

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA PESQUERA



BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Myliobatis peruvianus* “RAYA

ÁGUILA” (GARMAN, 1913) PROVENIENTE DEL PUERTO

SALAVERRY, LA LIBERTAD, PERÚ

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO PESQUERO

AUTOR: Br. MIGUEL ANTONIO VALDERRAMA HERRERA

ASESORA: Dra. ZOILA GLADIS CULQUICHICÓN MALPICA

COASESOR: Blga. KENY KANAGUSUKU GONDO

TRUJILLO – PERÚ

2019

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Dr. ORLANDO MOISÉS GONZÁLES NIEVES

RECTOR

Dr. RUBÉN CÉSAR VERA VÉLIZ

VICERRECTOR DE ACADÉMICO

Dr. WEYDER PORTOCARRERO CÁRDENAS

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. FREDDY ROGGER MEJÍA COICO

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. MOISÉS EFRAÍN DÍAZ BARBOZA

DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA PESQUERA

Dra. ALINA MABEL ZAFRA TRELLES

DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE PESQUERÍA

DEL ASESOR

La que suscribe, Dra. Zoila Gladis Culquichicón Malpica, asesora a de la tesis titulada: **BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Myliobatis peruvianus* “RAYA ÁGUILA”** (Garman, 1913) PROVENIENTE DEL PUERTO SALAVERRY, LA LIBERTAD, PERÚ.

Hace constar que la presente investigación ha sido ejecutada de conformidad con los objetivos propuestos y revisados, además acogiendo las sugerencias pertinentes al tesista.

Por lo tanto, autorizo al Bachiller Miguel Antonio Valderrama Herrera, continuar con el trámite correspondiente según sus fines.

Trujillo, enero 2019

Dra. Zoila Gladis Culquichicón Malpica

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO:

En cumplimiento con las disposiciones reglamentarias vigentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, someto a vuestra consideración la tesis titulada: BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Myliobatis peruvianus* “RAYA ÁGUILA” (Garman, 1913) PROVENIENTE DEL PUERTO SALAVERRY, LA LIBERTAD, PERÚ; siendo uno de los requisitos indispensables para optar título de Biólogo Pesquero.

Trujillo, enero 2019

Br. Miguel Antonio Valderrama Herrera

JURADO DICTAMINADOR

Dr. LUIS ÁNGELO LUJÁN BULNES

PRESIDENTE

MsC. NELSON GUSTAVO YWANAGA REH

SECRETARIO

Dra. ZOILA GLADIS CULQUICHICÓN MALPICA

VOCAL

APROBACIÓN DE TESIS

Los profesores que suscriben, miembros del jurado dictaminador, declaran que la tesis titulada “BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Myliobatis peruvianus* “RAYA ÁGUILA” (Garman, 1913) PROVENIENTE DEL PUERTO SALAVERRY, LA LIBERTAD, PERÚ” ha cumplido con los requisitos formales y fundamentales, siendo aprobada por UNANIMIDAD.

Dr. Luis Angelo Lujan Bulnes

PRESIDENTE

MsC. Nelson Gustavo Ywanaga Reh

SECRETARIO

Dra. Zoila Gladis Culquichicón Malpica

VOCAL

DEDICATORIA

A mis amigos de la Escuela Profesional de Biología Pesquera de la Universidad Nacional de Trujillo con quienes compartimos consejos, memorias, preocupaciones y alegrías durante cada clase, reuniones de estudio, viajes y salidas de campo. Son ellos quienes hicieron de la época universitaria la mejor de mi vida.

A la gente de Salaverry, quienes apoyaron en esta investigación, esta información es para su pueblo.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a mis familia por confiar siempre en mí por a pesar de las circunstancias siempre fueron pacientes y tolerantes.

A la Dra. Zoila Gladis Culquichicón Malpica, por su guía y su disposición a compartir su vasto conocimiento sobre estadística aplicada y biología reproductiva en peces.

A la Blga. Keny Kanagusuku Gondo por su colaboración, guía y ayuda desinteresada a pesar de su limitado tiempo, para la culminación de la presente investigación y por el haberme compartido su gran pasión por el mundo de los elasmobranquios.

