo largo del año. Esto sugiere que la espermatogénesis es un proceso continuo. Los cistos de los estadios II y III, que contienen espermatogonias y espermatocitos respectivamente, muestran una composición celular totalmente similar al resto de los vertebrados, independientemente de que la unidad básica testicular sea el túbulo o el cisto (Engel y Callard, 2005).

El proceso de espermiogénesis puede presentar muchas variaciones entre los diferentes taxones. Girard *et. al.* (2000), describió tres tipos diferentes de espermátides en *Centroscyrnus coelolepis* y *Centrophorus squamosus*, con base en la observación de los núcleos: a) espermátides inmaduras con núcleos redondos y pequeños, b) espermátides intermedias con núcleos piriformes y c) espermátides maduras con núcleos ovales y grandes. La espermiogénesis es un proceso continuo y complejo que implica entre otras cosas, la condensación de la cromatina, el alargamiento del núcleo, la pérdida de gran parte del citoplasma y el desarrollo del flagelo. Teniendo en cuenta esto, no es raro encontrar una amplia gama de morfologías celulares incluidas en este estadio. En *A. platana* y *S. bonapartii* se diferenciaron espermátides inmaduras y maduras, las cuales presentaban diferencias morfológicas a nivel del núcleo y disposición dentro del cisto, en forma similar a *Himantura signifer* (Chatchavalvanich *et. al.*, 2005).

Las células de Sertoli cumplen varias funciones durante la espermatogénesis. Estas funciones incluyen: soporte físico de las células germinales en desarrollo, eliminación de cuerpos residuales desprendidos por

el desarrollo de las espermátides, esteroidogénesis y participación en la evacuación de los espermatozoides (Nagahama, 1986; Prisco *et. al.*, 2002).

Durante el desarrollo de la espermatogénesis, en ambas especies en estudio, las células de Sertoli se observaron durante las primeras etapas enfrentando el lumen de los cistos. Luego, en el inicio de la meiosis, su ubicación se modificó, encontrándose en la periferia del cisto. Las células de Sertoli mantuvieron esta posición, hasta la finalización de la espermiogénesis. No se conoce aún la causa de esta, aparente, migración, pero puede estar relacionada con cambios temporales en la recepción de la señal endocrina, con la producción de andrógenos, o con la inhibición o activación de la meiosis durante la ontogenia (Nagahama, 1986; Wartenberg, 1989). Es posible que las células de Sertoli no migren realmente, sino que sus núcleos se desplacen durante el proceso (Poulakis y Grier, 2013).

La presencia de una zona de degeneración exhibe una gran variación entre las especies de condricios. Teshima (1981), no la halló ni en *M. manazo*, ni en *M. griseus*. Sin embargo, Simpson y Wardle (1967) y Sumpter y Dood (1979), reportaron algunas variaciones en su localización, de acuerdo a la estación del año, en *Squalus acanthias* y *Scyliorhinus canicula*. Por el contrario, los datos expuestos aquí, no muestran diferencias anuales en su localización. Sin embargo, el área de cobertura de la zona de degeneración en *S. bonapartii* fue mayor durante el invierno, lo que sugiere que la producción de cistos maduros, ya fue liberada a los conductos y coincide con la época de apareamiento de la especie en el golfo (Estalles, 2012). En *A. platana* la

cobertura de esta área se mantuvo constante a lo largo de las estaciones, lo cual hace suponer una actividad sexual constante.

En ambas especies, se observaron células en el intersticio del testículo con características similares a las células de Leydig. Según Loir *et. al.* (1995), en los elasmobranquios, las células de Leydig frecuentemente están ausentes o son escasas e indiferenciadas. Investigaciones ultraestructurales realizadas en ejemplares sexualmente maduros de *Torpedo marmorata*, revelaron la presencia de verdaderas células de Leydig en el espacio intersticial (Prisco *et. al.*, 2002). Es claro que su contribución a la producción intratesticular de hormonas esteroides no es cuantitativamente importante, si se las compara con la producción por parte de las células de Sertoli, que en algunos casos las reemplazarían en su función hormonal (Pudney y Callard, 1986; Loir *et. al.*, 1995; Chatchavalvanich *et. al.*, 2004; Engle y Callard, 2005).

En los ejemplares juveniles de ambas especies, no se encontraron cistos con espermatozoides. Esto concuerda con lo observado en *U. venezuelae* y *R. percellens* (Acero *et. al.*, 2008). En los juveniles de *M. manazo* y *M. griseus* (Teshima, 1981), *C. coelolepis* (Girard *et. al.*, 2000) y *Sphyrna tiburo* (Gelsleichter *et. al.*, 2002), se describen los mismos estadios espermatogénicos que los observados en ejemplares adultos. Según Girard *et. al.* (2002), en estos casos los testículos maduran antes de que los animales puedan reproducirse (*claspers* pequeños y flexibles). Este hecho fue registrado en solo dos ejemplares juveniles de *A. platana*, donde se observaron testículos con cistos maduros.

Los testículos de los ejemplares inmaduros se reconocen porque en ellos sólo se observan cistos con espermatogonias y espermatocitos primarios. Esto mismo ha sido reportado en *U. venezuelae* (Acero *et. al.*, 2008) y las especies en este estudio concuerdan con ello.

La estacionalidad de los ciclos reproductivos de los machos de peces cartilaginosos se analiza, generalmente, considerando criterios macroscópicos tales como, cambios en el índice gonadosomático, en el ancho del epidídimo y en el diámetro de la vesícula seminal, entre otras (Pratt, 1979; Maruska *et. al.*, 1996; Poulakis y Grier, 2014). El enfoque histológico, como complementario de análisis de los índices reproductivos, otorga una mayor precisión en el estudio del ciclo de vida de estas especies.

Parsons y Grier (1992), afirmaron que el estudio de la cobertura testicular de cada estadio espermatogénico en el tejido testicular, es una herramienta útil para determinar los ciclos reproductivos y la producción de cistos a lo largo de la espermatogénesis. De esta manera se pueden relacionar los datos histológicos con los índices gonadosomáticos (véase *Cap. V: Indicadores reproductivos*). Nuestro análisis demostró, en ambas especies, que todos los estadios espermatogénicos estuvieron presentes a lo largo de las cuatro estaciones de año. En *A. platana*, el porcentaje de cobertura de los diferentes estadios se mantuvo constante a lo largo del año, de lo cual se infiere una producción continua de espermatozoides. Esta dinámica ha sido reportada en otras especies como *Leucoraja ocellata* (Sulikowski *et. al.*, 2004); *Amblyraja radiata* (Sulikowski *et. al.*, 2005) y *Cephaloscyllium laticeps* (Awruch *et. al.*, 2009)

y parecería estar relacionado con el tipo de ciclo reproductivo de la especie: anual con dos picos de máxima actividad (Coller, 2012).

Si bien en *S. bonapartii*, los meses de verano y otoño mostraron un mayor porcentaje de cobertura para el estadio V. Esto sugiere una producción estacional de espermatozoides. En otras especies como *M. manazo*, *M. griesus*, *H. ocellatum* y *S. canalicula*, se encontró el mismo patrón. Estalles (2012) determinó para la misma especie, en el golfo San Matías, que los valores máximos del índice gonadosomático se producían en estos meses, lo cual coincide con este estudio. También postuló que la época de apareamiento se registraba en las estaciones de invierno y primavera, lo cual explicaría el aumento de la zona de degeneración en invierno, ya que los espermatozoides maduros ya estarían en los epidídimos y conductos deferentes.

En los últimos años, los análisis histológicos han sido muy importantes en los estudios reproductivos, permitiendo mejorar la eficacia en el manejo de estos recursos (Alonso Fernández *et. al.*, 2011). Por lo general este tipo de estudios se han concentrado en la gónada femenina y los machos tienen menos peso, desde este punto de vista. El análisis realizado en esta sección, proporciona, no sólo información más exacta sobre la morfología y dinámica de las gónadas masculinas, sino que también ha demostrado ser un enfoque complementario que puede contribuir a un mejor conocimiento y cuidado de estas especies de interés comercial.

# Láminas

Figura IV.1.1: Modelos de desarrollo testicular propuestos por Pratt, 1988.

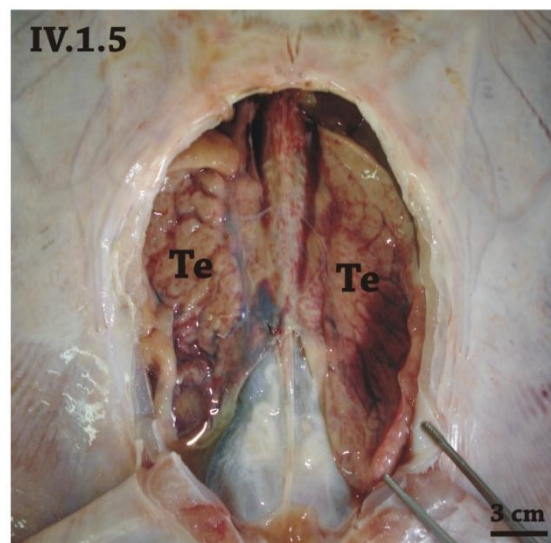
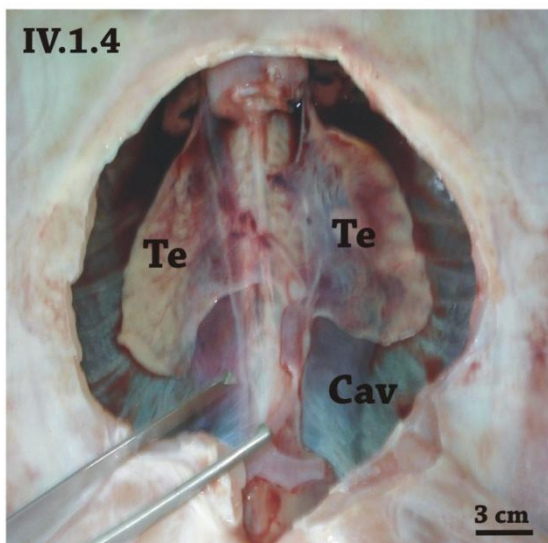
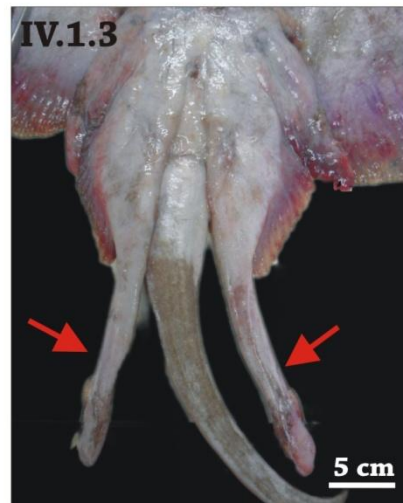
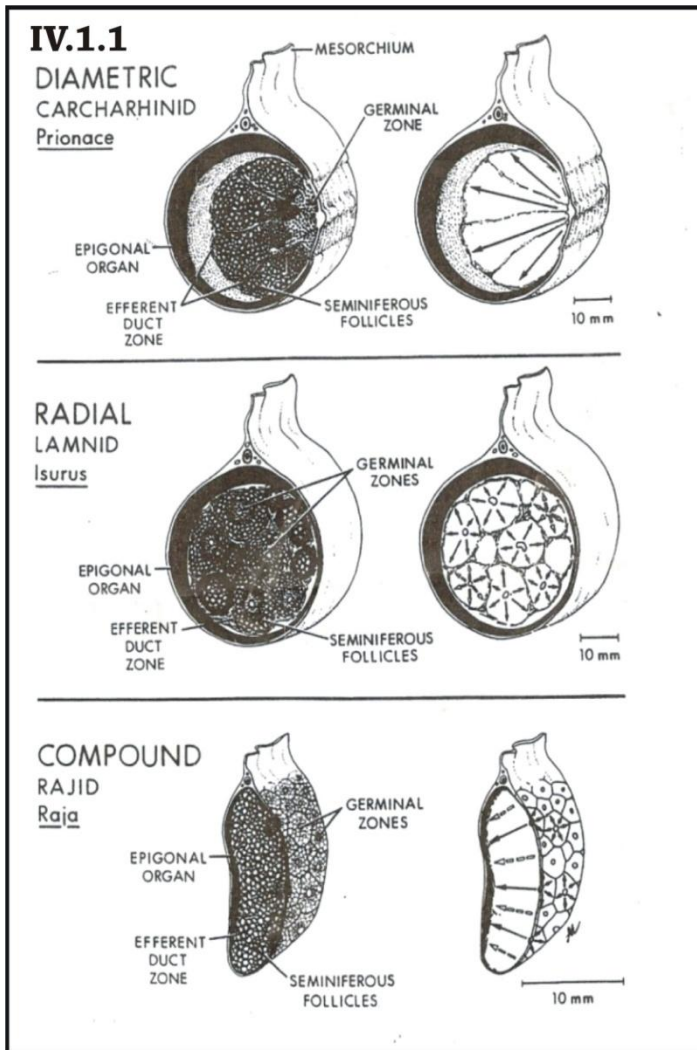
Figura IV.1.2: Claspers de un macho maduro de *S. bonapartii*.

Figura IV.1.3: Claspers de un macho maduro de *A. platana*.

Figuras IV.1.4 y IV.1.5: *S. bonapartii*. Ubicación de los testículos en la cavidad del cuerpo de un ejemplar inmaduro y maduro respectivamente.

*Referencias:* Flechas rojas: *claspers*; **Te**: testículos; **Cav**: cavidad del cuerpo.





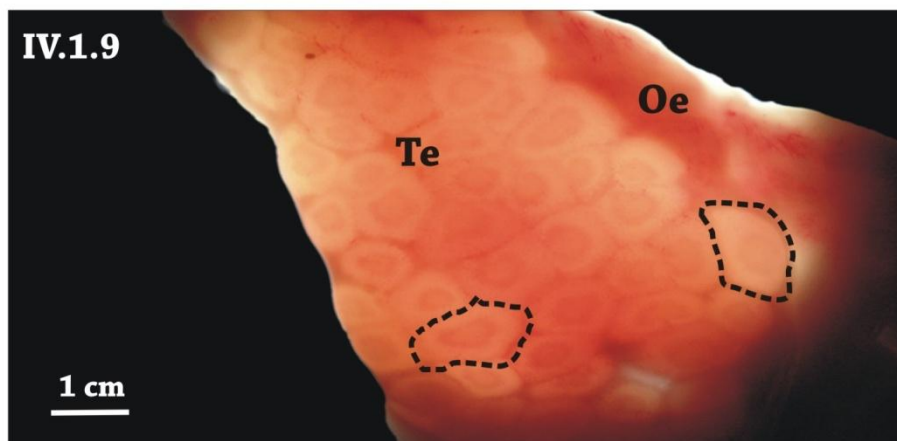
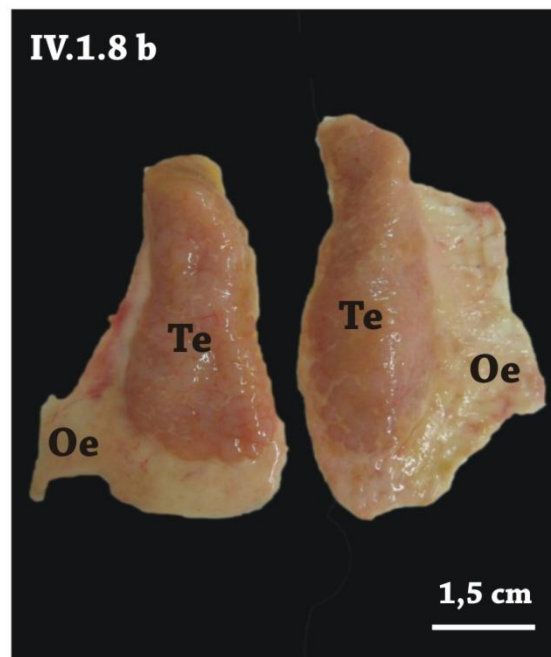
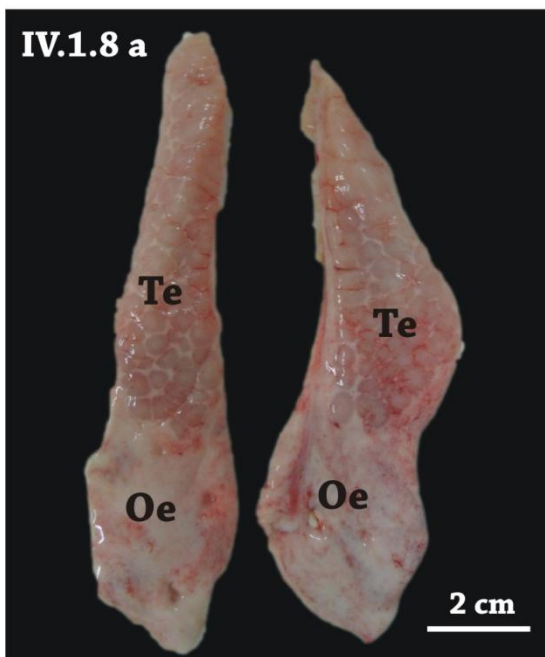
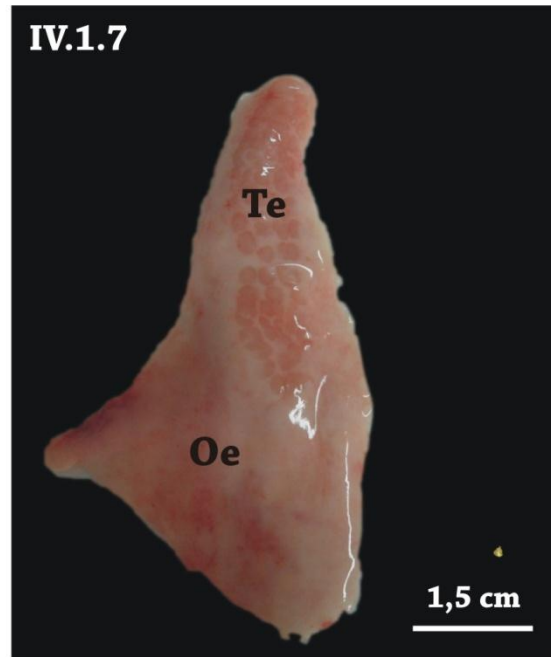
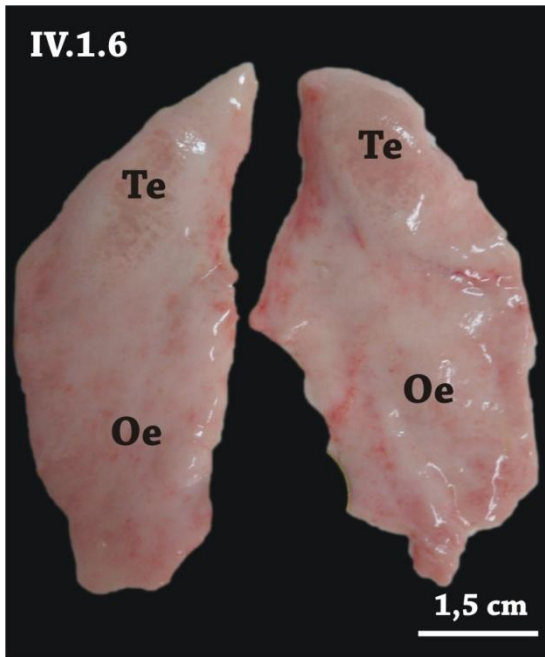
**Figura IV.1.6:** *A. platana*. Testículos de un ejemplar inmaduro. Nótese que la mayor parte del tejido corresponde al órgano epigonal.

**Figura IV.1.7:** *A. platana*. Testículo de un ejemplar en maduración donde se puede observar el desarrollo de lóbulos aislados.

**Figura IV.1.8:** Testículos maduros. a) *A. platana* b) *S. bonapartii*.

**Figura IV.1.9:** Testículo de un ejemplar maduro de *A. platana*, donde se pueden observar con detalle los lóbulos testiculares con sus respectivas zonas germinales.

**Referencias:** Te: testículo; Oe: órgano epigonal; **Círculo negro punteado:** lóbulo testicular.



**Figura IV.1.10:** Epitelio testicular a) cúbico simple ciliado (*A. platana*) b) plegado (*S. bonapartii*). Nótese la túnica albugínea por debajo del mismo. *Coloraciones: Tricrómico de Masson.*

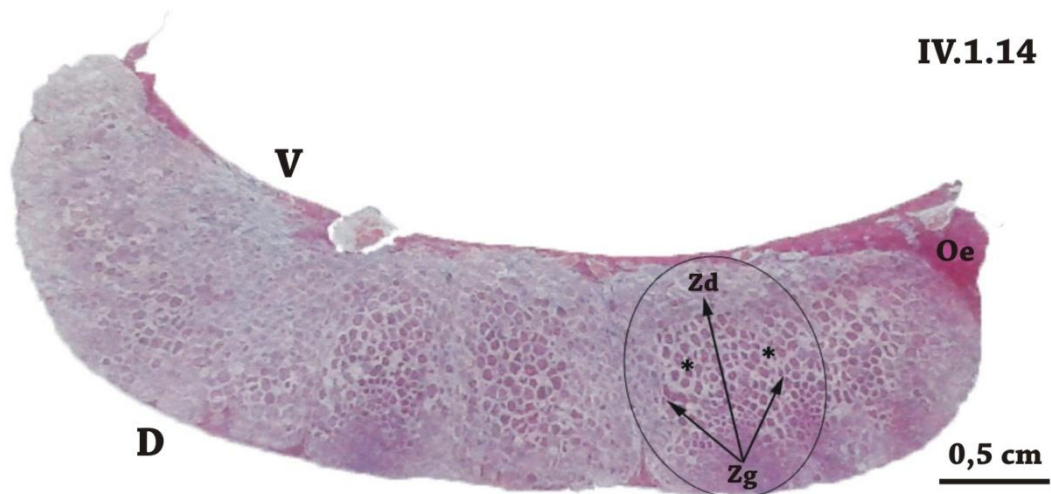
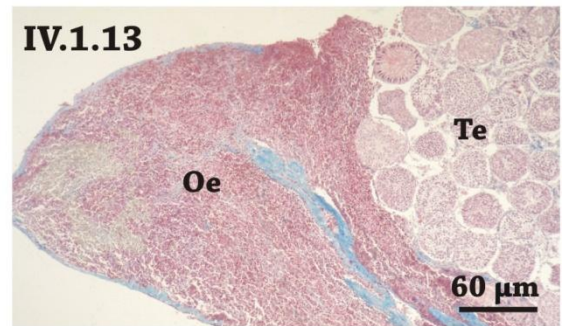
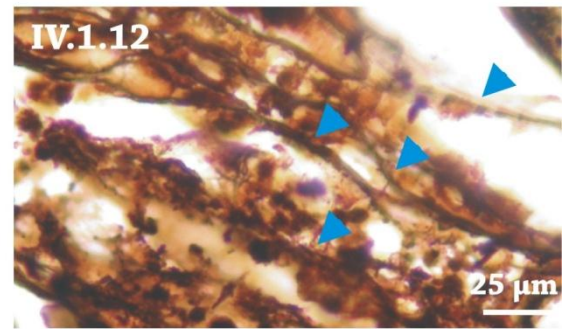
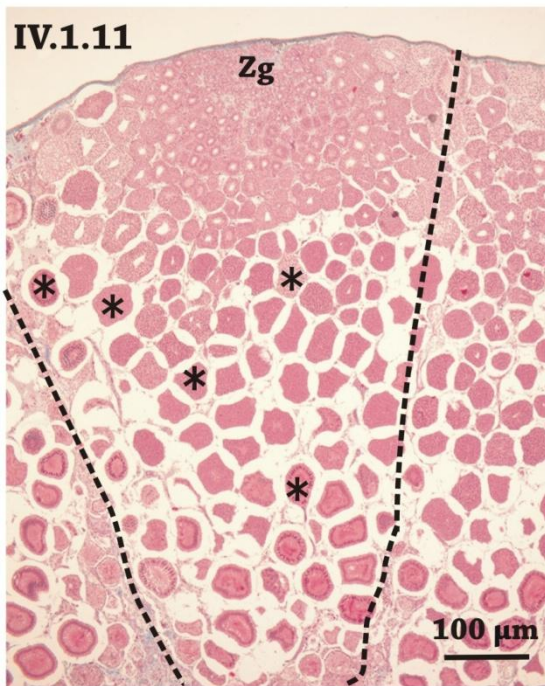
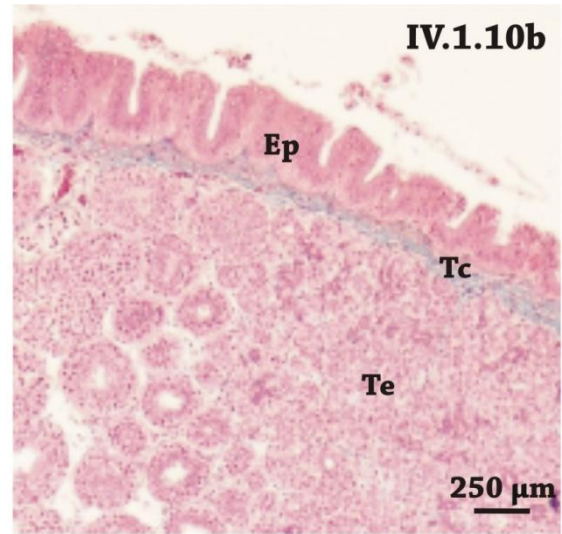
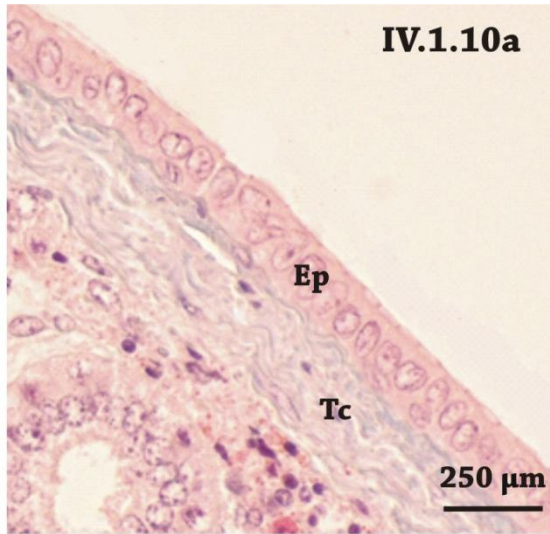
**Figura IV.1.11:** *A. platana*. Lóbulo testicular donde pueden observarse cistos en diferentes estadios de desarrollo. Las líneas punteadas delimitan un lóbulo. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.12:** Detalle de las fibras reticulares que corresponden al tejido conectivo de las trabéculas. *Coloración: Técnica de Gomori.*

**Figura IV.1.13:** *A. platana*. Relación entre el tejido epigonal y el testicular. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.14:** *S. bonapartii*. Vista general de un corte transversal del testículo de un ejemplar maduro, donde se pueden observar varios lóbulos. Nótese la retracción del órgano epigonal. Las flechas indican el avance madurativo de los cistos. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** Ep: epitelio; Tc: tejido conectivo; Te: testículo; Zg: zona germinal; Oe: órgano epigonal; Zd: zona de degeneración; D: dorsal; V: ventral; Flechas azules: fibras reticulares.



