

**Madurez sexual de hembras de *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii:  
Potamotrygonidae) de la ciénaga de Paredes (Santander, Colombia)**

**Tania del Mar Pedreros Sierra**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Bucaramanga  
2012**

**Madurez sexual de hembras de *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii:  
Potamotrygonidae) de la ciénaga de Paredes (Santander, Colombia)**

**Tania del Mar Pedreros Sierra**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Bióloga**

**Directora**

**PAOLA ANDREA MEJÍA FALLA**

**Bióloga**

**PhD (cand.)**

**Codirector**

**DAGOBERTO ARRIETA PRIETO**

**Licenciado en Biología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2012**

*A la memoria de mi hermosa madre, LUZ MARINA SIERRA GUERRERO,  
quien sería la persona más feliz con este gran logro.  
A aquellos que, de una u otra forma, son el impulso de mi quehacer.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Catalino Hurtado, a Hermes Bautista y a Joaquín Olave, por la colecta de los especímenes. A Pedro Reynel y a Elizabeth Peña, por su hospitalidad en el sitio del muestreo. A María Fernanda Carreño y a Edinson Sánchez por su colaboración con el trabajo de campo. A Fernando Rondón por su respaldo en el permiso de pesca de investigación. A la Fundación Colombiana para la Investigación y Conservación de Tiburones y Rayas (SQUALUS), por proporcionar equipos y materiales para el desarrollo de esta investigación.

## RESUMEN

### TÍTULO

Madurez sexual de hembras de *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) de la ciénaga de Paredes (Santander, Colombia) \*

### AUTOR

Tania del Mar Pedreros Sierra \*\*

### PALABRAS CLAVES

Raya del río Magdalena, talla de madurez, estados de madurez, tracto reproductivo, histología.

### DESCRIPCIÓN

A partir de observaciones microscópicas y macroscópicas y de análisis de regresión, se establecieron seis estados de madurez sexual y se estimaron parámetros reproductivos de 49 hembras de *Potamotrygon magdalenae* colectadas en la ciénaga de Paredes, Santander, Colombia. En las hembras inmaduras, no se distinguen los ovarios, y la glándula oviducal y el útero son ligeramente más ensanchados que el oviducto anterior. En las hembras en maduración, son visibles los folículos hialinos sobre el órgano epigonal, la glándula oviducal y el útero se agrandan y se presentan en forma de barril. En las hembras maduras pre-gestantes, los folículos yemados son de varios tamaños y presentan un epitelio folicular de células cilíndricas y globosas; la glándula oviducal presenta dos zonas que se diferencian en la forma de las lamelas y en el patrón de secreción de los mucopolisacáridos. En las hembras preñadas, post-parto y en regeneración, se observan cuerpos lúteos y folículos atrésicos; además, en las primeras, los trofonemas uterinos están conformados por criptas secretoras de mucopolisacáridos neutros y lípidos, intercaladas con capilares. Durante todo el desarrollo, el ovario derecho es más reducido que el izquierdo, desarrolla pocos y pequeños folículos yemados, y puede presentar cuerpos lúteos. Los órganos reproductivos del lado izquierdo fueron significativamente de mayor tamaño que los del lado derecho. La talla mediana de madurez fue de 14.4 cm de ancho de disco (AD) y la de preñez de 17.8 cm AD. La hembra madura más pequeña midió 13.6 cm AD (52.8 % del AD máximo) y la hembra inmadura más grande 17.8 cm AD. La fecundidad uterina promedio fue de 2.9 crías y se observó una relación positiva entre la talla materna y el número de embriones. Este estudio sugiere que la estrategia reproductiva de *P. magdalenae* consiste de baja fecundidad, madurez sexual a tallas pequeñas y, probablemente, ciclo reproductivo continuo.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora: Paola A. Mejía Falla.

Codirector: Dagoberto M. Arrieta Prieto.

## ABSTRACT

### TITLE

Sexual maturity of female *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the Paredes floodplain (Santander, Colombia) \*

### AUTHOR

Tania del Mar Pedreros Sierra \*\*

### KEY WORDS

Magdalena river stingray, size at maturity, maturity stages, reproductive tract, histology.

### DESCRIPTION

From microscopic and macroscopic observations and regression analysis, the maturity stages and the reproductive parameters of 49 female *Potamotrygon magdalenae* collected in the Paredes floodplain, Santander, Colombia, were established and estimated. In immature female, the ovaries are indistinguishable, and the oviducal gland and the uterus are slightly wider than the anterior oviduct. In maturing female, the hyaline follicles are visible on the epigonal organ; the oviducal gland and the uterus are enlarged and appear in barrel form. In pregestant female, the yolk follicles show variety in size and exhibit a follicular epithelium composed of cylindrical and globed-shaped cells; the oviducal gland has two zones that differ in the shape of the lamellae and the pattern of mucopolysaccharides secretion. In pregnant, postpartum and regenerating females, the corpora lutea and atretic follicles are evident; moreover, in pregnant females, the uterine trophonemata are comprised of neutral mucopolysaccharides and lipid-secreting crypts, which appear alternating with capillaries. During development, the right ovary is smaller than the left, it develops few and small yolk-follicles and may have corpora lutea. The reproductive organs on the left side were significantly larger than those on the right side. The median maturity size was 14.4 cm of disc width (WD) and the median pregnancy size was 17.8 cm. The smallest mature female measured 13.6 cm WD (52.8% of maximum WD) and the largest immature female measured 17.8 cm WD. The mean uterine fecundity was 2.9 embryos and a positive relationship between the maternal size and the number of embryos was observed. This study suggests that the reproductive strategy of *P. magdalenae* consists of low fecundity, sexual maturity at small sizes and probably a continuous reproductive cycle.

---

\* Work degree

\*\* Faculty of Science. Biology Program. Advisor: Paola A. Mejía Falla. Coadvisor: Dagoberto M. Arrieta Prieto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción.....	14
1. Marco teórico.....	16
1.1 Modos reproductivos.....	16
1.2 Escalas de madurez sexual.....	16
1.3 Anatomía macroscópica del tracto reproductivo.....	17
1.4 Anatomía microscópica del tracto reproductivo.....	18
1.5 Madurez sexual en rayas de agua dulce. ....	20
1.6 Fecundidad uterina en rayas dulceacuícolas.....	22
2. Materiales y métodos.....	23
2.1 Área de estudio y colecta de ejemplares.....	23
2.2 Análisis macroscópico.....	23
2.3 Análisis histológico.....	24
2.4 Establecimiento de las escalas de madurez sexual.....	24
2.5 Estimación de las tallas de madurez y de preñez.....	25
2.6 Relación de la talla con la fecundidad y las estructuras reproductivas.....	26
3. Resultados.....	27
3.1 Descripción macroscópica.....	27
3.2 Descripción microscópica.....	31
3.2.1 Ovario.....	31
3.2.2 Oviducto anterior.....	39
3.2.3 Glándula oviducal.....	40
3.2.4 Útero.....	45
3.3 Tallas de madurez y de preñez.....	48
3.4 Relación de la talla con la fecundidad y las estructuras reproductivas.....	50

4. Discusión.....	52
5. Conclusiones.....	65
6. Referencias.....	66

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Escala de madurez sexual para hembras de <i>P. magdalenae</i> : consideraciones macroscópicas.....	29
<b>Cuadro 2.</b> Prueba pareada de Wilcoxon entre las estructuras izquierda y derecha del tracto reproductivo de hembras de <i>P. magdalenae</i> .....	31
<b>Cuadro 3.</b> Escala de madurez sexual para hembras de <i>P. magdalenae</i> : consideraciones microscópicas.....	34
<b>Cuadro 4.</b> Histoquímica de la glándula oviducal de <i>P. magdalenae</i> .....	45

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Tracto reproductivo de hembras de <i>P. magdalenae</i> en los diferentes estados de madurez sexual.....	28
<b>Figura 2.</b> Epitelio germinal, ovogonias, folículos primordial y primario.....	32
<b>Figura 3.</b> Folículos vitelogénicos.....	36
<b>Figura 4.</b> Folículos atrésicos en diferentes etapas de desarrollo.....	37
<b>Figura 5.</b> Cuerpos lúteos en diferentes etapas de desarrollo.....	38
<b>Figura 6.</b> Sección transversal del oviducto en los diferentes estados de madurez sexual de <i>P. magdalenae</i> .....	40
<b>Figura 7.</b> Sección longitudinal de la glándula oviducal en hembras inmaduras y en maduración de <i>P. magdalenae</i> .....	41
<b>Figura 8.</b> Sección longitudinal de la glándula oviducal en hembras maduras de <i>P. magdalenae</i> .....	43
<b>Figura 9.</b> Histoquímica de la glándula oviducal de <i>P. magdalenae</i> .....	44
<b>Figura 10.</b> Sección longitudinal y transversal del útero en los diferentes estados de madurez sexual de <i>P. magdalenae</i> .....	47

<b>Figura 11.</b> Trofonemas en sección transversal en hembras preñadas y post-parto de <i>P. magdalенаe</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> Ojivas de madurez y de preñez de las hembras de <i>P. magdalенаe</i> .....	49
<b>Figura 13.</b> Relación entre la talla materna y el número de embriones de <i>P. magdalенаe</i> .....	50
<b>Figura 14.</b> Relación entre el ancho del disco y el ancho de los órganos reproductivos del lado izquierdo, para las hembras de <i>P. magdalенаe</i> .....	51

## INTRODUCCIÓN

*Potamotrygon magdalenae* es una de las aproximadamente 22 especies de rayas de la familia Potamotrygonidae (Rosa *et al.*, 2010; Carvalho & Lovejoy, 2011; Silva & Carvalho, 2011), la cual se caracteriza por ser exclusiva de hábitats dulceacuícolas (Compagno & Cook, 1995; de Carvalho *et al.*, 2003) y por distribuirse en las diversas cuencas neotropicales (Rosa, 1985). Colombia posee ocho especies de rayas de agua dulce, destacándose *P. magdalenae* por ser endémica de las cuencas de los ríos Magdalena y Atrato (Araújo *et al.*, 2004; Charvet-Almeida & Pinto de Almeida, 2004; Mejía-Falla *et al.*, 2009).

*Potamotrygon magdalenae* se encuentra en la categoría “Casi Amenazada”, en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Por una parte, porque es la raya de mayor importancia ornamental a nivel nacional, con una alta tasa de exportación (Dahl, 1971; Araújo *et al.*, 2004); actividad en la cual no se ejerce ningún control o monitoreo (Charvet-Almeida & Pinto de Almeida, 2004). Por otra, y al igual que como sucede con otros potamotrigónidos, se considera que esta especie es susceptible a la contaminación y a la pesca dirigida e incidental (Charvet-Almeida & Pinto de Almeida, 2004), situaciones frecuentes en los cuerpos de agua que habitan. El Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de Tiburones, Rayas y Quimeras de Colombia, le asigna a *P. magdalenae* el grado de prioridad de acción “Muy Alto” y establece como una de las actividades de investigación a corto plazo en las diferentes cuencas del país, la biología e historia de vida de las especies mediante estudios de edad, crecimiento, reclutamiento, aspectos reproductivos y alimentarios, necesarios para diseñar e implementar planes de manejo y control en la extracción y comercialización de las rayas de interés ornamental y de consumo (Caldas *et al.*, 2010).

El conocimiento acerca de la biología de *P. magdalenae* y de las rayas de agua dulce en general, es muy reducido (Charvet-Almeida *et al.*, 2005; Mejía-Falla *et al.*,

2009; Caldas *et al.*, 2010). Basados en el único trabajo sobre la biología reproductiva de *P. magdalenae* (Teshima & Takeshita, 1992), se conoce que es una especie vivípara aplacentada y el tracto reproductivo de las hembras consiste de dos ovarios funcionales, un par de oviductos con ostia separados, un par de glándulas oviducales y un par de úteros. Adicionalmente, la especie presenta una fecundidad uterina de dos embriones por hembra, tallas de primera madurez sexual similares entre machos y hembras (17-19 cm AD y 17-21 cm AD, respectivamente) y tallas de nacimiento de aproximadamente 10 cm AD. Los autores sugieren que, posiblemente, *P. magdalenae* tiene una reproducción continua, debido a que colectaron embriones en diferentes estados de desarrollo durante el mismo tiempo de muestreo.

Con el fin de aportar elementos para la evaluación poblacional de la raya de interés ornamental *P. magdalenae*, este trabajo pretende ampliar el conocimiento acerca de la biología reproductiva de la especie, caracterizando la estructura macroscópica y microscópica del tracto reproductivo de las hembras, estableciendo una escala de madurez sexual y estimando las tallas mínima y mediana de madurez y de preñez y la relación entre la talla con la fecundidad uterina y las estructuras reproductivas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Modos reproductivos

Los elasmobranquios presentan dos modos de reproducción: ovíparidad y vivíparidad. Los vivíparos se clasifican en placentados y aplacentados, y dependiendo del patrón de nutrición embrionario, estos últimos se dividen en tres grupos, los que dependen exclusivamente de reservas vitelinas (viviparidad con saco vitelino), aquellos que se alimentan de huevos u otros embriones (viviparidad con oofagia y canibalismo intrauterino) y los que intercambian oxígeno y nutrientes a través de vellosidades uterinas o trofonemas entre la madre y las crías (viviparidad con trofonemas o histotrofia. Hamlett & Koob, 1999; Carrier *et al.*, 2004). Este último modo reproductivo es característico de todas las rayas de agua dulce (Wourms, 1977) y en general, de los Myliobatiformes (Rosa *et al.*, 2010). En estos organismos, los trofonemas son los encargados de producir y secretar la “leche uterina” o histótrofo (Wood-Mason & Alcock, 1891; Hamlett, 2005b) que, junto con las reservas vitelinas, aporta nutrientes a los embriones en desarrollo (Wood-Mason & Alcock, 1891; McMillan, 2007).

### 1.2 Escalas de madurez sexual

Los estados en las escalas de madurez sexual en batoideos vivíparos hembras han sido considerados como inmadura, en maduración, madura no preñada, madura preñada y madura post-parto (White *et al.*, 2001; Acero *et al.*, 2008; Grijalba-Bendeck *et al.*, 2008; Mejía-Falla *et al.*, 2012). Esta clasificación hace referencia al tamaño, aspecto y diferenciación de los ovarios, ovocitos, oviductos y glándulas oviducuales, a la presencia, aspecto y ubicación de los embriones, y al aspecto y al tamaño de los úteros.

Algunos autores (p.e. Barone *et al.*, 2007; Acero *et al.*, 2008) emplean las descripciones citológicas e histológicas como complemento para el establecimiento de los estados de madurez sexual. Se tienen en cuenta los tejidos

predominantes, así como el desarrollo de las células germinales y características de células somáticas acompañantes, como la forma, el tamaño, la ubicación y la cantidad.

### **1.3 Anatomía macroscópica del tracto reproductivo**

El aparato reproductor de las hembras de peces cartilagosos consiste de uno o dos ovarios y de un par de oviductos, seguidos por el cérvix y el seno urogenital. Cada oviducto está conformado por una región anterior que se inicia en un ostium, una región media o glándula oviducal, un istmo (en algunas especies) y una región posterior o útero (Hamlett & Koob, 1999; Walker, 2005; McMillan, 2007).

Las hembras de elasmobranquios pueden presentar ovarios externos o internos, dependiendo de la posición de éstos con respecto al órgano epigonal. En el primero, el ovario se ubica sobre este órgano y en el segundo, el órgano epigonal rodea completamente a cada gónada (Pratt, 1988). En hembras inmaduras, los ovarios son pequeños y de textura gelatinosa; los ovocitos son muy reducidos o no están diferenciados, al igual que las glándulas oviducal y los oviductos son bastante estrechos (Walker, 2005). Durante el proceso de maduración, estos órganos aumentan de tamaño y en los ovarios, los ovocitos comienzan a almacenar reservas vitelinas. Una vez ocurre la ovulación, los ovocitos son atraídos al ostium por acción ciliar desde la cavidad peritoneal; la fertilización y encapsulación completa o parcial (dependiendo del modo de reproducción de la especie) se da en la glándula oviducal (Walker, 2005). Esta última, se presenta altamente diferenciada y desarrollada en especies ovíparas, al igual que el útero en especies vivíparas. La pared uterina es gruesa, esponjosa y vascular durante la gestación temprana, pero a medida que avanza, la pared se vuelve delgada, transparente y muy vascularizada (Walker, 2005).

#### 1.4 Anatomía microscópica del tracto reproductivo

En hembras maduras el ovario está compuesto de folículos pequeños, en desarrollo, preovulatorios y cuerpos lúteos embebidos en un estroma de tejido conectivo. Cada folículo, sostenido por una membrana basal, está conformado por un ovocito, el epitelio folicular y la teca. El ovocito posee plasmalema y zona pelúcida, como envolturas externas (Walker, 2005). En las rayas marinas *Narcine bancroftii*, *Rhinobatos percellens*, *Urotrygon venezuelae* y *Dasyatis guttata*, el desarrollo gonadal microscópico fue dividido en cuatro estados, los cuales se relacionan con la transformación de las células foliculares y la aparición de las capas que rodean al ovocito y la formación de las plaquetas vitelinas (Acero *et al.*, 2008). Teshima & Takeshita (1992) describen los ovocitos maduros de *P. magdalenae*, rodeados por la zona pelúcida, un estrato de células epiteliales cilíndricas y las tecas interna y externa. En esta especie, así como en *Urobatris jamaicensis*, el epitelio folicular se pliega hacia el ovocito; sin embargo, en ésta última, la envoltura tecal es una sola (Teshima & Takeshita, 1992; Hamlett *et al.*, 1999a). En hembras de *P. magdalenae* entre 15 y 35 cm de ancho de disco, el diámetro de los ovocitos está comprendido entre 0.5 y 2.5 cm, mientras que en hembras con ancho de disco menor a 15 cm, los ovocitos son muy reducidos (Teshima & Takeshita, 1992).

La pared del oviducto presenta las capas mucosa, submucosa, muscular y adventicia (McMillan, 2007). El epitelio luminal es plegado y sus células pueden ser planas, cúbicas o cilíndricas, con o sin cilios (McMillan, 2007); en *Sympterygia acuta*, se observan además, células glandulares con citoplasma PAS/AB (+) (Galíndez & Estecondo, 2008).

La glándula oviducal se compone de numerosas unidades glandulares tubulares simples, productoras de secreciones mucosas, serosas y proteicas (Hamlett *et al.*, 1998, 2005a; Galíndez *et al.*, 2010; Serra-Pereira *et al.*, 2011). De acuerdo con el modo reproductivo y el patrón de nutrición embrionario de cada especie, la

estructura de la glándula oviducal puede ser más o menos compleja (Hamlett & Koob, 1999). En general, está conformada por cuatro zonas bien definidas, denominadas *club*, *papillary*, *baffle* y *terminal*, designaciones que hacen referencia a la forma de las lamelas o prolongaciones de la mucosa y a la posición dentro de la glándula (Hamlett *et al.*, 1998, 2005a; Hamlett & Koob, 1999). Las zonas *club* y *papillary* presentan lamelas en forma de T y de papilas, respectivamente, y producen las envolturas de gelatina que rodean al embrión. La zona *baffle* se caracteriza por presentar una proyección epitelial adicional a los lados de cada lamela; esta zona secreta las envolturas proteicas que van desde cápsulas endurecidas a membranas muy delgadas y flexibles. La zona *terminal* hace referencia a su posición caudal y no presenta lamelas, almacena espermatozoides y produce los filamentos externos de la cápsula en algunas especies ovíparas, los cuales le permiten a los huevos adherirse a las superficies (Hamlett *et al.*, 1998, 2005a). En hembras de *Raja clavata*, la madurez sexual fue clasificada en cuatro estados: inmaduro, en desarrollo, maduro y en desove activo. Durante la fase media del estado en desarrollo, se diferencian completamente las zonas de la glándula oviducal y en los últimos estados aumenta el área de superficie de cada zona y el grosor y la longitud de los túbulos glandulares (Serra-Pereira *et al.*, 2011).