A la Blga. Paola Andrea Mejía Falla de Fundación SQUALUS por su ayuda con información de biología reproductiva de elasmobranquios.

Al Tec. Med. José Soldado Muro, por la preparación de las láminas histológicas y su tiempo para el análisis de cada una de ellas compartiéndome su enciclopédico saber.

Al Gerente de la Empresa Nacional de Puertos, Ing. Julio César Tam Castillo y al encargado del área de Seguridad Portuaria, Sr. Pablo Ruiz Albán por las facilidades brindadas para realizar los muestreos en el Terminal Portuario de Salaverry.

A los representantes de la Gerencia Regional de La Libertad, Ing. Pesq. Julio César Medina Lescano y Blgo. Santos Saenz Vásquez, así como a los funcionarios del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), Blga. Betsy Buitrón Díaz, Blgo. Ángel Perea De La Matta y

en especial al Blgo. Germán Vela Horna, que sin su ayuda no habría sido posible la realización de esta tesis.

A los profesores que fueron parte de mi formación académica, en especial a la Dra. Bilmia Veneros, Dr. Andrés Rodríguez, Dr. Luis Pollack, Dr. Elmer Alvites, MsC. Gustavo Ywanaga, Dr. José Pérez, Dra. Katya Balta, Dra. Letty Salinas, Dra. Luz Pacheco y Dr. Jaime Mattus.

A mi amiga Valentina Delgado Torrez, quien me ayuda a hacer llegar la información obtenida de manera didáctica al pueblo de Salaverry.

Por último, a los pescadores del puerto Salaverry por permitirme participar en sus labores para realizar las colectas y su interés en el tema.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Área de Estudio.....	6
Trabajo de Campo	9
Trabajo de Laboratorio.....	13
Fase de Análisis	16
RESULTADOS.....	21
Composición Poblacional de Organismos Muestreados.....	21
Composición de Tallas	23
Proporción Sexual	25
Relación Peso – Longitud.....	27
Factor de Condición	30
Índice Gonadosomático.....	31
Índice Hepatosomático.....	32
Sistema Reproductor en Hembras.....	33
a) Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho de Ovarios	34
b) Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho del Útero.....	36
c) Relación Ancho de Disco – Número y Diámetro de Ovocitos	39
d) Estadíos de Madurez Gonadal.....	42
e) Microestructura.....	46
Sistema Reproductor en Machos	58
a) Relación Ancho de Disco – Longitud de Clasper	59
b) Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho de Testículos.....	61
c) Relación Longitud de Clasper – Largo y Ancho de Testículo.....	64
d) Estadíos de Madurez Gonadal.....	67

e) Microestructura	73
Talla de Madurez Gonadal	86
DISCUSIÓN	88
Composición Poblacional de Organismos Muestreados.....	88
Composición de Tallas	90
Proporción Sexual	92
Relación Peso – Longitud y Factor de Condición	93
Índices Biológicos	94
Sistema Reproductor en Hembras.....	95
Sistema Reproductor en Machos	99
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXO 1: Fotos.....	114
ANEXO 2: Marcha Utilizada en Histología	122



RESUMEN

Myliobatis peruvianus, conocida localmente como “raya águila” es una especie bentopelágica de aguas templadas que es capturada comercialmente en la costa peruana, siendo el único batoideo con una pesca dirigida estacional. A pesar de ello, no se cuenta con suficiente información sobre su biología y menos sobre reproducción. El objetivo del estudio fue obtener información relacionada con la biología reproductiva de *M. peruvianus* proveniente del puerto Salaverry (La Libertad). Se realizaron muestreos mensuales de desembarques durante octubre del 2017 hasta noviembre del 2018, logrando un total de 160 ejemplares. Se obtuvieron datos de ancho de disco (AD), peso, sexo, calcificación de claspers y se colectaron el hígado y las gónadas. La madurez sexual se determinó comparando el largo y calcificación de los claspers en machos, y en hembras por comparación de estructura gonadal, para corroboración se tomaron muestras histológicas procesadas por inclusión en paraplast y por tinción de Hematoxilina-Eosina. Se obtuvieron 80 machos (41–153 cm AD) y 80 hembras (42–221.6 cm AD), hallándose una proporción sexual de 1H:1M. La fecundidad ovárica promedio fue de 32 ovocitos y se estimó la talla promedio de madurez sexual (TPMS) en 163 cm y 122 cm AD para hembras y machos respectivamente. Únicamente se muestrearon ovarios maduros a partir de las segundas mitades de cada año. La anatomía gonadal es descrita y no se llegaron a encontrar embriones. Al basarse la talla mínima de captura en la TPMS, los aspectos reproductivos estudiados ayudarían en la toma de decisiones para un mejor manejo, aprovechamiento sostenible y la conservación de la pesquería de esta especie.