**Figura IV.1.15:** *A. platana*. Zona germinal de un ejemplar maduro. *Coloración: Tricrómico de Masson. Coloración: Tricrómico de Masson.*

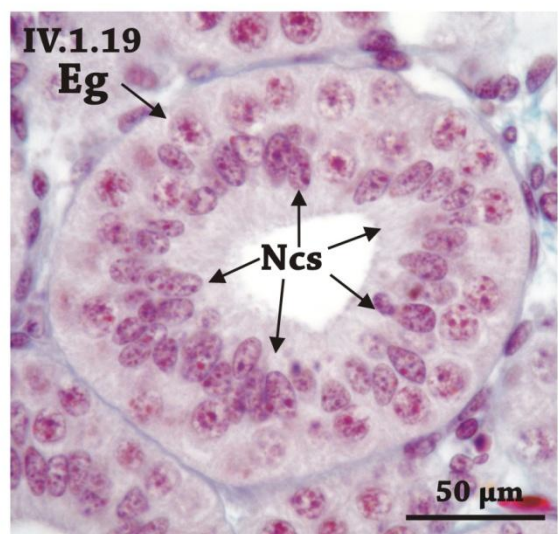
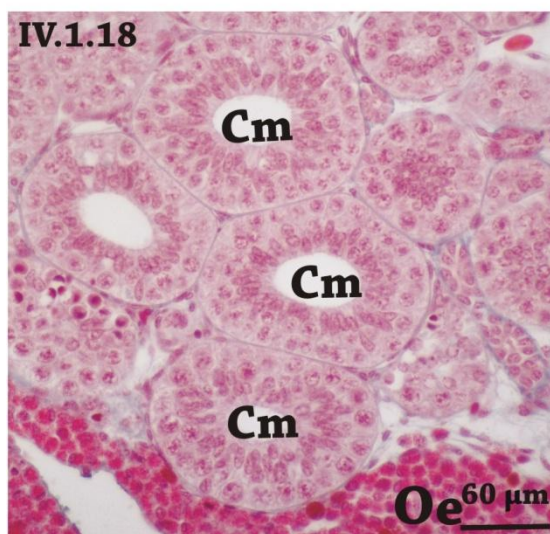
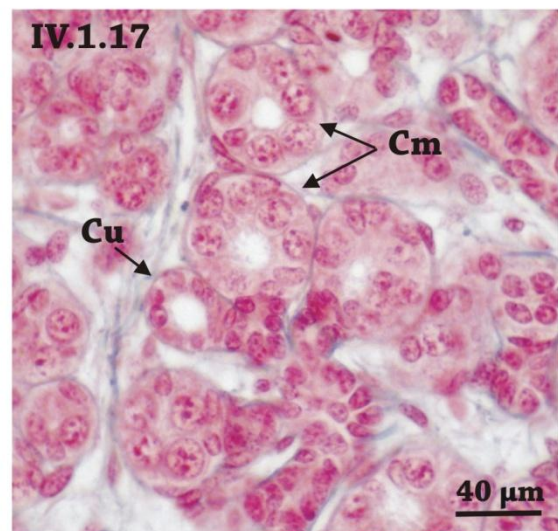
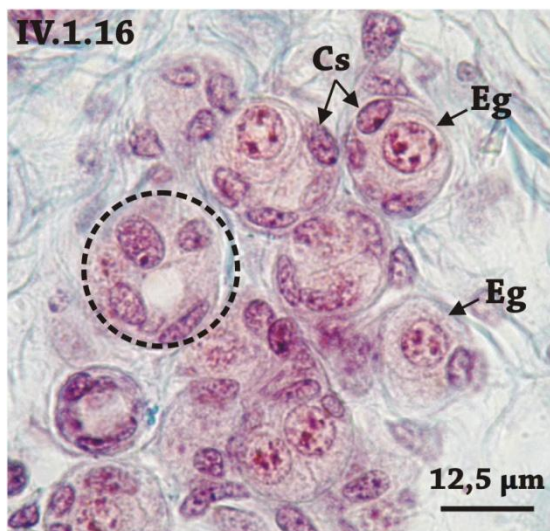
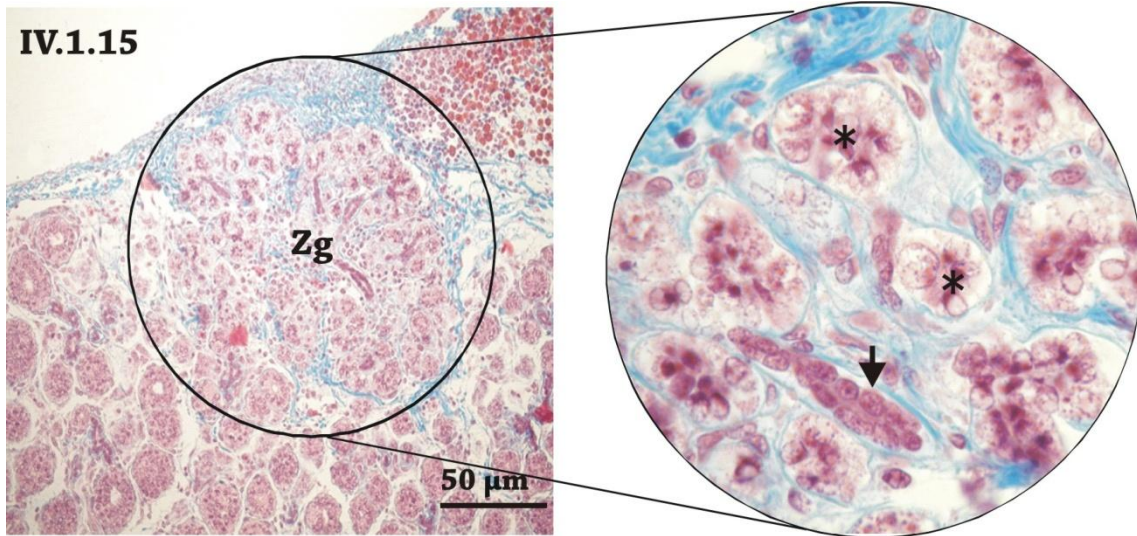
**Figura IV.1.16:** *S. bonapartii*. Detalle de las espermatogonias y células de Sertoli en la zona germinal de un ejemplar en maduración. El círculo negro punteado indica un cisto en unilaminar en formación. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.17:** *S. bonapartii*. Cistos unilaminares y multilaminares. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.18:** *S. bonapartii*. Cistos multilaminares de diferentes diámetros. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.19:** *S. bonapartii*. Detalle de un cisto multilaminar donde se pueden observar los núcleos de las células de Sertoli hacia el lumen. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** **Zg:** zona germinal; **Cs:** Células de Sertoli; **Eg:** espermatogonias; **Cu:** cisto unilaminar; **Cm:** cisto multilaminar; **Oe:** órgano epigonal; **Ncs:** núcleos de las células de Sertoli; **Flecha roja:** conducto intratesticular.



**Figuras IV.1.20 y IV.1.21:** *A. platana*. Cistos multilaminares. **a)** superficie apical del cisto PAS (+) **b)** superficie apical del cisto AB pH 2,5 (+). *Coloraciones: PAS y AB 2,5 pH.*

**Figura IV.1.22:** *A. platana*. Cisto multilaminar de un ejemplar adulto, donde se puede observar la “migración” de los núcleos de las células de Sertoli en la región basal del mismo. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

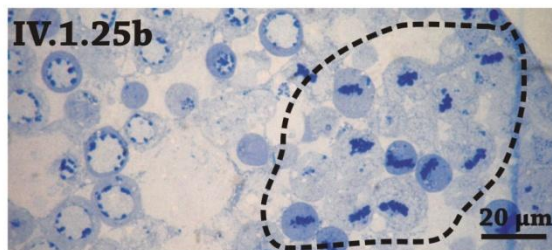
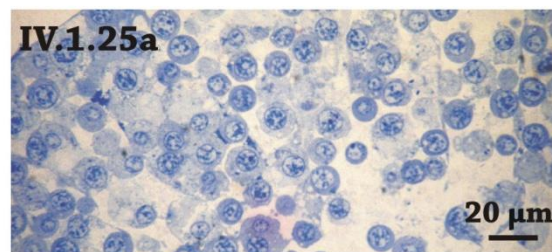
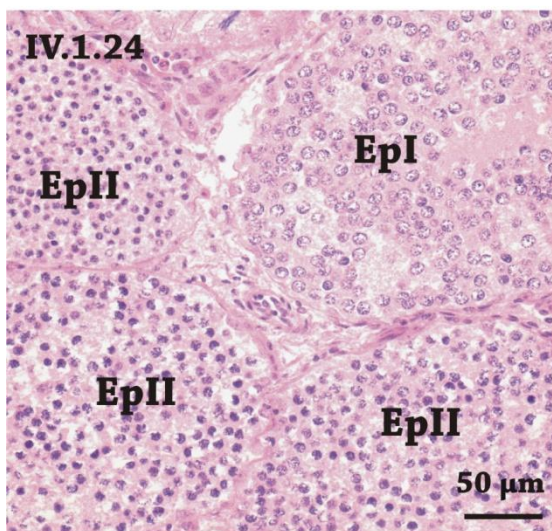
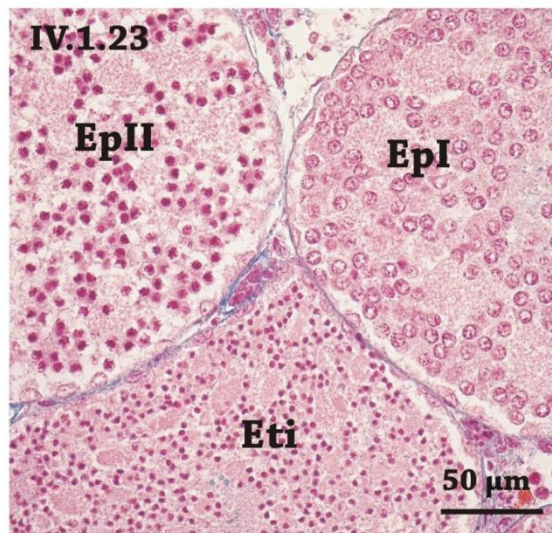
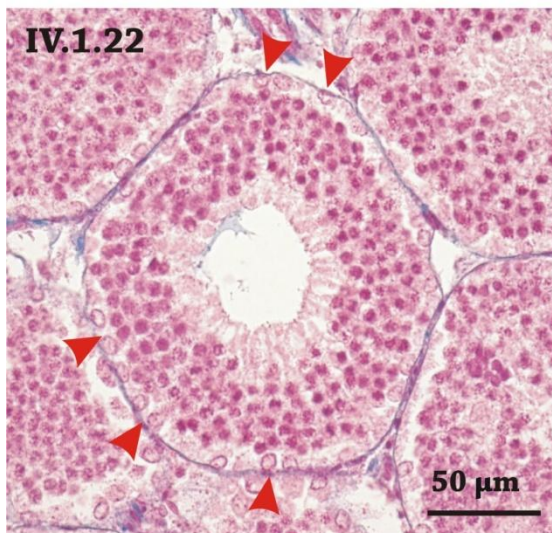
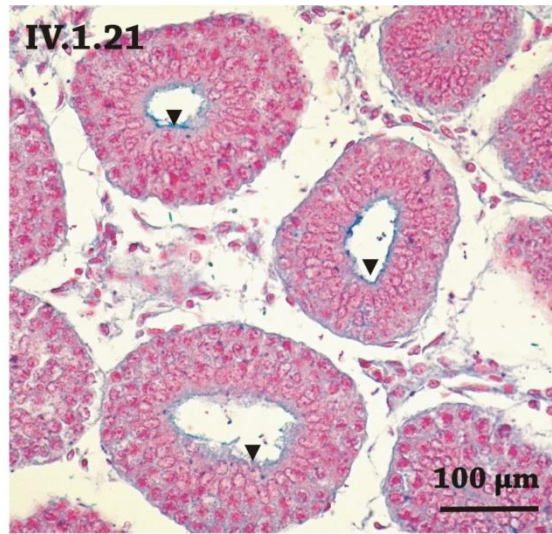
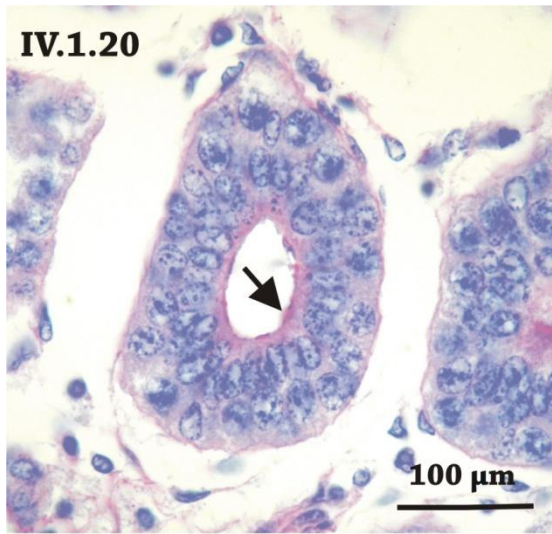
**Figura IV.1.23:** *A. platana*. Vista general de cistos en diferentes estadios espermatogénicos en un ejemplar adulto. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.24:** *A. platana*. Cistos con espermatoцитos primarios y secundarios en un ejemplar adulto. *Coloración: Hematoxilina-Eosina.*

**Figura IV.1.25:** *A. platana*. Cortes semifinos de un testículo maduro en donde pueden observarse los nucleos de los espermatoцитos. **A)** núcleos en profase I **b)** núcleos en metafase I. *Coloración: azul de metileno- azur II- fucsina básica.*

**Referencias:** Flecha negra: región apical del cisto PAS (+); Cabeza de flecha negra: región apical AB pH 2,5 (+); Cabezas de flecha rojas: células de Sertoli; EpI: espermatoцитos primarios; EpII: espermatoцитos secundarios; Eti: espermátides inmaduras; Círculo negro: núcleos profase I; Círculo negro punteado: núcleos en metafase I.





**Figura IV.1.26:** *A. platana*. Detalle de un cisto con espermátides inmaduras. *Coloración:* Hematoxilina-Eosina.

**Figura IV.1.27:** *A. platana*. Detalle de un cisto con espermátides maduras comenzándose a agrupar. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

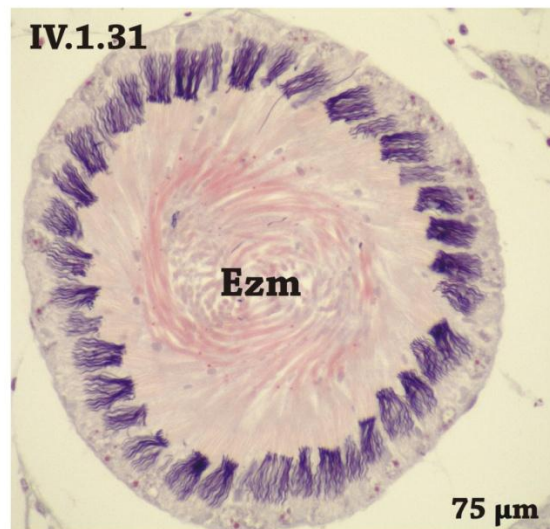
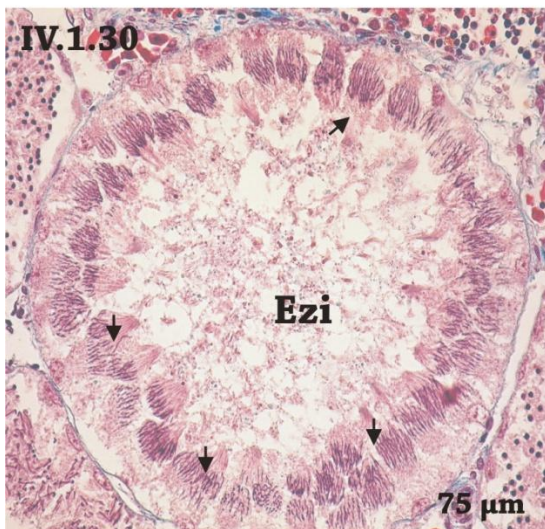
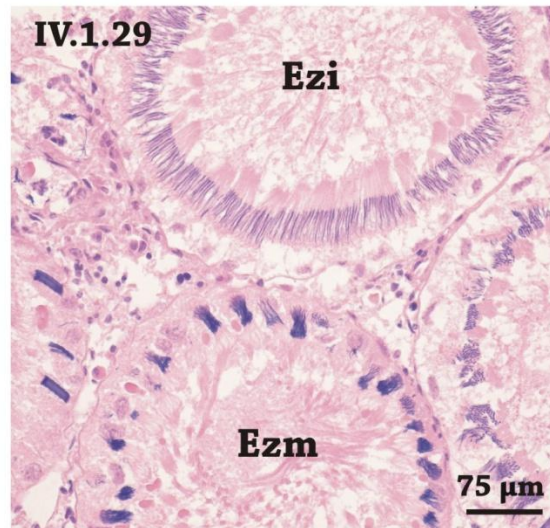
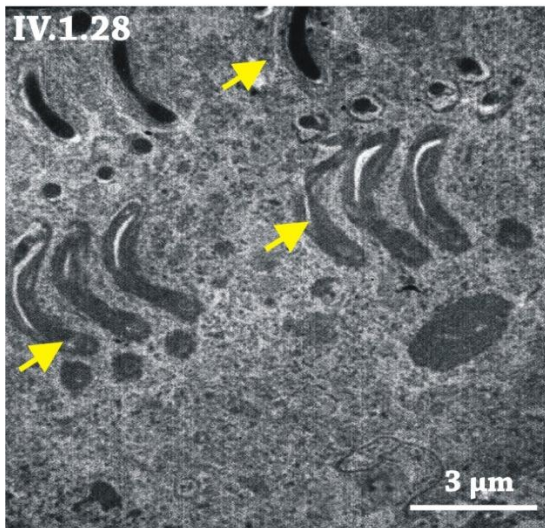
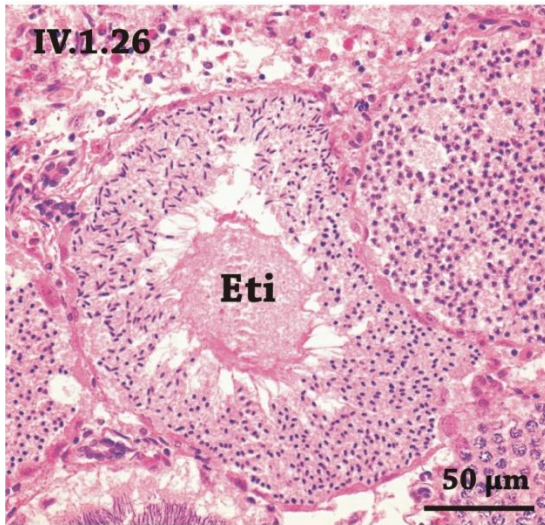
**Figura IV.1.28:** *A. platana*. Cistos con espermatozoides maduros e inmaduros. *Coloración:* Hematoxilina-Eosina.

**Figura IV.1.29:** *A. platana*. Detalle de un cisto con espermatozoides inmaduros en donde se observan paquetes de espermatozoides laxos (flechas negras). *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura IV.1.30:** *S. bonapartii*. Detalle de un cisto con espermatozoides maduros organizado en paquetes compactos. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Figura IV.1.31:** *S. bonapartii*. Detalle de las células de Sertoli y los paquetes de espermatozoides embebidos en ellas. *Coloración:* Tricrómico de Masson.

**Referencias:** **Eti:** espermátides inmaduras; **EpII:** espermatoцитos secundarios; **Etm:** espermátides maduras; **Ezi:** espermatozoides inmaduros; **Ezm:** espermatozoides maduros; **Cs:** célula de Sertoli; **Pez:** paquete de espermatozoides.



**Figura IV.1.32:** *A. platana*. Detalle de un cisto con espermatozoides donde se observa la máxima compactación de los paquetes espermáticos. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

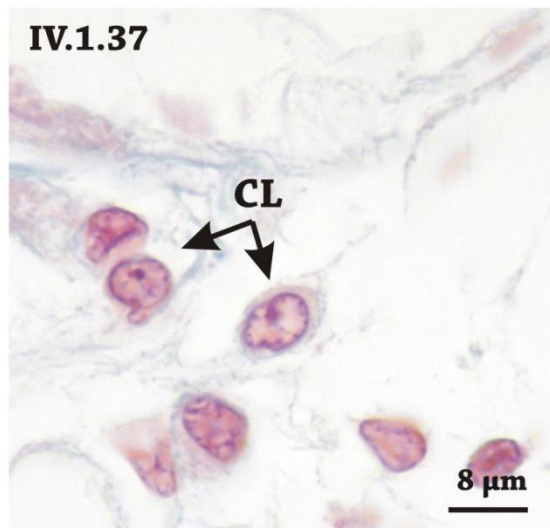
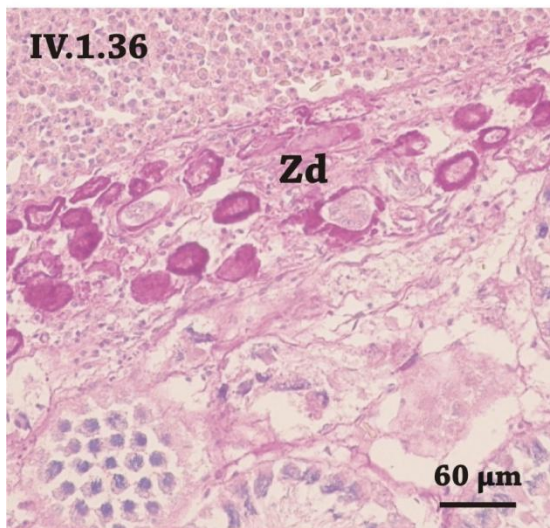
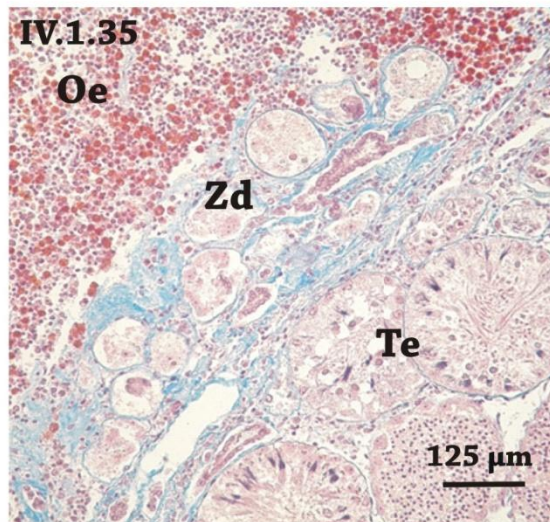
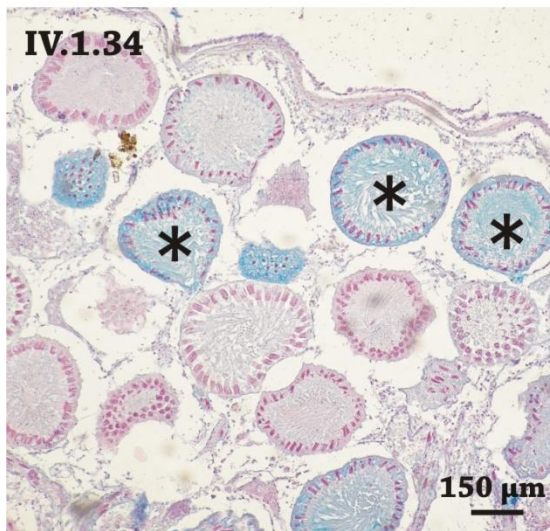
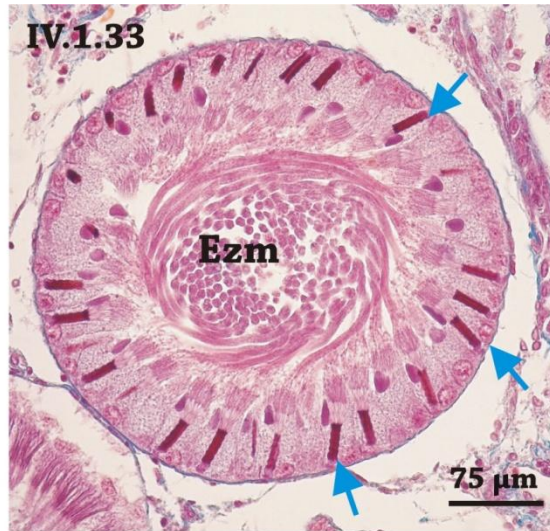
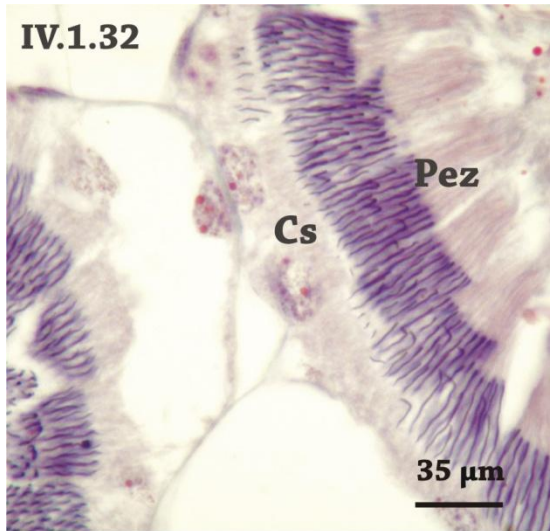
**Figura IV.1.33:** *A. platana*. Cisto previo a la espermiación, mostrando reactividad positiva al PAS en la región periférica del mismo. *Coloración: PAS.*

**Figura IV.1.34:** *A. platana*. Vista general de cistos con espermatozoides AB pH 2,5 (+). *Coloración: Azul Alcian pH 2,5.*

**Figuras IV.1.35 y IV.1.36:** *A. platana*. Zona de degeneración. IV.1.35) Detalle de los cistos vacíos luego del proceso de espermiación IV.1.36) Cistos vacíos PAS (+). *Coloraciones: Tricrómico de Masson y Azul Alcian pH 2,5 respectivamente.*

**Figura IV.1.37:** *A. platana*. Células de Leydig en el espacio intersticial. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** Ezm: espermatozoides maduros; Flechas azules: Células de Sertoli; Flechas negras: reacción PAS (+); asterisco: cistos con espermatozoides maduros AB pH 2,5 (+); Oe: órgano epigonal; Zd: zona de degeneración; Te: testículo; Cl: células de Leydig.



**Figura IV.1.38:** Vista general del testículo de un ejemplar inmaduro de *A. platana*.

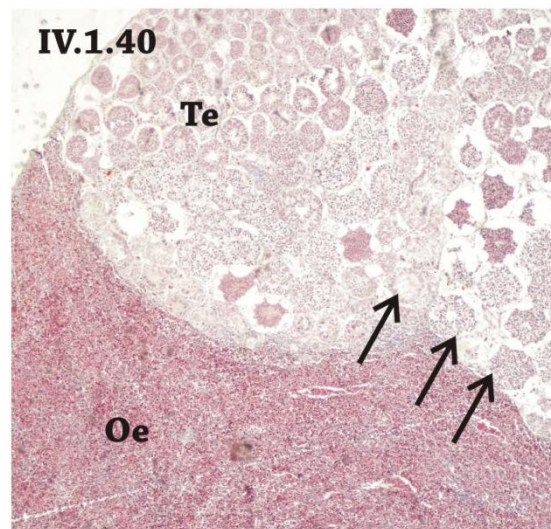
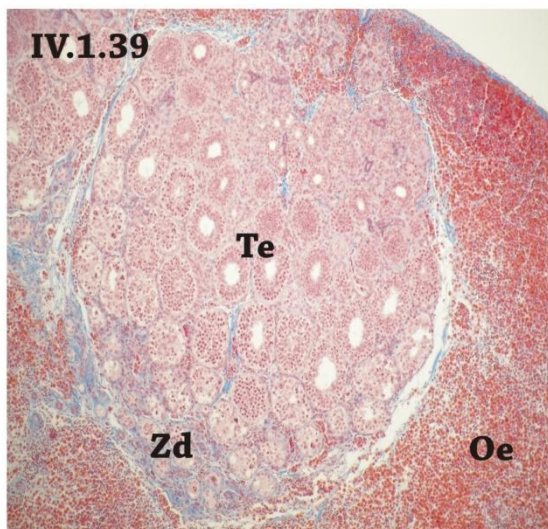
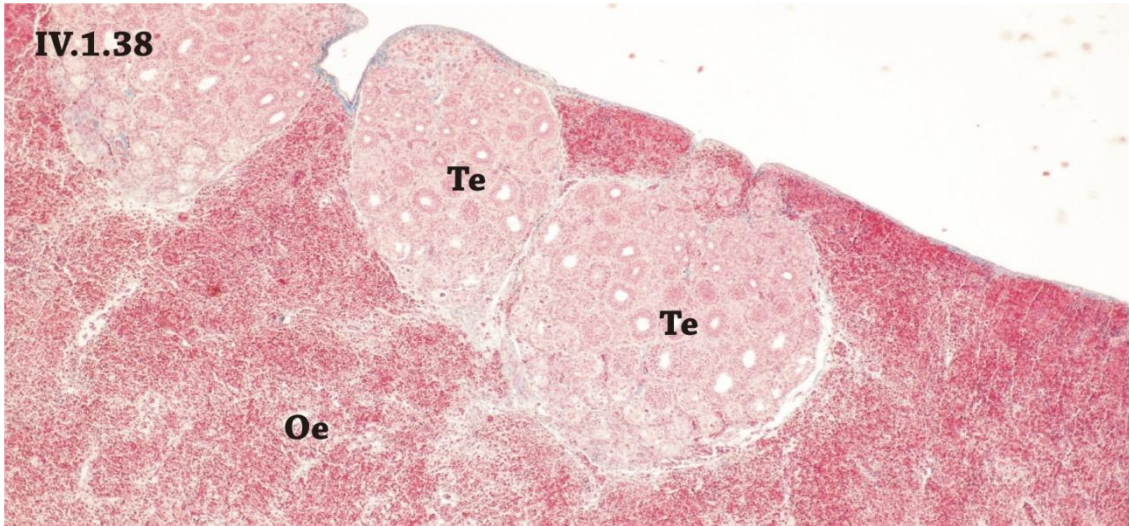
*Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.39:** Detalle de un lóbulo del testículo de un ejemplar inmaduro de *A. platana*, donde se pueden observar cistos inmaduros y una zona de degeneración. *Coloración:*

*Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.1.40:** Testículo de un ejemplar en maduración donde se pueden observar cistos con espermatozoides. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** Flechas negras: Cistos con espermatozoides; Oe: órgano epigonal; Zd: zona de degeneración; Te: testículo.