El útero en las especies ovíparas es el órgano en el cual se lleva a cabo la esclerotización y pigmentación de la cáscara de los huevos. En su parte interna, presenta pliegues delimitados por criptas secretoras y cilios que disminuyen en número desde la región anterior a la posterior del útero; en este mismo sentido, la vascularización y el ancho de la muscularis incrementan (Hamlett & Koob, 1999). En el tiburón vivíparo aplacentar con saco vitelino *Squalus acanthias*, la mucosa del útero está conformada por pliegues longitudinales; durante la preñez, la pared uterina consiste de dos capas de células epiteliales, la lámina basal, un sistema ramificado de capilares yuxtaepiteliales, una región de tejido conectivo con fibras reticulares y una capa muscular bien desarrollada (Jollie & Jollie, 1967). En

*Dasyatis americana*, una raya vivípara aplacental con histotrofia, el epitelio de los trofonemas uterinos forma un patrón digitiforme con un vaso sanguíneo en la parte central. En las hembras que contienen huevos fertilizados, el epitelio del útero es cúbico, mientras que en aquellas con embriones a término, el epitelio es plano (Hamlett *et al.*, 1996). En las especies vivíparas placentadas, el útero y el saco vitelino forman el complejo uteroplacentar, que en los tiburones *Carcharhinus plumbeus*, *C. acronotus* y *Rhizoprionodon terraenovae*, presenta dos segmentos, uno liso y escasamente vascularizado que se caracteriza por producir esteroides, y otro que es muy vascularizado y permite el transporte de nutrientes (Gilmore *et al.*, 2005).

### **1.5 Madurez sexual en rayas de agua dulce**

En la Tabla 1 se muestra la talla (ancho del disco) a la cual las hembras de varias especies de rayas de agua dulce, pertenecientes a la familia Potamotrygonidae, alcanzan la madurez sexual; así como el porcentaje de dichas tallas con respecto al ancho máximo del disco.

La Tabla 1 revela que en cinco de las nueve especies consideradas, la talla de primera madurez sexual se alcanza, aproximadamente, al 50% de su talla máxima (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon constellata*, *P. magdalenae*, *P. motoro* y *P. scobina*); mientras que en las otras, la madurez ocurre por encima del 70% de su ancho de disco máximo (*Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi*, *P. schroederi* y *Potamotrygon* sp.).

Tabla 1. Talla de primera madurez (ancho de disco, AD) de hembras de especies de la familia Potamotrygonidae, en las diferentes cuencas en las cuales se realizó el estudio y su porcentaje con respecto al ancho máximo del disco.

Especie	Cuenca-País	AD de madurez (cm)	AD máx. (cm)	Referencias	Porcentaje
<i>Paratrygon aiereba</i>	Orinoco-Venezuela	37.0	78.0	Lasso <i>et al.</i> (1996)	47.4%
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Amazonas-Brasil	50.0	65.0	Charvet-Almeida (2001); Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)	76.9%
<i>Potamotrygon constellata</i>	Amazonas-Brasil y Colombia	35.0-45.0	62.0	Thorson <i>et al.</i> (1983)	56.4-72.6%
<i>Potamotrygon magdalenae</i>	Magdalena-Colombia	17.0	35.7	Teshima & Takeshita (1992)	47.6%
<i>Potamotrygon motoro</i>	Amazonas-Colombia	24.0-32.0	54.5	Thorson <i>et al.</i> (1983)	44.0-58.7%
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Orinoco-Venezuela	29.5	32.5	Lasso <i>et al.</i> (1996)	90.8%
<i>Potamotrygon schroederi</i>	Amazonas-Brasil	44.0	54.0	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005); Araujo (2009)	81.5%
<i>Potamotrygon scobina</i>	Amazonas-Brasil	40.0	69.1	Almeida (2003); Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)	57.9%
<i>Potamotrygon</i> sp.	Golfo de Paria y Orinoco-Venezuela	21.4	27.6	Rodríguez-Guerra <i>et al.</i> (2007)	77.5 %

## 1.6 Fecundidad uterina en rayas dulceacuícolas

La fecundidad uterina de la familia Potamotrygonidae difiere entre especies y puede ir de 1 a 21 embriones por hembra (Tabla 2). *Plesiotrygon iwamae*, *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon magdalenae*, *P. orbignyi*, *P. schroederi* y *Potamotrygon* sp. C, presentan la fecundidad uterina más baja (entre 1 y 5), mientras que *P. brachyura* y *P. motoro* pueden tener hasta 19 y 21 embriones, respectivamente.

Tabla 2. Fecundidad uterina en especies de la familia Potamotrygonidae.

Especie	Cuenca-País	Fecundidad uterina (promedio)	Referencias
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Amazonas-Brasil	1-4 (2)	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Paratrygon aiereba</i>	Amazonas-Brasil	2	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Potamotrygon brachyura</i>	Del Plata-Argentina	19	Achenbach & Achenbach (1976)
<i>Potamotrygon constellata</i>	Amazonas-Brasil y Colombia	4-11 (7)	Thorson <i>et al.</i> (1983)
<i>Potamotrygon magdalenae</i>	Magdalena-Colombia	2	Teshima & Takeshita (1992)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Amazonas-Brasil y Colombia	6-7 (6) 4-11 (7) 21	Thorson <i>et al.</i> (1983) Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005) Almeida (2008)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Amazonas-Brasil	1-5 (2)	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Potamotrygon schroederi</i>	Amazonas-Brasil	1-3 (2)	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Potamotrygon scobina</i>	Amazonas-Brasil	1-16 (6)	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Potamotrygon</i> sp. C	Amazonas-Brasil	1-5 (2)	Charvet-Almeida <i>et al.</i> (2005)

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudio y colecta de ejemplares**

Se realizaron monitoreos de pesca artesanal cada dos meses entre agosto de 2010 y septiembre de 2011, en la ciénaga de Paredes (73°45'-73°49'W y 7°26'-7°29'N), con autorización del Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER), entidad que otorgó el permiso de pesca de investigación. Esta ciénaga pertenece al valle medio de la cuenca del río Magdalena y se encuentra ubicada en el departamento de Santander (Colombia) entre los municipios de Sabana de Torres y Puerto Wilches. La colecta se realizó con la colaboración de pescadores locales, los cuales utilizan como artes de pesca la atarraya y el trasmallo (2 m de alto, 300 m de ancho y 8.1 cm de ojo de malla). Una vez capturados los ejemplares, se pusieron en recipientes con agua, a la que se le agregó una dosis letal de roxicaina al 1%.

### **2.2 Análisis macroscópico**

A cada individuo se le midió el AD y la longitud total (LT) y mediante disección de la región medio-ventral, se extrajo el tracto reproductivo. Se determinó la coloración, tamaño, forma y/o consistencia de los ovarios y los folículos ováricos, de los úteros, los oviductos y las glándulas oviducuales. Se realizaron medidas de la longitud y el ancho de cada órgano, así como del diámetro del folículo ovárico más grande, y de la talla y del peso de las crías cuando fue posible. Con el fin de evaluar la funcionalidad de los órganos reproductivos de cada lado (izquierdo y derecho), se realizaron pruebas pareadas de Wilcoxon con cada medida (longitud y ancho), asumiendo dependencia entre las mismas. Inicialmente, se consideraron como hembras inmaduras a aquellas con órganos apenas visibles o poco desarrollados y como hembras maduras, a aquellas con estructuras bien desarrolladas y con folículos yemados y/o embriones. La descripción del tracto reproductivo de las hembras maduras post-parto sólo fue posible a partir de

hembras con embriones en los últimos estados de desarrollo y que presentaron abortos espontáneos.

Las mediciones se realizaron con un calibrador Digital Mitutoyo serie 0104692 y el peso de las crías se determinó con un dinamómetro Ohaus Modelo 8261-M de 100g. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Cannon PowerShot SX30 IS 14.1MP.

### **2.3 Análisis histológico**

Las muestras fueron fijadas en formaldehído 10%, deshidratadas en una serie ascendente de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en Paraplast (Mc Cormick ®), siguiendo el protocolo de Gray (1952). Se realizaron cortes de 5 µm de espesor en la porción media de cada órgano (en la mayoría de los casos sólo los del lado izquierdo), con micrótopo rotatorio 820 Spencer. Se usaron las técnicas de coloración hematoxilina-eosina (HE), según Gray (1952), y ácido peryódico de Schiff (PAS)-azul de Alcian (AB) pH 2.5 de acuerdo con Luna (1968), con reducciones en el tiempo de exposición de las muestras en agua corriente. Las microfotografías se obtuvieron con una cámara digital Olympus Stylus 1010 10.1MP.

### **2.4 Establecimiento de las escalas de madurez sexual**

Se establecieron dos escalas de madurez sexual, una con las observaciones microscópicas y otra, con las macroscópicas. Esta última, bajo dos aproximaciones: en la primera, se consideraron todas las estructuras del tracto reproductivo en conjunto y se tomaron como referencia los estados descritos por White *et al.* (2001), López (2009) y Mejía-Falla *et al.* (2012) para otras especies de rayas, también de viviparidad matrotrofica; y en la segunda, la cual está basada en la propuesta de Walker (2005), se asignó un índice a cada estructura reproductiva (Ovario, O; Glándula oviducal, G; Útero, U) con su respectiva descripción y estado de madurez. De esta manera, el índice del ovario se elaboró con base en la

presencia y la coloración de los folículos ováricos (O=1-4; Cuadro 1), el índice de la glándula oviducal en el color, la forma y la consistencia (G=1-3; Cuadro 1) y el índice del útero en la apariencia, el tamaño, el contenido y el color (U=1-5; Cuadro 1) del mismo. Por ejemplo, para el ovario, el índice O=1 corresponde a la ausencia de folículos, O=2 a la presencia de folículos hialinos, O=3 a la observación de folículos yemados y O=4 a la aparición de cuerpos lúteos.

Una vez definidos los estados de madurez sexual a nivel macroscópico, se realizaron las descripciones microscópicas correspondientes a cada estado previamente establecido.

## **2.5 Estimación de las tallas de madurez y de preñez**

La talla mínima de madurez se estimó considerando la hembra madura y la hembra preñada más pequeñas y la hembra inmadura más grande. La talla mediana de madurez sexual ( $AD_{50}$ ) se estimó mediante la frecuencia del ancho del disco (AD) a la cual el 50% de las hembras están maduras (Joung & Chen, 1995; Liu *et al.*, 1999). Para esto, se asignó un valor en escala binomial (1-maduro, 0-inmaduro) a cada hembra, teniendo en cuenta los análisis macroscópicos y microscópicos de todo el tracto reproductivo y de cada órgano por separado. Se usó el modelo logístico de la forma:

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-b(AD_i - AD_{50})}}$$

donde  $Y$  es la proporción de individuos maduros al AD,  $AD_i$  es la talla a la clase  $i$  y  $b$  es el parámetro del modelo. Este modelo se fijó usando una regresión logística de mínimos cuadrados. De igual forma se estimó la talla mediana de preñez, pero en este caso, a las hembras grávidas se les asignó el valor de 1 y a las no grávidas de 0.

## 2.6 Relación de la talla con la fecundidad y las estructuras reproductivas

La fecundidad uterina promedio fue determinada sumando el número de embriones en cada hembra preñada y dividiendo por el número de éstas. En presencia de abortos, se contaron los sacos vitelinos que aun permanecían en los úteros.

Para observar el efecto de la talla materna sobre la reproducción, se graficó el número de embriones vs el AD de las hembras preñadas, mediante un análisis de regresión lineal (Walker, 2005). Así mismo, se analizó la relación del ancho de disco de todas las hembras con el ancho de cada órgano reproductivo (ovario, oviducto anterior, útero y glándula oviducal), mediante una ecuación una logística modificada, siguiendo a Mejía-Falla *et al.* (2012):

$$L_i = \min L + \frac{\max L - \min L}{1 + e^{b(a-ADi)}}$$

donde  $a$  es el punto de inflexión, y  $\min L$  y  $\max L$  son el valor más bajo y más alto del ancho de cada órgano reproductivo, respectivamente. Este último análisis fue realizado con las estructuras del lado izquierdo del tracto reproductivo, por ser consideradas más informativas, dada su mayor funcionalidad.

Todos los anteriores análisis se efectuaron en el programa Statistica 8.0. El material de soporte fue incluido en la colección de peces de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia).

### 3. RESULTADOS

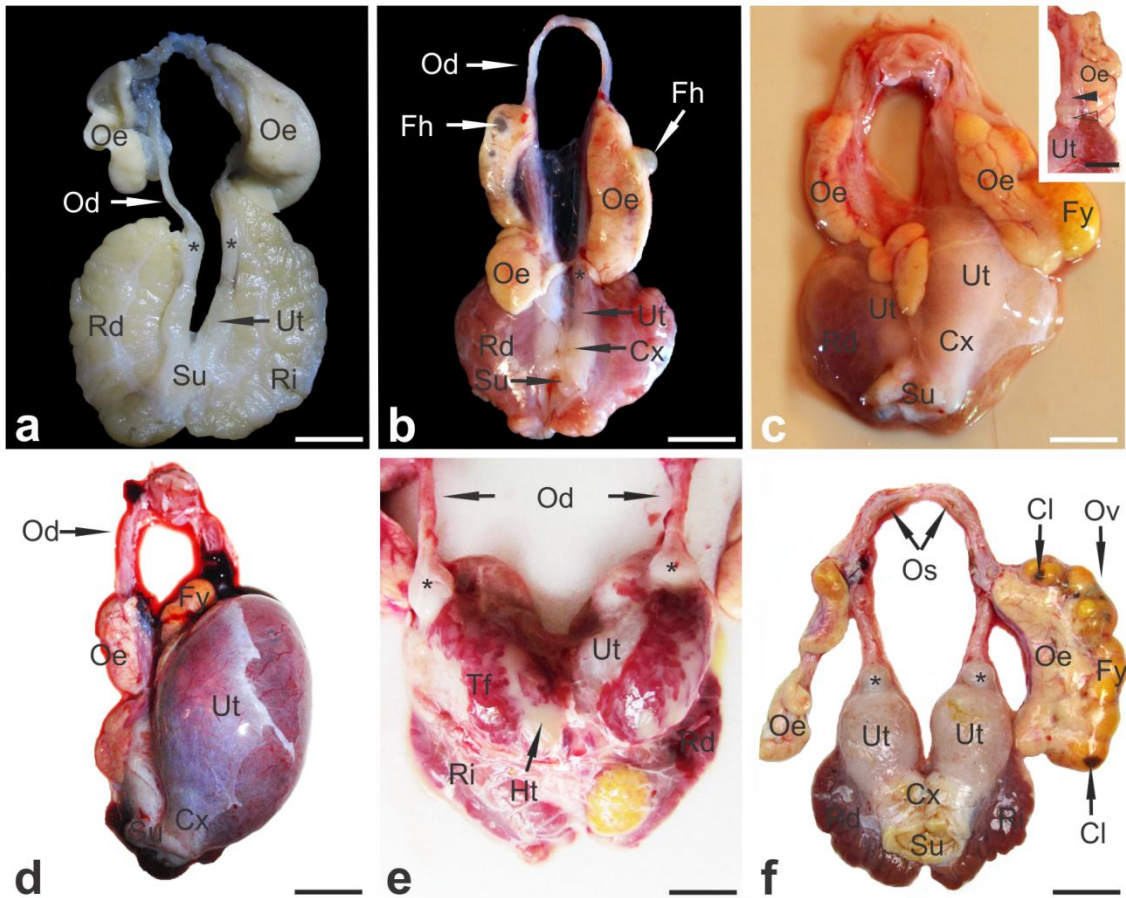
Se capturaron un total de 49 hembras de *P. magdalanae*, con tallas entre 8.0 y 41.5 cm (promedio  $\pm$  SD =  $15.9 \pm 6.5$ ) de AD y entre 18.8 y 82.5 cm ( $35.6 \pm 18.5$ ) de LT. Sus pesos totales variaron entre 23 y 3500g ( $340.9 \pm 575.6$ ).

#### 3.1 Descripción macroscópica

El tracto reproductivo de las hembras está conformado por dos ovarios y dos oviductos (Figura 1a-d,f). Cada oviducto consta de una porción anterior que se inicia en el ostium, una porción media o glándula oviducal y una porción posterior o útero (Figura 1f); los dos ostia están conectados a través de un puente membranoso. A continuación de cada útero se encuentra el cérvix uterino; los cuales confluyen en el seno urogenital. Asociado a lo largo de cada ovario, se encuentra el órgano epigonal (Figuras 1a-f); estos últimos, convergen en su región caudal, por debajo del útero (Figuras 1b,c).

En las hembras inmaduras (Figura 1a; Cuadro 1) no se observan ovarios a simple vista; en lugar de éstos, es evidente el órgano epigonal de cada lado. Éstos se presentan alargados, son de textura gelatinosa, aplanados y amarillentos; el izquierdo ligeramente de mayor tamaño. Los oviductos son muy estrechos y flácidos. La glándula oviducal y el útero son ligeramente más ensanchados que la región anterior del oviducto, pero no hay distinción entre el útero y el cérvix.

Figura 1. Tracto reproductivo de hembras de *P. magdalanae* en los diferentes estados de madurez sexual. **a)** Hembra inmadura. **b)** Hembra en maduración. **c)** Hembra madura pre-gestante. **d)** Hembra preñada. **e)** Hembra post-parto. **f)** Hembra en redrudescencia. Oe, órgano epigonal; Od, oviducto anterior; Os, ostium; Ov, ovario; Fh, folículo hialino; Fy, folículo yemado; Cl, cuerpo lúteo; Ut, útero; Cx, cérvix; Su, seno urogenital; Tf, tronfomas; Ht, histótrofo; Rd, riñón derecho; Ri, riñón izquierdo; asterisco, glándula oviducal; cabeza de flecha sólida, zona anterior hialina de la glándula oviducal; cabeza de flecha vacía, zona posterior de color blanco de la glándula oviducal. Reglillas: **a)** 0.5 cm; **b)** 0.8 cm; **c)** 1 cm, detalle 0.6 cm; **d)** 0.9 cm; **e)** 1.1 cm; **f)** 1.6 cm.



Cuadro1. Escala de madurez sexual para hembras de *P. magdalenae*: consideraciones macroscópicas.