Palabras clave: Batoideos, Myliobatiformes, Reproducción, Perú.

ABSTRACT

Myliobatis peruvianus, locally known as “Peruvian eagle ray” is a benthopelagic ray species of temperate waters that is commercially caught in the Peruvian coast, being the only batoid with a seasonal fishing. Despite of this, there is not enough information about its biology and less about the reproduction of this species. The aim of this study was to obtain information related to the reproductive biology of *M. peruvianus* from the port of Salaverry (La Libertad). Monthly samplings were made of the fishing landings of this species during October 2017 to November 2018, achieving a total of 160 specimens. Data of disc width (DW), weight, sex and clasper calcification were obtained and liver and gonads were collected. Sexual maturity was determined comparing clasper length and calcification in males and in females by comparing gonadal structure, for corroboration histological samples processed in paraplast and with haematoxylin-eosin staining were taken. 80 males (41–153 cm DW) and 80 females (42–221.6 cm DW) were obtained finding a 1:1 sex ratio. Average ovarian fecundity was 32 oocytes and average size-at-maturity was estimated in 163 cm and 122 cm DW for males and females respectively. Mature ovaries were sampled only during the second half of each year. The anatomy of gonads is described and no embryos were found. Since minimum capture sizes are based on the average estimated size-at-maturity, the reproductive aspects studied may help in the decision making for better management, a sustainable exploitation and the conservation of the fishery of this species.

Key words: Batoids, Myliobatiformes, Reproduction, Peru

INTRODUCCIÓN

Los peces cartilaginosos o condriictios están entre los vertebrados más antiguos que existen, teniendo evidencia de su existencia desde el Devónico (Alva *et al.*, 2012) y son probablemente los peces más exitosos en cuanto a perduración histórica, ello basado en su habilidad de sobrevivir las extinciones masivas de los últimos 400 millones de años (Grogan and Lund, 2015).

La característica principal de este grupo es la presencia de un esqueleto cartilaginoso lo cual le da bastante flexibilidad y en algunas especies está parcialmente calcificado pero nunca osificado (Alva *et al.*, 2012). Otra particularidad es la presencia de escamas placoides en los 2 mayores clados de este grupo, son dentículos dérmicos que aparte de protección, ayudan a la natación del pez.

El grupo de los condriictios consta en menor medida los **Holocéfalos** (quimeras, pejegallos o peces rata) ya que es el grupo con menor número de especies, mientras que los **Elasmobranquios** que incluye a seláceos (tiburones) y batoideos (rayas, peces guitarra y peces sierra) es el más representativo.

Dentro de los batoideos, existen cuatro órdenes y es Myliobatiformes uno de los más diversos en cuanto a especies se refiere. Habitan en todas las aguas tropicales y subtropicales del mundo e incluyen especies dulceacuícolas. Entre las familias destaca Myliobatidae con cuatro géneros (*Aetobatus*, *Aetomylaeus*, *Myliobatis* y *Pteromylaeus*) y 17 especies.

Las especies *Myliobatis chilensis* y *Myliobatis peruvianus* conocidas como “Rayas Águilas” en Perú (Chirichigno y Vélez, 2008) y “Mantas” en Chile (Lamilla y

Bustamante, 2005) (no deben ser confundidas con mantas del género *Mobula*) vienen a ser dos de las más importantes en la pesquería peruana de condriktios, inclusive en el departamento de La Libertad, existe una pesquería dedicada a esta especie y las capturas se dan sobre todo cuando las especies de mayor rentabilidad escasean. A pesar que no existe información de su consumo por toneladas, se podría inferir que, a nivel nacional, los departamentos de La Libertad y Lambayeque son los principales consumidores de batoideos, ello por su inclusión en los platos locales (tales como “chinguirito”, “sudado de raya”, “tortilla de raya” y “charqui de raya”) y tener una descarga pesquera constante.