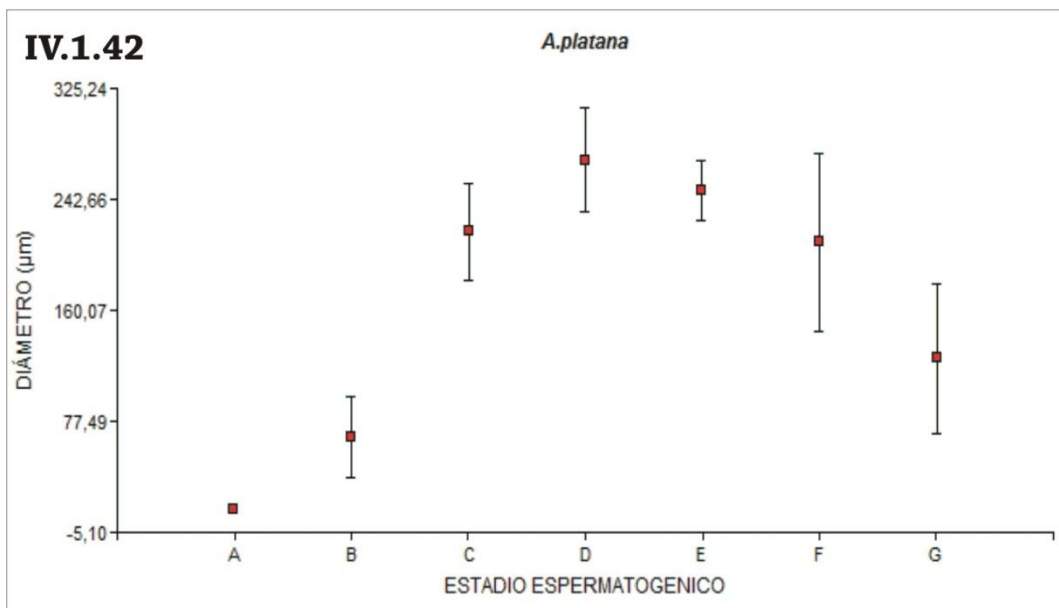
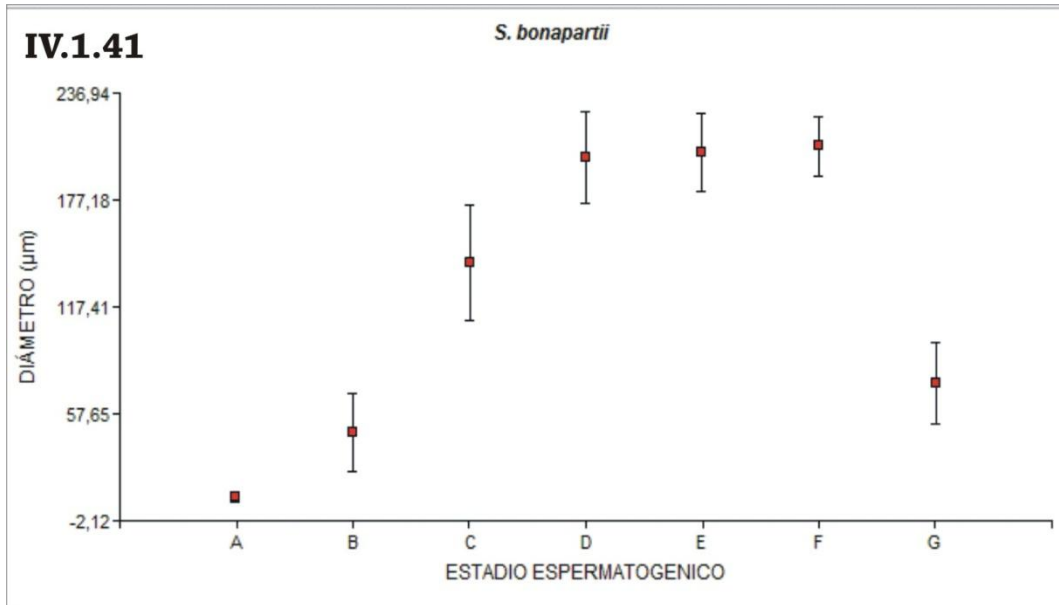


Figuras IV.1.41 y IV.1.42: Diámetro de las espermatogonias y de los diatintos espermatocistos. IV.1.41) *S. bonapartii* IV.1.42) *A. platana*.

*Referencias:*

- A: Diámetro de las espermatogonias;
- B: Diámetro de los cistos uni y multilaminares;
- C: Diámetro de cistos con espermatocitos primarios y secundarios;
- D: Diámetro de cistos con espermatides inmaduras y maduras;
- E: Diámetro de cistos con espermatozoides inmaduros;
- F: Diámetro de cistos con espermatozoides maduros;
- G: Zona de degeneración.

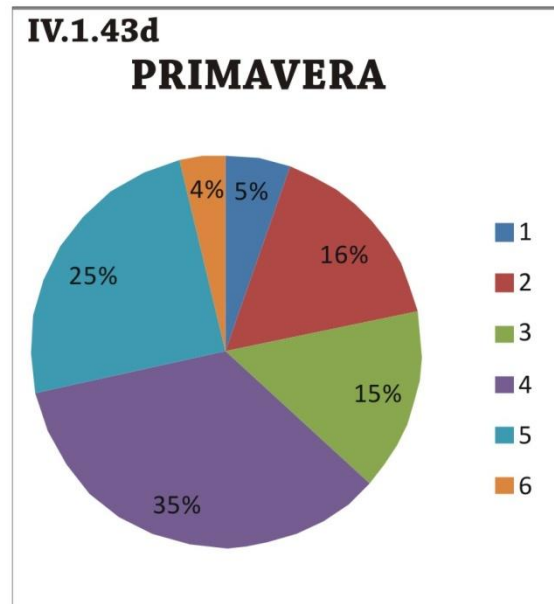
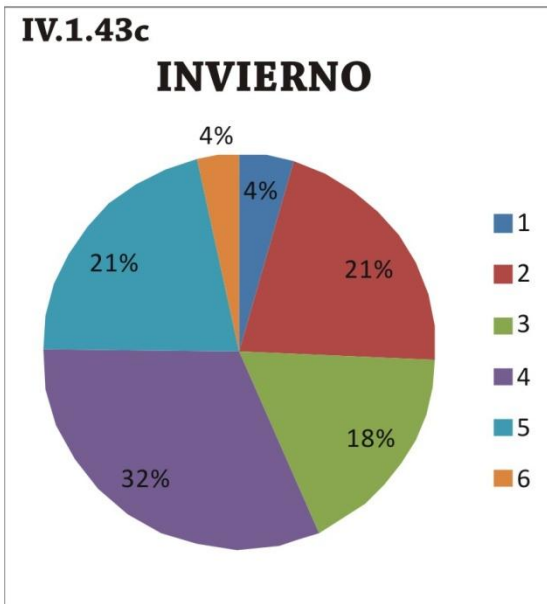
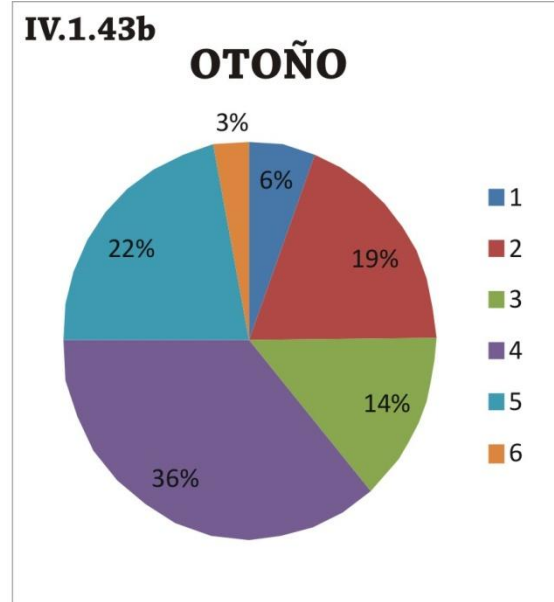
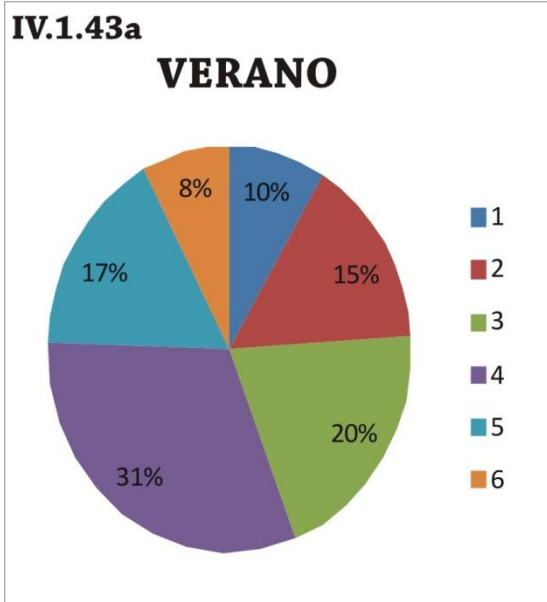




Figuras IV.1.43 a-d: *A. platana*. Análisis estacional del porcentaje de cobertura de los diferentes estadios espermatogénicos.

*Referencias:*

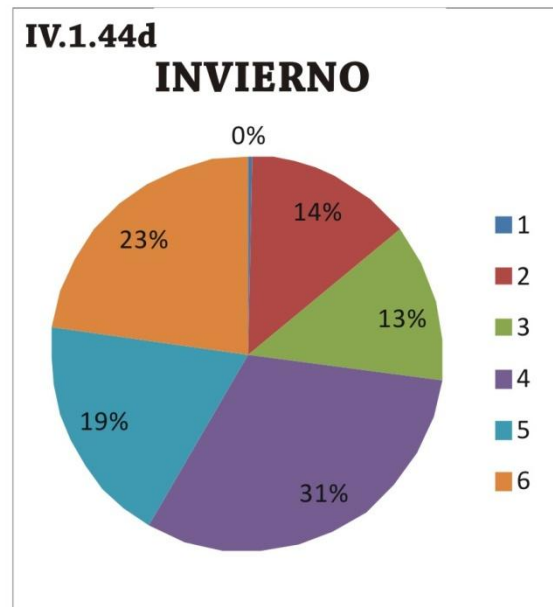
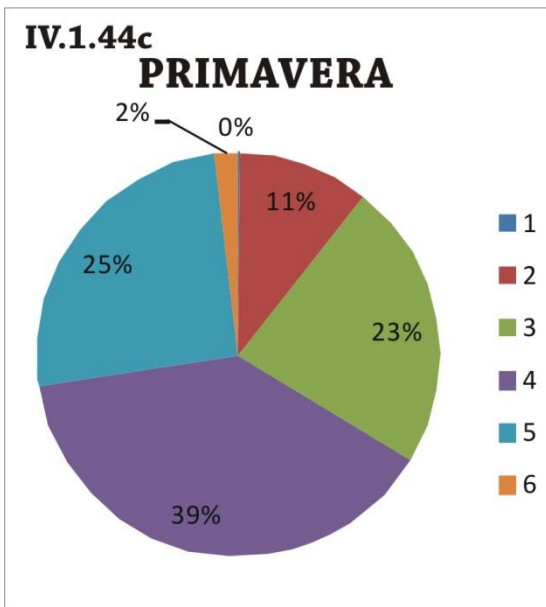
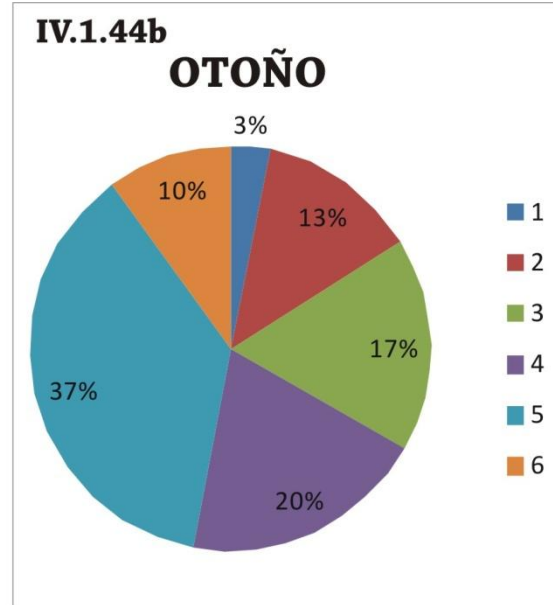
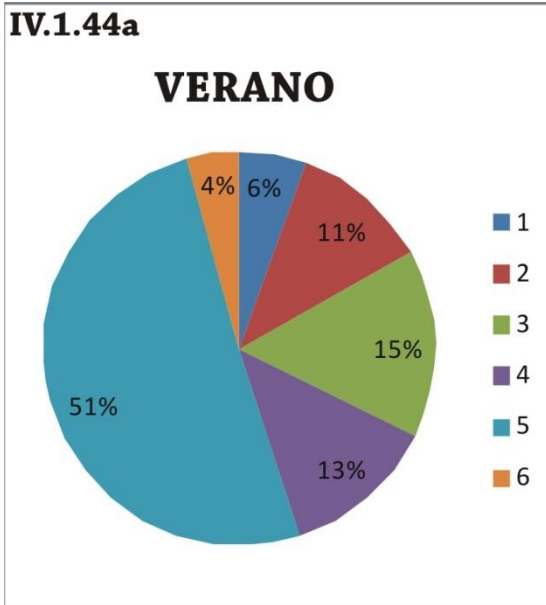
- 1: Zona germinal;
- 2: Cistos inmaduros;
- 3: Cistos con espermatocitos primarios y secundarios;
- 4: Cistos con espermátides inmaduras y maduras;
- 5: Cistos espermatozoides inmaduros y maduros;
- 6: Zona de degeneración.



Figuras IV.1.43 a-d: *A. platana*. Análisis estacional del porcentaje de cobertura de los diferentes estadios espermatogénicos.

*Referencias:*

- 1: Zona germinal;
- 2: Cistos inmaduros;
- 3: Cistos con espermatocitos primarios y secundarios;
- 4: Cistos con espermátides inmaduras y maduras;
- 5: Cistos espermatozoides inmaduros y maduros;
- 6: Zona de degeneración.



## **IV.2: CONDUCTOS GENITALES**

### **IV.2.1: INTRODUCCIÓN**

Los condrictios poseen un sistema de conductos genitales que derivan de los conductos de Müller y presentan varias homologías con los de otros vertebrados (Musick y Ellis, 2005; Mc Millan, 2007) (véase Cap. III: Introducción).

Los órganos internos del aparato genital masculino incluyen un par de testículos, conductos genitales intratesticulares y extratesticulares (eferente, epidídimo, conducto deferente). Además presentan glándulas anexas: vesícula seminal, glándula de Leydig y glándula alcalina, esta última solo presente en rayas. Durante la maduración de las gónadas masculinas, los espermatozoides maduros producidos en los testículos son transportados a los conductos genitales (Conrath, 2005; Walker, 2005). Esto se produce en las etapas finales de la espermiogénesis, por medio del vaciamiento de los espermatozoides a una red colectora de conductos intralobulares, por donde el esperma llega a los conductos eferentes y baja hacia el conducto de los *claspers* (Hamlett, 1999a; Jones et. al., 2005).

La glándula de Leydig fue descrita por Jones y Jones (1982) en *Heterodontus portusjacksoni* como una glándula tubular ramificada, que se conecta al segmento inicial del epidídimo. Posee células especializadas en la producción de proteínas, las cuales se encuentran en niveles elevados en los fluidos seminales (Jones y Lin, 1993). Además, identificaron tres tipos principales de "partículas" (no gametas) en el lumen de los conductos genitales: *cuerpos de células de Sertoli*; *citoplasmas de células de Sertoli* y *cuerpos de las*

glándulas de Leydig, todos ellos con diferente tamaño, forma y afinidad tintorial.

Una de las adaptaciones reproductivas que poseen los condriictios, es la capacidad de ambos sexos de almacenar esperma por largos períodos (Smith *et. al.*, 2004; Jones *et. al.*, 2005). En los machos, puede ser almacenado en la parte media del epidídimo y en las vesículas seminales (Pratt y Tanaka, 1994). Según la especie, los espermatozoides se almacenan formando agregados inmersos en una matriz eosinófila (espermatóforos), o pueden formar masas en las que las colas se proyectan hacia fuera del perímetro de la matriz (espermatozeugmata) (Pratt y Tanaka, 1994).

En los peces óseos, en cambio, cuando existe almacenamiento, el semen se acumula en el conducto deferente, sin presentar la disposición mencionada anteriormente (Chatchavalvanich *et. al.*, 2005).

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- ✓ Analizar las características histológicas y citológicas de los conductos genitales de *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii* y su variación según el estadio de madurez.
- ✓ Registrar la presencia de esperma en los conductos intra y extratesticulares.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos con otras especies de Condriictios.

## **IV.2.2: MATERIALES Y MÉTODOS**

Véase IV.1.2: Materiales y métodos.

## **IV.2.3: RESULTADOS**

### **IV.2.3.1: ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS CONDUCTOS GENITALES EN MACHOS DE AMBAS ESPECIES.**

El sistema de conductos y glándulas en ambas especies (véase Cap. II: Figs. II. 12; II. 14 y II. 16) se dispone en sentido anteroposterior y en forma bilateral en el siguiente orden:

- **Conductos intralobulares:** ubicados en el estroma testicular.
- **Conductos eferentes:** son tubulares y cortos. Se encuentra asociados al órgano epigonal que bordea de testículo.
- **Epidídimo:** Conducto sumamente enrollado en el cual se pueden diferenciar dos zonas, una proximal y una distal.
- **Conducto deferente:** conducto de trayecto más o menos lineal, que se ensancha en la parte final, para formar la vesícula seminal.
- **Cloaca:** seno urogenital amplio, que comunica con el exterior y que se continua con los **surcos de los claspers**, por donde se vehiculiza el esperma y el cual recibe la secreción de la glándula homónima.
- **Glándula de Leydig:** corre de forma paralela al epidídimo y llega hasta la parte anterior de los conductos deferentes. Presenta una coloración amarillenta y forma lobulada.



- **Glándula de los clasper:** son glándulas pares que se disponen en forma paralela al eje mayor de los órganos copuladores. Estas glándulas son alargadas y están inmersas en un saco dérmico.

La parte final del trayecto de los conductos genitales, se encuentra asociado al tejido renal.

Los epidídimos y los conductos deferentes junto a las glándulas de Leydig, se sitúan dorsalmente a ambos lados de la columna vertebral.

#### **IV.2.3.2: ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CONDUCTOS GENITALES EN MACHOS DE AMBAS ESPECIES.**

El sistema de conductos se inicia con los **conductos intralobulares**, que se ubican en el estroma conectivo testicular. La mucosa, está formada por un epitelio simple cúbico, bajo, cuyos núcleos redondeados ocupan casi la totalidad del citoplasma. El tejido conectivo que se encuentra por debajo del epitelio es sumamente delgado y se confunde con el estroma conectivo general de los testículos. En las regiones donde los cistos presentan mayor diámetro, estos conductos pueden encontrarse presionados contra la membrana basal cística (Figs. IV.2.1 y IV.2.2).

Los **conductos eferentes** se asocian al tejido epigonal que bordea el testículo (Fig. IV.2.3). En *S. bonapartii* presentan un epitelio cilíndrico simple, con estereocilios de altura variable (Figs. IV.2.3 y IV.2.4). Los conductos eferentes de *A. platana*, en cambio, tienen un epitelio simple cúbico sin especializaciones (Fig. IV.2.5). En ambas especies no se detectó actividad secretoria. Por debajo del epitelio se puede observar una capa de tejido conectivo denso y células

musculares lisas aisladas (Figs. IV.2.4 y IV.2.5). En los machos maduros de *A. platana*, se registró presencia de espermatozoides, de manera desagregada, en los meses de junio y agosto (Fig. IV.2.5). En los machos maduros de *S. bonapartii* no se observó esperma.

Las secciones histológicas del **epidídimo**, muestran numerosos túbulos que corresponden a un solo conducto altamente enrollado, cuya parte anterior se encuentra asociada al órgano epigonal (Figs. IV.2.6 y IV.2.7). En el lumen se observaron, en las cuatro estaciones de año y en ambas especies, espermatozoides de forma desagregada (zona proximal) y en agregación (zona distal) (Figs. IV.2.8; IV.2.9 y IV.2.10). Los ejemplares con estas características tenían, además, cistos con espermatozoides (véase Cap. IV. 1.1.3). En *S. bonapartii* se registraron cuerpos de Sertoli (Fig. IV.2.8).

El epidídimo está tapizado por un epitelio pseudoestratificado bajo con cilias y estereocilios entremezclados. Morfológicamente se pueden diferenciar dos zonas, una proximal y otra distal, basándose en la altura de las especializaciones de la membrana apical (mas altas en la región distal) y en la forma de organización de los espermatozoides (Figs. IV.2.9 y IV.2.10). Por debajo del epitelio hay una capa de tejido conectivo denso, con células musculares lisas aisladas (Fig. IV.2.9). La región distal se caracteriza por un aumento progresivo del enrollamiento. La presencia de cilias y microvellosidades en esta región, en *A. platana*, se corroboró con microscopía electrónica (Fig. IV.2.11). El epitelio del órgano resultó PAS (-) y AB pH 2,5 (+).

En el **conducto deferente**, el epitelio de revestimiento es similar al epididimario, pero en este caso la mucosa está muy plegada, haciéndose más

plegada aún en la región de las vesículas seminales (Figs. IV.2.12; IV.2.13; IV.2.14 y IV.2.15), por debajo se observa una capa de tejido conectivo muy fina con escasas fibras musculares dispersas. En estos conductos, los espermatozoides se encuentran de manera agregada (Fig. IV. 2.16).

La **vesícula seminal** presenta la mucosa sumamente plegada, con largas papilas, revestidas por epitelio pseudoestratificado, en las cuales ingresa el corion (Figs. IV.2.14 y IV.2.15). En el interior, los espermatozoides se encuentran formando grupos (Fig. IV.2.16).

La **glándula de Leydig**, es de tipo tubular ramificado. Se encuentran rodeando el epidídimo y el conducto deferente (Figs. IV.2.6; IV.2.18 y IV.2.19). El epitelio es cilíndrico simple y la mayor parte de sus células son secretoras, con núcleos ovalados y basales. Entre ellas se observan células con estereocilios y núcleos apicales (Fig. IV.2.19). Cada adenómero está rodeado por una capa de tejido conectivo denso y fibras musculares lisas. La secreción de estas glándulas es PAS (+) y AB pH 2,5 (-).

A lo largo del año se encontró semen, tanto en el epidídimo como en el conducto deferente de ambas especies. Con respecto a la vesícula seminal, solo se encontró esperma en dos ejemplares de verano de *A. platana*.

#### **IV.2.3.3 LARVA L<sub>3</sub> DE *Anisakis* sp.**

Durante el estudio de las gónadas masculinas, se registró la presencia de larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* sp. (parásito, Nematoda) dentro de la cavidad visceral de dos ejemplares machos de *A. platana* (uno en maduración y uno maduro).

Los parásitos se encontraron en el órgano epigonal, asociado a los testículos y conductos genitales (Figs. IV.2.20 y IV.2.21).

En el caso del hospedador en maduración, las larvas se encontraron en el órgano epigonal adyacente al testículo, rodeadas por una intensa respuesta inflamatoria (Fig. IV.2.20). En el ejemplar maduro se registraron en el tejido linfomieloide, cercano a los conductos genitales, pero en este caso no se detectó respuesta inflamatoria (Fig. IV.2.21).

Siguiendo el criterio de Oshima (1972) la larva se identificó como un estadio 3 (L<sub>3</sub>) de *Anisakis sp.* La cutícula se presentó con tenues estriaciones transversas, un número de células musculares de aproximadamente 41-56 por cuadrante y cordones hipodérmicos de forma acorazonada. El diámetro máximo de las larvas rondó entre los 0.35 y 0.37 mm (Figs. IV.2.22 y IV.2.23).

A pesar de la presencia de estas larvas, la citoarquitectura del tejido reproductivo y del linfomieloide se hallaba conservada.

#### **IV.2.4: DISCUSIÓN**

La estructura anatómica del sistema reproductor masculino de ambas especies coincide con lo observado en la mayoría de los batoideos (Walker, 2005).

En los vertebrados amniotas, los espermatozoides producidos dentro de los túbulos seminíferos, son vehiculizados por contracción de las células mioides hacia el sistema de conductos. En la mayoría de los anamniotas en cambio, no existen túbulos seminíferos, sino que presentan espermaticistos. Estas estructuras se forman en una zona germinal y se constituyen en sacos ocupados completamente, por una cohorte de células espermáticas (Pratt, 1988; Walker, 2005). El desplazamiento de los espermaticistos alejándose de la zona germinal, a medida que avanza el proceso de diferenciación, no es un movimiento activo. Los cistos más avanzados en el desarrollo van siendo trasladados pasivamente hacia la zona ventral, por la siguiente cohorte de espermaticistos (Parsons y Grier, 1992; Chatchavalvanich *et. al.*, 2005) (véase Cap. IV.1.1: Testículo).

Finalmente, los cistos cargados de espermatozoides vierten su contenido en los conductos intralobulares, que son el inicio del sistema de conductos. Estos conductos podrían analogarse a los túbulos rectos y la *rete testis*, presentes en los testículos de los mamíferos y constituyen el nexo entre los cistos maduros y los conductos eferentes (Chatchavalvanich *et. al.* 2005).

Luego de la espermiación, los cuerpos y citoplasmas de las células de Sertoli pueden permanecer en los conductos genitales (Jones *et. al.*, 1984; Pudney y Callard, 1986; Hamlett *et. al.*, 1999a; Henderson *et. al.*, 2014; Pedreros

Sierra y Ramírez Pinilla, 2015). Estas estructuras se hallaron en ambas especies, a lo largo del trayecto de los conductos.

Los conductos eferentes están revestidos por un epitelio simple que, en *S. bonapartii*, presenta especializaciones apicales. La arquitectura de este segmento es muy variable dentro del grupo, pudiendo presentar cilias y el revestimiento ser pseudoestratificado (*Heterodontus portusjacksoni*, Hamlett et al., 1999a) o simple (*Himantura signifer*; Chatchavalvanich et al., 2005).

En los mamíferos, el transporte espermático se ve favorecido por contracciones de las tónicas musculares de los conductos. Por el contrario, en los batoideos la fuerza motriz principal proviene de la especializaciones del epitelio y la participación muscular es minoritaria (Chatchavalvanich et al., 2005; Jones y Hamlett, 2005). Las especies estudiadas no presentaron una capa muscular desarrollada, pero en todo el tracto genital se observaron cilios y estereocilios, corroborando la tesis de fuerza motriz ciliar.

El epidídimo de ambas especies está claramente zonificado. La presencia tanto de cilias como de estereocilias no es habitual y se ha encontrado en algunas especies (Jones y Lin, 1993; Jones y Hamlett, 2006), en tanto que en otras solo se hallaron cilios (Chatchavalvanich et al., 2005).