Estado	Ovario	Oviducto anterior, Glándula oviducal y Útero	Indice
<b>Inmadura</b>	No se observa a simple vista.	Oviductos estrechos, flácidos y pareados. La glándula oviducal y el útero son ligeramente más ensanchados que el oviducto anterior. No hay distinción del cérvix.	O=1, G=1, U=1
<b>En maduración</b>	Folículos hialinos fácilmente visibles, ubicados generalmente en la región dorsal de uno o ambos ovarios.	Glándula oviducal y útero agrandados y parcialmente rígidos. Se distingue el cérvix del útero.	O=2, G=2, U=2
<b>Madura pre-gestante</b>	Ovocitos de diversos tamaños sostenidos por una pared ovárica muy delgada y transparente. Próximos a éstos se observa tejido epigonal, el cual es ligeramente amarillo y de aspecto denso. Generalmente, solo se observan folículos en el ovario izquierdo; cuando se presentan en el ovario derecho, éstos son escasos.	Los oviductos adquieren mayor diámetro y rigidez. Generalmente el útero izquierdo es de mayor tamaño que el derecho. La glándula oviducal se presenta hialina en el tercio anterior y blanca en la región posterior.	O=3, G=3, U=3
<b>Madura preñada</b>	Numerosos folículos yemados de diversos tamaños en el ovario izquierdo, así como	Úteros con embriones, voluminosos, de paredes gruesas y de color rojo oscuro. Abundante histótrofo.	O=4, G=3, U=4
<b>Madura post-parto</b>	folículos atrésicos y cuerpos lúteos de color anaranjado y negro. El ovario derecho permanece con escasos ovocitos yemados	Úteros sin embriones, voluminosos, de paredes gruesas y de color rojo oscuro.	O=4, G=3, U=5
<b>Madura en recrudescencia</b>	y de tamaño reducido, o sin éstos.	Úteros sin embriones, un poco rígidos, de color rosado y en ocasiones, el útero izquierdo de mayor tamaño que el derecho.	O=4, G=3, U=3

En las hembras en el Estado en maduración (Figura 1b; Cuadro 1) se observan los ovarios, generalmente en la región dorsal del órgano epigonal, destacándose pequeños folículos hialinos. Los oviductos adquieren mayor grosor y se evidencian las regiones que corresponden al oviducto anterior, la glándula oviducal, el útero y el cérvix. La región anterior del oviducto es tubular y recta, mientras que los tres órganos restantes presentan forma de barril, son parcialmente rígidos y de dimensiones similares.

En las hembras maduras pre-gestantes (Figura 1c; Cuadro 1), el tamaño de los ovarios aumenta (en especial el ovario izquierdo), así como el órgano epigonal. En el ovario izquierdo se observan folículos hialinos y yemados de diversos tamaños, sostenidos por una pared ovárica delgada y transparente. En los casos en que se presentan folículos en el ovario derecho, éstos son escasos y pequeños. El diámetro y la longitud de los oviductos aumentan, en especial las regiones correspondientes al útero; éstos se presentan rígidos y el izquierdo, generalmente con mayores dimensiones que el derecho. La glándula oviducal es hialina en el tercio anterior y blanca en la región posterior (detalle de la Figura 1c).

En las hembras preñadas, post-parto y en recrudescencia (Figuras 1d-f; Cuadro 1), el ovario derecho se mantiene reducido y puede contener pequeños y escasos folículos. Por su parte, el ovario izquierdo presenta numerosos folículos hialinos y yemados de diversos tamaños (el diámetro máximo registrado fue de 2.4 cm en una hembra preñada), los cuales pueden ser clasificados de dos a cinco grupos (rango establecido por observación a simple vista); además, contiene folículos atrésicos y cuerpos lúteos, los cuales se observan como masas pequeñas anaranjadas y negras. Se evidencian dos o más folículos por tamaño. En presencia de embriones (Figura 1d), el o los úteros están dilatados, son de pared delgada o gruesa (dependiendo del estado de desarrollo de los embriones) con abundante “leche úterina” o histótrofo y de color rojo oscuro; además, en las nueve hembras preñadas, el útero izquierdo alojaba más embriones cuando eran varios o

al único, cuando estaba presente sólo un embrión. En ausencia de embriones, los úteros son flácidos o presentan cierto grado de rigidez, también de color rojo oscuro (Estado post-parto; Figura 1e) o de color rosado (Estado en recrudescencia; Figura 1f) y en ocasiones, el útero izquierdo de mayor tamaño que el derecho.

Las pruebas pareadas de Wilcoxon indicaron que todos los órganos reproductivos del lado izquierdo (a excepción del oviducto anterior), difieren significativamente de los del lado derecho, tanto en longitud como en ancho, siendo de mayor tamaño los del lado izquierdo (Cuadro 2). Las medidas de los ovarios y los úteros fueron las de mayor variación, contrario a lo sucedido con las medidas de la glándula oviducal.

Cuadro 2. Prueba pareada de Wilcoxon (**Z**) entre las estructuras izquierda y derecha del tracto reproductivo de las hembras de *P. magdalanae*. Valores **P** marcados con asterisco indican diferencias significativas. Me, valores de la mediana.

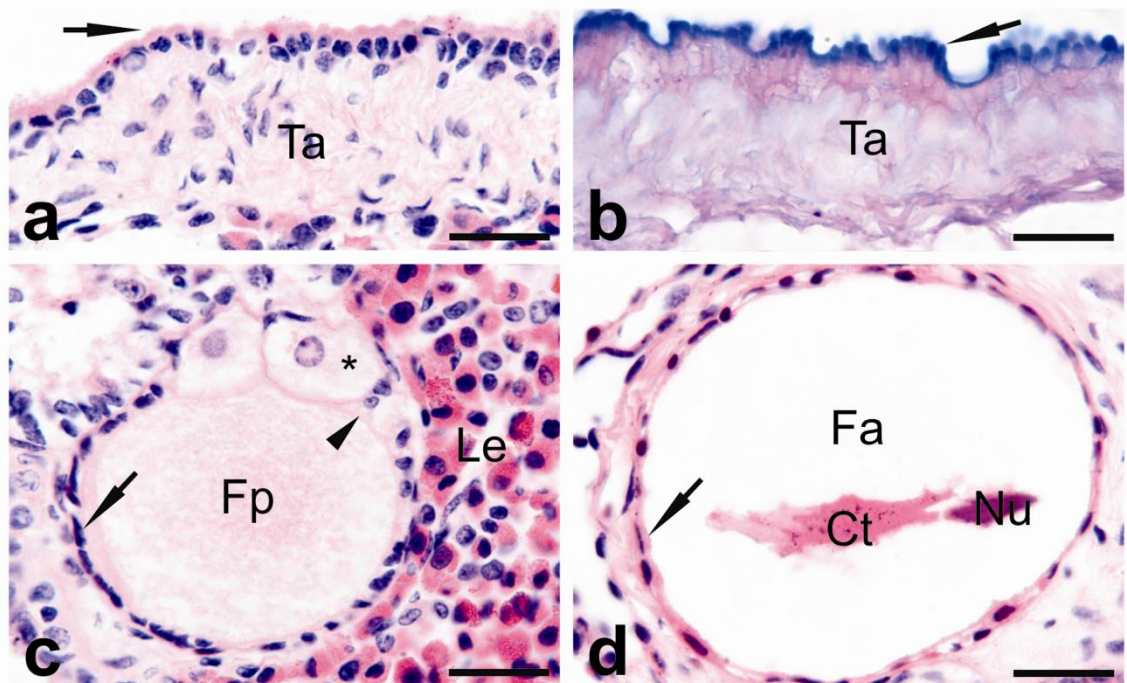
<b>Variables</b>	<b>Me.Izq.</b>	<b>Me.Der.</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
Ancho de ovarios	0.990	0.520	39	0.0	5.373	<0.001*
Longitud de ovarios	2.400	1.800	40	3.0	5.471	<0.001*
Ancho de oviductos anteriores	0.160	0.190	40	39.5	1.164	0.244
Longitud de oviductos anteriores	2.795	3.050	39	33.0	2.868	0.004*
Ancho de glándulas oviducal	0.400	0.390	38	60.0	2.372	0.018*
Longitud de glándulas oviducal	0.590	0.550	37	29.5	3.300	0.001*
Ancho de úteros	0.900	0.650	32	14.0	3.397	0.001*
Longitud de úteros	1.795	1.250	33	19.0	3.490	<0.001*

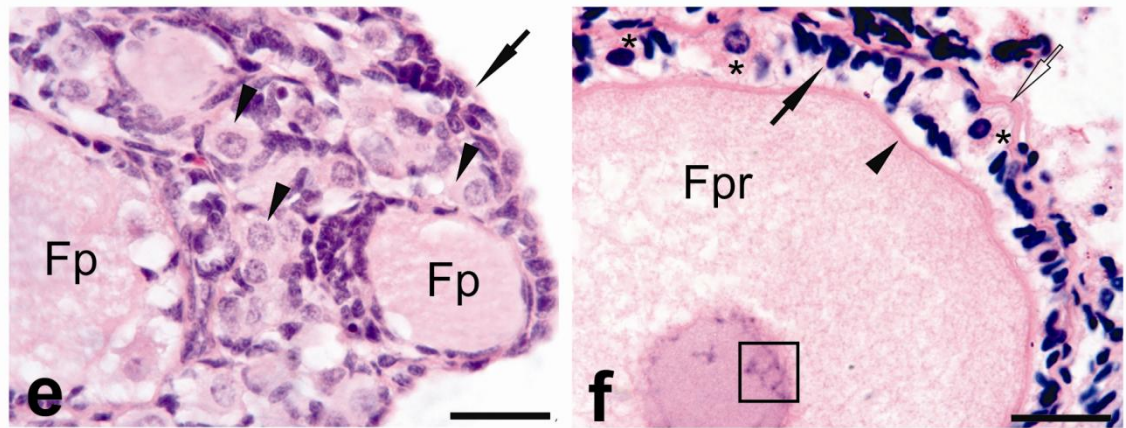
### **3.2 Descripción microscópica**

**3.2.1 Ovario.** Los ovarios derecho e izquierdo de *P. magdalanae* presentan un epitelio germinal cúbico simple de superficie festoneada, con células de citoplasma apical AB (+)/PAS (+) debido a la presencia de mucopolisacáridos ácidos y neutros, respectivamente. Subyacente a éste, se encuentra la túnica albugínea, la

cual varía en espesor con el grado de madurez (Figuras 2a-b). Poseen estroma ovárico escaso y asociado a cada uno se encuentra el órgano epigonal, rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso e integrado por abundantes vasos sanguíneos y leucocitos. En ocasiones, agrupaciones de estas células se encuentran dispersas en el estroma, próximas a los folículos ováricos (Figura 2c).

Figura 2. Epitelio germinal, ovogonias, folículos primordial y primario. Epitelio germinal cúbico simple de superficie festoneada (cabeza de flecha) con las técnicas **a)** HE y **b)** PAS/AB en hembras preñadas; Ta, túnica albugínea de tejido conectivo denso. **c)** Folículo primordial (Fp) con membrana vitelina (cabeza de flecha), células foliculares planas a cúbicas (flecha) y células esféricas voluminosas (asterisco); Le, leucocitos junto al folículo. HE. **d)** Folículo primordial atrésico (Fa) con ovocito colapsado, se observan remanentes del núcleo (Nu) y del citoplasma (Ct); flecha, células foliculares de núcleos aplanados y condensados. HE. **e)** ovogonias (cabeza de flecha) y folículos primordiales (Fp) subyacentes al epitelio germinal (flecha). HE. **f)** Folículo primario (Fpr) con membrana vitelina (cabeza de flecha) y epitelio folicular sostenido por la membrana basal (flecha vacía); el epitelio está integrado por células cúbicas a cilíndricas (flecha sólida), con extensiones celulares, y células esféricas voluminosas (asterisco); recuadro, núcleo del ovocito con cromosomas en cepillo. Reglillas: **a)** 36  $\mu\text{m}$ ; **b)** 24  $\mu\text{m}$ ; **c)** 27  $\mu\text{m}$ ; **d)** 33  $\mu\text{m}$ ; **e)** 40  $\mu\text{m}$ ; **f)** 27  $\mu\text{m}$ .





En las hembras inmaduras y en maduración (Figura 2c-f; Cuadro 3), se observan folículos primordiales, primarios y previtelogénicos funcionales y atrésicos. Los folículos primordiales se componen del ovocito con o sin membrana vitelina, de un estrato simple de células foliculares planas a cúbicas y unas pocas células esféricas voluminosas, y de una lámina basal delgada (Figura 2c). La atresia en estos folículos se manifiesta por la presencia de ovocitos colapsados o ausencia de los mismos y granulosa con células de núcleos aplanados y condensados (Figura 2d). En uno de los ejemplares inmaduros, se observaron ovogonias asociadas con células foliculares (Figura 2e).

En los folículos primarios, las células foliculares son cúbicas a cilíndricas y forman un epitelio estratificado con extensiones celulares proyectadas hacia la membrana vitelina (Figura 2f). En los folículos previtelogénicos, la granulosa es estratificada y de células foliculares cilíndricas. Adicionalmente, hay diferenciación de tecas interna y externa y en el núcleo de los ovocitos se pueden visualizar los cromosomas en cepillo, así como en el núcleo de los ovocitos presentes en los folículos primordiales y primarios (Figura 2f).

Cuadro 3. Escala de madurez sexual para hembras de *P. magdalenae*: consideraciones microscópicas.

Estado	Ovario	Oviducto anterior	Glándula oviducal	Útero
<b>Inmadura</b>	Folículos primordiales, primarios, previtelogénicos y	Ligeros plegamientos del epitelio. Lámina propia reducida.	Epitelio cilíndrico pseudoestratificado de superficie recta o formando lamelas cortas.	Epitelio cúbico a cilíndrico simple, organizado en cortas prolongaciones fungiformes. Lamina propia de tejido mesenquimal. Capa interna de musculatura visceral de disposición circular y otra externa longitudinal; ambas reducidas.
<b>En maduración</b>	atrésicos embebidos en un estroma escaso.	Plegamientos epiteliales cortos. Lamina propia de aspecto denso y de mayor grosor.	Epitelio compuesto por unidades glandulares poco profundas y lamelas uniformes.	Prolongaciones epiteliales filiformes y elongadas con epitelio cilíndrico simple. Lámina propia más diferenciada y vascularizada. Capas musculares de mayor grosor.
<b>Madura pre-gestante</b>	Folículos primordiales, primarios, previtelogénicos, vitelogénicos y atrésicos	Plegamientos elongados del epitelio; presencia de células ciliadas de núcleo apical y células secretoras de núcleo basal. Lámina propia prominente y muy vascularizada.	Epitelio compuesto por unidades glandulares profundas, provistas de células secretoras y de células ciliadas. Las lamelas de la zona anterior tienen forma de T y las de la posterior, son digitiformes.	<b>Pre-gestante y en recrudescencia:</b> Largos trofonemas provistos de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, una lámina propia de tejido conectivo areolar con haces longitudinales de musculatura lisa y abundantes capilares. Muscular y adventicia prominentes; esta última, organizada en una capa interna amplia de tejido conectivo laxo y una capa externa de tejido conectivo denso.
<b>Madura preñada</b>	Folículos primordiales, primarios, previtelogénicos, vitelogénicos, atrésicos y postovulatorios.	Adventicia con abundantes haces de colágeno, fibroblastos y fibras musculares lisas.		<b>Preñada y post-parto:</b> Epitelio de los trofonemas dispuesto en numerosas criptas que se alternan con capilares de diámetros variables.
<b>Madura post-parto</b>				
<b>Madura en recrudescencia</b>				

Alcanzada la madurez (Figuras 3-4; Cuadro 3), además de los folículos descritos, se observan folículos vitelogénicos (Figura 3) y atrésicos (Figura 4) en diferentes etapas de desarrollo. Los folículos vitelogénicos se componen del ovocito con membrana vitelina y plaquetas, granulosa estratificada lisa (Figura 3a) o plegada (Figura 3b) con extensiones celulares, lámina basal, teca interna vascularizada y teca externa (Figura 3c). En las células esféricas voluminosas es posible observar plaquetas vitelinas y depósitos que podrían corresponder a lípidos (detalle de la Figura 3b y Figura 3c). A medida que avanza la foliculogénesis, estas células disminuyen en número y la cantidad y el tamaño de las plaquetas vitelinas del ovocito aumentan. La atresia de los folículos previtelogénicos y vitelogénicos, está dada por un colapso generalizado del ovocito, de las capas tecales y de la granulosa (Figura 4); la muerte celular es evidente en estas últimas, con la fragmentación y la condensación del núcleo (Figuras 4a-b). En otras etapas de la atresia, la teca se hipertrofia y presenta tejido conectivo cicatrizal; la granulosa es amplia e invade la cavidad folicular (Figura 4c). En los folículos vitelogénicos atrésicos se observan remanentes de las plaquetas vitelinas, fagocitadas por las células foliculares y por células fagocíticas de la sangre (Figura 4d). También se puede observar invasión de la granulosa por los granulocitos y los linfocitos (Figura 4e).

Figura 3. Folículos vitelogénicos. La granulosa se presenta lisa (a) o plegada (doble flecha en b); se observan las células foliculares cilíndricas (flecha vacía) y las esféricas voluminosas con plaquetas vitelinas (círculo) y lípidos (asterisco), la membrana basal (Mb y cabeza de flecha sólida en a), la teca interna (Ti y cabeza de flecha vacía), la teca externa (flecha larga), las plaquetas vitelinas (Y) y la membrana vitelina (flecha sólida). Cabeza de flecha en c, extensiones celulares proyectadas desde las células foliculares hacia el ovocito. HE. Reglillas: a) 63  $\mu\text{m}$ ; b) 91  $\mu\text{m}$ , detalle 34  $\mu\text{m}$ ; c) 28  $\mu\text{m}$ .