En las especies estudiadas en este trabajo se encontraron espermatozoides libres, en distintos grados de agregación, en la luz del epidídimo. Los animales ectodermos producen espermatozoides a menor velocidad que los endotermos y, por ende, dependen más del almacenamiento espermático, como una estrategia para optimizar la probabilidad de fecundación (Jones, 1998). Otro factor que favorece la función de reserva, es la limitación alométrica de la masa testicular, que

induce a que la acumulación se produzca en el sistema de conductos (Jones, 1999). Asimismo, en los condrictios, la espermatogénesis es un proceso continuo en animales sexualmente maduros, con picos estacionales (Hamlett, 1999b). Así, el almacenamiento espermático se adecúa con la época de apareamiento (Jones, 1998; 2005). La reserva puede ocurrir tanto en el epidídimo como en la vesícula seminal (*Callorhynchus milli*, Reardon et. al., 2002; *D. sabina*, Percy et. al., 2003; *H. signifer*, Chatchavalvanich et. al., 2005; *Potamotrygon magdalenae*, Pedreros Sierra y Ramirez Pinilla, 2014). En *A. platana*, al igual que en *S. bonapartii*, se encontraron espermatozoides en el epidídimo en todos los ejemplares maduros muestreados y en todas las estaciones de año. La vesícula seminal, por su parte, se encontró vacía en la mayoría de los ejemplares analizados. Por lo tanto, no existiría una reserva espermática en este tramo. Esto es lógico, ya que en ambas especies, se registraron cistos maduros en los testículos a lo largo del año. En base a estas dos características, pueden considerarse que son especies con producción continua de esperma, por lo cual la "reserva espermática" no sería una necesidad.

Estructuralmente, la vesícula seminal presenta una mucosa plegada. Sin embargo, el revestimiento de la misma pareciera ser variable dentro del grupo. Hay especies que presentan un epitelio cilíndrico simple (*H. portusjacksoni*, Jones y Lin, 1993; *R. erinacea*, Hamlett et. al., 1999a; *D. sabina*, Percy et. al. 2003; *R. eglanteria*, Jones y Hamlett, 2006;). Por su parte, las especies aquí estudiadas, exhiben epitelio pseudoestratificado, al igual que (*M. griesus* y *M. manaso*, Teshima, 1981; *D. bleekeri*, Chatchavalvanich y Visutthipat, 1994; *H. signifer*, Chatchavalvanich et. al., 2002;) De todas formas, la diferencia

estructural es mínima, ya que en ambos casos, ambos epitelios son simples y no parecieran tener una función específica que pueda inferirse de su estructura.

En general, la túnica muscular no suele ser muy importante, a excepción de *C. milli*, donde existe una capa de musculo liso definida (Reardon *et. al.*, 2002). De todas formas, estas pequeñas diferencias morfológicas no son sustanciales en la estructura y función de la glándula.

En las dos especies analizadas, los espermatozoides cambian el estado de agrupamiento a lo largo del trayecto del sistema de conductos. Esta situación coincide con las observaciones de Colonello, (2009) para las especies: *Atlantoraja castelnaui*, *Rioraja agassizi* y *Zapteryx brevirostris* en las costas bonaerenses. El empaquetamiento final, en todos los casos, es bajo la forma de *spermatozeugmata*, (Pratt y Tanaka, 1994).

El agrupamiento de los espermatozoides observado en esta sección, demuestra la existencia de un proceso de maduración extra-gonadal. La matriz final en la que se encuentran podría proveer un medio apropiado y con nutrientes suficientes para atravesar el tracto reproductivo de las hembras (Colonello, 2009), o mantener la viabilidad espermática.

Tanto *A. platana* como *S. bonapartii* presentan el epitelio de revestimiento de la glándula de Leydig, con características similares a otras especies, variando solamente en cuanto a la presencia o no, de cilias o estereocilios (*H. portusjacksoni*, Jones y Lin, 1993; *C. milli*, Hamlett *et. al.*, 2002; *H. signifer*, Chatchavalvanich *et. al.*, 2005; *R. eglanteria*, Jones y Hamlett, 2006). Estas glándulas producen una secreción rica en carbohidratos y proteínas glicosiladas y la vierten a lo largo del sistema. Se cree que esta secreción podría participar en la agregación espermática, generando una matriz que



aglutine a los espermatozoides (Chatchavalvanich et. al., 2005). La formación de paquetes de esperma podría ser una adaptación tendiente a incrementar la eficacia en la transferencia hacia la hembra y para optimizar el almacenamiento (Jones et. al., 2005).

El semen, antes de ser eyaculado, está constituido por espermatozoides en diferente grado de agregación, cuerpos y citoplasmas de células de Sertoli, restos císticos (McClusky, 2005; Pedreros Sierra y Ramírez Pinilla, 2014) y secreciones proteicas (Jones y Lin, 1993; Lacy, 2005). Por último, la secreción de la glándula de los *claspers*, una vez que el semen ingresa por la hendidura de los órganos copuladores, ayudaría a la activación, movilidad y nutrición de los mismos (LaMarca, 1964).

Los Anisakidos pueden parasitar a los elasmobranquios como larvas o adultos y generalmente se presentan como parásitos internos (Caira, 1990). Normalmente estos parásitos tienen órganos blanco como el intestino, hígado, corazón, cavidad corporal, músculo y vejiga natatoria (peces óseos) (Williams y Jones, 1994; Dick y Choundhury, 1995). En el caso de la raya platana se encontraron en la cavidad visceral de dos ejemplares, cercanos al órgano epigonal, lugar que no es muy común para ser parasitado, por su alta población de células inmunocompetentes.

La identificación a nivel genérico de las larvas, se basó en: la estructura particular que presenta el tubo digestivo, la capa muscular del cuerpo, los cordones hipodérmicos y la glandular excretora asociada a ellos (Oshima, 1972), así como las dimensiones de los diámetros corporales, coincidentes con los hallazgos previos de *Anisakis* sp. en teleósteos de la misma zona. Sin embargo, su identificación específica es complicada porque muy pocos de los

caracteres utilizados en el adulto, están presentes en el estado larvario (Dick y Choudhury, 1995)

Santos (2004) reportó la presencia de Pseudoanisakidos en el intestino de dos rayas: *R. agassizii* y *Psammobatis extenta*. Alvarez et al. (2006) encontró seis especies de nematodos, entre ellos *A. simplex*, en el lumen del intestino de peces cartilaginosos. Tanzola y Guagliardo (2004) reportaron varias larvas estadio 3 en el lumen intestinal de peces cartilaginosos, pero no en cavidad corporal. Considerando que esta cavidad, en los Condrictios, raras veces es colonizada por helmintos, debido a sus altas concentraciones de urea, es destacable este primer hallazgo de ejemplares de Anisákidos en estado larval 3. La larvas halladas en este estudio son morfológicamente similares a las encontradas en *Seriolella porosa* por Guagliardo et al. (2009).

Las observaciones realizadas en el sistema de conductos genitales masculinos de *A. platana* y *S. bonapartii*, amplía la información existente y sustenta la hipótesis que indica que el sistema de conductos genitales en los peces cartilaginosos es similar al del resto de los vertebrados, con excepción de los teleósteos. En los últimos, el epidídimo y vesículas seminales no están desarrolladas, excepto en algunas especies (Billard, 1990).

# Láminas

**Figura IV.2.1:** Conducto intratesticular de *A. platana*. En el interior puede observarse la presencia de esperma. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

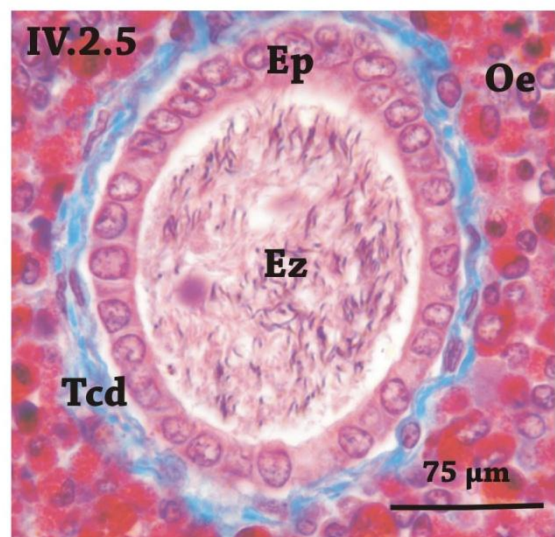
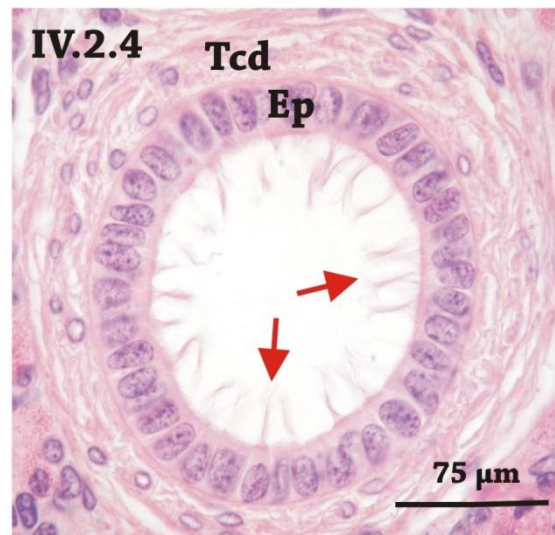
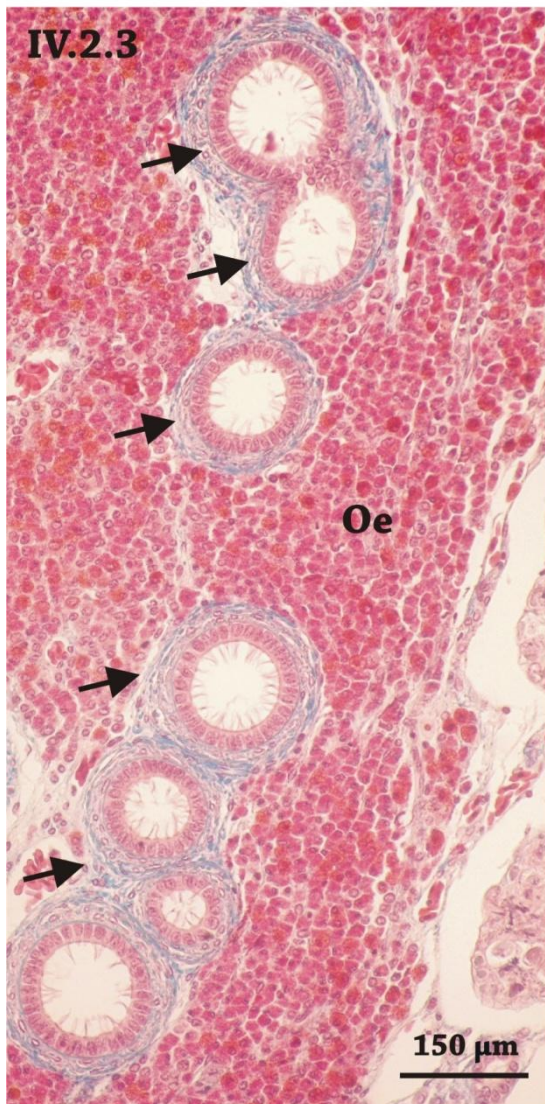
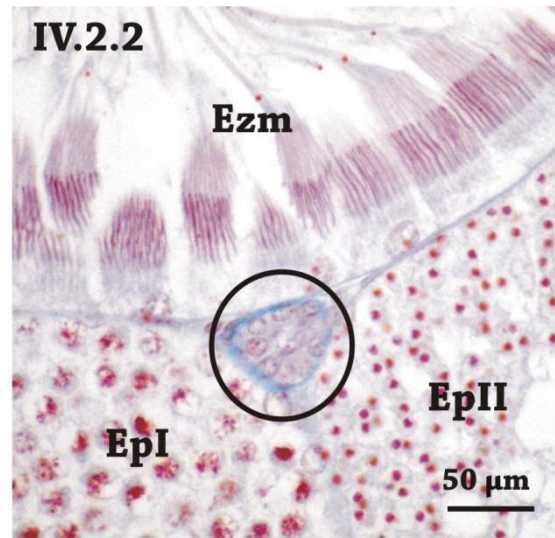
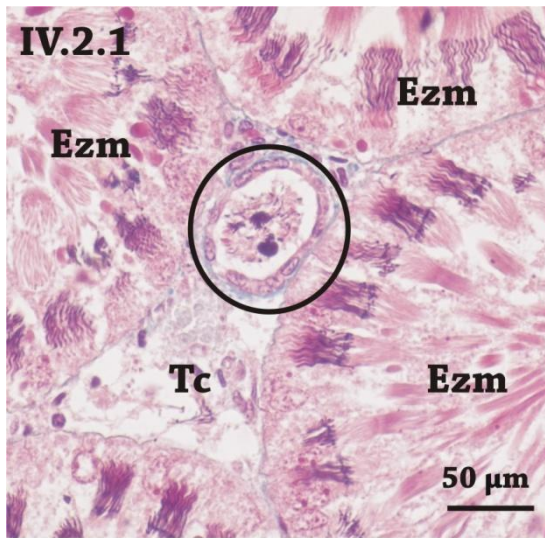
**Figura IV.2.2:** Conducto intratesticular de *S. bonapartii*, entre cistos maduros. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.3:** Vista general de la ubicación de los conductos eferentes bordeando el tejido epigonal en un testículo maduro de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.4:** Detalle de un conducto eferente de *S. bonapartii*. *Coloración: Hematoxilina-eosina.*

**Figura IV.2.5:** Detalle de un conducto eferente de *A. platana*. En su interior pueden observarse espermatozoides. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** **Círculo negro:** conductos intratesticulares; **Ep:** Epitelio; **EpI:** espermatoцитos primarios; **EpII:** espermatoцитos secundarios; **Ez:** espermatozoides; **Ezm:** espermatozoides maduros; **Flechas rojas:** estereocilios; **Flechas negras:** Conductos eferentes; **Oe:** órgano epigonal; **Tc:** tejido conectivo, **Tcd:** tejido conectivo denso.



**Figura IV.2.6:** Vista general del epidídimo de un macho maduro de *A. platana*, en donde se puede observar la asociación con el órgano epigonal. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.7:** Zona proximal del epidídimo de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

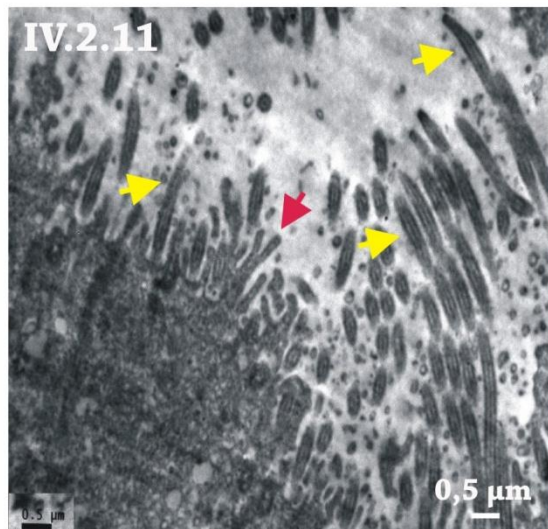
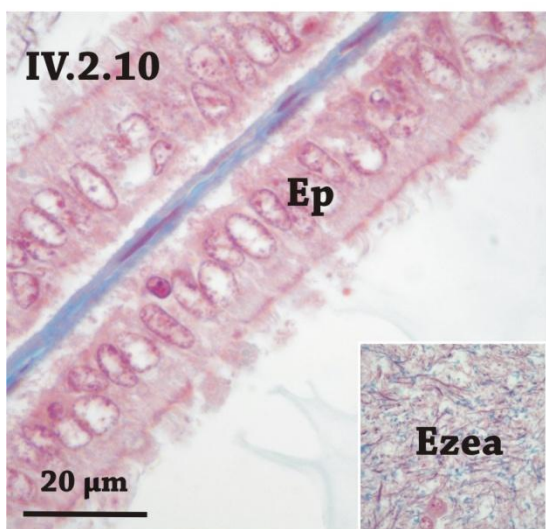
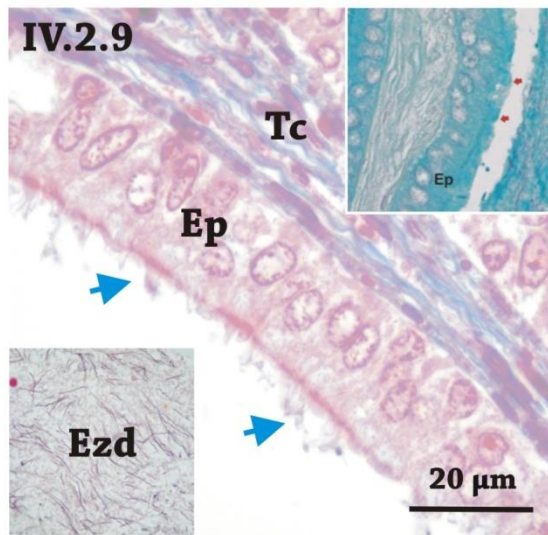
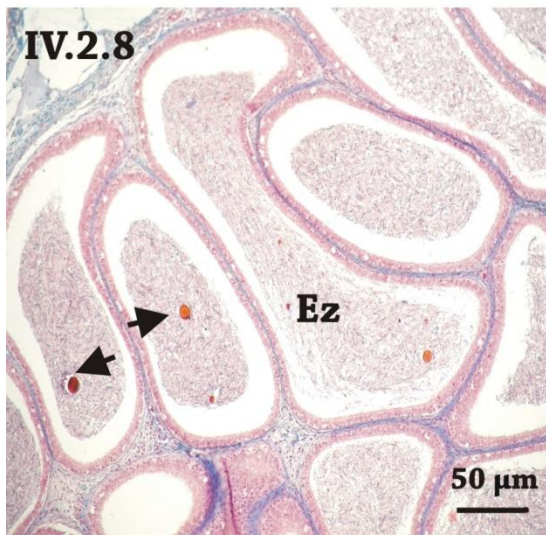
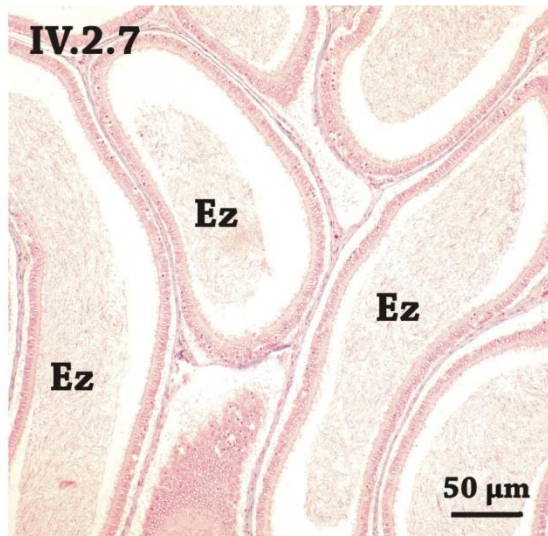
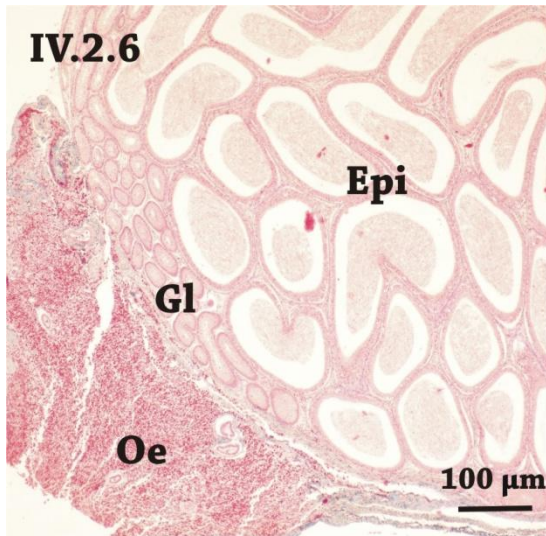
**Figura IV.2.8:** Zona distal del epidídimo de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.9:** Detalle del epitelio de la zona proximal del epidídimo. Inserto abajo izq: detalle de los espermatozoides desagregados. Inserto derecha arriba: reacción positiva al AB pH 2,5. *Coloración: Tricrómico de Masson y Azul Alcian, pH 2,5.*

**Figura IV.2.10:** Detalle del epitelio de la zona distal del epidídimo. Inserto: espermatozoides en agregación. *Coloración: Tricrómico de Masson*

**Figura IV.2.11:** Microfotografía del epitelio del epidídimo de un ejemplar maduro de *A. platana*. Se puede observar la presencia de cilios y estereocilios.

**Referencias:** Ep: epitelio; Epi: epidídimo; Ez: espermatozoides; Ezd: espermatozoides desagregados; Ezea: espermatozoides en agregación; Flechas amarillas: cilias ; Flechas azules: especializaciones de la membrana apical; Flechas negras: cuerpos de Sertoli; Flecha roja: estereocilios ; Gl: glándula de Leydig; Oe: órgano epigonal; Tc: tejido conectivo.



**Figura IV.2.12:** Vista general del conducto deferente de un macho maduro de *A. platana*.

*Coloración: Tricrómico de Masson*

**Figura IV.2.13:** Detalle del epitelio que tapiza los conductos deferentes, con presencia de espermatozoides agregados en su interior. *Coloración: Tricrómico de Masson*

**Figura IV.2.14:** Vista general de la vesícula seminal. *Coloración: Tricrómico de Masson*

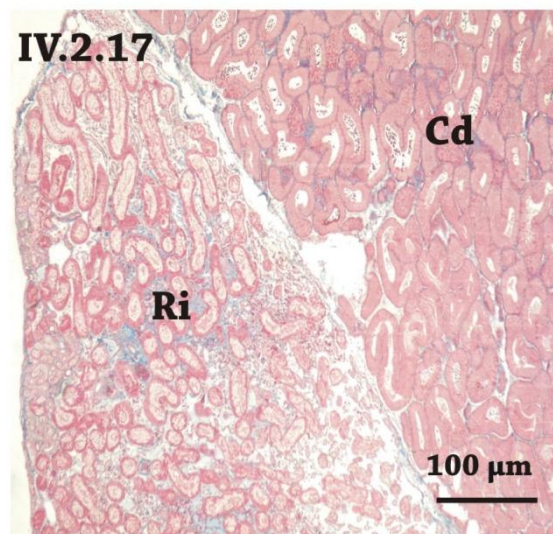
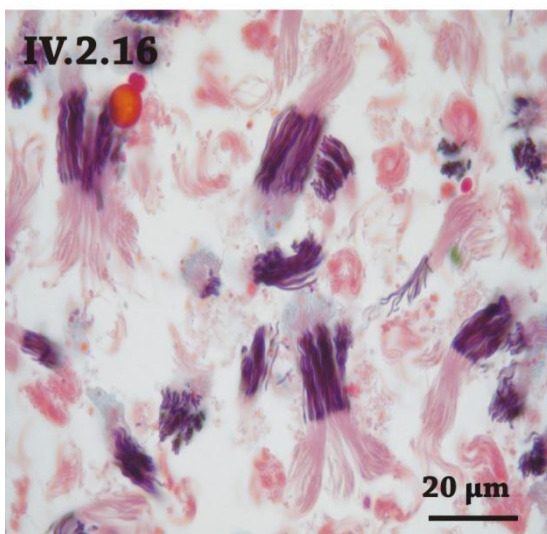
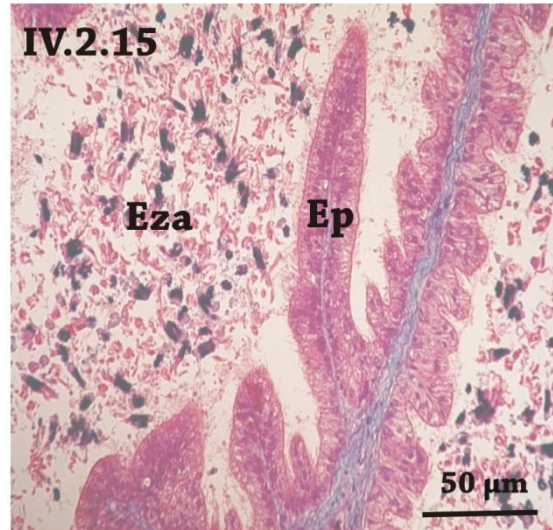
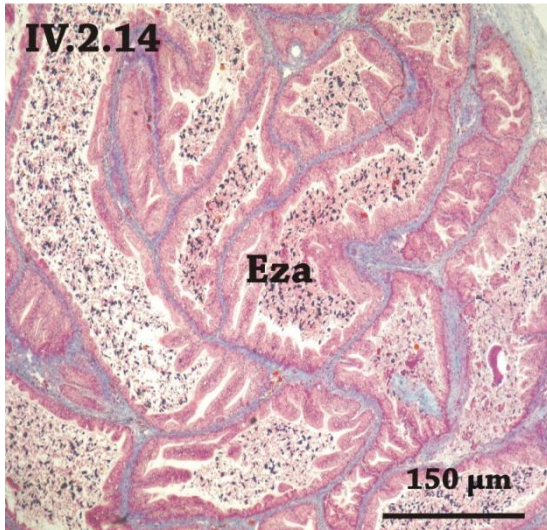
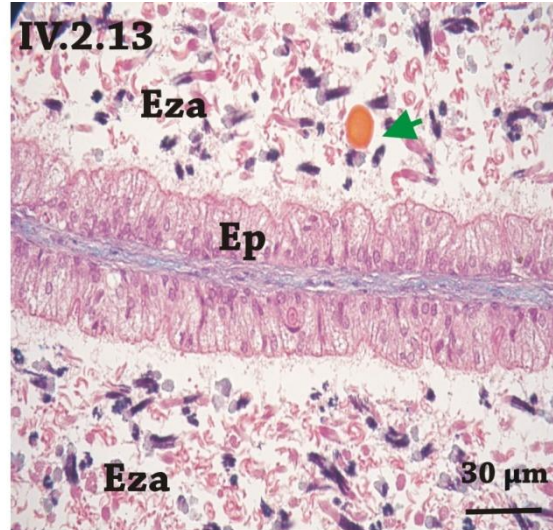
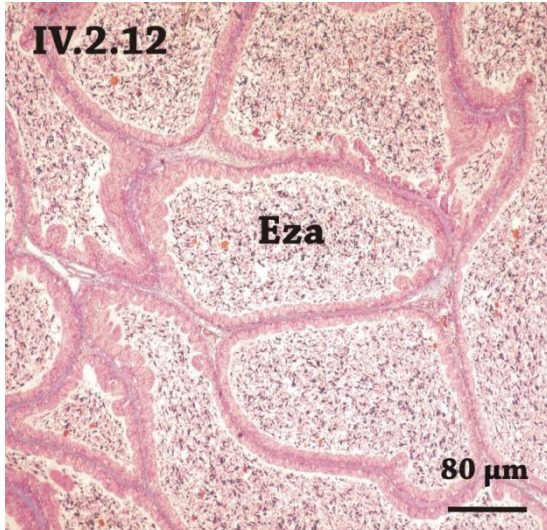
**Figura IV.2.15:** Detalle del plegamiento de la mucosa de la vesícula seminal. *Coloración: Tricrómico de Masson*

**Figura IV.2.16:** Espermatozoides en su máximo estado de agregación en la vesícula seminal. *Coloración: Tricrómico de Masson*

**Figura IV.2.17:** Vista general de la asociación de la región terminal de los conductos con el tejido renal. *Coloración: Tricrómico de Masson*

**Referencias:** Cd: conductos terminales; Ep: epitelio; Eza: espermatozoides agregados; Ri: riñón.





**Figura IV.2.18:** Vista general de la glándula de Leydig de un ejemplar maduro de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.19:** Detalle de la glándula de Leydig en donde se pueden observar los dos tipos celulares. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

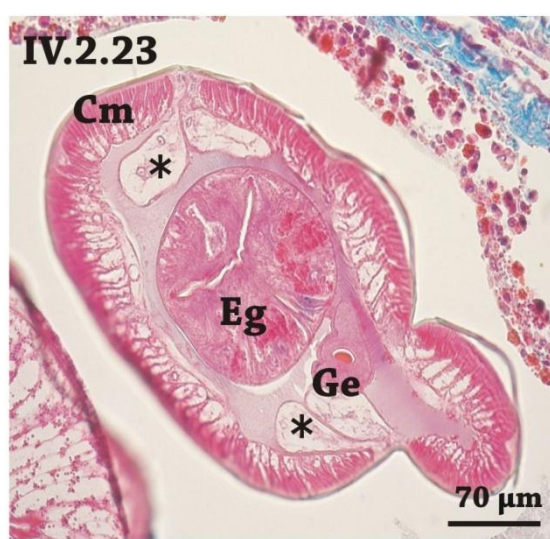
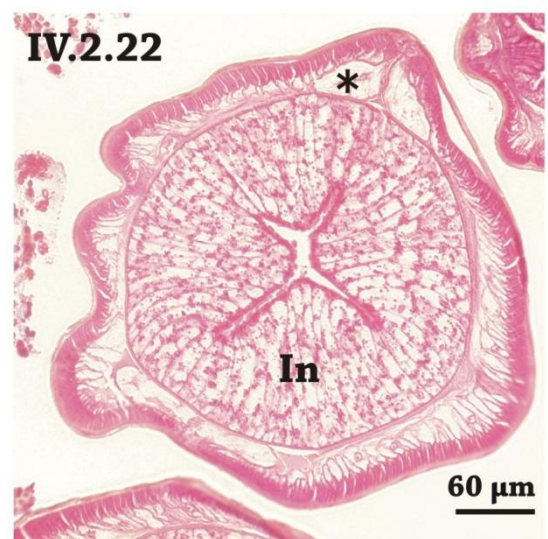
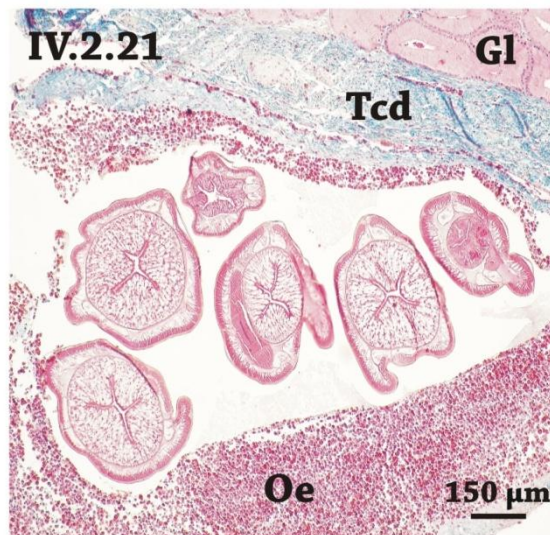
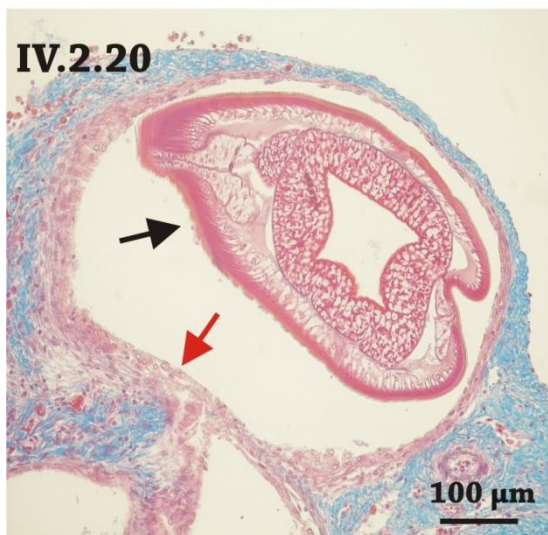
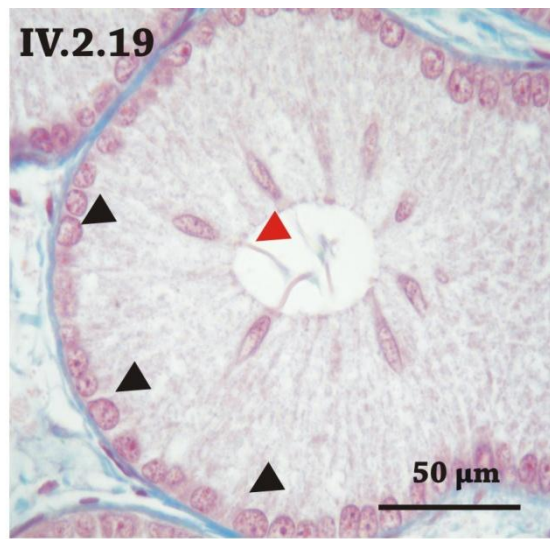
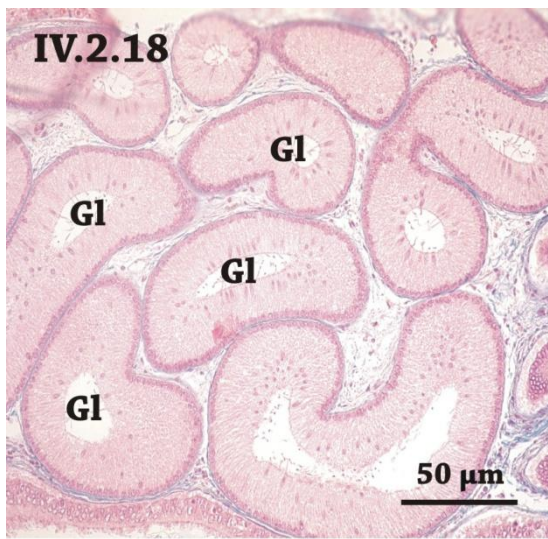
**Figura IV.2.20:** Corte transversal de una larva estadio 3 de *Anisakis sp.* en el tejido visceral cercano al testículo de un ejemplar en maduración de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.21:** Vista general de *Anisakis sp.* en el tejido epigonal que bordea los conductos genitales de un ejemplar maduro de *A. platana*. *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.22:** Detalle de un corte transversal de la parte media de la larva de *Anisakis sp.* *Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Figura IV.2.23:** Detalle de un corte transversal de la parte anterior de la larva de *Anisakis sp.* *Coloración: Tricrómico de Masson. Coloración: Tricrómico de Masson.*

**Referencias:** **Asterisco:** cordones hipodérmicos; **Cm:** células musculares; **Cabezas de flechas negras:** células secretoras; **Cabezas de flechas rojas:** células con estereocilios; **Eg:** esófago; **Flecha negra:** Larva L<sub>3</sub> de *Anisakis sp.*; **Flecha roja:** reacción inflamatoria; **Ge:** glándula excretora; **Gl:** glándula de Leydig; **In:** intestino; **Oe:** órgano epigonal; **Tcd:** tejido conectivo denso.





**CAPÍTULO V: INDICADORES RELACIONADOS CON LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA  
DE *Atlantoraja platana* y *Sympterygia bonapartii*.**

**V.1: INTRODUCCIÓN**

Wourms (1977) estableció tres tipos de ciclos reproductivos para los Condrictios: 1) *un ciclo reproductivo continuo durante todo el año o la mayor parte del mismo*; 2) *un ciclo anual definido parcialmente, con uno o dos picos en la actividad*; 3) *un ciclo anual o bianual bien definido*.

La disposición espacial durante diferentes etapas del ciclo de vida, el interés comercial coyuntural y las características particulares de cada pesquería, hacen que no todas las poblaciones de Condrictios tengan la misma vulnerabilidad, independientemente del tipo de ciclo ( Dulvy *et. al.*, 2014; Bernasconi *et. al.*, 2014).

La vulnerabilidad de estos peces a la explotación pesquera, es explicada principalmente por las características de historia de vida particulares (crecimiento lento, madurez sexual tardía, baja fecundidad y alta longevidad), asociadas al incremento de capturas a nivel mundial, ya sea como fauna acompañante (*by-catch*) o como objetivo de pesca dirigida (Stevens *et. al.*, 2000; Colonello *et. al.*, 2002; García *et. al.*, 2008; Dulvy *et. al.*, 2014; Awruch *et. al.*, 2015).

En este sentido la inferencia de los ciclos reproductivos, a partir de indicadores indirectos de la actividad, contribuye con información necesaria, para lograr implementar medidas de manejo que permitan evitar superponer

áreas sensibles, espaciales y/o temporales de las especies, a la actividad extractiva de las flotas pesqueras.

En función de esto, se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Analizar características relacionadas al ciclo reproductivo de ambas especies a partir del uso de indicadores indirectos.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos con los estudios realizados por Coller (2012) y Estalles (2012) para *A. platana* y *S. bonapartii* respectivamente, sobre ejemplares muestreados en los años 2004-2006 en el área del golfo San Matías.

## **V.2: MATERIALES Y MÉTODOS**

Para realizar este estudio se consideraron las siguientes variables:

**Hembras:** peso total, peso del hígado, peso de los ovarios derecho e izquierdo, peso de las glándulas oviductales derecha e izquierda, número y diámetro de los folículos de ambos ovarios y presencia de cápsulas.

**Machos:** peso total, peso del hígado, peso de los testículos derecho e izquierdo, largo de los claspers derecho e izquierdo.

Se analizó la simetría de los órganos reproductivos, mediante un test “t” de Student para muestras pareadas, considerando como hipótesis nula la no existencia de diferencias laterales.

Para el estudio del ciclo anual se empleó el Análisis de la Varianza (ANOVA). En caso de hallarse diferencias, se aplicaron comparaciones *post hoc*, Test de Tuckey o Test LSD de Fisher

Los índices gonadosomático (IGS) o hepatosomáticos (IHS), se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\text{IGS} = (\text{Peso gónada/Peso total}) * 100$$

$$\text{IHS} = (\text{Peso hígado/Peso total}) * 100$$

La talla de primera madurez sexual ( $LT_{50}$ ), se estimó, para cada sexo y especie, ajustando una curva logística mediante una aproximación de máxima verosimilitud (Aubone, 2002).

### **V.3: RESULTADOS**

#### **V.3.1 INDICADORES REPRODUCTIVOS**

##### **V.3.1.1 *Atlantoraja platana***

Los resultados correspondientes al análisis de la distribución anual del diámetro folicular, fueron tratados en el capítulo III en la sección de ovario.

##### **Hembras**

La talla máxima registrada ( $n = 125$ ) fue de 88 cm. La talla de primera madurez estimada ( $LT_{50}$ ) fue de 70,48 cm (80,1 % de la talla máxima registrada (Fig. V.1)

Ambos ovarios (n=120) fueron funcionales y no presentaron asimetría lateral (*t* de Student  $p>0.05$ ). El peso promedio de los ovarios de hembras maduras, entre las estaciones del año, no mostró diferencias (ANOVA,  $p>0.05$ ), como así tampoco tuvieron diferencias estacionales los ovarios de hembras, con o sin cápsulas en el útero (ANOVA,  $p>0.05$ )

El peso de las glándulas oviductales no presentó asimetría lateral (*t* de Student  $p>0.05$ ). Se encontraron diferencias en el peso promedio de las glándulas oviductales, en hembras maduras, entre estaciones del año (ANOVA,  $p<0.05$ ). Se aplicó una comparación *post hoc*, test de Tuckey ( $p<0.05$ ), resultando que dichas diferencias se producen entre Primavera-Otoño y Verano.

No se encontraron diferencias en los valores del IGS y de IHS a lo largo de las estaciones del año (ANOVA,  $p>0.05$ ) (Figs. V.2 y V.3).

### **Machos**

La talla máxima registrada para machos (n=104) fue de 77 cm. La talla de primera madurez estimada ( $LT_{50}$ ) fue de 60,17 cm (78,1% de la talla máxima registrada. (Fig. V.4).

Ambos testículos fueron funcionales (n = 90) y presentaron asimetría en los ejemplares maduros (*t* de Student  $p< 0,001$ ). El estudio de Análisis de la Varianza para el peso de los testículos derecho e izquierdo, en todos los estadios, demostró dicha diferencia (ANOVA,  $p<0.05$ ). En la Fig.V.5 se muestra la distribución de la diferencia de pesos entre testículo derecho e izquierdo.



Los machos maduros (n = 39) presentaron hasta 3 hileras de espinas alares y los en maduración (n = 7), hasta dos hileras. Los ejemplares inmaduros (n = 18) no presentaron hileras de espinas (Fig. V.6).

No se detectaron diferencias significativas en los valores del IGS a lo largo de las estaciones del año (ANOVA,  $p > 0.05$ , (Fig. V.7)

Se encontraron diferencias significativas en el IHS (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Se aplicó una comparación *post hoc*, test LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ), resultando que dichas diferencias se producen entre Invierno y Verano (Fig. V.8).

### **V.3.1.2 *Sympterygia bonapartii***

#### **Hembras**

La talla máxima registrada (n = 70) fue de 72 cm. La talla de primera madurez estimada ( $LT_{50}$ ) fue de 55,98 cm (77,6 % de la talla máxima registrada) (Fig. V.9).

Ambos ovarios (n=67) fueron funcionales y no presentaron asimetría lateral (*t* de Student  $p > 0.05$ ). El peso promedio de los ovarios de hembras maduras, entre las estaciones del año, mostró diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Se aplicó una comparación *post hoc*, test de Tuckey ( $p < 0.05$ ), resultando que dichas diferencias se producen entre Otoño y Primavera.

El peso de las glándulas oviductales fue registrado solo en un número pequeño de ejemplares, por lo tanto no se realizó el análisis específico.

El IGS de las hembras maduras mostró diferencias significativas (ANOVA  $p < 0.05$ ) (Fig. V.10). Se aplicó una comparación *post hoc*, test de Tuckey ( $p < 0.05$ ), resultando que dichas diferencias se corresponden con los valores de Primavera. No se encontraron diferencias en los valores IHS a lo largo de las estaciones del año (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (Fig.V.11).

### **Machos**

La talla máxima registrada para machos ( $n = 31$ ) fue 67 cm. La talla de primera madurez estimada ( $LT_{50}$ ) fue de 52,45 cm (78,3% de la talla máxima registrada), (Fig. V.12).

Ambos testículos ( $n = 22$ ) fueron funcionales y no presentaron asimetría (*t* de Student  $p < 0.05$ ).

Se detectaron diferencias significativas en los valores del IGS a lo largo de las estaciones (ANOVA  $p < 0.05$ ) (Fig.V.12). Se aplicó una comparación *post hoc*, test de Tuckey ( $p < 0.05$ ), resultando que dichas diferencias separan la Primavera del Otoño. No se encontraron diferencias en los valores IHS a lo largo de las estaciones del año (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (Fig.V.13).

#### **V.4 DISCUSIÓN**

La historia de vida de los Condrictios, se caracteriza por un crecimiento lento, una edad tardía de madurez sexual, gran longevidad y baja fecundidad (Stevens *et. al.*, 2000). Estas características, sumadas al impacto humano (Myers y Worm, 2005), lleva a que el conocimiento de los indicadores biológicos de las especies sea fundamental a la hora de evaluar estrategias de protección del recurso.

Normalmente, los Rájidos tienen ovarios funcionales y simétricos y las especies aquí estudiadas siguen ese patrón coincidiendo con lo hallado por Coller (2012) y Estalles (2012). En *Atlantoraja platana*, no se hallaron diferencias estacionales en el peso del ovario, lo cual pareciera tener relación con el ciclo anual de la especie (Coller, 2012). Por su parte, en *Sympterygia bonapartii*, se detectaron diferencias entre Otoño y Primavera y este valor no puede interpretarse fuera del contexto del IGS. Los resultados de Estalles (2012), para la población del golfo San Matías y de Díaz Andrade (2011), para la del Estuario de Bahía Blanca, son coincidentes, con un valor mayor del índice gonadosómico en la Primavera, estación que Estalles (2012), propuso como época de apareamiento en el golfo San Matías.

La glándula oviductal está totalmente asociada a la producción de las ootecas y su estudio morfométrico puede ser abordado, a través del peso o del ancho máximo. Este trabajo muestra que las glándulas de *A. platana* son simétricas y alcanzan sus valores máximos, en primavera. Coller (2012), abordó el estudio, a través del análisis del ancho de la glándula oviductal. Los

resultados obtenidos en esta tesis no pueden compararse directamente y por lo tanto, se presentan de forma informativa.

Los testículos de los Rájididos se presentan pares, aplanados dorsoventralmente y simétricos. Coller (2012), describió estas características, sin embargo en los estudios realizados para esta tesis, se observó que los machos de *A. platana* presentaba un ligero grado de asimetría. Existen referencias de otras especies donde se aprecia esto, *Myliobatis goodei* (Settembrino, 2013). La causa de este fenómeno no es clara ni tiene, aparentemente, un valor adaptativo. Ciertamente, no afecta la funcionalidad del macho. Se requieren estudios dirigidos al tema, para tratar de dilucidar este comportamiento. *S. bonapartii* por su lado, no presenta ninguna asimetría testicular ni diferencias anuales en el peso.

En los machos de los elasmobranquios, un incremento abrupto en la longitud de los claspers y el peso de los testículos, son los criterios más utilizados para la determinación de la madurez sexual (Conrath y Musick, 2002; Oddone y Vooren, 2005; Ebert, 2005). Otro carácter utilizado para ello, es el número de hileras de espinas alares (Mabragaña *et. al.*, 2002; Oddone y Vooren, 2005; Oddone *et. al.*, 2007). Estas espinas son un carácter sexual dimórfico secundario y son utilizadas para sostener a la hembra en el momento de la cópula (Luer y Gilbert, 1985). En *A. platana*, estas hileras de espinas, aparecen con el inicio del proceso madurativo y alcanzan su máximo número en la madurez (Coller, 2012).

En esta especie puede considerarse que los machos adultos presentan, al menos, cinco hileras de espinas alares y esto coincide con lo observado para la misma especie en la costa de Brasil (Oddone *et. al.*, 2007; Oddone y Amorin, 2008). Todos los machos adultos con al menos entre 3 y 5 hileras de espinas alares, tenían testículos con cistos maduros y esperma en los epidídimos y conductos deferentes.

El uso de los índices gonadosómicos y hepatosomáticos se ha difundido en el estudio de la biología reproductiva de los peces óseos (Wilk *et. al.*, 1990; Jons y Miranda, 1997) y de los Condrictios (Di Giácomo y Perier, 1994; Conrath, 2004) para definir estacionalidad de ciclos.

Los IGS de las hembras de ambas especies no presentaron diferencias con los registrados por Coller (2012) y Estalles (2012), para las especies en estudio y son similares a los obtenidos en otros Rájidos (Oddone *et. al.*, 2008; Colonello, 2009). Se planteó la posibilidad que la cópula tenga lugar dos veces al año y que durante el resto del año, las hembras fecunden sus ovocitos con el esperma almacenado en la glándula oviductal. La información recabada en este trabajo, no avala esta proposición. El esperma hallado en las glándulas oviductales, sería en "transito" y no parte de una reserva.

En los machos, la variación estacional del peso de los testículos (IGS), es el método más utilizado para analizar la condición reproductiva y definir la estacionalidad (Pearsons y Grier, 1992). Esta técnica no siempre provee información sobre la estacionalidad reproductiva (Maruska *et. al.*, 1996; Sulikowski, 2005). La falta de variación de este índice, conjuntamente con la

presencia de espermatozoides maduros en los testículos y presencia de espermatozoides en el epidídimo y conducto deferente de *A. platana* a lo largo de las cuatro estaciones muestreadas, determina que la especie puede reproducirse todo el año, al igual que lo reportado en *R. agassizi* y *A. castelnavi* (Collonello, 2009). Coller (2012), no encontró variación en este índice para la misma especie con diez años de diferencia entre muestreos. En *S. bonapartii*, en cambio se encontró variación en este índice a lo largo de las estaciones, al igual que lo reportado por Estalles (2012). Se registraron dos picos de máxima actividad en las estaciones de Verano y Otoño, esto coincide con los hallazgos realizados en el análisis de cobertura microscópica del testículo, donde en los mismos meses presentaba mayor porcentaje de cistos con espermatozoides (estadio V). Sin embargo, debemos tener en cuenta que en los machos, los máximos valores en el IGS no siempre se corresponden con la época de apareamiento debido al tiempo que le lleva al espermatozoides madurar en los conductos genitales, luego de la espermiación, (Conrath, 2005) (véase Cap. IV: testículo).

La falta de variación estacional en el peso del hígado en las hembras de ambas especies en estudio, se podría corresponder con los costos energéticos vinculados a la producción continua de ovocitos. El hígado es el principal órgano productor de vitelogenina, fosfoproteína precursora de vitelo (Hamlett y Koob, 1999; Koob y Callard, 1999). El continuo crecimiento de los ovocitos durante el ciclo ovárico, implica una síntesis constante de vitelogenina. Este evento, además, se vio reflejado en los análisis histológicos

de ovario de *A. platana*, en donde podían observarse precursores de vitelo en forma de gránulos, en el epitelio folicular (véase Cap. III: ovario).

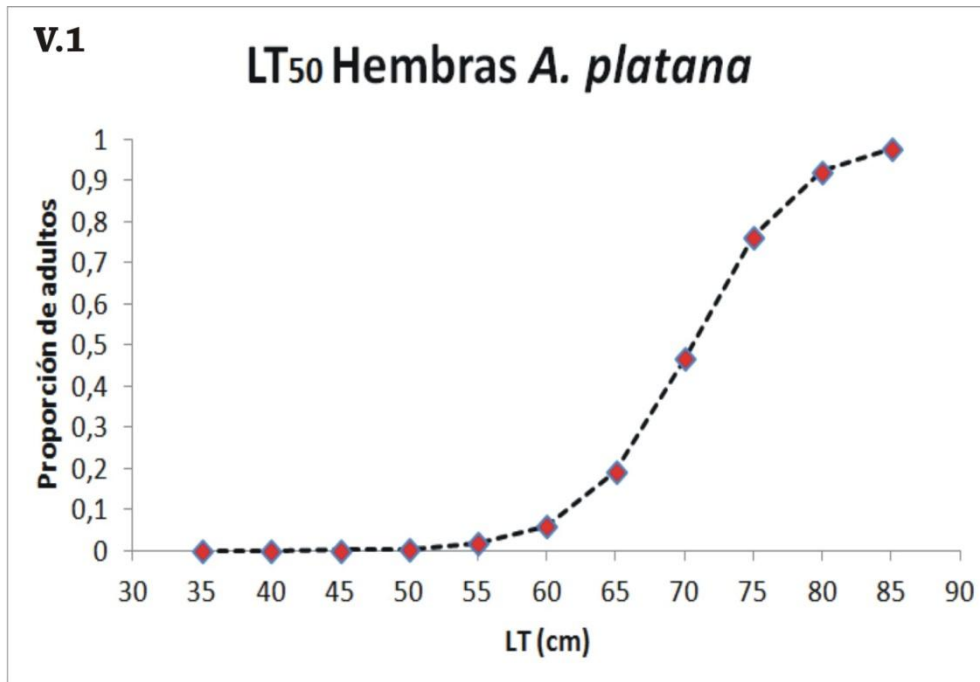
Muchas especies de Condrictios muestran cambios estacionales en la condición energética del hígado (Rossouw, 1987; Hoffmayer *et. al.*, 2006), asociado con la intensidad y composición de la alimentación, migración y época reproductiva. La variación registrada en el IHS de los machos de *A. platana*, podría deberse a alguna de estas variables.

Holden (1974) sugirió que los elasmobranquios maduran a una talla que representa entre un 60 y 90 % de su máximo LT observado. Aparentemente en los Rájidos, la madurez sexual se da cuando alcanzan aproximadamente un 70% o más, de su LT máxima, como lo ocurrido en las dos especies en estudio y en otras especies como *S. acuta* (Díaz Andrade, 2010); *P. extenta* (Braccini y Chiaromonte, 2002); *P. rudis* y *P. normani* (Mabragaña y Cousseau, 2004); *P. bergi* (San Martin *et. al.*, 2005) y *B. albomaculata* (Ruocco, *et. al.*, 2006); *A. castelnaui* y *A. cyclophora* (Oddone *et. al.*, 2008) y *R. agassizi* (Colonello, 2009);;. En principio, esto sería un buen parámetro para tener en cuenta en aquellas especies de Rájidos de las que aún se desconoce su  $LT_{50}$ , como un parámetro a usar en la implementación de las medidas de manejo para la especie. Además, ha sido utilizado para manifestar el grado de vulnerabilidad de los elasmobranquios a la explotación pesquera. Las  $LT_{50}$  aquí registradas, no difieren de las reportadas por Coller (2012) y Estalles (2012,) para ambas especies en el golfo, con diez años de diferencia entre muestreos. Por lo tanto, se puede inferir que el esfuerzo pesquero ejercido en ese lapso no habría afectado la talla de primera madurez.;

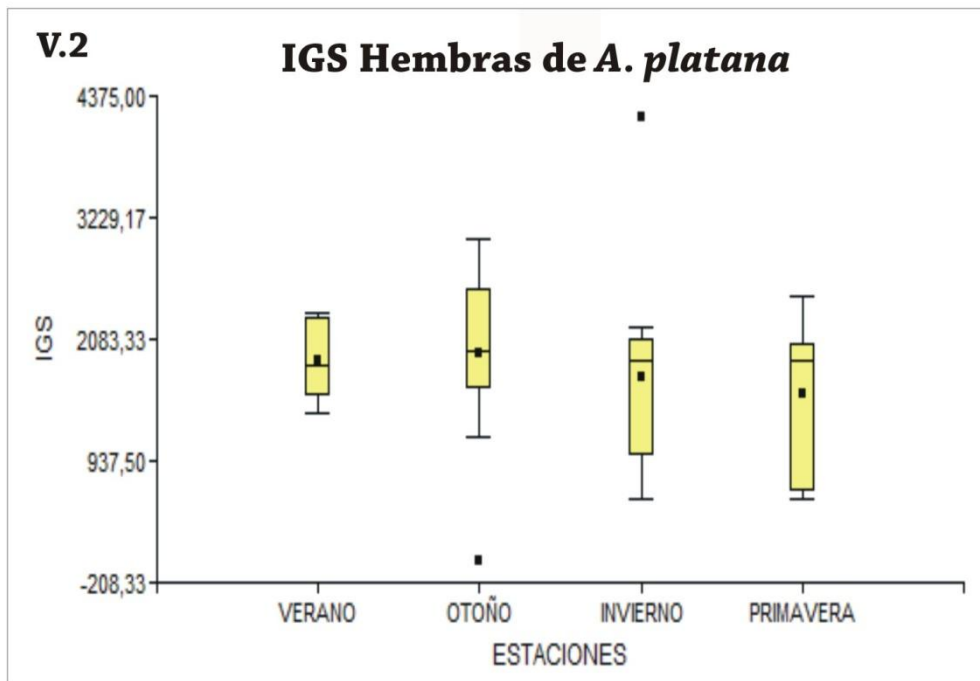
*S. bonapartii* es la única especie de Rájido del golfo San Matías que presenta un ciclo reproductivo estacional (Estalles 2012; Díaz Andrade, 2010). Los estudios realizados en *A. platana* (Coller, 2012), muestra que la especie presentan un ciclo anual, con una o dos estaciones de mayor actividad. Esto sugiere que adaptar el ciclo reproductivo a períodos anuales, con o sin estacionalidad, es más una estrategia reproductiva de la especie independientemente del área en el que se reproduzcan.



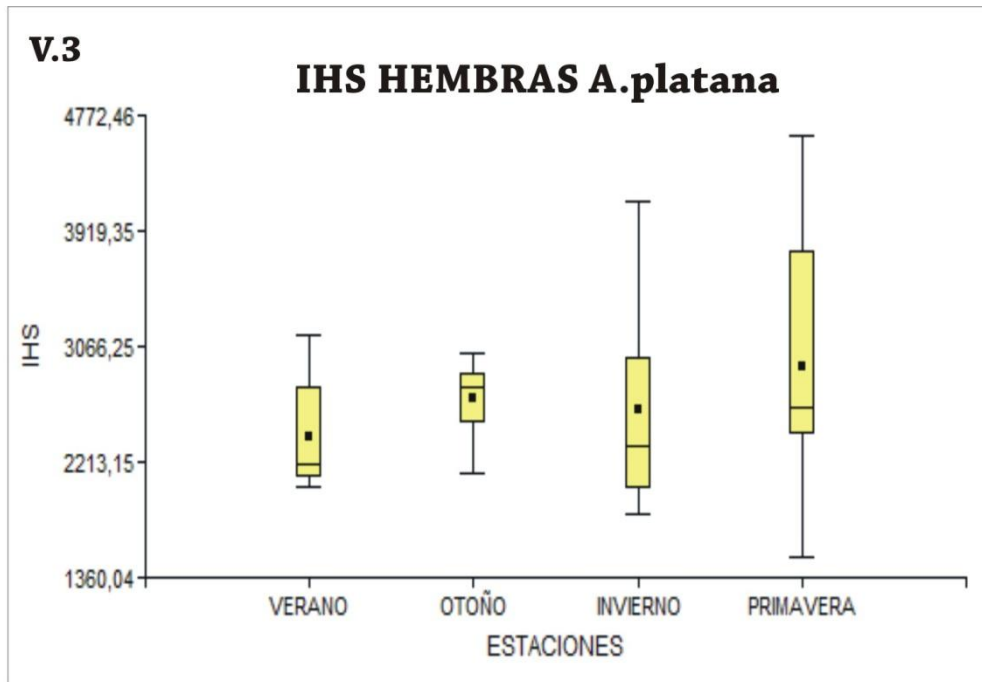
# Láminas



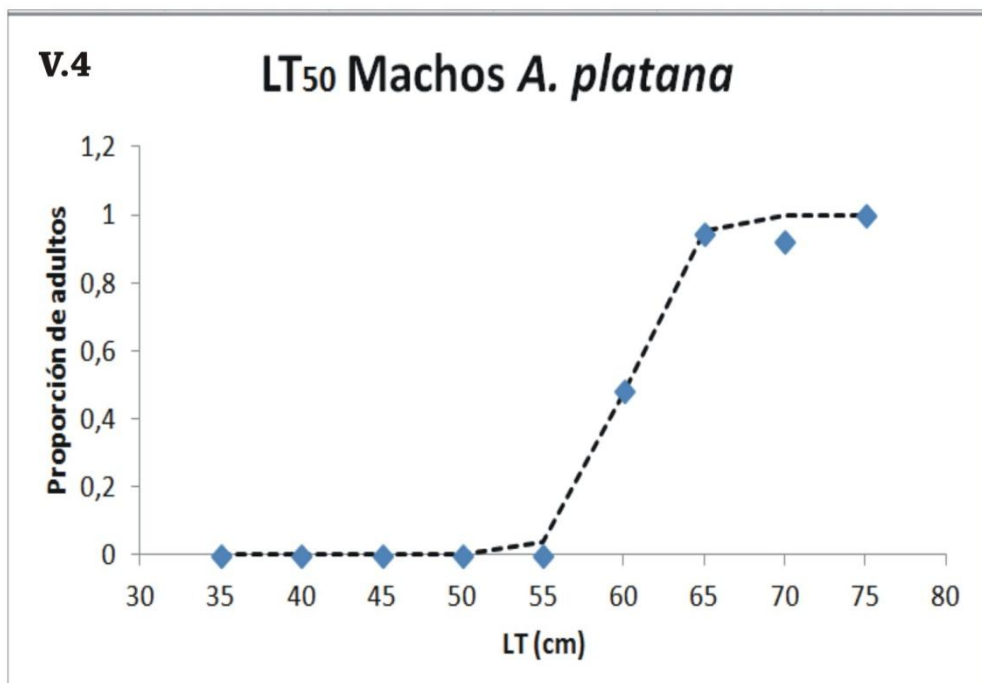
**Fig. V.1:** Talla de primera madurez sexual en hembras de *A. platana*.