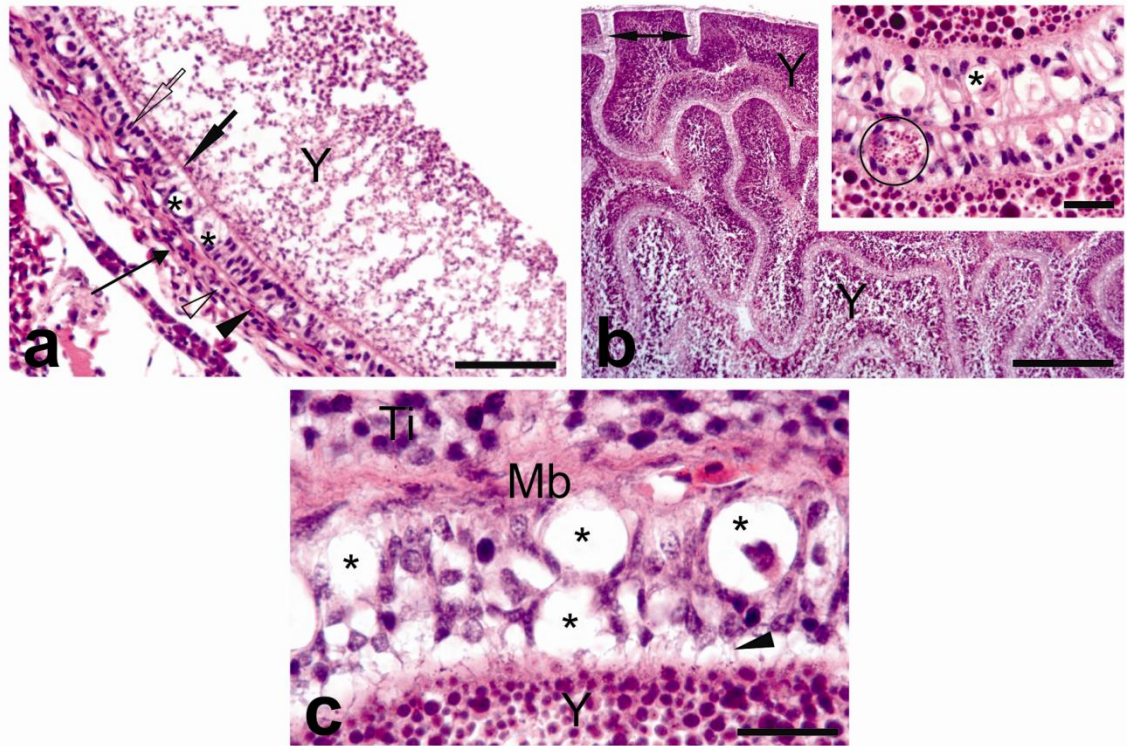
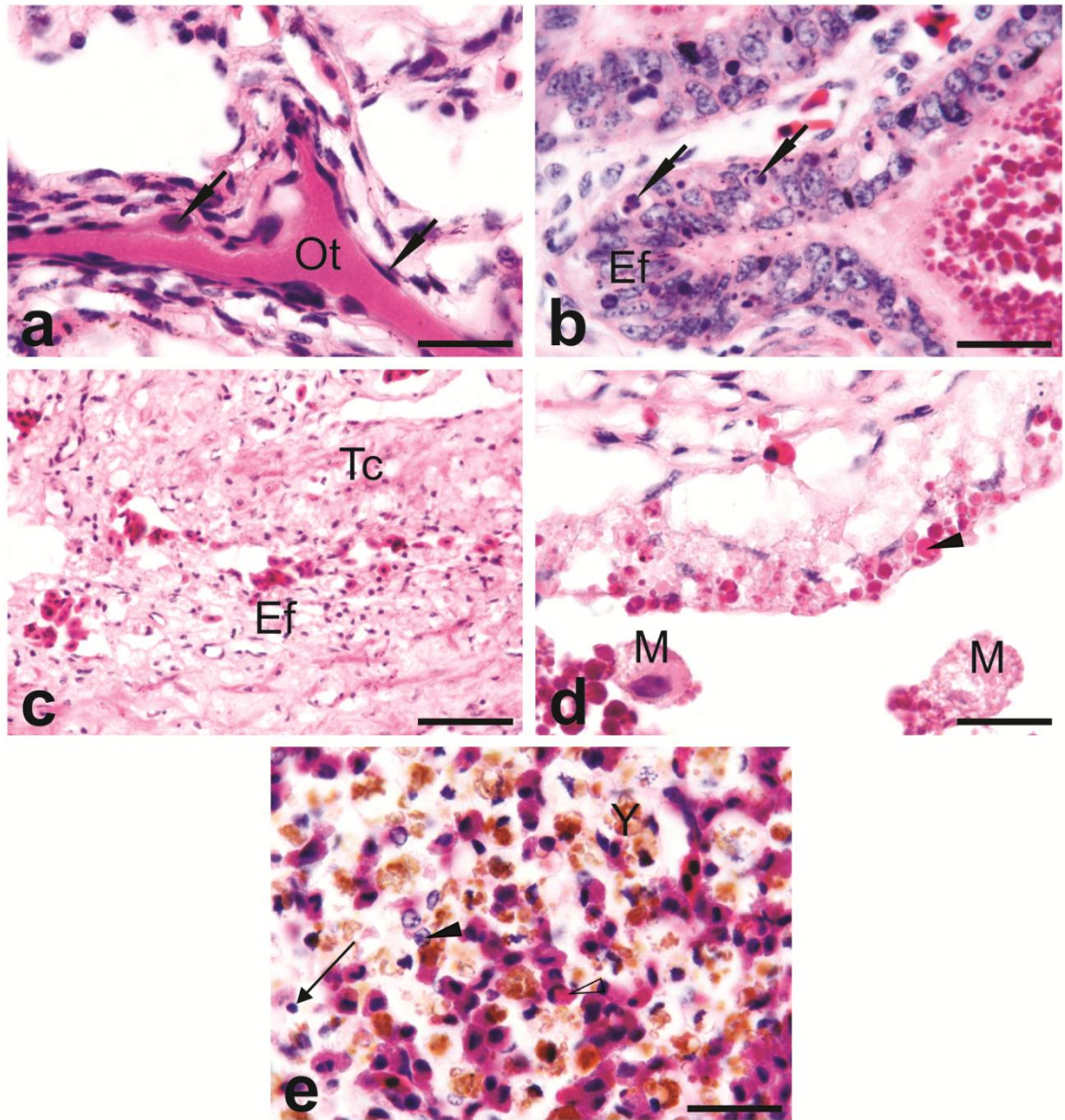
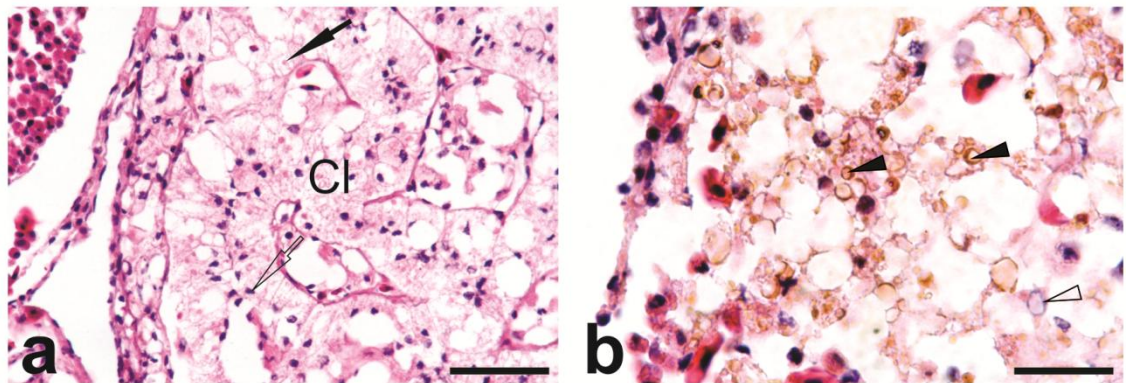


Figura 4. Folículos atrésicos en diferentes etapas de desarrollo. **a)** Ovocito colapsado (Ot) y picnosis de las células foliculares (flecha) de un folículo previtelogénico atrésico. (**b-e**) Folículos vitelogénicos atrésicos; **b)** Epitelio folicular plegado (Ef) con células en proceso de cariólisis (flecha). **c)** Granulosa (Ef) invadiendo la cavidad folicular y teca interna con tejido conectivo cicatrizal (Tc). **d)** Plaquetas vitelinas fagocitadas por el epitelio folicular (cabeza de flecha) y por los macrófagos (M). **e)** Folículo invadido por granulocitos (cabeza de flecha vacía) y linfocitos (cabeza de flecha sólida); flecha larga, picnosis de célula folicular. HE. Reglillas: **a)** 28  $\mu\text{m}$ ; **b)** 25  $\mu\text{m}$ ; **c)** 89  $\mu\text{m}$ ; **d)** 21  $\mu\text{m}$ ; **e)** 31  $\mu\text{m}$ .



En las hembras preñadas, post-parto y en recrudescencia (Figura 5; Cuadro 3) son comunes los cuerpos lúteos, en los cuales el arreglo histológico y citológico varía según el momento de su formación a partir de la ovulación; en éstos persisten los extensos plegamientos formados por la granulosa y la teca interna. Inicialmente, las células luteales derivadas de la granulosa, conforman un epitelio cilíndrico simple, presentan núcleo eucromático en posición apical y plaquetas vitelinas en su citoplasma, el cual es pálido y granular con espacios que le confieren un aspecto vacuolado (Figura 5a). Gradualmente, estas células pierden su forma hasta desintegrarse y se evidencian signos de cariólisis e inclusiones de color anaranjado en forma de semiluna (Figura 5b). Interpuestos entre las agrupaciones de las células luteales, se presentan vasos sanguíneos inmersos en tabiques de tejido conectivo PAS (+) derivados de la teca interna, los cuales finalmente desaparecen.

Figura 5. Cuerpos lúteos en diferentes etapas de desarrollo. **a)** Células luteales (Cl) con plaquetas (flecha sólida) y núcleo apical eucromático (flecha vacía). **b)** Remanente de las células luteales (cabeza de flecha vacía) e inclusiones en forma de semiluna (cabeza de flecha sólida). HE. Reglillas: **a)** 85  $\mu\text{m}$ ; **b)** 27  $\mu\text{m}$ .

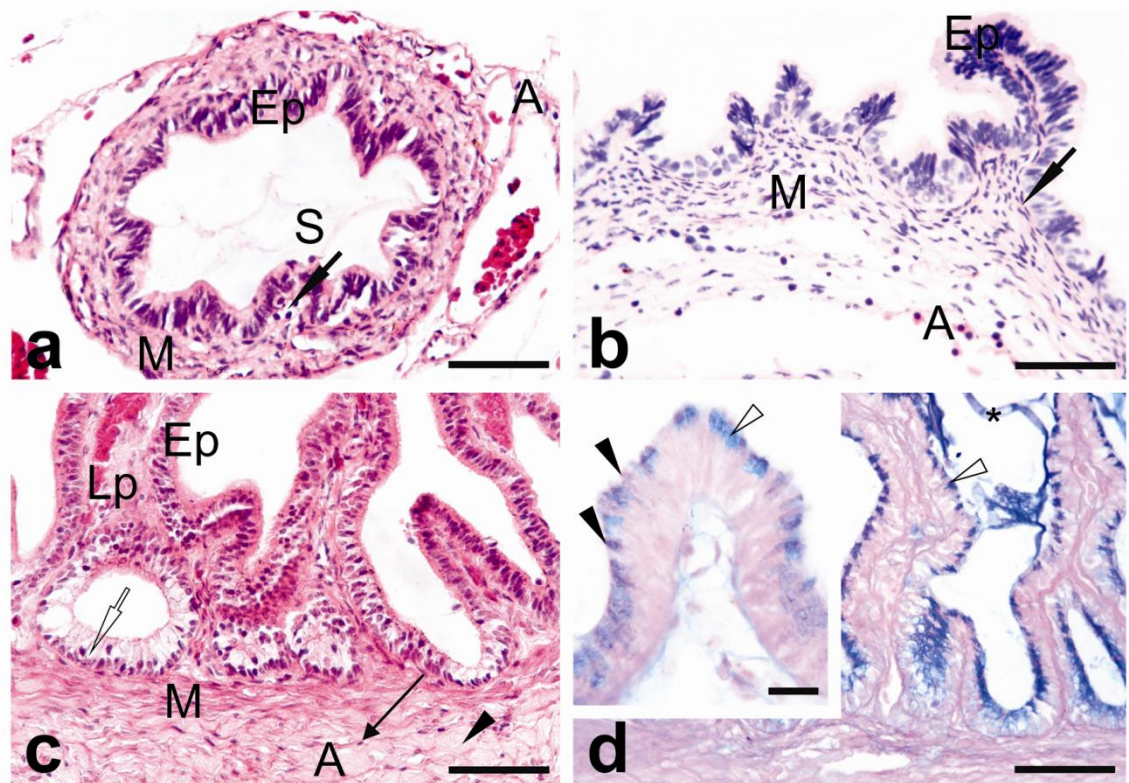


En cuanto a las propiedades histoquímicas de las diferentes estructuras que conforman los folículos ováricos, la membrana vitelina reacciona positivamente con PAS o con AB, o con ambas. Esta situación se da en cualquier momento de la foliculogénesis, contrario a lo que se observa en la granulosa, cuya reacción varía

de acuerdo con el grado de desarrollo folicular; así, en los folículos vitelogénicos avanzados es AB (+), la de los folículos atrésicos es PAS (+) y en los cuerpos lúteos, las células luteínicas derivadas de la granulosa son PAS (+). En los folículos vitelogénicos es muy evidente la membrana basal PAS (+) que sostiene las células foliculares, mientras que las tecas son AB (+) al igual que en los cuerpos lúteos y en los folículos atrésicos.

**3.2.2 Oviducto anterior.** En toda su extensión, el oviducto está formado por tres capas concéntricas: la epitelial (sostenida por su lámina propia), la muscular y la adventicia. En el Estado inmadura, los plegamientos epiteliales apenas se insinúan y la lámina propia es muy reducida (Figura 6a; Cuadro 3). En el Estado en maduración, el epitelio y la lámina propia subyacente, ahora de mayor grosor y de aspecto denso, se organizan en proyecciones cortas (Figura 6b; Cuadro 3). En el Estado madura pre-gestante (Cuadro 3), el oviducto adquiere su máximo desarrollo, de tal manera que las elongadas proyecciones epiteliales colman la región luminal. La mayoría de las células de las criptas glandulares poseen núcleo basal y citoplasma de aspecto vacuolado AB (+) (Figuras 6c-d); las células de la región media y superficial de las proyecciones presentan un citoplasma apical de aspecto granular PAS (+)/AB (+), y se encuentran intercaladas con células que no reaccionan a dicha coloración (Figura 6d). La lámina propia es prominente y muy vascularizada, y está formada por abundantes fibras conectivas. La capa muscular es delgada y de disposición circular. La adventicia es de consistencia densa (grandes haces de colágeno) y en ella se encuentran inmersos fibroblastos y fibras musculares lisas (Figura 6c). Durante todo el desarrollo del oviducto se mantiene un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado (Figuras 6a-c), con un alto contenido de mucopolisacáridos, en especial de mucopolisacáridos ácidos, revelado por la reacción positiva con PAS y AB. También se observa material secretor AB (+) en el lumen del oviducto de individuos inmaduros (Figura 6a), indicando que la actividad secretora del epitelio se inicia temprano en el desarrollo.

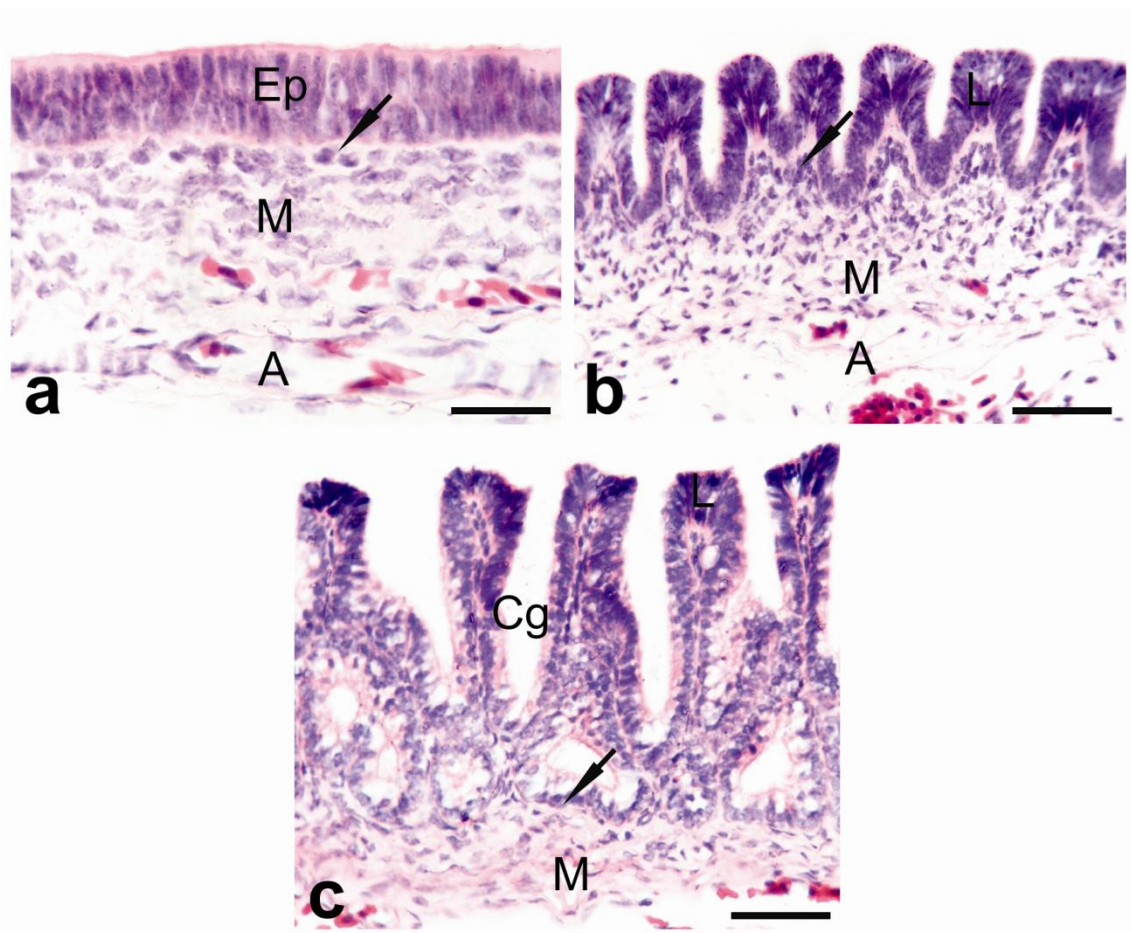
Figura 6. Sección transversal del oviducto en los diferentes estados de madurez sexual de *P. magdalenae*. **a)** Hembras inmaduras. **b)** Hembras en maduración. **c)** Hembras maduras. Ep, epitelio pseudoestratificado; M, capa muscular circular; A, adventicia; Lp y flecha sólida corta, lámina propia; S, material de secreción en el lumen del oviducto de individuos inmaduros; cabeza de flecha sólida, haces de colágeno en la adventicia, rodeados por fibras musculares longitudinales (flecha larga); flecha vacía en **c)**, célula secretora de núcleo basal en las criptas glandulares; cabeza de flecha vacía en **d)**, material de secreción AB (+); flecha sólida en **d)**, material de secreción PAS (+); asterisco en **d)**, secreción AB (+) en el lumen del oviducto de individuos maduros. Reglillas: **a)** 90  $\mu\text{m}$ ; **b)** 97  $\mu\text{m}$ ; **c)** 123  $\mu\text{m}$ ; **d)** 113  $\mu\text{m}$ , detalle 18  $\mu\text{m}$ .



**3.2.3 Glándula oviducal.** Este órgano está revestido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, sostenido por tejido conectivo areolar. Posee una capa de musculatura visceral en disposición circular y una adventicia de tejido conectivo areolar (Figura 7). En las hembras inmaduras, la superficie epitelial es lisa o se invagina y forma lamelas cortas (Figuras. 7a-b; Cuadro 3). En las hembras en el Estado en maduración, el epitelio forma unidades glandulares poco profundas y uniformes (Figura 7c; Cuadro 3); se observa material PAS (+)/AB (+) en forma de

gránulos en toda su extensión. En las hembras maduras, el epitelio está organizado en numerosas lamelas y unidades glandulares profundas, provistas de células secretoras y de células ciliadas de núcleos basales y apicales, respectivamente (Figuras 8-9). A medida que progresa la madurez, el epitelio aumenta de espesor y las capas de tejido conectivo y muscular se mantienen reducidas (Figura 8; Cuadro 3).