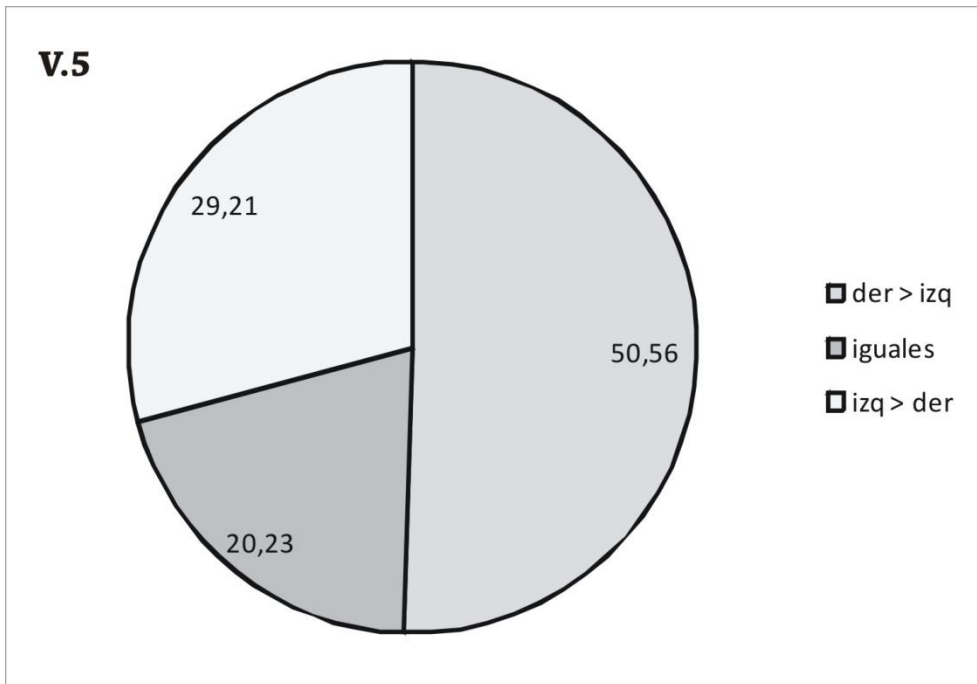
**Fig. V.2:** Distribución estacional del índice gonadosomático (IGS) en hembras maduras de *A. platana*.



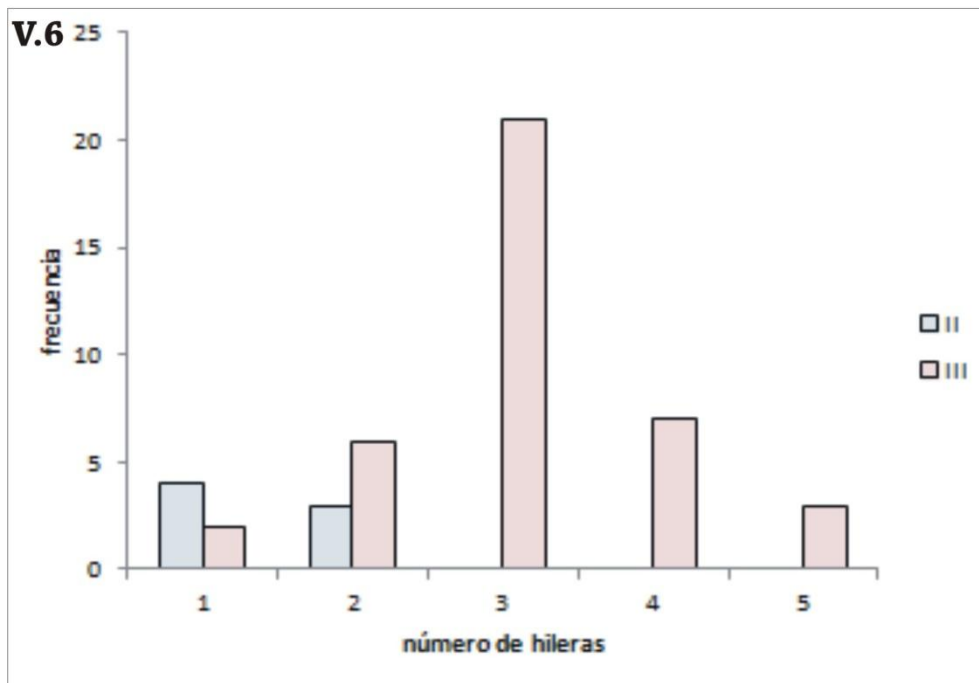
**Fig. V.3:** Distribución estacional del índice hepatosomático (IHS) en hembras maduras de *A. platana*.



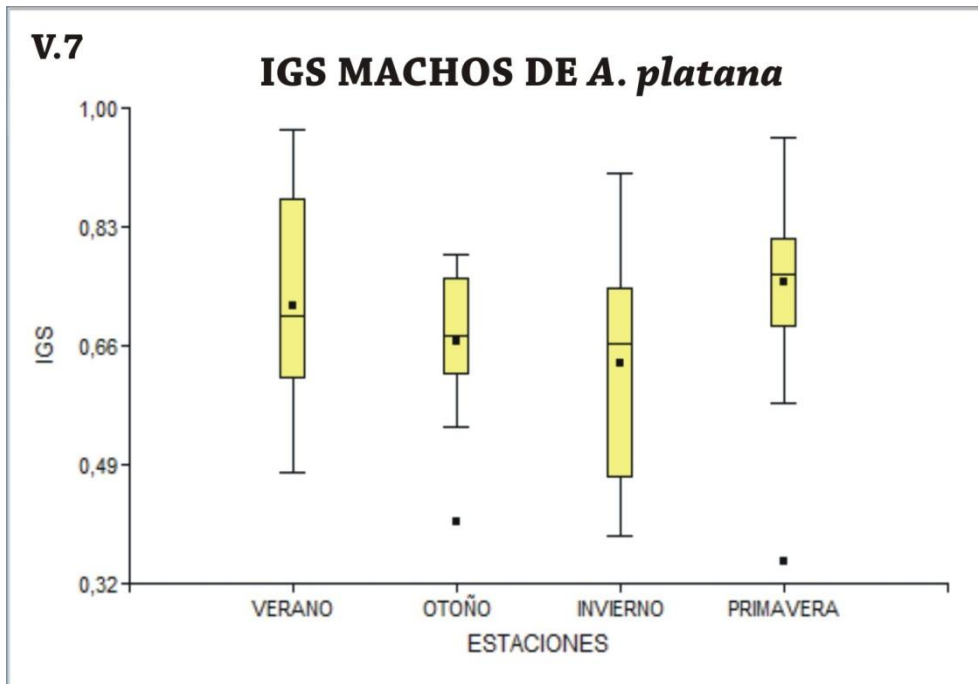
**Fig. V.4:** Talla de primera madurez sexual en machos de *A. platana*.



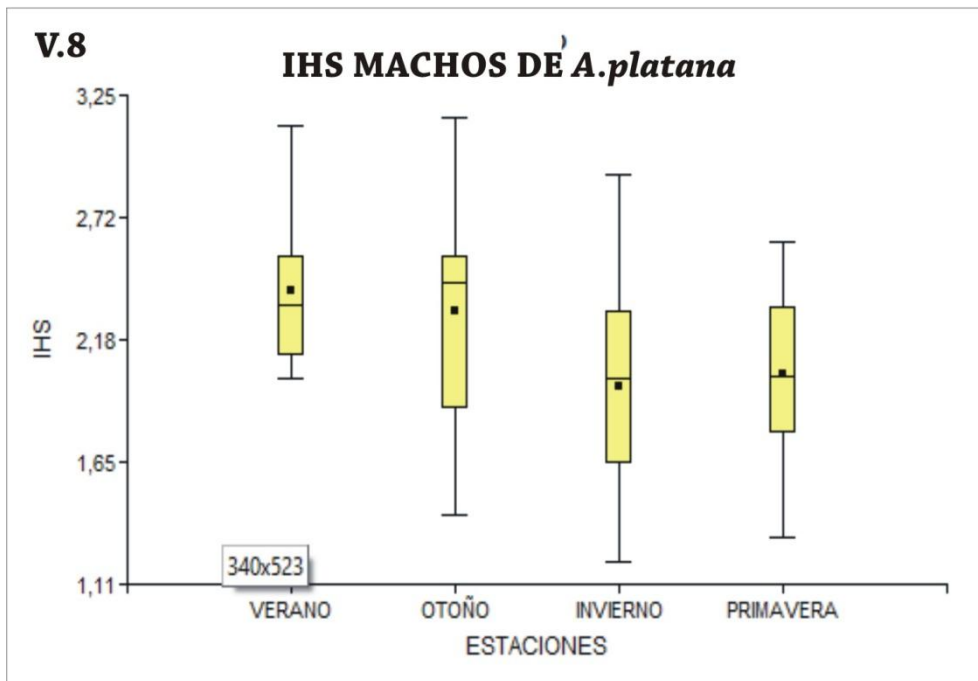
**Fig. V.5:** Distribución de la diferencia de pesos entre testículo derecho e izquierdo en machos de *A. platana*.



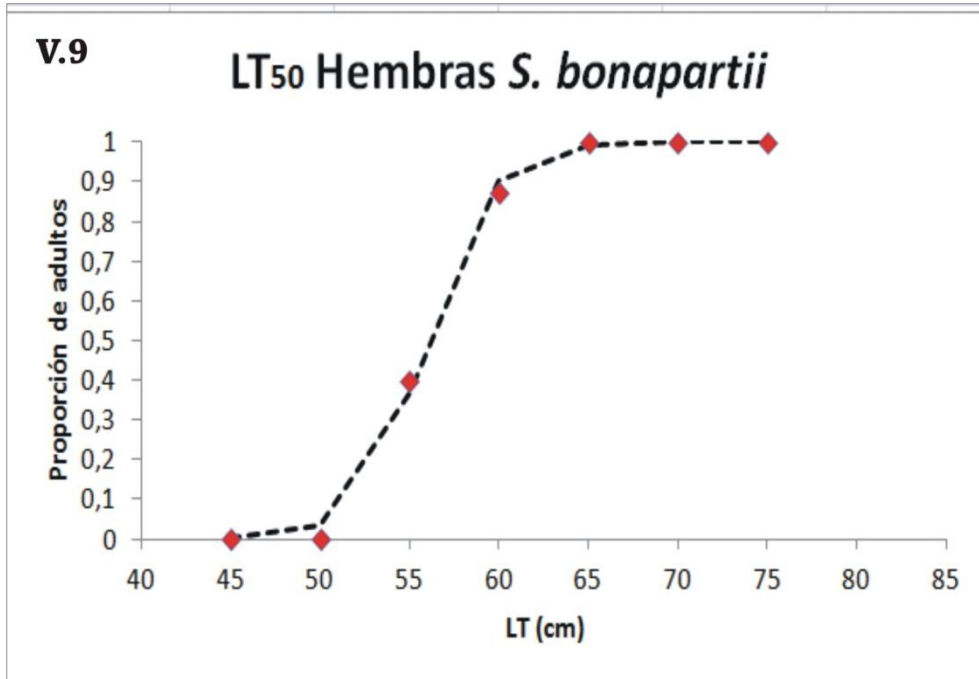
**Fig. V.6:** Frecuencia del número de hileras de espinas alares en machos en maduración y maduros de *A. platana*.



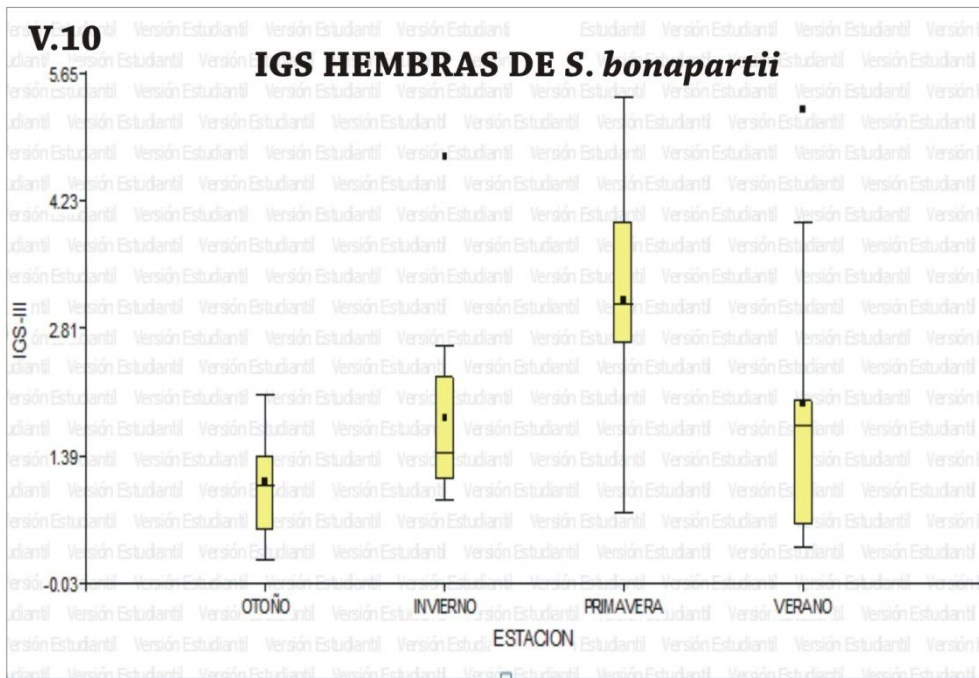
**Fig. V.7:** Distribución estacional del índice gonadosomático (IGS) en machos maduros de *A. platana*.



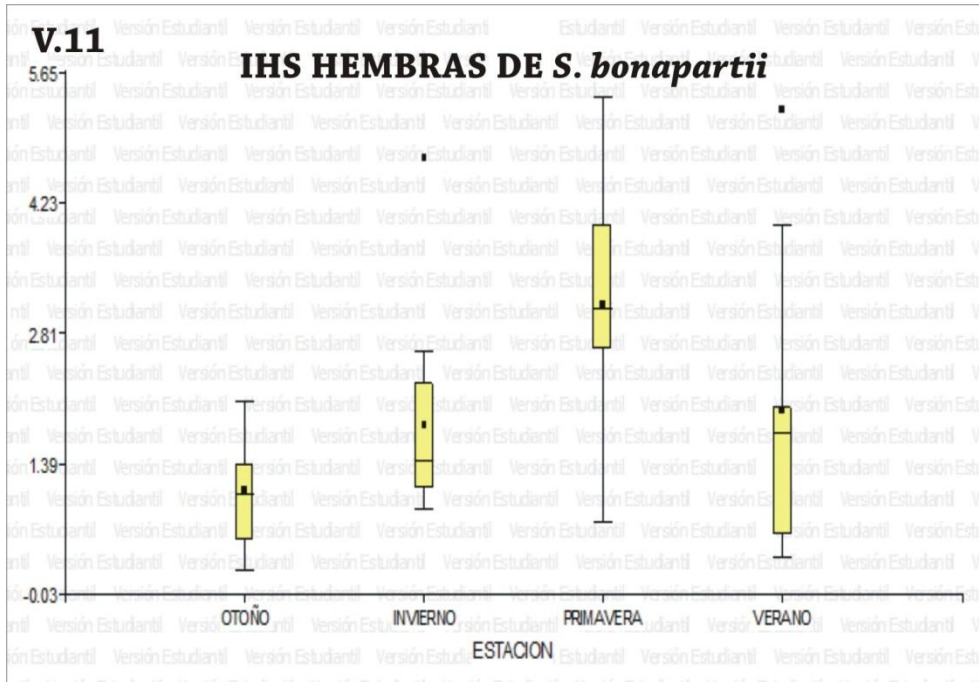
**Fig. V.8:** Distribución estacional del índice hepatosomático (IHS) en machos maduros de *A. platana*.



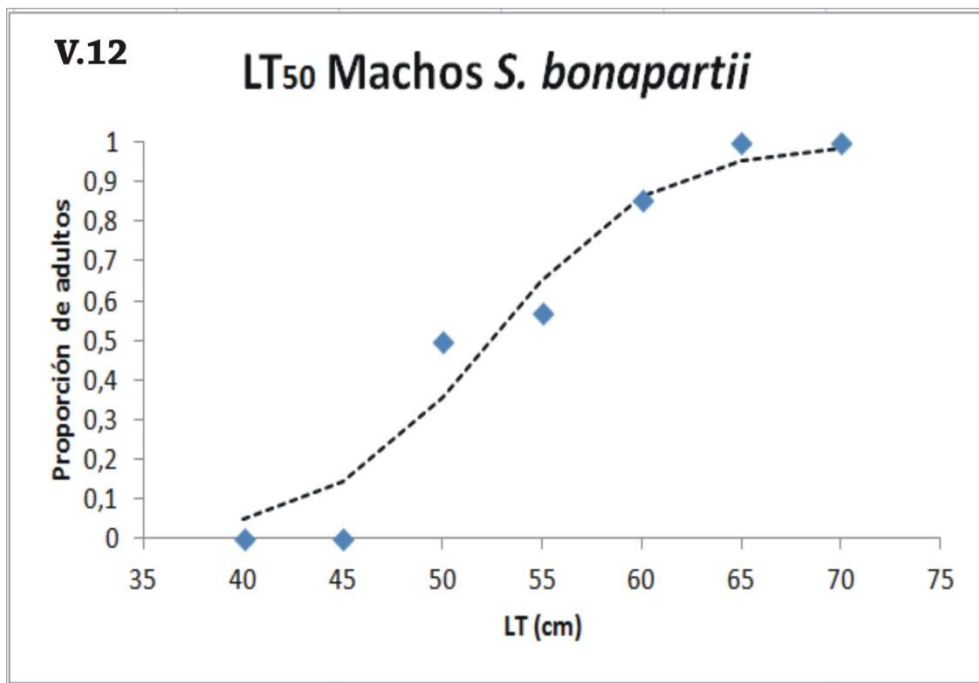
**Fig. V.9:** Talla de primera madurez sexual en hembras de *S. bonapartii*.



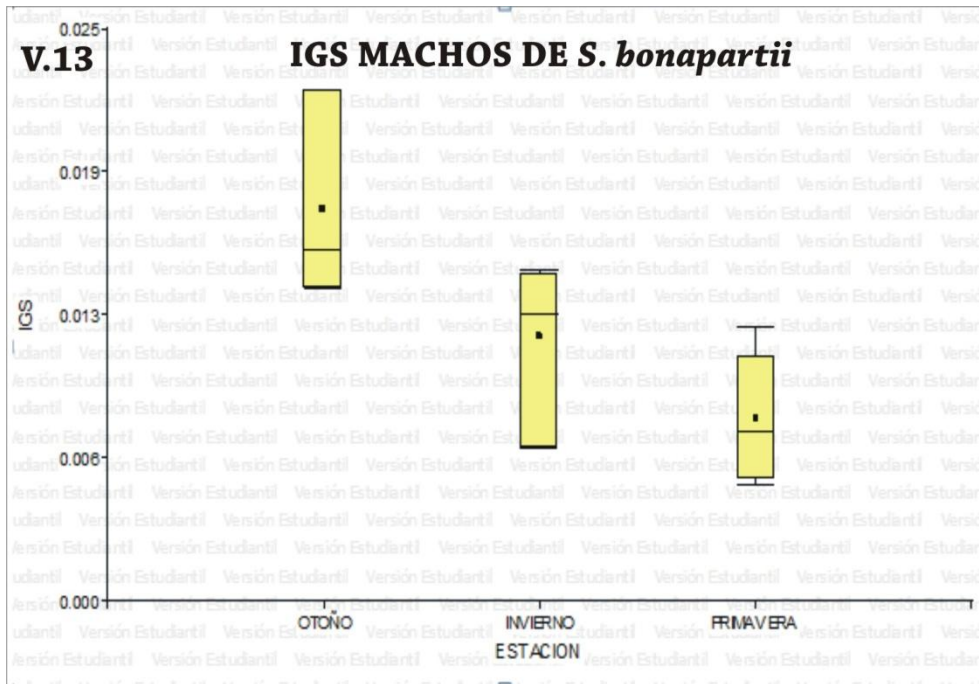
**Fig. V.10:** Distribución estacional del índice gonadosomático (IGS) en hembras maduras de *S. bonapartii*.



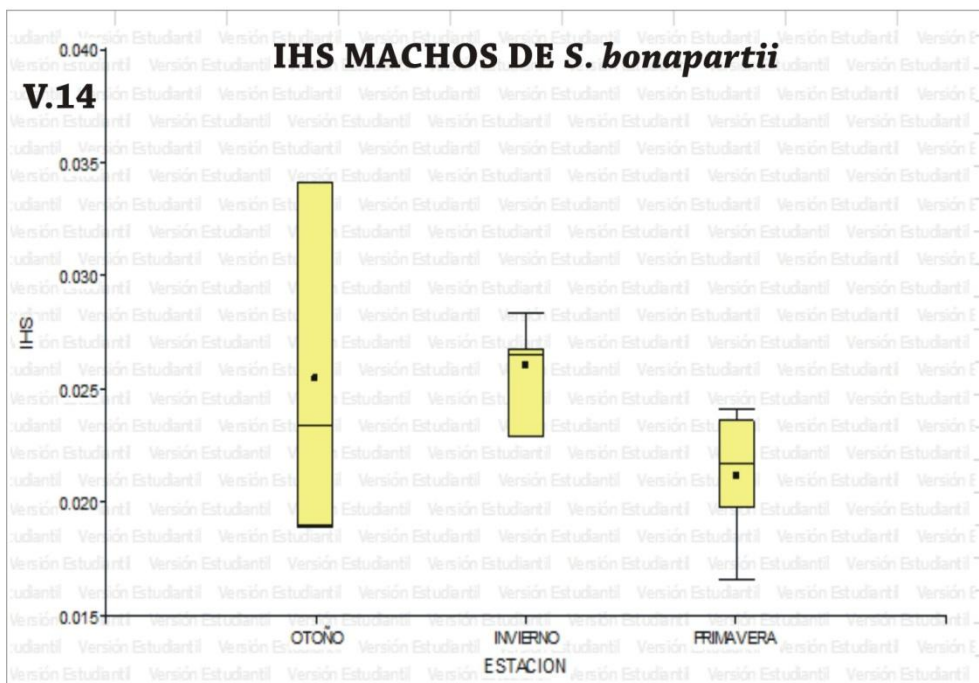
**Fig. V.11:** Distribución estacional del índice hepatosomático (IHS) en hembras maduras de *S. bonapartii*.



**Fig. V.12:** Talla de primera madurez sexual en machos de *S. bonapartii*.



**Fig. V.13:** Distribución estacional del índice gonadosomático (IGS) en machos maduros de *S. bonapartii*.



**Fig. V.14:** Distribución estacional del índice hepatosomático (IHS) en machos maduros de *S. bonapartii*.





## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Las observaciones histológicas corroboran la clasificación de los estadios de madurez realizados macroscópicamente.
- ✓ Los ovarios y los testículos de ambas especies están íntimamente relacionados con el órgano epigonal. La relación entre estas dos estructuras, varía según el grado de madurez de la gónada.
- ✓ La morfología general del sistema reproductor de *A. platana* y *S. bonapartii* concuerda con lo observado para la mayoría de los rájidos.
- ✓ El ovario de *A. platana* presenta folículos de varios tamaños, cuerpos atrésicos y cuerpos lúteos embebidos en una matriz conectiva. La organización del parénquima ovárico no muestra ninguna segregación en corteza y médula.
- ✓ El ovario está tapizado por un epitelio cilíndrico simple. Los pliegues del epitelio sumado a las características de la túnica albugínea, serían adaptaciones al gran incremento de tamaño que sufren los folículos.
- ✓ En *A. platana* las ovogonias se encontraron en escasa cantidad, aisladas y sólo en ejemplares inmaduros al igual que en *Zearaja chilensis* y presencia en etapas tempranas del desarrollo, podrían asociarse a una menor capacidad reproductiva.
- ✓ Los folículos de *A. platana* están conformados por el ovocito, un epitelio folicular, asociado a su lámina basal y un revestimiento tecal. Los folículos primordiales y en desarrollo de *A. platana*, presentaron cuerpos de Balbiani, los cuales están asociados a la biosíntesis de

proteínas y serían claves para la actividad *metabólica* que precede a la acumulación de vitelo.

- ✓ El epitelio folicular comienza como una capa simple y a medida que avanza el proceso de foliculogénesis se estratifica para finalmente terminar en una monocapa en folículos "a término".
- ✓ En *A. platana* se distinguieron dos tipos celulares en el epitelio folicular al igual que en *S. bonapartii* y *S. acuta*.
- ✓ La presencia de gránulos Sudan B positivos en los espacios intercelulares y en el interior de las células de la granulosa, durante la vitelogénesis de *A. platana*, indicaría que los precursores vitelínicos serían transportados a través de la granulosa.
- ✓ La disposición de la zona pelúcida, comienza a observarse en los folículos primordiales.
- ✓ El grosor de la zona pelúcida, mostró un marcado incremento durante la etapa previtelogénica y un posterior adelgazamiento durante la vitelogénesis, debido, probablemente en parte, a un aumento en el diámetro folicular.
- ✓ La zona pelúcida de *A. platana*, presenta glucoproteínas ácidas y neutras al igual que en *S. acuta* y *S. bonapartii*. La diferenciación de las tecas en una capa interna y una externa, es semejante a la observada en otras especies de Rajiformes.
- ✓ La vascularización creciente de la teca interna, incrementaría el flujo de nutrientes hacia el ovocito.
- ✓ La teca externa presentaría características de naturaleza glandular.

- ✓ La presencia de cuerpos lúteos en una especie ovípara como *A. platana*, corrobora que estas estructuras no estarían necesariamente asociada a condiciones de gestación.
- ✓ Se observaron cuerpos atrésicos en hembras de *A. platana* de todos los estadios de madurez sexual. Esto podría considerarse como un mecanismo regulador adaptativo para las condiciones ambientales que prevalecen en la temporada reproductiva.
- ✓ Las tallas foliculares máximas registradas fueron de 44 mm de 27,5 mm de diámetro para *A. platana* y *S. bonapartii*, respectivamente.
- ✓ Se registra por primera vez la talla microscópica promedio de inicio de vitelogénesis de *A. platana*, la cual fue de 2 mm.
- ✓ En *A. platana*, el diámetro del folículo más pequeño con indicios de vitelación midió 0,8 mm.
- ✓ La talla promedio microscópica de inicio de vitelogénesis para *S. bonapartii* del golfo San Matías fue de 1,58 mm, siendo cercana a la registrada por Díaz Andrade (2010) para la misma especie en el estuario de Bahía Blanca.
- ✓ Los oviductos anteriores son órganos pares, tapizados por un epitelio cilíndrico simple con dos tipos celulares. La cilias presentes en la región apical de estas células contribuiría al movimiento del ovocito hacia la glándula oviductal.
- ✓ El diseño funcional de la glándula oviductal, concuerda con el esquema general observado en la mayoría de los peces cartilaginosos, reconociéndose en hembras maduras, cuatro zonas.

- ✓ Las ciliias presentes en el epitelio superficial de la glándula oviductal, en combinación con las secreciones mucosas, conducirían al huevo en sentido anteroposterior.
- ✓ La complejidad de las zonas *Club* y *Papillary* en las glándulas oviductales de hembras maduras, sumado a la abundante secreción gelatinosa observada en el interior de las cápsulas, concuerda con la función secretora de estas zonas.
- ✓ En *A. platana* la zona *Baffle* ocupa la mayor proporción de la glándula y es similar a la de otras especies ovíparas.
- ✓ Los gránulos de secreción observados en el interior del citoplasma de las células de la zona *Baffle*, son característicos de células especializadas en secreciones proteicas.
- ✓ La zona terminal es responsable de la formación de los cuernos y proyecciones que ornamentan la cápsula.
- ✓ En *A. platana*, la disposición de los acinos serosos, mucosos y mixtos en la región terminal, es similar a la observada en *R. clavata*.
- ✓ Los depósitos de material rojizo-marrón encontrados en el lumen de la zona *Baffle* y zona *Terminal* en hembras con cápsulas en formación, podrían corresponder a secreciones para la formación de la futura cápsula.
- ✓ Los resultados muestran, que la secreción de la cápsula comienza con los cuernos posteriores y continúa en forma anterógrada.
- ✓ En *A. platana* las cápsulas estuvieron presentes durante todo el año y en diferentes etapas de desarrollo.

- ✓ En *A. platana* y *S. bonapartii*, se registró la presencia de esperma en los pliegues del epitelio y en el interior de los túbulos de la región *baffle*, respectivamente. Este esperma estaría en tránsito como resultado de un apareamiento reciente y no representaría una “reserva espermática”.
- ✓ Se registró esperma en los *frotis* de las cloacas de ambas especies, esto correspondería a esperma post-cópula.
- ✓ En ambas especies, los testículos se presentaron como órganos pares, funcionales, elongados y levemente comprimidos dorsoventralmente.
- ✓ En ambas especies, las observaciones microscópicas mostraron que la relación órgano epigonal/tejido testicular disminuyó gradual y considerablemente con la maduración sexual.
- ✓ El testículo de *ambas especies* es de tipo cístico y corresponde al modelo “compuesto”.
- ✓ En los ejemplares adultos, de ambas especies, se describen 7 estadios de desarrollo espermatogénico.
- ✓ La espermatogénesis en *A. platana* y *S. bonapartii* es similar a la estudiada en otras especies de batoideos.
- ✓ En ambas especies, las etapas sucesivas de la espermatogénesis se organizan en un estricto orden temporal y espacial, manifestándose una clara zonación.
- ✓ Los cistos o espermatocistos constituyen la unidad funcional y estructural del testículo y en su interior se encuentran células de Sertoli y células germinales, sincronizadas en la misma etapa de desarrollo.

- ✓ En ambas especies en estudio, existe una zona germinal en la superficie dorsal de cada lóbulo. Esta zona se registró en ejemplares inmaduros, en maduración y maduros.
- ✓ En los ejemplares inmaduros sólo se observan cistos con espermatogonias y espermatoцитos primarios.
- ✓ Los ejemplares juveniles no presentan cistos con espermátides maduras ni espermatozoides.
- ✓ En ejemplares inmaduros, juveniles y maduros se observa una zona de degeneración.
- ✓ Cada célula de Sertoli se relaciona con un clon de células germinales, que se desarrollan sincrónicamente.
- ✓ Durante el desarrollo de la espermatogénesis, en ambas especies en estudio, las células de Sertoli se observaron durante las primeras etapas, orientadas hacia el lumen de los cistos. Luego, en el inicio de la meiosis, su ubicación modificó, ubicándose en la periferia. Las células de Sertoli mantuvieron esta posición, hasta la finalización de la espermiogénesis.
- ✓ En el espacio intersticial del testículo se observaron células con características similares a las de Leydig, más pequeñas y escasas que en mamíferos.
- ✓ En *A. platana*, el porcentaje de cobertura de los diferentes estadios cuantificados en los lóbulos del testículo, se mantuvieron constantes a lo largo de las cuatro estaciones, de lo cual se infiere una producción continua de espermatozoides.
- ✓ Si bien en *S. bonapartii* estuvieron representados todos los estadios espermatogénicos a lo largo del año, los meses de verano y otoño

mostraron un mayor porcentaje de cobertura para el estadio V. Esto sugiere una producción continua de espermatozoides con dos picos estacionales.

- ✓ El porcentaje de cobertura de la zona de degeneración en *A. platana*, se mantuvo constante a lo largo de las cuatro estaciones. En *S. bonapartii* fue mayor en invierno, lo que sugiere que la producción de cistos ya fue liberada a los conductos y coincide con la época de apareamiento en el golfo.
- ✓ El sistema de conductos genitales masculinos y glándulas anexas de ambas especies, se dispone de forma par y siguiendo el siguiente orden: conductos intratesticulares, conductos eferentes, epidídimo (parte proximal y distal), conducto deferente que se ensancha formando la vesícula seminal.
- ✓ Las glándulas de Leydig, corren paralelas al epidídimo hasta la porción media del conducto deferente.
- ✓ La porción final de los conductos genitales de los machos, se encuentra asociada al tejido renal. La mucosa que reviste el sistema de conductos masculinos de ambas especies, se encuentra tapizada por un epitelio pseudoestratificado con cilias y estereocilios.
- ✓ La carencia de una túnica muscular definida y solo células aisladas sugiere que el movimiento del semen se produce, en mayor parte, por medio de especializaciones apicales de las células.
- ✓ En *A. platana* se registró, por primera vez, la presencia de una larva L<sub>3</sub> de *Anisakis sp.* Esta fue encontrada en la cavidad corporal cercana al



órgano epigonal que está asociado a las gónadas y conductos genitales masculinos.

- ✓ Los ovarios de ambas especies, fueron funcionales y no presentaron asimetría lateral.
- ✓ Los valores de LT<sub>50</sub> obtenidos para hembras de *A. platana* y *S. bonapartii*, fueron de 70,48 cm y de 55,98 cm, respectivamente.
- ✓ Los valores de LT<sub>50</sub> obtenidos para machos de *A. platana* y *S. bonapartii*, fueron de 60,17 cm y de 52,45 cm, respectivamente.
- ✓ Las LT<sub>50</sub> registradas en este estudio, no difieren de las reportadas por
- ✓ Coller (2012) y Estalles (2012) para ambas especies en el golfo, con diez años de diferencia entre muestreos. Por lo tanto, se puede inferir que el esfuerzo pesquero ejercido en ese lapso no habría afectado la talla de primera madurez.
- ✓ La hilera de espinas alares aparecen en el inicio del proceso madurativo y alcanzan su máximo número en la madurez.
- ✓ Todos los machos adultos con al menos entre 3 y 5 hileras de espinas alares, presentaron testículos con cistos maduros y esperma en los epidídimos y conductos deferentes.

Los IGS de las hembras de ambas especies no presentaron diferencias con los registrados por Coller (2012) y Estalles (2012), para las especies en estudio y son similares a los obtenidos en otros Rájidos (Oddone et al., 2008; Colonello, 2009).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 32 (125): 571-586.
- Alonso Fernández, A.; Alós, J.; Grau, A.; Domínguez Petit, R. y Saborido Rey, F. (2011). The use of histological techniques to study the reproductive biology of the hermaphroditic mediterranean fishes *Coris julis*, *Serranus scriba* and *Diplodus annularis*. *Mar. Coast. Fish. Dyn. Manag. Eco. Sci.*, 3: 145-159.
- Álvarez, M.F.; Aragort, W.; Leiro, J.M. y Sanmartín, M.L. (2006). Macroparasites of five species of ray (genus *Raja*) on the northwest coast of Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 70: 93-100.
- Andrade, R.F.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. y Sato, Y. (2001). Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tiss. Cell.*, 33: 524-532.
- Andreuccetti, P.; Iodice, M.; Prisco, M. y Gualtieri, R. (1999). Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the elasmobranch *Raja asterias*. *Anat. Rec.*, 255:180-187.
- Aubone, A. (2002). Cálculo para el ajuste de una curva logística. Biomatemática. INIDEP:

- Awruch, C.A. (2015). Reproduction strategies. *En*: Shadwick, R.; Farrell, A. y Brauner, C. (Eds.) *Physiology of Elasmobranch Fishes: Structure and Interaction with Environment*. Vol. 34 A. Academic Press: 255-310.
- Awruch, C.A.; Pankhurst, N.W.; Frusher, S.D. y Stevens; J.D. (2009). Reproductive seasonality and embryo development in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps*. *Mar. Freshw. Res.*, 60: 1265-1272.
- Barone, M.; De Ranieri, S.; Fabiani, O.; Pirone, A. y Serena, F. (2007). Gametogenesis and maturity stages scale of *Raja asterias* Delaroche, 1809 (Chondrichthyes, Rajidae) from the South Ligurian Sea. *Hydrobiol.*, 580: 245-254.
- Benson, A.J.; McFarlane, G.A. y King, J.R. (2001). A phase "0" review of elasmobranch biology, fisheries, assessment and management. *Can. Sci. Adv. Sec. (CSAS) Res. Doc. 2001/129*. Ottawa, Canada. 69 pp.
- Bernasconi, J.F. y Navarro, G. (2014). Explotación mundial y estado de conservación de los condriictios. *DNPP. Inf. GP N° 11/2014*. 12 pp.
- Billard, R. (1990). Spermatogenesis in teleost. *En*: Lamming, G.E. (Ed.). *Marshall's physiology of reproduction, vol. 2*. Churchill Livingtone, New York: 183-212.
- Birkhead, T.R. y Moller, A.P. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive event: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol. J. Linn. Soc.*, 50: 295-311.

- Blackburn, D.G.** (2005). Evolutionary origins of viviparity in fishes. *En: Grier, H.J. y Uribe, M.C. (Eds.). Viviparous Fishes. Homestead, FL: New Life Publications: 287-301.*
- Bone, Q. y Moore, R.H.** (2008). The diversity of fishes. *En: Bone, M. y Moore, R.H. (Eds.). Biology of Fishes. Taylor and Francis group. New York. 1-30 pp.*
- Bonfil, R.** (1994). Overview of world elasmobranch fisheries. *FAO Fisheries Technical paper 341: 1-119.*
- Braccini, J.M. y Chiaramonte, G.E.** (2002). Biología de la raya *Psammobatis extenta*. *Rev. Chil. Hist. Nat., 75: 179-188.*
- Braccini, J.M.; Gillanders, B.M. y Walker, T.I.** (2006). Determining reproductive parameters for population assessments of chondrichthyan species with asynchronous oivulation and parturition: piked spurdog (*Squalus megalops*) as a case study. *Mar. Freshw. Res., 57: 105-119.*
- Bromage, N.; Porter, M. y Randall, C.** (2001). The environmental regulation of maturation in farmed fish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquacul., 197: 63-98.*
- Brusle, S., Debas L., Cauty, C.** (1989). Morphological and cytological aspects of sex inversion in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon* (Teleostei, Serranidae). *Adv. Trop. Aquacult., 9:559-562.*
- Caira, J.N.** (1990). Metazoan parasites as indicators of elasmobranch biology. *En: Pratt Jr, H.L., Gruber, S.H. y Taniuchi, T. (Eds.). Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics, and the Status of the Fisheries. NOAA Technical Report: 71-96.*

- Callard, G.V. (1991). Reproduction in male elasmobranchs fish. *En: Kinne, R; Kinne-Saffran, E y Beyenbach, K. (Eds). Oogenesis, Spermatogenesis and Reproduction. Comparative Physiology.* Karger, Basel: 104-154.
- Callard, G.V. (1996). Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. *En: Payne, A.H.; Hardy, M.P. y Russell, L.D. (Eds.). The Leydig Cell.* Cache River Press: Vienna, IL, USA: 308-331.
- Callard, I.P.; Fileti, L.A.; Perez, L.E.; Sorbera, L.A.; Giannoukos, G.; Klosterman, L.L.; Tsang, P. y McCracken, J.A. (1992). Role of the *corpus luteum* and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *Amer. Zool.*, 32: 264-275.
- Callard, I.P.; Klosterman, L.L.; Sorbera, L.A.; Fileti, L.A. y Reese, J.C. (1989). Endocrine regulation of reproduction in elasmobranch: archetype for terrestrial vertebrates. *J. Exp. Zool. Supp.* (2): 12-22.
- Camhi, M.; Fowler, S.; Musick, J.; Bräutigam, A. y Fordham, S. (1998). Sharks and their relatives: ecology and conservation. *Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission*, 20: 1-39.
- Conrath, C. (2004). Reproductive Biology. Pp: 133-164. *En: Musick, J.A. y Bonfil, R. (Eds.). Elasmobranch Fisheries Management Techniques.* Asia-Pacific Economic Cooperation. Singapore: 251.
- Carrier, J.C.; Pratt, H.L. y Castro, J.I. (2004). Elasmobranch reproduction. *En: Carrier, J.C.; Musick, J.A. y Heithaus, M.R. (Eds.). Biology of shark and their relatives.* LLC. CRC Press, Boca Raton: 269-286.

- Carrier, J.C.; Pratt, H.L. y Martin, L.K. (1994). The shark nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environ. Biol. Fish.*, 38: 37-48.
- Casarini, L.M. (2006). Dinâmica populacional de raias demersais dos géneros *Atlantoraja* y *Rioraja* (Elasmobranchii, Rajidae) da costa sudeste e sul de Brasil. *Tese Doutoral em Ciencias, Instituto Oceanográfico da Unoversidade de São Paulo, área de Oceanografia Biológica*. 206 pp.
- Cavanagh, R.D. y Gibson, C. (2007). Overview of the conservation status of cartilaginous fishes (Chondrichthyes) in the Mediterranean Sea. *IUCN, Gland, Switzerland and Malaga, Spain* pp 42.
- Chatchavalvanich, K.; Thongpan, A. y Nakai, M. (2005). Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifier* (Elasmobranchii. Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyol. Res.*, 52: 123-131.
- Chatchavalvanich, K. y Visuttiapat, R. (1997). Gross and microscopic structures of the female reproductive system in the whip-tale stingray (*Dasyatis bleekeri*). *Thammasat Int. J. Sc. Tech.*, 2 (1): 47-55.
- Coller, N.M. (2012). Biología, ecología y explotación de la raya platana *Atlantoraja platana* (Günther, 1880), (Chondrichthyes, Rajidae), del golfo San Matías. *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina*. 179 pp.

- Colonello, J.H. (2009). Ecología reproductiva de tres batoideos (Chondrichthyes): *Atlantoraja castelnaui* (Rajidae), *Rioraja agassizi* (Rajidae) y *Zapteryx brevirostris* (Rhinobatidae). Implicancias de distintas estrategias adaptativas en un escenario de explotación comercial intensiva. *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.* 183 pp.
- Colonello, J.H.; Christiansen, H.E.; Cousseau, M.B. y Macchi, G.J. (2013). Uterine dynamics of the southern eagle ray *Myliobatis goodei* (Chondrichthyes: Myliobatidae) from the southwest Atlantic Ocean. *Italian. J. Zool.*, 1-8.
- Colonello, J.H.; Massa, A.M. y Lucifora, L.O. (2002). Composición de la captura de rayas del buque palangrero “Sureste 501” en el norte del Mar Argentino. *INIDEP Inf. Téc. Int.* N° 107. 13 pp.
- Compagno, L.J.V. (1984). FAO species catalogue. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of sharks species known to data. Part 2, Carcharhiniformes. *FAO Fish. Synop.*, 125(4): 251-655.
- Compagno, L.J.V. (1990). Alternate life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environ. Biol. Fish.*, 28: 33-75.
- Compagno, L.J.V. (1999). Systematics and body form. *En: Hamlett, W.C (Ed.). Sharks, Skates and Rays. The biology of Elasmobranch Fishes.* The John Hopkins University Press: Baltimore: 444-466.
- Compagno, L.J.V. (2005). Checklist of living Chondrichthyes. *En: Hamlett, W.C (Ed.). Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimaeras.* Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA: 503-548.



- Conrath, C.L. y Musick, J.A. (2002). Reproductive biology of the smooth dogfish, *Mustelus canis*, in the northwest Atlantic Ocean. *Environ. Biol. Fish.*, 64: 367-377.
- Cousseau, M.B.; Figueroa, D.E.; Díaz de Astarloa, J.M.; Mabragaña, E. y Lucifora, L.O. (2007). Rayas, chuchos y otros batoideos del Atlántico Sudoccidental (34° S – 55° S). *Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP*. 102 pp.
- Cousseau, M.B. y Perrotta, R.G. (2004). Peces marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca. *Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP*. 167 pp.
- Davenport, I.R.; Weaver, A.L. y Wourms, J.P. (2011). A novel set of structures within the elasmobranch, ovarian follicle. *J. Morphol.*, 5: 557-565.
- Di Giácomo, E.E. y Perier, M.R. (1991). Evaluación de la biomasa y explotación comercial del pez gallo (*Callorhynchus callorhynchus*) en el golfo San Matías, Argentina. *Frente Marítimo.*, 9 (A): 7-13.
- Di Giácomo, E.E. y Perier, M.R. (1994). Reproductive biology of the cockfish, *Callorhynchus callorhynchus* (Holocephali: Callorhinchidae) in Patagonian water (Argentina). *Fish. Bull.*, 92: 531-539.
- Di Giácomo, E.E., Perier, M.R., Pascual, M.S. y Zampatti, E.A. (2005). El mar y sus recursos: golfo San Matías. *En: Massera, F., Lew, J. y Serra Peirano, G. (Eds.). Las mesetas patagónicas que caen al mar: la costa rionegrina*. Viedma, Río Negro: 409-439.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011) *InfoStat*. Universidad Nacional de Córdoba.

- 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, DBByF, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca*. 243 pp.
- Díaz Andrade, C.; Galíndez, E.J.; Avaca, M. S. y Estecondo, S. (2008). Morfología e histoquímica de la glándula oviductal de *Sympterygia bonapartii* y *Mustelus schmitti* (Chondrichthyes; Elasmobranchii). *Int. J. Morphol.*, 26(3):765.
- Díaz Andrade, M.C.; Galíndez E.J. y Estecondo S. (2009). The ovary of the bignose fanskate *Sympterygia acuta* Garman, 1877 (Chondrichthyes, Rajidae) in the Bahía Blanca estuary, Argentina: morphology and reproductive features. *Braz. J. Biol.*, 2: 405-413.
- Díaz Andrade, M.C.; Galíndez, E.J.; Lopez Cazorla, A. y Estecondo S. (2011) Ovarian folliculogenesis in the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller and Henle 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Int. J. Morphol.*, 29(1): 174-181.
- Díaz Andrade, M.C.; Lopez Casorla, A. y Galíndez, E.J. (2013). Histological remarks of the uterus of *Sympterygia acuta* (Garman, 1877) and *Sympterygia bonapartii* (Müller y Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Int. J. Morphol.*, 31 (3): 864-872.
- Dick, T.A. y Choudhury, A. (1995). Phylum Nematoda. *En: Wood, P.T.K. (Ed.). Fish Diseases and Disorders vol. 1. Protozoan and metazoan infections*. CAB International: 415-446.

- Dodd, J.M. (1983). Reproduction in cartilaginous fishes (Chondrichthyes). *En: Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M. (Eds.). Fish physiology.* New York Academic Press: 31-95.
- Dodd, J. M. y Dodd; M.H.I. (1986). Evolutionary aspects of reproduction in cyclostomes and cartilaginous fishes. *En: Forman, R.E. y Gorbman, J.M. (Eds.). Evolutionary biology of primitive fishes.* Vol 103. New York, NY. Plenum Press: 295-319.
- Dulvy, N.K.; Fowler, S.L.; Musick, J.A.; Cavanagh, R.D.; Kyne, P.M.; Harrison, L.R.; Carlson, J.K.; Davidson, L.D.; Fordham, S.V.; Francis, M.P.; Pollock, C.M.; Simpfendorfer, C.A.; Burgess, G.H.; Carpenter, K.E.; Compagno, L.J.; 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. *E-Life* 3: e00590.
- Dulvy, N.K. y Reynolds, J.D. (1997). Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proceed. Royal Soc. Lond. B* 264: 1309-1315.
- Ebert, D.A. (2005). Reproductive biology of skates, *Bathyraja* (Ishiyama), along the eastern Bering Sea continental slope. *J. Fish. Biol.*, 66: 618-649.
- Ebert, D.A. y Compagno, L.J.V. (2007). Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes, Rajoidei). *Environ. Biol. Fish.*, (80): 111-124.

- 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 Chimeras*. Science Publishes, INC., Enfield, VH, USA: 171-200.
- Estalles, M.L. (2012). Características de historia de vida y explotación comercial de la raya *Sympterygia bonapartii* en el golfo San Matías. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 167 pp.
- Estalles, M.L.; Coller, N.M.; Perier, M.R. y Di Giácomo, E.E. (2011). Skates in the demersal trawl fishery of San Matías Gulf: species composition, relative abundance and maturity stages. *Aquat. Liv. Res.*, 24: 193-199.
- Estalles, M.L.; Perier, M.R. y Di Giácomo, E.E. (2016). Trophic ecology of the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* in the San Matías Gulf, northern Patagonia, Argentina. *Ichthyol. Res.*, 63: 207-217.
- FAO (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. *Roma*. 253 pp.
- Field, I.C.; Meekan, M.G.; Buckworth, R.C. y Bradshaw, C.J.A. (2009). Susceptibility of sharks, rays and chimaeras to global extinction. *Adv. Mar. Biol.*, 56: 275-363.
- Figueiredo, J.L. (1977). Manual de peixes marinos do Sudeste do Brazil. Introdução Cações, raias e quimeras. Museu de Zoologia. Universidade do São Paulo, São Paulo, Brazil 104 pp.
- Francis, M.P. (2006). Morphometric minefields towards a measurement standard for chondrichthyan fishes. *Environ. Biol. Fish.* 77: 407-421.

- .Gagliardini, D.A. y Rivas, A.L. (2004). Environmental characteristics of San Matías Gulf obtained from LANDSAT-TM AND ETM+DATA. *Gayana*, 68:186-193.
- Galíndez, E.J. (2016). Reproducción de peces cartilaginosos. Una revisión de algunas adaptaciones reproductivas. *Cienc. Morf.*, 18 (1): 20-23
- Galíndez, E.J. y Aggio, M.C. (1997). The hemopoietic system: A phylogenetic approach. *Histol. Histopathol.*, 12: 823-826.
- 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. *Rev. Chil. Anat.*, 20(1): 49-54.
- Galíndez, E.J.; Díaz Andrade, M.C.; Avaca, M.S. y Estecondo, S. (2010). Morphological study of the oviductal gland in the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Braz. J. Biol.*, 70(2): 325-333.
- Galíndez, E.J.; Díaz Andrade, M.C. y Estecondo, S. (2014). Morphological indicators of initial reproductive commitment in *Mustelus schmitti* (Springer, 1939) (Chondrichthyes, Triakidae): folliculogenesis and ovarian structure along the life cycle. *Braz. J. Bio.*, 74 (3) 154-163.
- Galíndez, E.J. y Estecondo, S. (2008). Histological remarks of the oviduct and the oviductal gland of *Sympterygia acuta* (Garman, 1877). *Braz. J. Biol.*, 68 (2):359-365.

- Gallegó Castejón, L. (2006) Los Cordados. Origen y Diversificación. *Editorial Club Universitario*, Alicante, España.
- Gallucci, V.F.; Foy, R. J.; O'brien, S. M.; Aires Da-Silva, A.; Nesse, H.; Langseth, B.; Vega, N.; Taylor, I. y Goldman, K.J. (2008). Information from a pregnant salmon shark *Lamna ditropis* in the eastern North Pacific with observations on oophagous reproduction. *J. Fish Biol.*, 73, 732-739.
- García, V.B.; Lucifora, L.O. y Myers, R.A. (2008). The importance of habitat and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimaeras. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 275: 83-89.
- Gelsleichter, J.; Rasmussen, L.E.L.; Manire, C.A.; Tyminsky, J.; Chang, B. y Lombardi-Carlson, L. (2002). Serum steroid concentrations, and development of reproductive organs during puberty in male bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 26: 389-401.
- Gilmore, R.G. (1993). The reproductive biology of lamnoid sharks. *Environ. Biol. Fish.*, 38: 95-114.
- Girard, M.; Rivalan, P. y Siquin, G. (2000). Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscyrnus caelolopis* and *Centrophorus squamosus*. *J. Fish. Biol.*, 57: 1575-1589.
- Gomori, G. (1937). Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *Am. J. Path.*, 13:993.

- Goto, T. (2001). Comparative anatomy, phylogeny and cladistic classification of the order Orectolobiformes (Chondrichthyes, Elasmobranchs). *Mem. Grand. Sch. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, 48, 1-100.
- Gračan R., Lazar B., Lackovic, G. (2013) Follicle development in immature spiny dogfish (*Squalus acanthias*): histomophometric analysis. *J. Cytol. Histol.* 4: 1-4.
- Grier, H.J. (1993). Comparative organization of Sertoli cell barrier. *En: Russell, L.D. y Griswold, M.D. (Eds.) The Sertoli cell.* Clearwater, Cache River Press: 704-730.
- Grogan, E.D. y Lund, R. (2004). Origin and relationships of early Chondrichthyes. *En: Carrier, C.; Musick, J.A. y Heithaus, M.R. (Eds.). Biology of sharks and their relatives.* CRC Press, Estados Unidos: 3-31.
- Guagliardo, S.E.; De Salvo, M.N.; Schwerdt, C.B.; Galeano, N.A. y Tanzola, R.D. (2009). Anisákidos del savorín, *Seriolella porosa* (Pisces: Centrolophidae). Análisis de la interacción parásito-hospedador. *BioScriba*, 2 (2): 106-114.
- Guraya, S. (1986). The cell and molecular biology of fish oogenesis. *Monograph. Develop. Biol.*, 18: 1-223.
- Hamlett, W.C. (1999). Male reproductive system. *En: Hamlett, W. C (Ed.). Sharks, Skates and Rays. The biology of Elasmobranch Fishes.* The John Hopkins University Press: Baltimore: 444-470.
- Hamlett, W.C.; Fishelson, L.; Baranes, A.; Hysell, C.K. y Sever D.M. (2002). Ultrastructural analysis of the oviductal gland and sperm storage in the Oman shark, Iago Omanensis. *Mar. Fresh. Res.*, 53: 601-613.

- Hamlett, W.C. y Koob, T.J. (1999). Female reproductive system. *En*: Hamlett, W. C (Ed.). *Sharks, Skates and Rays. The biology of Elasmobranch Fishes*. The John Hopkins University Press: Baltimore: 398-443.
- Hamlett, W.C.; Knight, D.C.; Koob, T.J.; Jezior, M.; Luong, T.; Rizycki, T.; Brunette, N. y Hysell, M.K. (1998). Survey of oviductal gland structure and function in elasmobranchs. *J. Exp. Zool.*, 282: 399-420.
- Hamlett, W.C.; Knight, D.C.; Periera, F.T.V.; Steele, J.; Sever, D.M. (2005). Oviducal glands in chondrichthyans. *En*: Hamlett, W.C. (Ed.) *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimaeras*. Science Publishers, INC. Enfield, NH, USA: 301-334.
- Hamlett, W.C.; Kormanik, G.; Storrie, M.; Stevens, B.; Walker, T.J. (2005b). Chondrichthyan parity, lecithotrophy and matrotrophy. *En*: Hamlett, W.C. (Ed.) *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimaeras*. Science Publishers, INC. Enfield, NH, USA: 395-435.
- Hamlett, W.C.; Musick, J.A.; Eulitt, A.M.; Jarrell, R.L. y Kelly, M.A. (1996). Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Can. J. Zool.*, 74: 1417-1430.
- Henderson A.C., Reeve A.J., 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. *J. Fish. Biol.*, 84: 297-313.
- Hisaw Jr., F.L. y Hisaw, F.L. (1959). *Corpora lutea* of elasmobranch fishes. *Anat. Rec.*, 135: 269-277.