Figura 7. Sección longitudinal de la glándula oviducal en hembras maduras y en maduración de *P. magdalenae*. En hembras inmaduras con superficie epitelial lisa (a) o formando lamelas cortas (b). En hembras en maduración con unidades glandulares poco profundas y lamelas uniformes (c). Ep, epitelio; M, muscular; A, adventicia; Cg, conducto glandular; L, lamela; flecha, lámina propia. HE. Reglillas: a) 66  $\mu$ m; b-c) 64  $\mu$ m.

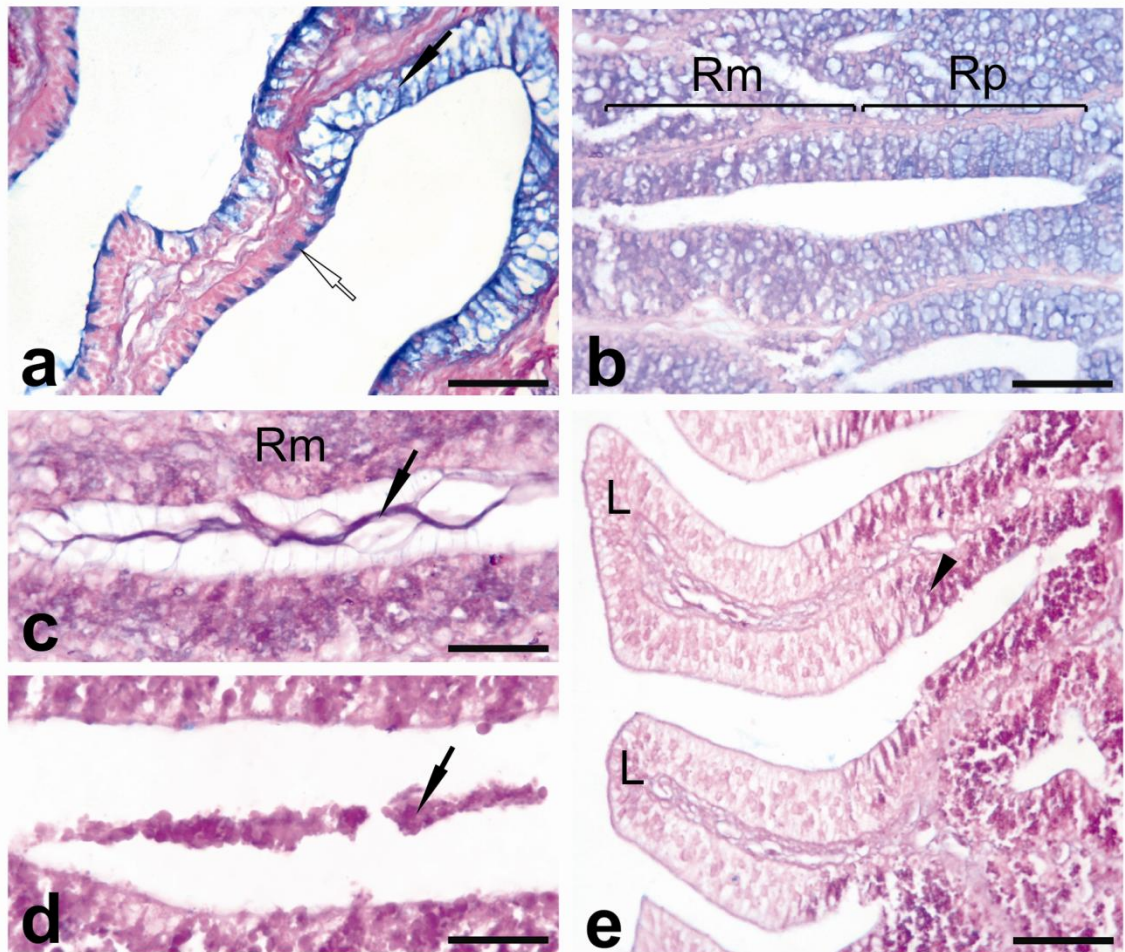


En los Estados de madurez y actividad reproductiva, la morfología de las lamelas y la naturaleza química de las unidades glandulares, establecen dos zonas fácilmente distinguibles en la glándula oviducal. Las lamelas de la zona anterior tienen forma de “T” y con HE, los núcleos celulares muestran basofilia intensa y el citoplasma es moderadamente eosinófilo (Figura 8; Cuadro 3). En esta misma zona, con la coloración PAS/AB, las unidades glandulares próximas al oviducto son AB (+) (Figura 9a; Cuadro 4) y las próximas a la zona posterior son PAS (-)/AB (-) en la región superficial, PAS (+)/AB (+) en su región media y AB (+) en su región profunda (Figuras 9b,c; Cuadro 4). La secreción AB confiere a las células epiteliales un aspecto vacuolado en la región profunda de las unidades glandulares; mientras que en la región media, ésta se concentra en la parte apical (Figura 9a). A diferencia de la zona anterior, las lamelas de la zona posterior son digitiformes y sus células tienen citoplasma de eosinofilia intensa (Figura 8; Cuadro 3). En esta misma zona, con la coloración PAS/AB, las células de las unidades glandulares poseen gránulos PAS (+) (Figuras 9d,e; Cuadro 4).

Figura 8. Sección longitudinal de la glándula oviducal en hembras maduras de *P. magdalenae*. ZA, zona anterior con lamelas (L) en forma de T y células de citoplasma ligeramente eosinófilo. ZP, zona posterior con lamelas (L) digitiformes y células de citoplasma intensamente eosinófilo. Flecha sólida, células secretoras de núcleo basal; flecha vacía, células sustentaculares ciliadas de núcleo apical; cabeza de flecha, cilios; M, muscular; asterisco, lámina propia. HE. Reglillas: 131  $\mu$ m, detalle 26  $\mu$ m.



Figura 9. Histoquímica de la glándula oviducal de *P. magdalenae*. **a-c)** Zona anterior; **d-e)** posterior. **a)** Unidades glandulares próximas al oviducto con secreciones AB (+), las cuales proporcionan a las células de las criptas un aspecto vacuolado (flecha sólida) pero son supranucleares en las células de la región media y superficial (flecha vacía). **b-c)** Unidades glandulares próximas a la zona posterior con secreciones mucosas AB (+) en la región profunda (Rp) y PAS (+)/AB (+) en la región media (Rm) y luminal (flecha). **d)** Secreción luminal PAS (+) de la región media de las unidades glandulares en la zona posterior. **e)** Lamelas de la zona posterior (L) con gránulos PAS (+) moderadamente coloreados hacia la región media (cabeza de flecha). Reglillas: **a)** 78  $\mu\text{m}$ ; **b)** 77  $\mu\text{m}$ ; **c)** 30  $\mu\text{m}$ ; **d)** 29  $\mu\text{m}$ ; **e)** 89  $\mu\text{m}$ .



Cuadro 4. Histoquímica de la glándula oviducal de *P. magdalenae*. Se indica la reacción de las unidades glandulares que conforman las zonas, a la coloración PAS/AB. (-) Negativo; (+) Positivo débil; (++) Positivo moderado; (+++) Positivo intenso.

Zonas	Unidades glandulares	Niveles de la unidad glandular	PAS	AB pH 2.5
Anterior	Próximas al oviducto	Profundo	-	++
		Medio	-	++
		Superficial	-	++
	Próximas a la zona posterior	Profundo	-	++
		Medio	+++	+
		Superficial	-	-
Posterior	Todas	Profundo	+	-
		Medio	++	-
		Superficial	-	-

**3.2.4 Útero.** Presenta cuatro arreglos estructurales a lo largo de la madurez sexual. En el primero, que corresponde al Estado inmadura (Cuadro 3), el epitelio es cúbico a cilíndrico simple con células de citoplasma vacuolado y está organizado en cortas prolongaciones fungiformes; subyacente al epitelio de las prolongaciones, la lámina propia se presenta como un tejido mesenquimal intensamente basófilo debido a la gran concentración de núcleos (Figura 10a). Por debajo del epitelio, se empiezan a organizar dos capas de musculatura visceral, una interna de disposición circular y otra externa longitudinal, ambas de espesor reducido; la adventicia corresponde a una envoltura de tejido conectivo areolar (Figura 10a). En el Estado en maduración (Cuadro 3), segundo arreglo, las prolongaciones o trofonemas se elongan, poseen un epitelio cilíndrico simple y una lámina propia vascularizada y con mayor grado de diferenciación. Las células epiteliales tienen núcleos basales de gran volumen (ovalados o triangulares) y en el citoplasma, una vacuola apical (Figura 10b); las capas musculares aumentan de espesor. En el tercer arreglo, que corresponde a los Estados madura pre-gestante y en recrudescencia (Cuadro 3), el endometrio se pliega en extensos trofonemas; éstos están conformados por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, en el cual se observan capilares procedentes de la lámina propia, en la que surgen fibras de

musculatura visceral (Figuras 10c-d). El miometrio se hipertrofia y se dispone en fascículos y el perimetrio se organiza en una capa interna amplia de tejido conectivo laxo y una capa externa de tejido conectivo denso en contacto directo con la serosa (Figura 10c). En el cuarto arreglo (Cuadro 3), el cual se presenta en los Estados madura preñada y madura post-parto, la lámina propia AB (+) de los trofonemas conserva los haces longitudinales de musculatura lisa a lado y lado de un vaso sanguíneo central (Figura 11a); este último, se ramifica y forma capilares de diversos diámetros intercalados entre criptas de células cilíndricas, formadas por la invaginación del epitelio (Figura 11). En las zonas en donde se encuentran los capilares, el epitelio de los trofonemas se adelgaza y se organiza en una capa simple de células planas a cúbicas (Figuras 11b-d). El citoplasma de las células glandulares contiene abundantes gotas de lípidos y, en algunas hembras, gránulos de mucopolisacáridos neutros invadiendo completamente la célula o solo en la región apical (Figuras 11c-d). Sumado a esto, tres de las nueve hembras preñadas presentaron linfocitos, granulocitos, macrófagos, células plasmáticas, eritrocitos y restos de células epiteliales, dispersos en el lumen uterino (Figuras 11a-b).

Figura 10. Sección longitudinal (**a-b**) y transversal (**c**) del útero en los diferentes estados de madurez sexual de *P. magdalenae*. **a**) En hembras inmaduras con prolongaciones epiteliales fungiformes (Ep) y lámina propia de aspecto mesenquimal (Lp). **b**) En hembras en maduración, prolongaciones epiteliales más elongadas con epitelio cilíndrico simple (Ep) y lámina propia vascularizada (asterisco); células epiteliales con vacuola supranuclear (flecha). **c-d**) En hembras maduras pre-gestantes y en recrudescencia, con capas musculares hipertrofiadas (Mc, muscular circular; MI, muscular longitudinal), adventicia interna de tejido conectivo laxo (Al) y adventicia externa de tejido conectivo denso (flecha); **d**) trofonema en sección longitudinal con capilar central (Cp) embebido en la lámina propia (flecha) y epitelio pseudoestratificado (Ep). HE. Reglillas: **a**) 90  $\mu$ m; **b**) 89  $\mu$ m; **c**) 178  $\mu$ m; **d**) 47  $\mu$ m.

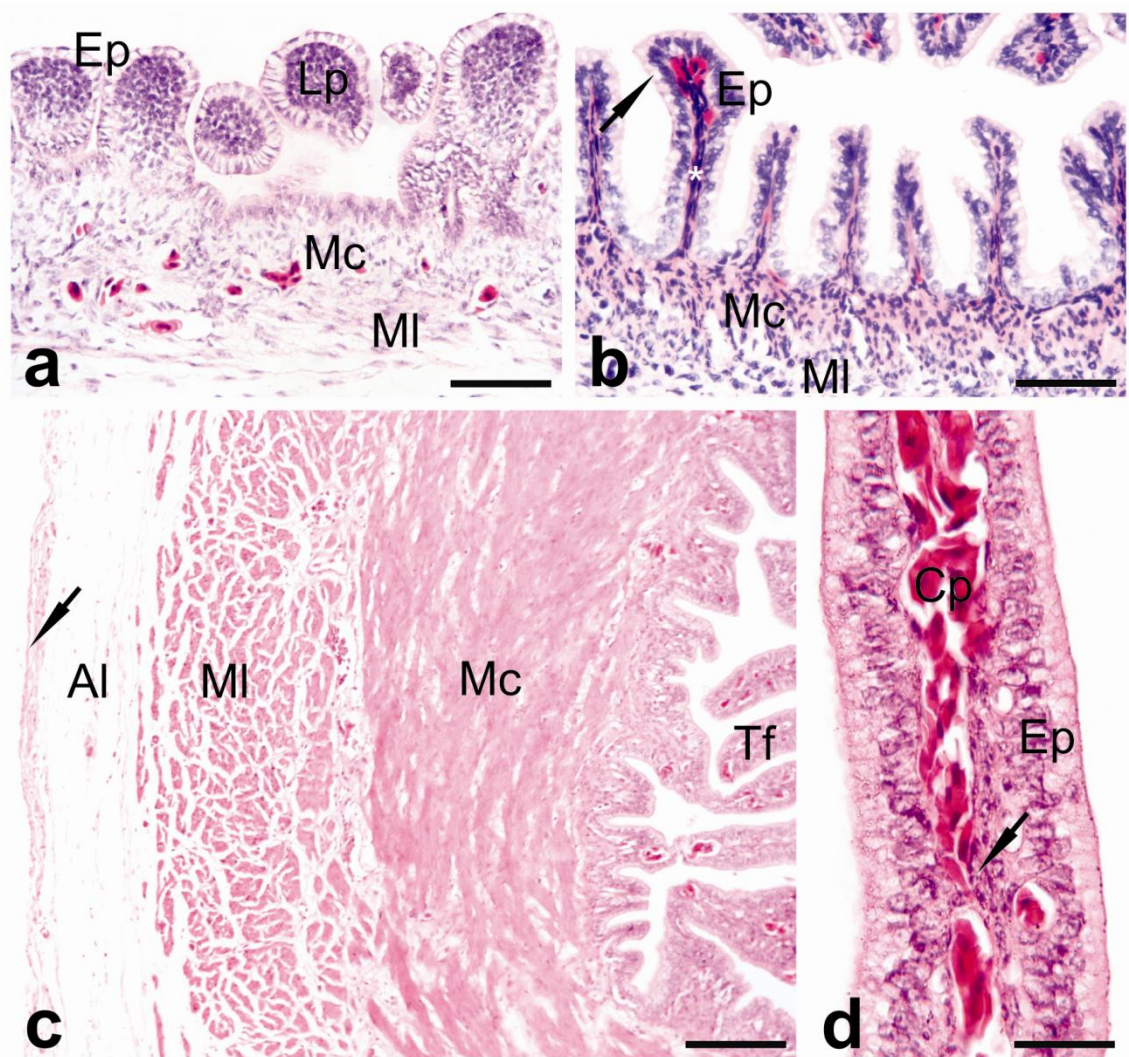
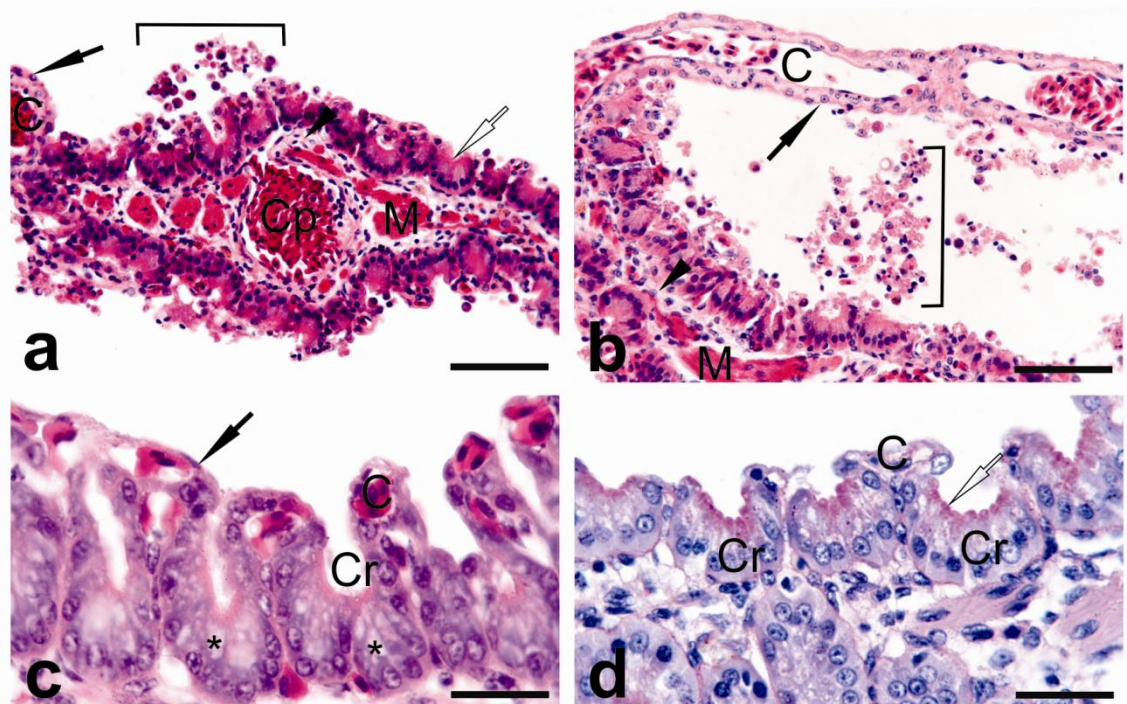


Figura 11. Trofonemas en sección transversal en hembras preñadas y post-parto de *P. magdalena*. **a, b)** Epitelio cilíndrico simple formando criptas secretoras (flecha vacía); capilar central (Cp) y haces de músculo liso (M) embebidos en la lámina propia (cabeza de flecha); corchete, leucocitos y restos de células epiteliales en el lumen uterino. HE. **c, d)** Ramificaciones capilares (C) intercaladas entre las criptas (Cr) y en esas regiones, el epitelio de los trofonemas se organiza en una capa simple de células planas o cúbicas (flecha sólida). **d)** Material de secreción PAS (+) (flecha vacía); asterisco, presuntas gotas de lípidos en las células de las criptas. PAS. Reglillas: **a)** 106  $\mu$ m; **b)** 79  $\mu$ m; 38  $\mu$ m; **d)** 29  $\mu$ m.



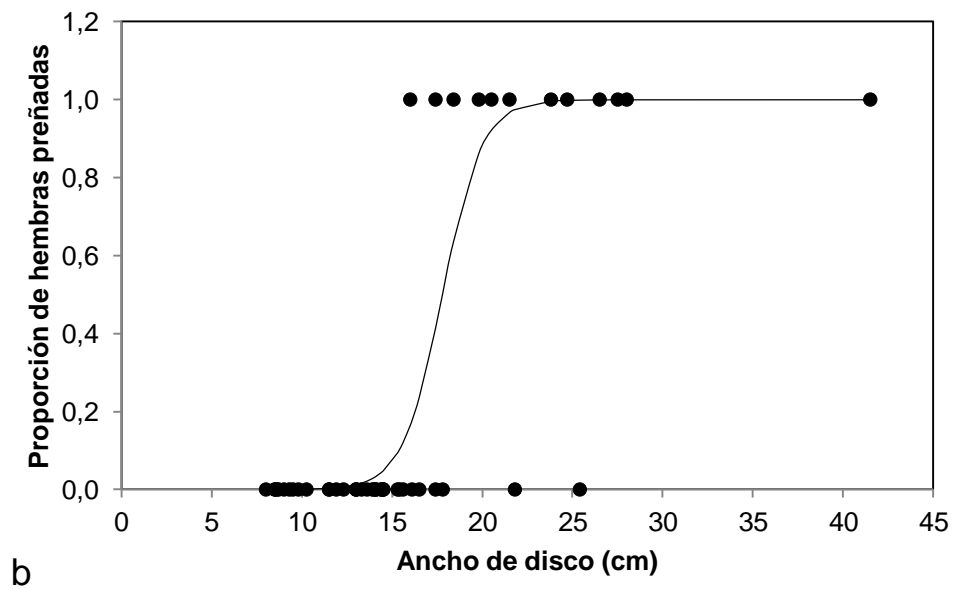
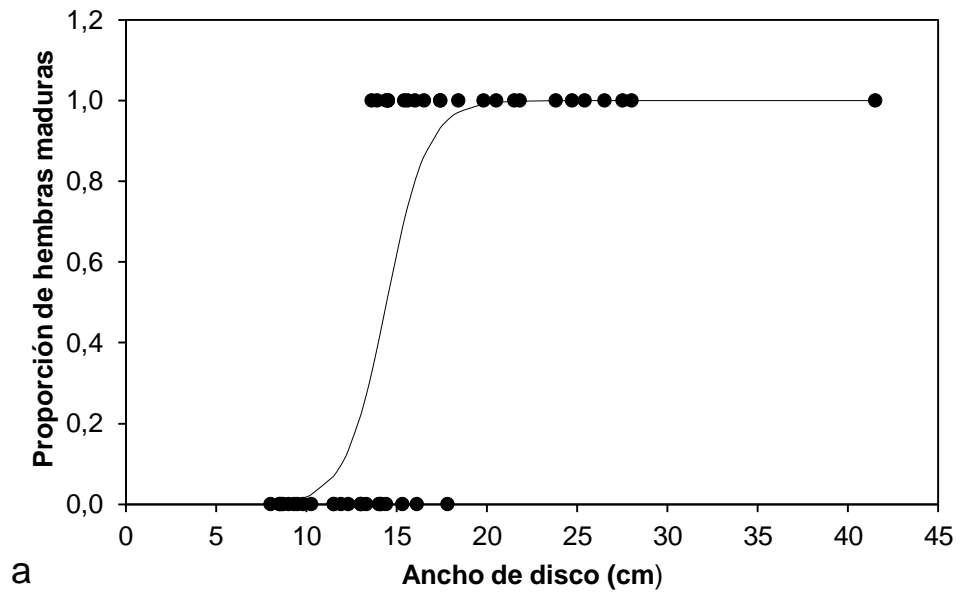
### 3.3 Tallas de madurez y de preñez

La hembra madura más pequeña midió 13.6 cm AD (Estado madura pre-gestante) y la hembra inmadura más grande, 17.8 cm AD (Estado en maduración). Las hembras preñadas presentaron tallas entre 16.0 cm y 41.5 cm AD, siendo esta última la mayor talla registrada.

Las ojivas de madurez basadas en los estados de madurez establecidos a partir de todo el tracto reproductivo y de cada estructura por separado, arrojaron el mismo  $AD_{50}$  (14.4 cm) e intervalos de confianza (I.C. 95% = 13.6 – 15.2; Figura

12a). La talla mediana de preñez fue más alta, siendo estimada en 17.8 cm AD (I.C. 95% = 16.7 – 18.9; Figura 12b).

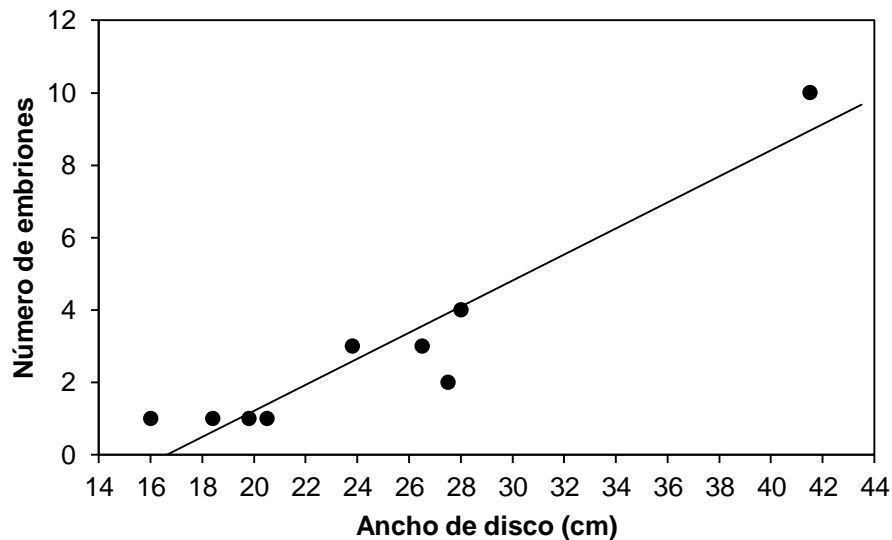
Figura 12. Ojivas de madurez (a) y de preñez (b) de las hembras de *P. magdalanae*.



### 3.4 Relación de la talla con la fecundidad y las estructuras reproductivas

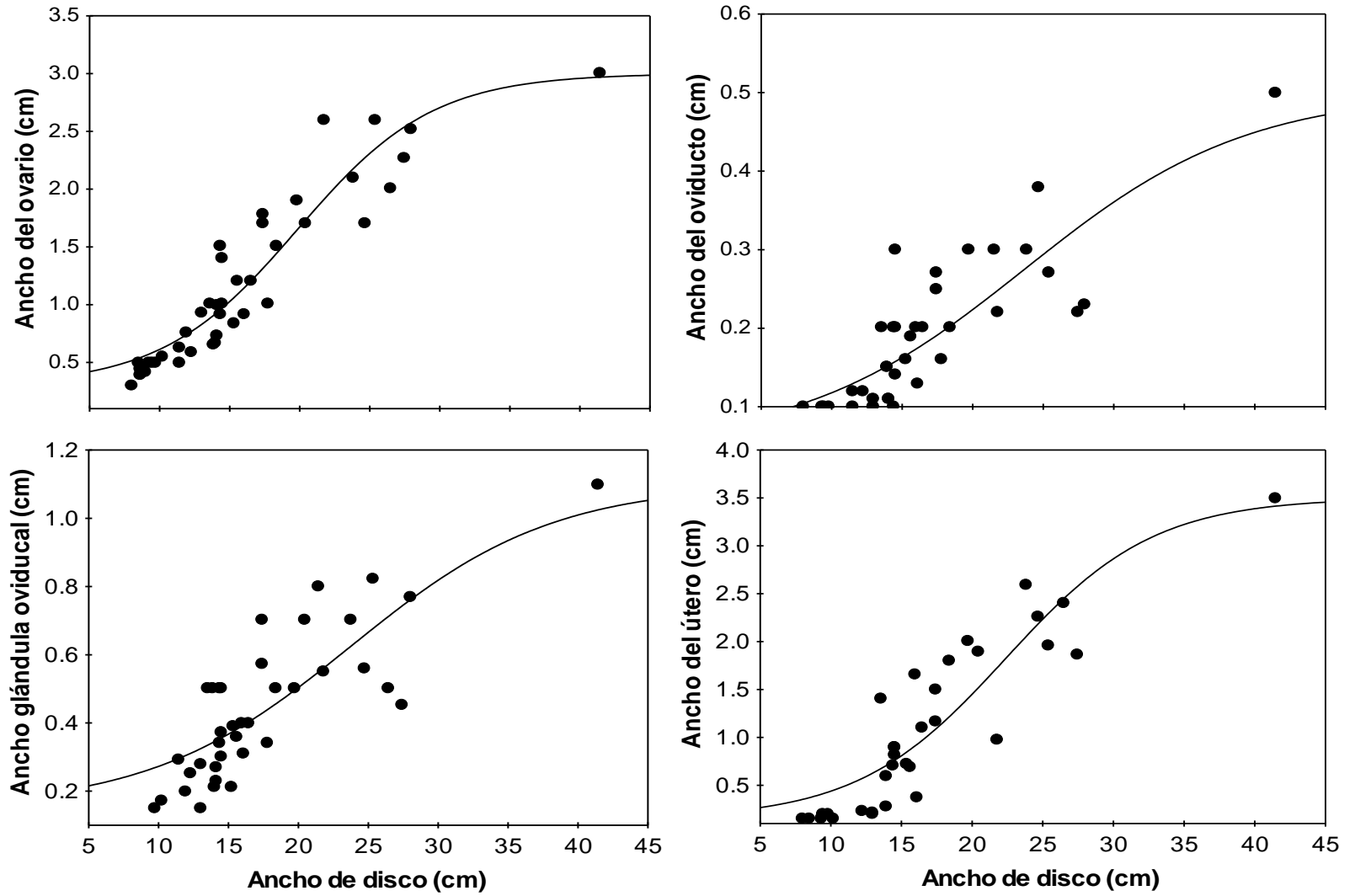
Los embriones presentaron tallas entre 1.8 y 8.5 cm AD y pesos entre 0.7 y 38.3 g; todos en estados de desarrollo tardío. Las cuatro crías más grandes (8.1-8.4 cm AD) y de mayor peso (35.0 – 38.3 g), fueron encontradas en una hembra de 28 cm AD, capturada en el mes de agosto. Los ovocitos más grandes variaron entre 0.49 y 2.44 cm de diámetro y de 0.05 a 2.0 g en peso. Las hembras preñadas presentaron folículos vitelogénicos de varios tamaños (mayores diámetros entre 0.9 y 2.0 cm). La fecundidad uterina ( $F$ ) varió entre uno y 10 embriones (Media = 2.9; Mediana = 2), y presentó una relación positiva con la talla materna ( $F = -5.99 + 0.36*AD$ ;  $r^2 = 0.89$ ,  $P = 0.0001$ ; Figura 13).

Figura 13. Relación entre la talla materna y el número de embriones de *P. magdalanae*.



Las curvas logísticas entre el AD de las hembras y el ancho de los órganos reproductivos del lado izquierdo (Figura 14), indicaron un punto de inflexión similar entre las generadas con el oviducto anterior (23.7 cm, 95% IC = 21.4 – 26.0), la glándula oviducal (23.8 cm, 95% IC = 21.4 – 26.1) y el útero (22.4 cm, 95% IC = 20.8 – 24.0). El punto de inflexión de la relación AD vs ancho del ovario fue ligeramente menor (19.8 cm, 95% IC = 18.8 – 20.8; Figura 14).

Figura 14. Relación entre el ancho del disco (AD) y el ancho de los órganos reproductivos del lado izquierdo de las hembras de *P. magdalenae*.



#### 4. DISCUSIÓN

El tracto reproductivo de *P. magdalenae* es funcional en su totalidad, como fue descrito por Teshima & Takeshita (1992). Sin embargo, el ovario derecho siempre se presentó muy reducido con relación al ovario izquierdo y aunque en algunas hembras maduras contenía unos pocos folículos yemados, éstos no superaron los 0.5 cm de diámetro; tamaño mayor al encontrado en *Urobatís halleri* (Babel, 1967). Por el contrario, los folículos del ovario izquierdo alcanzaron diámetros hasta de 2.4 cm. Sumado a esto, se observaron cuerpos lúteos en cortes histológicos de ambos ovarios. De acuerdo con Hamlett & Koob (1999) y Lutton *et al.* (2005), los elasmobranchios pueden presentar uno o dos ovarios, independientemente del modo de reproducción; en la última situación, éstos pueden ser ambos funcionales o uno funcional y otro rudimentario. En la mayoría de los potamotrigónidos estudiados, al igual que en *U. jamaicensis*, el ovario derecho se encuentra atrofiado y la producción de folículos está dada solo por el ovario izquierdo como es el caso de *Potamotrygon motoro* (Castex, 1963; Thorson *et al.*, 1983; Achenbach & Achenbach, 1976; Charvet-Almeida *et al.*, 2005), *Potamotrygon constellata* (Thorson *et al.*, 1983), *Potamotrygon orbignyi* y *Paratrygon aiereba* (Lasso & Lasso-Alcalá, 1996; Charvet-Almeida *et al.*, 2005), *Potamotrygon* sp. (Araújo, 1998), *Potamotrygon brachyura* (Achenbach & Achenbach, 1976), *Plesiotrygon iwamae* (Charvet-Almeida, 2001; Charvet-Almeida *et al.*, 2005), *Potamotrygon schroederi*, *Potamotrygon scobina* y *Potamotrygon* sp. C (Charvet-Almeida *et al.*, 2005). En otros trabajos con *Paratrygon aiereba* y *Potamotrygon motoro* (Charvet-Almeida, 2006; Almeida, 2008), el ovario derecho de estas especies puede también presentar folículos, como se encontró en *P. magdalenae*; aunque Teshima & Takeshita (1992) solo mencionan que éste es funcional. Por otra parte, Lutton *et al.* (2005) suponen que el desarrollo de pequeños folículos en el ovario derecho se hace para la producción de esteroides.

El ovario de *P. magdalенаe* concuerda con el tipo externo, definido por Pratt (1988), de acuerdo con su asociación con el órgano epigonal. Similar a éste, el ovario de *P. constellata* posee tres grupos de ovocitos clasificados por tamaño, lo cual, probablemente, corresponde a tres reproducciones sucesivas (Thorson *et al.*, 1983). El ovario izquierdo de algunas hembras maduras de *P. magdalенаe*, sobre todo el de aquellas que se han reproducido al menos una vez, también presentó grupos de ovocitos por tamaño, pero en este caso entre dos y cinco. El folículo ovárico de mayor diámetro registrado fue de 2.4 cm, similar al encontrado por Teshima & Takeshita (1992) para esta misma especie (2.5 cm); de acuerdo con estos autores, ese es el tamaño aproximado de ovulación.

La estructura microscópica del ovario de *P. magdalенаe* es similar a la descrita por Teshima & Takeshita (1992); no obstante, estos autores observaron uno o dos estratos en el epitelio germinal y la formación de células foliculares cilíndricas y agrandadas en folículos entre 0.8 y 1.0 cm de diámetro. En el presente trabajo, se observó sólo un estrato en el epitelio germinal y un epitelio folicular con células agrandadas a partir de folículos más pequeños. Por otra parte, a diferencia de otros batoideos como *S. acuta* (Díaz-Andrade *et al.*, 2009), *S. bonapartii* (Díaz-Andrade *et al.*, 2011) y *Raja asterias* (Barone *et al.*, 2007), el epitelio germinal de *P. magdalенаe* no es ciliado. Según Díaz-Andrade *et al.* (2011), estas estructuras podrían facilitar el traslado del ovocito desde el ovario hasta el ostium; en el caso de *P. magdalенаe*, este paso, seguramente, solo está dado por la acción ciliar de los ostia.

La presencia de ovogonias en el ovario de individuos recién nacidos y juveniles ya ha sido observada en otras especies de rayas como en *Torpedo marmorata* (Prisco *et al.*, 2001), *S. acuta* (Díaz-Andrade *et al.*, 2009) y *S. bonapartii* (Díaz-Andrade *et al.*, 2011). En *T. marmorata*, las células germinales de los embriones se componen sólo de grupos de ovogonias. Sin embargo, en los recién nacidos, éstas comienzan a disminuir mientras aumenta el número de folículos; se

considera probable que en *P. magdalенаe* se dé la misma situación, lo cual hace suponer que la fase proliferativa de la ovogénesis concluye en los neonatos y por lo tanto, el número de ovulaciones es limitado.

En los folículos ováricos de muchos elasmobranquios es posible encontrar varios tipos de células, haciendo parte del epitelio folicular: pequeñas (cúbicas o cilíndricas), grandes (globosas y piriformes) e intermedias (Babel, 1967; Chatchavalvanich & Visuttiapat, 1997; Hamlett *et al.*, 1998, 1999a; Prisco *et al.*, 2001, 2002a, 2007; Lutton *et al.*, 2005; Barone *et al.*, 2007; Grijalba-Bendeck *et al.*, 2008; Díaz-Andrade *et al.*, 2009, 2011). Las dos últimas surgen por diferenciación de las células pequeñas, en un momento determinado de la foliculogénesis y disminuyen en número cerca a la ovulación (Babel, 1967; Hamlett *et al.*, 1999a; Prisco *et al.*, 2002a, 2007; Lutton *et al.*, 2005). En *P. magdalенаe*, al igual que en *U. halleri* (Babel, 1967), las células globosas presentan gránulos de vitelo; como en *U. jamaicensis* (Hamlett *et al.*, 1999a), espacios en el citoplasma a manera de lípidos y vesículas apicales en las células cilíndricas, y como en *S. acuta* (Díaz-Andrade *et al.*, 2009) y *S. bonapartii* (Díaz-Andrade *et al.*, 2011), el citoplasma de las células foliculares contiene vesículas PAS (+)/AB (+). Tsang & Callard (1983) consideraron que, posiblemente, las inclusiones en las células de la granulosa son precursores para la síntesis de esteroides y/o precursores de gránulos de vitelo. Prisco *et al.* (2002a, 2007) encontraron que las células de la granulosa contribuyen al crecimiento del ovocito en *T. marmorata*, transfiriéndole glucógeno, lípidos y vitelogenina, principalmente durante la vitelogenénesis. Adicionalmente, las células foliculares de los elasmobranquios presentan extensiones que permiten el transporte de dichos materiales al ovocito (Lutton *et al.*, 2005); por ejemplo, Prisco *et al.* (2002b, 2007), Barone *et al.* (2007) y Díaz-Andrade *et al.* (2009, 2011) observaron crestas intercelulares en las células piriformes, las cuales se forman por la fusión de la membrana plasmática de la célula folicular y el ovocito. Hamlett *et al.* (1999a) describieron la formación de extensiones celulares con transosomas en las células foliculares pequeñas, las

cuales atraviesan la zona pelúcida y presionan el ovocito; el extremo o transosoma se expande y está conformado por dos membranas, la del ovocito y el plasmalema de la célula folicular. *P. magdalенаe* también presenta extensiones celulares; sin embargo, no fue posible determinar de qué tipo. La transferencia de materiales también ha sido observada en otros vertebrados como en algunas aves y reptiles escamados, al igual que las extensiones celulares (Press, 1964; Rahil & Narbaitz, 1973; Motta *et al.*, 1995; De Caro *et al.*, 1998). Andreuccetti *et al.* (1999) y Prisco *et al.* (2007) mencionan que esto parece ser una característica ventajosa en especies con ovocitos provistos casi en su totalidad de vitelo y un pequeño disco germinativo (telolecitos), como es el caso de los elasmobranquios (Wyffels, 2009).