- Hoar, W.S. y Randall, D.J. (1969). Fish physiology. Vol. III: Reproduction and growth, bioluminescence, pigments and poisons. *Academic Press Inc., New York*. 485 pp.
- Hoff, G.R. (2009). Skate *Bathyraja spp.* Egg predation in the eastern Bering Sea. *J. Fish. Biol.*, 74: 250-269.
- Hoffmayer, E.R.; Parsons, G.R y Horton, J. (2006). Seasonal and interannual variation in the energetic condition of adult male Atlantic sharpnose shark *Rhizoprionodon terranovae* in the northern gulf of Mexico. *J. of Fish. Biol.*, 38: 645-653.
- Holden, M.J. (1974). Problems in the rational exploitation of elasmobranch populations and some suggested solutions. *En: Harden Jones, F.R. (Ed.), Sea Fisheries Research*. Wiley, New York: 117-137.
- Holt, W.V. y Lloyd, R.E. (2009). Sperm storage in the vertebrate females reproductive tract: How does it work so well?. *Theriog.*, 73 (6): 713-722.
- Hotchkiss, R. (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Bioch.*, 16:131.
- Hutt, K.J. y Albertini, D.F. (2007) An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed.*, 6: 758-764.
- Hyder, S.L.; Cayer, M.L. y Pettey, C.L. (1983). Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tiss. Cell.*, 15. 437.
- IUCN, 2016. 2016 IUCN Red List of Threatened Species. ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).
- Jones, C.J.P. y Hamlett, W.C. (2006). Ultrastructure of the male genital ducts of the clearnose skate *Raja eglanteria*. *J. Exp. Zool.*, 305: 1018-1029.

- Jones, C.J.P.; Walker, T.; Bell, J.; Reardon, M.B.; Ambrosio, C.E; Almeida, A. y Hamlett, W.C. (2005). Male genital ducts and copulatory appendages in Chondrichthyans. *En: Hamlett, W. C. (Ed.). Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimeras.* INC. Enfield, NH, USA: 361-393.
- Jones, R.C.; Jones, N. y Djakiew, D. (1984). Luminal composition and maturation of spermatozoa in the male genital ducts of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *Exp. Zool.*, 230: 417-426.
- Jones, R.C. y Lin, M. (1993). Structure and functions of the genital ducts of the male Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *Environ. Biol. Fish.*, 38: 127-138.
- Jones, T.S. y Uglund, K.L. (2001). Reproduction of female spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in the Oslofjord. *Fish. Bull.*, 99: 685-690.
- Jones, W. y Jones, R.C. (1982). The structure of the male genital system of the Port Jackson shark *Heterodontus portusjacksoni*, with particular reference to the genital ducts. *Aust. J. Zool.* 30: 523-541.
- Jons, G.D. y Miranda L.E. (1997). Ovarian weight as an index of fecundity, maturity and spawning periodicity. *J. of Fish. Biol.*, 50: 150-156.
- Knight, D.P. y Feng, D. (1994). Some observations on the collagen fibrils of the egg capsule of the dogfish, *Scyliorhinus*. *Tiss. Cell.*, 26: 384-401.
- Knight, D.P., Feng, D. y Stewart, M. (1996). Structure and function of the Selachian egg case. *Biol. Rev.*, 71: 81-111.

- Koob, T.J. y Callard, I.P. (1991) Reproduction in female elasmobranch. *En: Kinne, R* (Ed.). *Comparative Physiology*. Basel, Karger: 155-209.
- Koob, T.J. y Cox, D.L. (1990). Introduction and oxidation of catechols during the formation of the skate (*Raja erinacea*) egg capsule. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 70: 395-411.
- Koob, T.J. y Straus, J.W. (1998). On the role of egg jelly in *Raja erinacea*. *Bull. MT Desert Island Biol. Lab.*, 37:117-119.
- Kormanik, G.A. (1993). Ionic and osmotic environment of developing elasmobranch embryos. *Environ. Biol. Fishes.*, 38: 223-240.
- LaMarca, M.J. (1964). The functional anatomy of the clasper and clasper gland of the yellow stingray, *Urolophus jamaicensis*. *J. Morph.*, 114 (2): 303-323.
- Last P.R. y Stevens, J.D. (1994). Sharks and rays of Australia (*CSIRO Division of Fisheries: Australia*). 513 pp.
- Leonard, J.B.K.; Summers, A.P. y Koob, T.J. (1999). Metabolic rate of embryonic little skate, *Raja erinacea* (Chondrichthyes: Batoidea): the cost of active pumping. *J. Exp. Zool.*, 283: 13-18.
- Lo Bianco, S. (1909). Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita sessuale degli animali del Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Napoli.*, 19:513-761.
- Loir, M.; Sourdain, P.; Shandrina, M.L.C.; Mendis, H. y Jegou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Micr. Res. Tech.*, 32(6): 533-552.

- Long, J.A.; Trinajstić, K. y Johanson, S. (2009). Devonian antheridion embryos and the origin of internal fertilization in vertebrates. *Nature*, 457: 1124-1127.
- Luer, C.A. y Gilbert, P.W. (1985). Mating behavior, egg deposition, incubation period, and hatching in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Env. Biol. of Fish.*, 13(3): 161-171
- Luer, C.A.; Walsh, O.E.; Bodine, A.B. y Wyffels, J.T. (2007). Normal embryonic development in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. With experimental observations on artificial insemination. *Environ. Biol. Fish.*, 80: 239-255.
- Lutton, B.L. y Callard, I.P. (2007). Effects of reproductive activity and sex hormones on apoptosis in the epigonal organ of the skate *Leucoraja erinacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 154: 75-84.
- Mabragaña, E. (2007). Las rayas del género *Psammobatis* de la Plataforma Argentina: biología y ecología. *Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Mar del Plata, Argentina.* 178 pp.
- Mabragaña, E. y Cousseau, M.B. (2004). Reproductive biology of two sympatric skates in the south-west Atlantic: *Psammobatis rudis* and *Psammobatis normani*. *J of Fish. Biol.*, 65: 559-573.
- Mabragaña, E.; Lucifora, L.O. y Massa, A.M. (2002). The reproductive ecology and abundance of *Sympterygia bonapartii* endemic to the south-west Atlantic. *J. Fish Biol.*, 60: 951-967.
- Maia, C.; Serra Pereira, B.; Erzini, K. y Figueiredo, I. (2015). How is the morphology of the oviducal gland and of the resulting egg capsule associated with the egg laying habitats of Rajidae species?. *Environ. Biol. Fish.*, 98: 2037-2048.

- Mannire, C.A.; Rasmussen, L.E.L.; Gelsleichter, J. y Hess, D.L. (2004). Maternal serum and yolk hormone concentrations in the placental viviparous bonhead shark, *Sphyrna tiburo*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 136: 241-47.
- Marçal, A.S. (2003). Biología reproductiva de *Atlantoraja platana* (Gunther, 1880) (Elasmobranchii, Rajidae) no Sul do Brasil. *MSc Thesis, Universidade Federal de Rio Grande*, Rio Grande do Sul, Brazil. 99 pp.
- Marcos, M.A. y Mancini, M.V. (2012). Comunidades vegetales de la costa norte del golfo San Matías, Río Negro, Argentina. *Ecol. Aust.*, 22: 188-194.
- Marongiu, M.F.; Porcu, C.; Bellodi, A.; Cuccu, D.; Mulas, A. y Follesa, M.C. (2015). Oviducal Gland Microstructure of *Raja miraletus* and *Dipturus oxyrinchus* (Elasmobranchii, Rajidae). *J. Morphol.* 276: 1392-1403.
- Maruska, K.P.; Cowie, E.G. y Tricas, T.C. (1996). Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranchs fishes. *J. Exp. Zool.*, 276: 219-232.
- Massa, A.M. y Hozbor, N.M. (2003). Peces cartilaginosos de la Plataforma Argentina: explotación, situación y necesidades para un manejo pesquero adecuado. *Frente Marítimo*, no. 19: 199-206.
- Massa, A.; Marí, N.; Giussi, A. y Hozbor, N. (2007). Índices de abundancia de *Squalus acanthias* en la Plataforma Continental Argentina. *Informe Técnico INIDEP N° 6*.
- Matthews, L.H. (1950). Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus* (Gunner). *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 234: 247-316.

- Mazio, C.A. y Vara, C.D. (1983). Las mareas del golfo San Matías. *Servicio de Hidrografía Naval*. Armada Argentina, Buenos Aires.
- McCauley, D.J.; Pinsky, M.L.; Palumbi, S.R.; Estes, J.A.; Joyce, F.H. y Warner, R.R. (2015). Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. *Science* 347 (6219): 1255641-1 a 7.
- McClenachan, L.; Cooper, A.B. y Dulvy, N.K. (2016). Rethinking trade-driven extinction risk in marine and terrestrial megafauna. *Curr.Biol.*, 26: 1640-1646.
- McClusky, L.M. (2005). Stage and season effects on cell cycle and apoptotic activities of germ cells and Sertoli cells during spermatogenesis in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Reprod.*, 129: 89-102.
- McClusky, L.M. (2012). Coordination of spermatogenic processes in the testis: lessons from cystic spermatogenesis. *Cell. Tiss. Res.* 349: 703-715.
- McClusky, L.M. y Sulikowski, J. (2014). The epigonal organ and mature pole of the testis in the recreationally fished blue shark (*Prionace glauca*): histochemico-functional correlates. *J. of Anat.*, 225 (6): 614-624.
- McEachran, J.D. y Aschliman, N. (2004). Phylogeny of Batoidea. *En: Carrier, J.C.; Musick, J.A.; Heithaus, M.R. (Eds.). Biology of sharks and their relatives*. CRC Press, USA: 79-113.
- McEachran, J.D. y Dunn, K.A. (1998). Phylogenetic analysis of skates, a morphologically conservative clade of elasmobranchs (Chondrichthyes: Rajidae). *Copeia*, 1998 (2): 271-290.

- McMannus, J.F.A. (1946) Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature.*, 158: 202.
- Mc Millan, D.B. (2007). Fish histology. Female Reproductive Systems. *Springer, Dordrecht*, The Netherlands. 598 pp.
- Menni, R.C. (1972). “*Raja*” (“*Atlantoraja*”) subgen. nov. y lista crítica de los “*Rajidae*” argentinos (Chondrichthyes, Rajiformes). *Rev. Mus. La Plata. Secc. Zool.*, 11: 165-173.
- Menni, R.C. y Lucifora, L.O. (2007). Condriactios de la Argentina y Uruguay. Lista de trabajo. *ProBiota, FCNyM, UNLP. Serie Técnica y Didáctica*. La Plata, Argentina. 11: 1-15.
- Menni, R.C. y Stehmann, F.W. (2000). Distribution, environment and biology of batoid fishes of Argentina, Uruguay and Brazil. A review. *Rev. Mus. Arg. de Cs. Nat.*, 2(1): 69-109.
- Metten, H. (1939). Reproduction of the dogfish. *Nature.*, 143: 121-122.
- Metten H. (1944). The fate of spermatozoa in the female dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Quart J Microsc Sci.*, 84: 283–295.
- Millán, D.O. (2010). Estadística pesquera año 2010 Provincia de Río Negro. Dirección de pesca. Río Negro, Argentina.
- Modig, C.; Westerlund, L. y Olsson, P. (2007). Oocyte zona pellucida proteins. *En: Babin, P.; Cerda, J. y Lubzens, E. (Eds.). The fish oocyte. From basic studies to biotechnological applications*. Netherland, Springer: 508.
- Motova, N. y Cooley, L. (2001) Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev. Biol.*, 1-30.

- Moura, T.; Serra Pereira, B.; Gordo, L.S. y Figueiredo, I. (2011). Sperm storage in males and females of the deepwater shark Portuguese dogfish with notes on oviducal gland microscopic organization. *J. Zool.*, 283:210–219.
- Mowry, R.W. (1956). Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 407.
- Musick, J.A. y Ellis, J.K. (2005). Reproductive evolution of Chondrichthyans. *En: Hamlett, W.C. y Jamieson, B.G.M. (Eds.) Reproductive biology and phylogeny*. Vol. 3. Science publishers, INC. Enfield: 45-79.
- Musick, J.A. y Musick, S. (2011). Sharks. Fisheries and Aquaculture Reviews and Studies. FAO, Rome, 17 pp.
- Myers, R. A. y Worm, B. (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes. *Phil. Trans. of Royal Soc. Lond.*, B1453: 13-20.
- Nagahama, Y. (1986). Testis. *En: Pang, P.K.T. y Schreibman, M.P. (Eds.) Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications, vol 1, Morphological considerations*. Academic, Orlando: 399–437.
- Nelson, J.S. (2006). Fishes of the world. *Fourth Edition*. Wiley, J. and Sons, Inc. (Eds.). 601 pp.
- Nelsen, O. E. (1953). Comparative Endocrinology of the Vertebrates. Blackiston, New York.
- Oddone, M.C. y Amorim, A.F. (2007). Length-weight Relationships, Condition and Population Structure of the Genus *Atlantoraja* (Elasmobranchii, Rajidae, Arhynchobatinae) in Southeastern Brazilian Waters, SW Atlantic Ocean. *J of North. Atl. Fish. Sci.*, 38: 43–52.



- Oddone, M.C. y Amorim, A.F. (2008). Size at maturity of *Atlantoraja platana* (Günther, 1880) (Chondrichthyes: Rajidae: Arhynchobatinae) in the south-west Atlantic Ocean. *J. Fish. Biol.*, 72: 1515-1519.
- Oddone, M.C.; Mesa, A. y Ferreira de Amorim, A. (2006). The egg capsule of *Rioraja agassizi* (Müller & Henle) (Elasmobranchii, Rajidae), endemic to the SW Atlantic. *J. Aquatic. Sci.*, 1(2): 43-48.
- Oddone, M.C.; Paesch, L. y Norbis, W. (2005). Length at first sexual maturity of two species of rajoid skates, genera *Atlantoraja* and *Dipturus* (Pisces, Elasmobranchii, Rajidae), from the Southwestern Atlantic Ocean. *J. Appl. Ichthyol.*, 21:70-72.
- Oddone, M.C. y Velasco, G. (2004). Size at maturity of the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller y Henle, 1841) (Pisces; Elasmobranchii, Rajidae) in the SW Atlantic. *ICES. J. Mar. Sci.*, 61: 293-296.
- Oddone, M.C. y Vooren, C.M. (2005). Reproductive biology of *Atlantoraja cyclophora* (Regan 1903) (Elasmobranchii: Rajidae) off southern Brazil. *ICES. J. Mar. Sci.*, 62: 1095-1103.
- Oktem, O. y Oktay, K. (2008) Stem cells: a perspective on oocytes. *An NY Acad. Sci.*, 1: 20-26.
- Oshima, T. (1972). Anisakis and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Prog. Med. Paras. Japan.*, (4) 301-393.
- Pankhurst, N.W. y Porter, M.J.R. (2003). Cold and dark of warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. *Fish. Physiol. Biochem.*, 28, 385-389.

- Paesch, L. y Domingo, A. (2003). La pesca de condricios en el Uruguay. *Frente Marítimo.*, 19: 207-216.
- Parsons, G.R. y Grier, H.J. (1992). Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *J. Exp. Zool.*, 261: 173-184.
- Pedreros Sierra, T.D.M. y Ramírez Pinilla, M.P. (2014). Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *J. Morph.*, 276: 273-89.
- Perier, M.R.; Coller, N.M.; Di Giacomo, E.E y Gavensky, M. (2003). Capturas de condricios en la pesquería de arrastre del golfo San Matías. *V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIII Coloquio Argentino de Oceanografía*. Mar del Plata, Argentina. 153 pp.
- Perier, M.R.; Coller, N.M.; Di Giacomo, E.E. y Estalles, M.L. (2007). Estado biológico de las especies de condricios del golfo San Matías. *Serie Documento Técnico 01/07*, CONDROS, IBMPAS. 42 pp.
- Perier, M.R. y Di Giacomo, E.E. (2002). Distribución, abundancia y reproducción de *Paralichthys isósceles*, *P. patagonicus* y *Xistreuris rasile* (Pleuronectiformes: Bothidae) en aguas patagónicas, Argentina. *IBMP- Serie Publicaciones*, 1: 32-39.
- Perier, M.R.; Estalles, M.L.; Coller, N.M.; Suarez, M.N.; Mora, G.J. y Di Giacomo, E.E. (2011). Chondrichthyan fauna of San Matías gulf, Patagonia, Argentina. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat.*, 13 (2): 213-220.

- Pierantoni, R.; Cobellis, G.; Meccariello, R.; Cacciola, G.; Chianese, R.; Chioccarelli, T. y Fasano, S. (2009). Testicular gonadotropin releasing hormone activity, progression of spermatogenesis, and sperm transport in vertebrates. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. *An. New York Acad. Sci.*, 1163: 279-291.
- Piercy, A.; Gelsleichter, J. y Snelson Jr., F.F. (2003). Morphological and histological changes in the genital ducts of the male Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, during seasonal reproductive cycle. *Fish. Physiol. Biochem.*, 29: 23-35.
- Piola, A.R. y Scasso, L.M. (1988). Circulación en el golfo San Matías. *Geoacta.*, 15: 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. Antecedentes históricos de las explotaciones en el mar y las características ambientales.* INIDEP. Mar del Plata, Argentina.
- Porcu, C.; Marongiu, M.F.; Follesa, M.C.; Bellodi, A.; Mulas, A.; Pesci, P. y Cau, A. (2014). Reproductive aspects of the velvet belly *Etmopterus spinax* (Chondrichthyes: Etmopteridae), from the central western Mediterranean Sea. Notes on gametogenesis and oviducal gland microstructure. *Med. Mar. Sci.* 15(2):313– 326.
- Poulakis, G. R. y Grier, H. J. (2014). Ontogenetic testicular development and spermatogenesis in rays: the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, as a model. *Environ. Biol. Fish.*, 97: 1013-1029.

- Prasad, R.R. (1945). The structure, phylogenetic significance, and function of the nidamental glands of some elasmobranchs of the Madras coast. *Proc. Nat. Inst. Sci. India, Part B, Biol. Sci.*, 11: 282-303.
- Pratt Jr., H.L. (1979). Reproduction in the blue shark *Prionace glauca*. *Fish. Bull.*, 77: 445-470.
- Pratt Jr., H.L. (1988). Elasmobranch gonad structure: a description and survey. *Copeia* 1988 (3): 719-729.
- Pratt Jr., H.L. (1993). The storage of spermatozoa in the oviductal glands of western North Atlantic sharks. *Environ. Biol. Fish.*, 38: 139-149.
- Pratt, H.L. y Carrier, J.C. (2001). A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Env. Biol. Fish.*, 60: 157-188.
- Pratt, H.L. y Tanaka, S. (1994). Sperm storage in male elasmobranchs: a description and survey. *J. Morph.*, 219: 297-308.
- Prisco, M.; Liguoro, A.; D'Onghi, B.; Ricchiari, L.; Limatola, E.; Andreuccetti, P. y Angelini, F. (2002). Fine structure of Leydig and Sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.*, 63:192-201.
- Prisco, M.; Liguoro, A.; Ricchiari, L., Del Giudice, G. y Andreuccetti, P. (2007). Oogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 17: 1-10.
- Prisco, M.; Ricchiari, L. y Andreuccetti, P. (2001) An ultrastructural study of germ cells during ovarian differentiation in *Torpedo marmorata*. *Anat. Rec.*, 263(3): 239-247.

- Pudney, J. y Callard, G.V. (1986). Sertoli cell cytoplasm in the semen of spiny dogfish *Squalus acanthias*. *Tiss. Cell.*, 18: 375-382.
- Reardon, M.B.; Walker, T.I. y Hamlett, W.C. (2002). Microanatomy of spermatophore formation and male genital ducts in the holocephalan, *Callorhynchus milli*. *Mar. Fresh. Res.*, 53: 591-600.
- Ravaglia, M. y Maggese, M. (2003). Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) with special reference to the vitelline envelope development. *Tiss. Cell* 35: 9-17.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17:208.
- Roose Runge, E.C. (1977). The process of spermatogenesis in animals. *Cambridge Uni. Press*. Cambridge: 102-132.
- Roosow, G.J. (1987). Function of the liver and hepatic lipids of the lesser sand shark, *Rhinobatos annulatus* (Müller y Henle). *Comp. Bioch. Phys.*, 86B: 785-790.
- Ruocco, N.L.; Lucifora, L.O.; Díaz de Astarloa, J.M. y Whöler, O. (2006). Reproductive biology and abundance of the White-dotted skate, *Bathyraja albomaculata*, in the Southwest Atlantic. *ICES. J of Mar. Sci.*, 63:105-116.
- Sadowsky, V. y Menni, R.C. (1974). Sobre *Raja platana* Günther (1880) (Chondrichthyes, Rajidae). *Physis. Sec. A* 33 (86): 23-32.
- San Martín, M.J.; Perez, J.E. y Chiaramonte, G.E. (2005). Reproductive biology of the South West Atlantic marble sand skate *Psammobatis bergi* Marini, 1932 (Elasmobranchii, Rajidae). *J App. Ichth.*, 21: 504-510.

- Sánchez, M.F. y Mabragaña, E. (2002). Características biológicas de algunas especies de rayas de la región subpatagónica. *INIDEP Informe Técnico* N° 48: 15 pp.
- Santos, C.P.; Lent, H. y Gibson, D.I. (2004). A new species of *Pseudoanisakis*. Layman y Borovkova 1926 (Nematoda: Ascaridida) from *Rioraja agassizii* and *Psammobatis extenta* (Rajidae) in Brazilian southwestern Atlantic waters. *Syst. Paras.*, 57: 229-235.
- Schmit Nielsen, K. (1984). Fisiología animal: adaptación y medio ambiente. *Ediciones Omega*, Barcelona, España, 499 pp.
- Schulz, R.W.; De França, L.R.; Lareyre, J. y LeGac, F. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165: 390-411.
- Serra Pereira, B.; Afonso, F.; Farias, I.; Joyce, P.; Ellis, M.; Figueiredo, I. y Serrano Gordo, L. (2010). The development of the oviductal gland in the Rajid thornback ray, *Raja clavata*. *Helgol. Mar. Res.*, 65: 399-411.
- 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 elasmobranch. *Mar. Coast. Fish. Dyn. Manag. Ecosyst. Sci.*, 3: 160-175.
- Settembrino, C.S. (2013). Morfología y microscopia testicular de *Myliobatis goodei* (Chondrichthyes, Dasyatidae). *Tesis presentada como requisito para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina. 42 pp.*
- Sever, D.M. y Hamlett, W.C. (2002). Female sperm storage in reptiles. *J. Exp. Zool.*, 292: 187-199.

- Sheehan, H.L. y Storey, G.W. (1947). An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black. *B. J. Pathol. Bacteriol.*, 59:336-1947.
- Simpson, T.H. y Wardle, C.S. (1967). A seasonal cycle in the testis of the spurdog, *Squalus acanthias* and the sites of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J. Mar. Biol. Assoc. Unit. King.*, 47: 699-708.
- Simpson, T.H., Wright, R.D. y Renfrew, J. (1964). Steroid biosynthesis in the semen of the dogfish (*Squalus acanthias*). *J Endocrinol.*, 31:11–20.
- Skinner, M.K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.*, 12: 45-77.
- Smith, R.M.; Walker, T.I. y Hamlett, W.C. (2004). Microscopic organization of the oviductal gland of the holocephalan elephant fish, *Callorhynchus milli*. *Mar. Fresh. Res.*, 55: 155-164.
- Stanley, H.P. (1963). Urogenital morphology in the chimaeroid fish *Hydrolagus colliei* (Lay and Bennett). *J. Morphol.*, 112:99-127
- Stanley, H.P. (1966). The structure and development of the follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Zeitsch. für Zellf.*, 75: 453-468.
- Steedman, H.F. (1950). Alcian Blue 8 GX: A new stain for mucin. *Quart. J. Microbiol. Sci.*, 91: 477.
- Stehmann, M.F.W. (2002). Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). *Arch. Fish. Mar. Res.*, 50: 23-48.
- Stevens, B. (2001). Uterine and oviducal mechanisms for gestation in the common sawshark, *Pristiophorus cirratus*. *Bachelor of Science (Honours) Thesis, University of Melbourne, Melbourne, Australia.* 41 pp.

- 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 J. Mar. Sci.*, 57: 476-494.
- Storrie, M. (2004). Microscopic modifications of the female reproductive tissues of *Mustelus antarcticus*. Thesis submitted in fulfillment for the degree of Doctor of Philosophy, Deakin University, 153 pp.
- Storrie, M.T.; Walker, T.I.; Laurenson, L.J. y Hamlett, W.C. (2008). Microscopic organization of the sperm storage tubules in the oviducal gland of the female gummy shark (*Mustelus antarcticus*), with observations on sperm distribution and storage. *J. Morphol.*, 269: 1308-1324.
- Storrie, M.T.; Walker, T.I.; Laurenson, L.J. y Hamlett, W.C. (2009). Gestational morphogenesis of the uterine epithelium of the gummy shark (*Mustelus antarcticus*). *J. Morphol.*, 270: 319-336.
- Sulikowski, J.A.; Kneebone, J.; Elzey, S.; Jurek, J. y Danley, P. (2005). The reproductive cycle of the thorny skate (*Amblyraja radiata*) in the western Gulf of Maine. *Fish. Bull.*, 103: 536-543.
- Sulikowski, J. A.; Tsang, P.C.W. y Hunting Howell, W. (2004). An annual cycle of steroid hormone concentrations and gonad development in the winter skate, *Leucoraja ocellata*, from the Western Gulf of Maine. *Mar. Biol.*, 144: 845-853.
- Sumpter, J.P. y Dood, J.M. (1979). The annual reproductive cycle of the female lesser spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* L. and its endocrine control. *J. Fish Biol.*, 15: 687-695.



- Tanzola, R.D. y Guagliardo, S.E. (2004). Nematodes anisákidos presentes en peces del área de Bahía Blanca y el riesgo potencial de anisakidosis humana. *Rev. Cient. AMBB*, 14 (3), 67-73.
- Teshima, K. (1981). Studies on the Reproduction of Japanese Smooth Dogfishes, *Mustelus manazo* and *Mustelus griseus*. *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, 29(2): 113-199.
- Vannuccini, S. (1999). Shark utilization, marketing and trade. FAO Fisheries Technical paper N° 389. <http://www.fao.org/docrep/005/x3690e/x3690e00.htm>.
- Vooren, C.M. (1998). Elasmobrânquios demersais. *En*: Seeliger, U.; Odebrecht, C. y Castello, J.P. (Eds.). *Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil*. Rio Grande Ecocientia, Rio Grande: 157-162.
- Walker, T. (2005). Reproduction in fisheries Science. *En*: Hamlett, W.C. (Ed.). *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Sharks, Batoids and Chimeras*. INC. Enfield, NH, USA. 81-127 pp.
- Ward Paige, C.A.; Keith, D.; Worm, B. y Lotze, H.K. (2012) Recovery potential and conservation options for elasmobranchs. *J. Fish. Biol.*, 80: 1844–1869.
- Wartenberg, H. (1989) Differentiation and development of the testes. *En*: Burger, H. y Kretser, D. (Eds.). *The testis. 2nd ed.* Raven, New York: 67–118.
- Williams, H. y Jones, A. (1994). Parasitic worms of fish. *Taylor and Francis Ltd. London*, 593 pp.

- Wehitt A., Di Giacomo E.E., Galíndez E.J. (2015) The female reproductive system of *Zearaja chilensis* (Guichenot, 1848) (Chondrichthyes, Rajidae). Gametogenesis and microscopic validation of maturity criteria. *Int. J. Morphol.*, (33)1: 309-317.
- Wenbin, Z. y Shuyuan, Q. (1993). Reproductive biology of the guitarfish *Rhinobatos hynnicephalus*. *Env. Biol. Fish.*, 38: 81-93.
- Wilk, S.J.; Morse, W.W. y Stehilk, L.L. (1990). Annual cycles of gonadosomatic indices as indicators of spawning Activity for Select Species of finfish collected from the New York Bight. *Fish. Bull.*, 88: 775-786.
- Williams, H. y Jones, A. (1994). Parasitic worms of fish. *Taylor and Fancis Ltd. London*. 593 pp.
- Wourms, J.P. (1977) Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Am. Zool.*, 17: 379-410.
- Wourms, J.P. (1981). Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishes. *Amer. Zool.*, 21(2): 473-515.
- Wourms, J.P y Demski, L.S. (1993). The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: Introduction, history, overview, and future prospects. *Env. Biol. Fish.*, 38: 7-21.
- Zaro, C. (1979). Presencia de *Raja platana* Günther (1880), en aguas de la plataforma Continental Argentina (Chondrichthyes, Rajidae). *Neotrópica*, 25(73): 77-82.