En los elasmobranquios, además de la capa granulosa, la teca también presenta cambios durante la foliculogénesis (Lutton *et al.*, 2005), adquiriendo así gradualmente las propiedades endocrinas y de sostén. Inicialmente, en *P. magdalенаe*, la teca está integrada por una capa de células planas y luego, por una capa interna de células cúbicas secretoras y una externa de células aplanadas de soporte. En *T. marmorata* la capa interna se compone de células aplanadas, mientras que la externa de células cúbicas (Prisco *et al.*, 2002a, 2007). En los folículos primarios del ovario de *S. bonapartii*, ambas capas están conformadas por células planas pero la interna presenta células de núcleo eucromático y citoplasma eosinófilo, mientras que la externa tiene células de núcleo heterocromático y citoplasma ligeramente basófilo; en los folículos preovulatorios, la teca interna es estratificada y la externa es inconspicua (Díaz-Andrade *et al.*, 2011). En *U. jamaicensis* solo se presenta una capa tecal (Hamlett *et al.*, 1999a).

En *P. magdalенаe*, algunos folículos vitelogénicos presentan un epitelio folicular plegado, tal como en *U. jamaicensis* y *U. halleri* (Hamlett *et al.*, 1999a; Babel, 1967). De acuerdo con Hamlett & Koob (1999) y Prisco *et al.* (2002b), estos

plegamientos proporcionan una mayor superficie para el transporte de precursores de vitelo al ovocito, durante el período de crecimiento.

Con relación a los cromosomas en cepillo, en *P. magdalenae* éstos son fácilmente visibles en los folículos primordiales, como ocurre en *S. bonapartii* (Díaz-Andrade *et al.*, 2011), y en los folículos previtelogénicos, como en *R. asterias* (Barone *et al.*, 2007). Su formación señala la intensa actividad biosintética de los precursores vitelogénicos (Gilbert, 2005).

El órgano epigonal es un tejido linfomieloide asociado con el ovario en los elasmobranquios y del cual no se conoce su función con exactitud (Lutton *et al.*, 2005). Se ha considerado la posibilidad de que sus células actúen como filtradoras del material antigénico que pudiera llegar al ovario vía aorta dorsal-arterias genitales (Lutton *et al.*, 2005). Adicionalmente, se han observado leucocitos en la teca, en la granulosa y/o en el epitelio germinal de los folículos ováricos de varias especies y se ha demostrado que la progesterona y la testosterona inducen la apoptosis de los leucocitos y que el órgano epigonal puede inhibir algunos procesos reproductivos (Lutton *et al.*, 2005). Por lo tanto, es probable, que ovario-órgano epigonal actúen como un sistema de retroalimentación bidireccional, en el que se regula la producción de esteroides sexuales o que el órgano epigonal sea capaz de modular la función reproductiva al inducir e inhibir la producción de esteroides (Lutton *et al.*, 2005). Sin embargo, la presencia de macrófagos haciendo fagocitosis de plaquetas vitelinas, así como de granulocitos y linfocitos en los folículos atrésicos de *P. magdalenae*, sugiere que las células epigonales intervienen en la eliminación de restos de células y de materiales foliculares.

El arreglo histológico del oviducto de *P. magdalenae* es similar al observado tanto en especies de rayas ovíparas, por ejemplo *S. acuta* (Galíndez & Estecondo, 2008) y *Rioraja agassizi* (Colonello, 2009), como en vivíparas aplacentadas, por ejemplo *Dasyatis bleekeri* (Chatchavalvanich & Visuttipat, 1997), *N. bancroftii*, *R.*

*percellens*, *U. venezuelae* y *D. guttata* (Acero *et al.*, 2008). Sin embargo, difiere con *S. acuta*, *R. percellens* y *D. bleekeri* en que en éstas el epitelio del oviducto es cilíndrico simple y en *P. magdalenae* es cilíndrico pseudoestratificado. Además, en *S. acuta* la orientación de las fibras de la pared muscular es longitudinal y en *D. bleekeri* y *R. agassizi* se presenta en dos orientaciones, circular interna y longitudinal externa. El oviducto de *P. magdalenae* no posee una capa muscular longitudinal externa, pero la adventicia está conformada por fibras musculares lisas en disposición longitudinal y fibroblastos rodeando grandes haces de colágeno, característica que no es descrita en ninguna de las anteriores especies. *S. acuta* y *P. magdalenae* evidencian la misma composición química del epitelio, excepto que en la primera, el citoplasma perinuclear de dichas células presenta vesículas PAS (+) y en *P. magdalenae* dichas vesículas sólo son supranucleares. Para las otras especies no existe información con respecto a la reacción histoquímica, aunque Chatchavalvanich & Visuttiapat (1997) encontraron carbohidratos en la secreción luminal del oviducto de *D. bleekeri*. Con relación a la actividad secretora del oviducto de individuos inmaduros, ésta tal vez se da como resultado del proceso de diferenciación celular, dado que el epitelio en este Estado aún no presenta un carácter glandular. No obstante, no se tiene información que contribuya al entendimiento de esta situación.

La morfología externa de la glándula oviducal de *P. magdalenae* y el tamaño con relación al resto del tracto reproductivo, es tal y como se ha descrito para algunas especies vivíparas; pequeña y en forma de barril, como en *S. acanthias* y *U. jamaicensis* (Hamlett *et al.*, 1998); en otras como *U. rogersi*, adopta forma de campana (Mejía-Falla *et al.*, 2012). En las especies ovíparas es grande y refleja la forma de la cápsula (Hamlett & Koob, 1999). Existen pocos trabajos relacionados con la glándula oviducal de las rayas de agua dulce. En *P. constellata* y *P. motoro* se presenta como un engrosamiento del oviducto, conformada por glándulas dispuestas radialmente alrededor de una cavidad central (Thorson *et al.*, 1983); dicha descripción es común a la de todos los elasmobranquios, incluida *P.*

*magdalенаe*. Babel (1967) menciona que en *U. halleri*, la glándula oviducal presenta una región anterior de color piel mientras que la posterior es de color crema, situación que es similar a la encontrada en *P. magdalенаe*; este autor, identifica dichas zonas como “la secretora de albumina”, la cual sería el equivalente a las zonas *club* y *papillary*, y “la secretora de la cáscara” o zona *baffle* con pérdida de función. En concordancia con la forma y posición de las lamelas y con las designaciones propuestas por Hamlett *et al.* (1999b), las zonas anterior y posterior de la glándula oviducal en *P. magdalенаe* podrían corresponder a las zonas secretoras de las capas de gelatina *club* y *papillary*, respectivamente. La estructura característica de la zona *baffle*, la cual es muy conservada en los elasmobranchios en que se presenta (Hamlett *et al.*, 1998, 2005a), y la de la zona terminal no fueron observadas. En *U. jamaicensis* (Hamlett *et al.*, 1998), otra especie con viviparidad histotrófica, se presentan secreciones de mucus y gelatina, pero no una zona *baffle* propiamente dicha. Thorson *et al.* (1983) mencionan que en *P. constellata* no se observaron membranas rodeando los embriones en ninguna de las etapas del desarrollo y es de esperar que en *P. magdalенаe* solo se produzcan las envolturas de gelatina. No obstante, es necesario realizar observaciones en embriones en los primeros estados de desarrollo, ya que todos los ejemplares colectados se encontraban en estados tardíos, y es en los estados tempranos de las especies vivíparas histotróficas en los que permanecen dichas envolturas (Wyffels, 2009). La ausencia de zona *terminal* en la glándula oviducal de *P. magdalенаe* es consistente con su modo de reproducción, ya que los embriones completan su desarrollo en el útero (Wyffels, 2009) y por lo tanto, sus envolturas no requieren de filamentos de adherencia a substratos. Adicionalmente, el almacenamiento de espermatozoides es común en especies que viven en ambientes con bajas temperaturas, o en especies donde machos y hembras no coexisten (Moura *et al.*, 2011); rasgos que no presentan los potamotrigónidos al estar restringidos a las cuencas del trópico y carecer de segregación sexual al tener una proporción sexual poblacional que tiende a ser

1:1, con algunas excepciones en las que las hembras superan en número a los machos (Rosa *et al.*, 2010).

La glándula oviducal de los condrictios, incluida *P. magdalенаe*, se compone básicamente de dos tipos de células, las sustentaculares ciliadas de núcleo apical y las secretoras de núcleo basal (Hamlett *et al.*, 1998, 2002; Galíndez & Estecondo, 2008; Galíndez *et al.*, 2010; Serra-Pereira *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2011); éstas se disponen de manera intercalada en todas las zonas, aunque la cantidad de una u otra puede variar. El material producido también varía entre y dentro de las zonas, entre especies y durante el proceso de gestación (Hamlett *et al.*, 2005a). En los elasmobranquios en los cuales se ha revisado la composición histoquímica de la glándula oviducal, se ha encontrado que las zonas *club* y *papillary* sólo secretan mucopolisacáridos. En los batoideos ovíparos *S. acuta* (Galíndez & Estecondo, 2008), *S. bonapartii* (Galíndez *et al.*, 2010) y *R. clavata* (Serra-Pereira *et al.*, 2011), estas zonas producen tanto mucinas ácidas como neutras; mientras que en el batoideo con viviparidad histotrófica *D. bleekeri* (Chatchavalvanich & Vissutipat, 1997) toda la glándula, cuya estructura es uniforme, produce solo mucopolisacáridos neutros. En *P. magdalенаe*, la zona anterior (*club*) secreta mucopolisacáridos ácidos y neutros, y la zona posterior (*papillary*), solo gránulos de mucopolisacáridos neutros. Koob & Straus (1998) y Hamlett *et al.* (1998) sugieren que las capas de gelatina funcionan como soporte hidrodinámico para el embrión, como material de adhesión y lubricante durante la encapsulación.

La actividad secretora de la glándula oviducal de *P. magdalенаe* es muy conservada; es decir, no se observó una relación diferencial entre las hembras grávidas y las ingravidas. Incluso, en presencia de embriones completamente desarrollados, el lumen de las unidades glandulares presentó material secretor. Teniendo en cuenta que en estas hembras algunos folículos yemados eran de gran diámetro, posiblemente dicha secreción está destinada a una próxima

ovulación. Moura *et al.* (2011) observaron una situación similar en el tiburón vivíparo aplacentado *Centroscyrnus coelolepis* y concluyeron que el material residual secretado después de la preñez, podría ser usado para lubricación del oviducto y para mantener el fluido uterino.

Con respecto a los úteros, se ha observado que en todos los potamotrigónidos ambos son funcionales como ocurre en *P. magdalенаe*; sin embargo, en otras especies de rayas sólo uno de los dos es funcional, por ejemplo en *D. longa* (Villavicencio-Garayzar *et al.*, 1994; López, 2009), *Dasyatis sabina* (Snelson *et al.*, 1988), *Dasyatis sayi* (Snelson *et al.*, 1989) y *U. lobatus* (White *et al.*, 2001). Como un rasgo particular, en la mayoría de las hembras de *P. magdalенаe* en el Estado madura pre-gestante, el útero izquierdo se presenta mucho más grande que el derecho y en las hembras preñadas, alojaba más embriones cuando eran varios o al único, cuando estaba presente sólo un embrión. Algo similar se observó en *U. halleri* (Babel, 1967) y en *U. rogersi* (Mejía-Falla *et al.*, 2012); en ambos casos, las hembras más pequeñas tenían un solo embrión y éste se alojaba en el útero izquierdo. Al incrementarse la edad y el tamaño de la madre, aumenta el número de crías y, es en esa condición, que el útero derecho comienza a ser funcional, aunque aloja embriones en menor o igual número que el izquierdo. Babel (1967) concluyó que el útero derecho se desarrolla más lentamente y se usa menos que el izquierdo debido, en parte, a que la ruta entre el ovario funcional (izquierdo) y el ostium derecho presenta más obstáculos que hacia el ostium izquierdo. En *U. lobatus* (White *et al.*, 2001), también el útero izquierdo es de mayor tamaño y la asimetría comienza a observarse antes de alcanzar la madurez; sin embargo, a diferencia de *P. magdalенаe* y como se mencionó anteriormente, el derecho nunca llega a ser funcional.

La estructura microscópica de los trofonemas de *P. magdalенаe* es similar a la descrita en otras especies como *Pteroplatea* (= *Gymnura*) *micrura* (Wood-Mason & Alcock, 1891), *U. halleri* (Babel, 1967), *D. americana* (Hamlett *et al.*, 1996) y *D.*

*bleekeri* (Chatchavalvanich & Visuttiapat, 1997). Según Amesbury (1997) y Hamlett *et al.* (1996, 2005b), dicha estructura, y por lo tanto la cantidad de histótrofo producido, el contenido de nutrientes y la distancia de difusión para el intercambio de oxígeno entre la madre y la(s) cría(s), varían durante la gestación. En *D. americana* por ejemplo, durante la gestación temprana, la vascularización de los trofonemas es moderada y los vasos sanguíneos periféricos están cubiertos por un epitelio cúbico simple; en la gestación tardía el diámetro de los capilares aumenta y el epitelio pasa a ser plano simple (Hamlett *et al.*, 1996). En *P. magdalenae* por el contrario, es posible encontrar epitelios cúbicos sobre los capilares de hembras con gestación tardía. Incluso, las hembras maduras ingravidas también presentaron abundante vascularización y capilares de gran diámetro. Con relación a la variación en el contenido de nutrientes, se observó que las hembras de *P. magdalenae* con los embriones de mayor desarrollo, presentaron gránulos de mucopolisacáridos neutros en las células del epitelio uterino, lo cual hace suponer que la producción de estos carbohidratos se da finalizando el período de gestación, lo cual podría proporcionarle a los neonatos una reserva energética importante antes de capturar alimentos del medio. Sin embargo, el nivel al cual fue seccionada la muestra pudo afectar los resultados. En cuanto a esto, Hamlett *et al.* (1996) observaron que en *D. americana* no todos los trofonemas producen secreciones a la vez, por lo cual concluyeron que mientras unos trofonemas están activos, otros se encuentran inactivos. En *P. magdalenae*, las células epiteliales de todas las hembras gestantes presentaron gotas de lípidos, lo cual sugiere que estos compuestos posiblemente se secretan durante toda la preñez o por lo menos, durante todo el desarrollo embrionario tardío.

Ranzi (1934) estableció que los leucocitos desintegran las células epiteliales de los trofonemas y después de este proceso comienzan las secreciones úterinas. Sin embargo, Hamlett & Koob (1999), indicaron que esta situación nunca fue observada en *D. americana* ni en *Rhinoptera bonasus* y que lo planteado por Ranzi (1934) pudo deberse a un artefacto de la fijación o a una interpretación

errónea de los resultados. No obstante, la observación en *P. magdalenae* de abundantes células sanguíneas y restos de células epiteliales en el lumen uterino de algunas hembras, sugiere que en este caso también los leucocitos pueden afectar la estructura del epitelio.

Debido a que los órganos reproductivos del lado izquierdo difieren significativamente en tamaño, con respecto a los del lado derecho, muy posiblemente estos presentan una mayor actividad y contribución al éxito reproductivo. Generalmente, el tracto reproductivo de las hembras de peces cartilagosos presenta variaciones marcadas con respecto a la distribución y desarrollo del mismo (Worms 1977).

Teshima & Takeshita (1992) reportan para *P. magdalenae* del departamento de Bolívar (Colombia) una madurez sexual entre 17 y 21 cm AD (47.6% del AD máximo); este resultado obedeció a que las hembras de 15 cm AD presentaron folículos ováricos diminutos y úteros como filamentos, mientras que las de 17 y 21 cm contenían ovocitos próximos a la ovulación (2.5 cm de diámetro) y embriones en el útero, respectivamente. En este trabajo, la mayoría de las hembras a partir de 13.6 cm AD, tenían estructuras bien desarrolladas y otras, de 16 cm AD en adelante, presentaron crías, llevando esto a que la especie presentara una talla mediana de madurez sexual de 14.4 cm AD (32.8% del AD máximo); este porcentaje también es menor que el encontrado en otras especies de la familia Potamotrygonidae (Tabla 1). En cuanto a la diferencia entre la talla mediana de madurez sexual y la talla mediana de preñez (17.8 cm AD), es posible que el número de hembras preñadas colectadas influyera en estos resultados; sin embargo, Walker (2005) menciona que en algunos condriictios dicho período puede demorar un año o menos y en otros hasta varios años, dependiendo del ciclo ovárico y reproductivo de cada especie. Por ejemplo, en la raya espinosa *U. rogersi*, el  $AD_{50}$  de madurez (11.8 a 12.3 cm) y de preñez (12.5 cm) son similares,

debido a que esta especie presenta un ciclo reproductivo corto (Mejía-Falla *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que a partir de las ojivas de madurez, realizadas con base en todo el tracto reproductivo y con cada estructura por separado, se obtuvo el mismo  $AD_{50}$ , la condición de desarrollo de cualquier órgano del tracto reproductivo puede tomarse como referencia al momento de determinar la madurez sexual de las hembras de *P. magdalенаe*, pues se presenta sincronía en la organogénesis. Aun así, se recomienda que la madurez sexual sea establecida considerando todas las estructuras en conjunto o, en ausencia de ovarios por descomposición, se puede recurrir a características como la consistencia y la coloración de la glándula oviducal.

De las nueve hembras preñadas, las que alojaban un solo embrión presentaron un ancho de disco entre 16 y 20.5 cm; a partir de esta última talla el número de embriones aumentó (Figura 13), situación que es consistente con el incremento drástico en el ancho de los órganos reproductivos del lado izquierdo (Figura 14). Esto ha sido observado en otras especies de rayas como *Urobatis halleri* (Babel, 1967), *Urotrygon chilensis* (Rubio, 2009) y *Urotrygon rogersi* (Mejía-Falla *et al.*, 2012); los últimos autores plantean que estas características influyen en el desarrollo adecuado de los embriones. La fecundidad uterina promedio (2.9) fue similar a la encontrada en *Plesiotrygon iwamae* (2), *Paratrygon aiereba* (2), *Potamotrygon orbignyi* (2), *Potamotrygon schroederi* (2) y *Potamotrygon* sp. C (Charvet-Almeida *et al.*, 2005; Tabla 2). Teshima & Takeshita (1992) registraron para *P. magdalенаe* una fecundidad de dos embriones por hembra; sin embargo, de las 44 hembras que colectaron sólo dos, con 21 y 24 cm AD, se encontraban preñadas. Estos autores encontraron individuos con sacos vitelinos vacíos y muy reducidos entre 8.5 y 9.7 cm AD; no obstante, el ejemplar más pequeño sin saco vitelino fue de 8.0 cm AD, por lo cual concluyeron que los embriones nacen antes de alcanzar los 10 cm AD. Estos resultados son similares a los encontrados en el

presente trabajo, ya que el embrión más grande y con escaso vitelo fue de 8.5 cm AD; mientras que el individuo más pequeño sin saco vitelino fue de 8.0 cm AD.

## 5. CONCLUSIONES

Las descripciones del tracto digestivo de las hembras de *P. magdalanae* permitieron establecer seis estados de madurez sexual: Inmadura, En maduración, Madura pre-gestante, Madura preñada, Madura post-parto y Madura en recrudescencia. Aparentemente, la especie presenta un ciclo reproductivo continuo, puesto que hay crecimiento folicular durante la gestación. El tracto reproductivo es funcional en su totalidad; no obstante, los órganos del lado izquierdo, posiblemente, presentan una mayor contribución al éxito reproductivo, ya que son significativamente de mayor tamaño que los del lado derecho. Además, la producción de ovocitos viables por parte del ovario derecho es ocasional. Al parecer, el órgano epigonal participa en la degradación de los componentes de los folículos atrésicos. La glándula oviducal presenta solo dos zonas, probablemente las productoras de las capas de gelatina que rodean al embrión. Con relación a otros potamotrigónidos, *P. magdalanae* alcanza la madurez sexual temprano en el desarrollo; sin embargo, la primera preñez parece ser retardada. La fecundidad uterina promedio fue baja, dependiente de la talla materna, y se relacionó con el aumento drástico en el tamaño de los órganos reproductivos del lado izquierdo.

## 6. REFERENCIAS

- ACERO, A., GRIJALBA-BENDECK, M., MORENO, F., ACEVEDO, K. & GONZÁLEZ, E. (2008). Histología comparada del sistema reproductivo de cuatro especies de rayas caribeñas (Chondrichthyes: Batoidea). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **32**, 571-586.
- ACHENBACH, G. M. & ACHENBACH, S. V. M. (1976). Notas acerca de algunas especies de raya fluvial (Batoidei, Potamotrygonidae), que frecuentan el sistema hidrografico del rio Parana medio en el Departamento La Capital (Santa Fe-Argentina). *Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"* **8**, 1-34.
- ALMEIDA, M. P. (2003). Pesca, policromatismo e aspectos sistemáticos de *Potamotrygon scobina*, Garman 1913 (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) da região da Ilha de Colares da Ilha de Marajó, Pará. Unpublished M.Sc. Thesis, Museu Paraense Emilio Goeldi and Universidade Federal do Para, Belém, Brasil.
- ALMEIDA, M. P. (2008). Historia natural das raias de agua doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na ilha de Marajo (Para-Brasil). Unpublished Ph.D. Dissertation, Museu Paraense Emilio Goeldi and Universidade Federal do Para, Belém, Brasil.
- AMESBURY, E. (1997). Embryo development and nutrition in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina* (Elasmobranchii, Dasyatidae). Unpublished Ph.D. Thesis. University of Central Florida, Orlando.

- ANDREUCCETTI, P., IODICE, M., PRISCO, M. & GUALTIERI, R. (1999). Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the elasmobranch *Raja asterias*. *The Anatomical Record* **255**, 180-187.
- ARAUJO, M. L. G. (1998). Biología reproductiva e pesca de *Potamotrygon* sp. C (Chondrichthyes-Potamotrygonidae), no medio rio Negro, Amazonas. Unpublished M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil.
- ARAÚJO, M. L. G., CHARVET-ALMEIDA, P., PINTO DE ALMEIDA, M. & PEREIRA, H. (2004). Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document presented to CITES Animals Committee, AC 20, Inf. 8: 1-6.
- ARAÚJO, M. L. G. (2009). *Potamotrygon schroederi*. In *IUCN Red List of Threatened Species*. Available at [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (last accessed 14 October 2011).
- BABEL, J. S. (1967). Reproduction, life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. *Fishery Bulletin* **137**, 1-104.
- BARONE, M., DE RANIERI, S., FABIANI, O., PIRONE, A. & SERENA, F. (2007). Gametogenesis and maturity stages scale of *Raja asterias* Delaroché, 1809 (Chondrichthyes, Rajidae) from the South Ligurian Sea. *Hydrobiologia* **580**, 245-254.
- CALDAS, J. P., CASTRO-GONZÁLEZ, E., PUENTES, V., RUEDA, M., LASSO, C., DUARTE, L. O., GRIJALBA-BENDECK, M., GÓMEZ, F., NAVIA, A. F., MEJÍA-FALLA, P. A., BESSUDO, S., DIAZGRANADOS, M. C. & ZAPATA, L. A. (2010). *Plan de Acción Nacional para la Conservación y Manejo de Tiburones*,

*Rayas y Quimeras de Colombia (PAN -Tiburones Colombia)*. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario.

CARRIER, J. C, PRATT, H. L. & CASTRO J. I. (2004). Reproductive Biology of Elasmobranchs. In *Biology of sharks and their relatives* (Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R., eds.), pp. 269-286. Florida: CRC Press LLC.

CARVALHO, M. R. & N. R. LOVEJOY. (2011). Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingray from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* **2776**, 13-48.

CASTEX, M. N. (1963). Observaciones sobre la raya de río *Potamotrygon motoro* (Müller y Henle). Comunicaciones del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. *Hidrobiología* **1**, 7-14.

CHARVET-ALMEIDA, P. (2001). Ocorrência, biologia e uso das raias de água doce na baía de Marajo (Para, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Unpublished M.Sc. Dissertation, Museu Paraense Emilio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Parará, Brasil.

CHARVET-ALMEIDA, P. & PINTO DE ALMEIDA, M. (2004). *Potamotrygon magdalenae*. In *IUCN Red List of Threatened Species*. Available at [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (last accessed 14 October 2011).

CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G. & PINTO DE ALMEIDA, M. (2005). Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwestern Atlantic Fishery Science* **35**, 165-171.

- CHARVET-ALMEIDA, P. (2006). Historia natural e conservacao das raias de agua doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no medio rio Xingu, area de influencia do projeto hidreletrico de Belo Monte (Para, Brasil). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Federal da Paraiba, Paraiba, Brasil.
- CHATCHAVALVANICH, K. & VISUTTIPAT, R. (1997). Gross and microscopic structures of the female reproductive system in the whiptale stingray (*Dasyatis bleekeri*). *Thammasat International Journal of Science and Technology* **2**, 47-55.
- COLONELLO, J. H. (2009). Ecología reproductiva de tres batoideos (Chondrichthyes): *Atlantoraja castelnaui* (Rajidae), *Rioraja agassizi* (Rajidae) y *Zapteryx brevirostris* (Rhinobatidae). Implicancias de distintas estrategias reproductivas en un escenario de explotación comercial intensiva. Unpublished Ph.D. Thesis, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Argentina.
- COMPAGNO, L. J. V. & COOK, S. F. (1995). The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: Status of taxa and prospects for the future. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* **8**, 62-90.
- DAHL, G. (1971). *Los peces del norte de Colombia*. Bogotá: Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables.
- DE CARO, M., INDOLFI, P., IODICE, C., SPAGNUOLO, S., TAMMARO, S. & MOTTA, C. M. (1998). How the ovarian follicle of *Podarcis sicula* recycles the DNA of its nurse, regressing follicle cells. *Molecular Reproduction and Development* **51**, 421-429.

- DE CARVALHO, M. R., LOVEJOY, N. & ROSA, R. (2003). Family Potamotrygonidae (River stingrays). In *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R., Kullander, S. & Ferraris, C., eds.), pp. 22-28. Porto Alegre: Edipucrs.
- DÍAZ-ANDRADE, M., GALÍNDEZ, E. J. & 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. *Brazilian Journal of Biology* **69**, 405-413.
- DÍAZ-ANDRADE, M. C., GALÍNDEZ, E. J., LÓPEZ-CAZORLA, A. & ESTECONDO, S. (2011). Ovarian Folliculogenesis in the Smallnose Fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *International Journal of Morphology* **29**, 174-181.
- GALÍNDEZ, E. J. & ESTECONDO, S. (2008). Histological remarks of the oviduct and the oviducal gland of *Sympterygia acuta* Garman, 1877. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 359-365.
- GALÍNDEZ, E. J., DÍAZ-ANDRADE, M. C., AVACA, M. S. & ESTECONDO, S. (2010). Morphological study of the oviductal gland in the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller and Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Brazilian Journal of Biology* **70**, 325-333.
- GILBERT, S. F. (2005). La saga de la línea germinal. In *Biología del desarrollo* (Gilbert, S. F., ed.), pp. 655-691. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- GILMORE, R. G., JR., PUTZ, O. & DODRILL, J. W. (2005). Oophagy, Intrauterine Cannibalism and Reproductive Strategy in Lamnoid Sharks. In *Reproductive*

*Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.), pp. 435-462. Enfield (NH): Science Publishers.

GRAY, P. (1952). *Handbook of Basic Microtechnique*. Philadelphia: The Blakiston Company.

GRIJALBA-BENDECK, M., ACERO, P. & GONZÁLEZ, E. (2008). Biología reproductiva de *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) (Batoidea: Rajiformes) en el Caribe colombiano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **43**, 469-481.

HAMLETT, W. C., MUSICK, J. A., EULITT, A. M., JARRELL, R. L. & KELLY, M. A. (1996). Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for uterolactation and gas exchange in the Southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal of Zoology* **74**, 1417-1430.

HAMLETT, W. C., KNIGHT, D. P., KOOB, T. J., JEZIOR, M., LOUNG, T., ROZYCKI, T., BRUNETTE, N. & HYSSELL, M. K. (1998). Survey of oviducal gland structure and function in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology* **282**, 399-420.

HAMLETT, W. C. & KOOB, T. (1999). Female reproductive system. In *Sharks, Skates and Rays. The biology of Elasmobranch Fishes* (Hamlett, W. C., ed.), pp. 398-443. Baltimore: The John Hopkins University Press.

HAMLETT, W., JEZIOR, M. & SPIELER, R. (1999a). Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray, *Urolophus jamaicensis*. *Annals of Anatomy* **181**, 159-72.

- HAMLETT, W. C., HYSELL, M., JEZIOR, M., ROZYCKI, T., BRUNETTE, N. & TUMILTY, K. (1999b). Fundamental zonation in elasmobranch oviducal glands. In *Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference, Nouméa* (Séret, B. & Sire, J.-Y., eds.), pp. 271-280. Paris, Société Française d'Ichtyologie.
- HAMLETT, W. C., FISHELSON, L., BARANES, A., HYSELL, C. K. & SEVER, D. M. (2002). Ultrastructural analysis of the oviducal gland and sperm storage in the Oman shark, *Iago omanensis*. *Marine and Freshwater Research* **53**, 601-613.
- HAMLETT, W. C., KNIGHT, D. P., PEREIRA, F. T. V., STEELE, J. & SEVER, D. M. (2005a). Oviducal Glands in Chondrichthyans. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.), pp. 301-336. Enfield (NH): Science Publishers.
- HAMLETT, W. C., KORMANIK, G., STORRIE, M., STEVENS, B. & WALKER, T. I. (2005b). Chondrichthyan Parity, Lecithotrophy and Matrotrophy. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.), pp. 395-434. Enfield (NH): Science Publishers.
- JOLLIE, W. P. & JOLLIE, L. G. (1967). Electron microscopic observations on accommodations to pregnancy in the uterus of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *Journal of Ultrastructure Research* **20**, 161-178.
- JOUNG, S. J. & CHEN, C. T. (1995). Reproduction in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the waters off northeastern Taiwan. *Copeia* **1995**, 659-665.

- KOOB, T. J. & STRAUS, J. W. (1998). On the role of egg jelly in *Raja erinacea* egg capsule. *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory* **37**, 117-119.
- LASSO, C. A., RIAL, A.B. & LASSO-ALCALÁ, O. (1996). Notes on the biology of the freshwater stingrays *Paratrygon aiereba* (Müller and Henle, 1841) and *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology* **2**, 39-52.
- LIU, K. M., CHEN, C. T., LIAO, T. H. & JOUNG, S. J. (1999). Age, growth, and reproduction of the pelagic thresher shark, *Alopias pelagicus* in the Northwestern. *Copeia* **1999**, 68-74.
- LÓPEZ, J. (2009). Aspectos biológicos de la raya látigo *Dasyatis longa* (Pisces: Dasyatidae) de la zona central del Pacífico colombiano. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
- LUNA, L. G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of the pathology*. 3rd ed. New York: McGrawHill.
- LUTTON, B. V., GEORGE, J. ST., MURRIN, C. R., FILETI, L.A. & CALLARD, I. P. (2005). The elasmobranch ovary. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, batoids and chimaeras* (Hamlett, W. C., ed.), pp. 237-281. Enfield (NH): Science Publishers.
- MCMILLAN, D. (2007). *Fish Histology: Female Reproductive System*. Dordrecht: Springer.
- MEJÍA-FALLA, P. A., RAMÍREZ-LUNA, V., USMA, J., MUÑOZ-OSORIO, L., MALDONADO-OCAMPO, J., SANABRIA, A. & ALONSO, S. (2009). Estado del

conocimiento de las rayas dulceacuícolas de Colombia. In *Avances en el conocimiento de tiburones, rayas y quimeras de Colombia* (Puentes, V., Navia, A., Mejía-Falla, P. A., Caldas, J., Diazgranados, M. & Zapata-Padilla, L., eds.), pp. 132-195. Fundación SQUALUS, Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto Colombiano Agropecuario, COLCIENCIAS, Conservación Internacional, WWF Colombia.

MEJÍA-FALLA, P. A., NAVIA, A. F. & CORTÉS, E. (2012). Reproductive variables of *Urotrygon rogersi* (Batoidea: Urotrygonidae): a species with a triannual reproductive cycle in the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology*. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03237.x

MOTTA, C. M., CASTRIOTA-SCANDERBERG, M., FILOSA, S. & ANDREUCCETTI, P. (1995). Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology* **273**, 247-256.

MOURA, T., SERRA-PEREIRA, B., GORDO, L. S. & FIGUEIREDO, I. (2011). Sperm storage in males and females of the deepwater shark Portuguese dogfish with notes on oviducal gland microscopic organization. *Journal of Zoology* **283**, 210-220.

ODDONE, M., AMORIM, A. & MANCINI, P. (2008). Reproductive biology of the spotback skate, *Atlantoraja castelnaui* (Ribeiro, 1907) (Chondrichthyes, Rajidae), in southeastern Brazilian waters. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **43**, 327-334.

PRATT, H. (1988). Elasmobranch Gonad Structure: A Description and Survey. *Copeia* **3**, 719-729.

- PRESS, N. (1964). An unusual organelle in avian ovaries. *Journal of Ultrastructure Research* **10**, 528-546.
- PRISCO, M., RICCHIARI, L. & ANDREUCETTI, P. (2001). An ultrastructural study of germ cells during ovarian differentiation in *Torpedo marmorata*. *The Anatomical Record* **263**, 239-47.
- PRISCO, M., LOREDANA, R. & PIERO, A. (2002a). Ultrastructural studies on developing follicles of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 78-86.
- PRISCO, M., ROMANO, M., RICCHIARI, L., LIMATOLA, E. & ANDREUCETTI, P. (2002b). An ultrastructural study on the vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *General and Comparative Endocrinology* **128**, 171-9.
- PRISCO, M., LIGUORO, A., RICCHIARI, L., DEL GIUDICE, G. & ANDREUCETTI, P. (2007). Oogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **17**, 1-10.
- RANZI, S. (1934). Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parti II e III. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* **13**, 331-437.
- RAHIL, K. S. & NARBAITZ, R. (1973). Ultrastructural studies on the relationship between follicular cells and growing oocytes in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Journal of Anatomy* **115**, 175-186.
- RODRÍGUEZ-GUERRA, J. C., LASSO, C. A. & LASSO-ALCALÁ, O. M. (2007). Aportación al conocimiento de la bioecología de la raya fluvio-estuarina *Potamotrygon* sp. (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) en el delta del Orinoco

y golfo de Paria, Venezuela. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales* **67**, 83-104.

ROSA, R. S. (1985). A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Unpublished Ph.D. Thesis, College of William and Mary, Williamsburg.

ROSA, R., CHARVET-ALMEIDA, P. & DIBAN, C. (2010). Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays. In *Sharks and their Relatives II: Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation* (Carrier, J., Musick, J. & Heithaus, M., eds.), pp. 241-281. New York: CRC Press.

RUBIO, M. S. (2009). Aspectos reproductivos de la raya *Urotrygon chilensis* (Günther, 1871) en las costas de Sinaloa, México. Unpublished B.Sc. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

SERRA-PEREIRA, B., AFONSO, F., FARIAS, I., JOYCE, P., ELLIS, M., FIGUEIREDO, I. & SERRANO, L. (2011). The development of the oviducal gland in the Rajid thornback ray, *Raja clavata*. *Helgoland Marine Research* **65**, 399-411.

SILVA, J. C. P. B. DA & M. R. DE CARVALHO. (2011). A new species of neotropical freshwater stingray of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 from the Río Madre de Díos, Perú (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* **51**, 139-154.

SNELSON, F. F., WILLIAMS-HOOPER, S. E. & SCHMID, T. H. (1988). Reproduction and ecology of the atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, in Florida Coastal Lagoons. *Copeia* **3**, 729-739.

- SNELSON, F. F., WILLIAMS-HOOPER, S. E. & SCHMID, T. H. (1989). Biology of the bluntnose stingray, *Dasyatis sayi*, in Florida Coastal Lagoons. *Bulletin of Marine Science* **45**, 15-25.
- STEHMANN, M. (2002). Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes). *Archive of Fishery and Marine Research* **50**, 3-48.
- TESHIMA, K. & TAKESHITA, K. (1992). Reproduction of the Freshwater Stingray, *Potamotrygon magdalenae* Taken from the Magdalena River System in Colombia, South America. *Bulletin of the Seikai National Fisheries Research Institute* **70**, 11-27.
- THORSON, T. B., LANGHAMMER, J. K. & OETINGER, M. I. (1983). Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes* **9**, 3-24.
- TSANG, P. & CALLARD, I. P. (1983). In vitro steroid production by ovarian granulosa cells of *Squalus acanthias*. *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory* **23**, 78-79.
- VILLAVICENCIO-GARAYZAR, C. J., HOFFMANN, C. D. & MELENDEZ, E. M. (1994). Tamaño y reproducción de la raya *Dasyatis longus* (Pisces: Dasyatidae), en Baja Almejas, Baja California Sur, Mexico. *Revista de Biología Tropical* **42**, 375-377.
- WALKER, T. (2005). Reproduction in Fisheries Science. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.), pp. 81-128. Enfield (NH): Science Publishers.

- WHITE, W. T., PLATELL, M. E. & POTTER, I. C. (2001). Relationship between reproductive biology and age composition and growth in *Urolophus lobatus* (Batoidea: Urolophidae). *Marine Biology* **138**, 135-147.
- WOOD-MASON, J. & ALCOCK, A. (1891). On the uterine villiform papillae of *Pteroplatea micrura*, and their relation to the embryo. *Proceedings of the Royal Society of London* **49**, 359-367.
- WOURMS, J. P. (1977). Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoologist* **17**, 379-410.
- WYFFELS, J. (2009). Embryonic Development of Chondrichthyan Fishes. In *Development of Non-teleost Fishes* (Kunz, Y. W., Luer, C. A. & Kapoor, B. G., eds.), pp. 1-103. Enfield (NH): Science Publishers.