Aun así, es increíble pensar que se conoce muy poco de los elasmobranquios en el Perú, por consiguiente, es muy poco lo que se sabe sobre *Myliobatis peruvianus*. Las investigaciones mencionando a esta especie se limitan a sus caracteres morfológicos para distinguirlas en claves de identificación como con Chirichigno (1998) para Perú, Sáez y Lamilla (2012) para Chile y de distribución y zonificación como el estudio de Carbajal *et al.* (2010) realizado por IMARPE.

Incluso a nivel internacional se tiene a *M. peruvianus* como una especie con datos deficientes (DD) según la IUCN. Se determina su distribución desde Paita, Piura, Perú hasta Curiñanco, Valdivia, Chile lo que le daría una distribución a lo largo de toda la corriente de Humboldt. Se especifica que alcanza 131 cm de ancho de disco, son animales pelágicos encontrándose en la plataforma continental, aunque pueden llegar al bentos para alimentarse mas no establecerse (IUCN, 2006). Los Myliobatidos se alimentan de cefalópodos, crustáceos y bivalvos, sus dientes planos ayudan a romper las conchas de bivalvos y exoesqueleto de crustáceos. No se sabe sobre la profundidad máxima que alcanza o frecuente, tampoco del tamaño de su población ni la longevidad de los organismos y lo que resulta crítico: se desconoce totalmente su talla de madurez sexual,

talla de nacimiento, edad de madurez sexual, tiempo de gestación, duración del ciclo reproductivo y tasa de incremento poblacional (IUCN, 2006).

Los batoideos poseen fertilización interna, el macho introduce el clasper (órgano copulador y dimorfismo sexual) en la cloaca de la hembra y expulsa el semen en su interior. No ponen huevos y esto ha sido tema de discusión científica en cuanto a sus beneficios y desventajas, pero sobretodo en la antigüedad de este modo de reproducción y al parecer la viviparidad viene a ser más ancestral (Dulvy y Reynolds, 1997; Musick, 2010; Music y Ellis, 2010; Conrath y Musick, 2012). Tricas (1974, 1980) estudió el comportamiento reproductivo en *Myliobatis californica* describiendo que los machos siguen a las hembras y durante la precópula el macho se junta ventralmente con la hembra y sincronizan los aleteos (Conrath y Musick, 2012).

En general los batoideos tienen una baja fecundidad, en promedio la camada consta entre 4 y 8 crías. La fecundidad ha sido comparada con la de otros miembros de la familia Myliobatidae. Capapé *et al.* (2007) estudiaron la biología reproductiva de *Myliobatis aquila* en el sur de Francia, encontrando 6 huevos fertilizados solamente en el mes de octubre. Asimismo, capturaron 12 especímenes aparentemente neonatos entre mayo y setiembre, lo que les hizo sugerir que esta especie tiene una máxima gestación de un año (Capapé *et al.*, 2007).

Mientras que Tagliafico *et al.* (2012) que estudiaron la explotación y reproducción de *Aetobatus narinari* determinaron una fecundidad media de 3 embriones, pero en sí la fecundidad real de *M. peruvianus* sigue siendo un misterio. Son vivíparos lipidohistótrofos (durante la gestación, los embriones se alimentan de una secreción uterina lipídica): durante el desarrollo, el embrión se nutre en primera estancia por las reservas de vitelo, pero conforme procede el desarrollo, los trofonemas (vellosidades

uterinas) incrementan su longitud y secretan secreciones uterinas conocidas como histiotrofo (Hamlett *et al.* 2005b; Wourns, 1981; Conrath y Musick, 2012) o leche uterina (Grijalba *et al.*, 2008; Dulvy y Reynolds, 1997) la cual alimentará al embrión hasta el momento de su nacimiento. Hamlett *et al.* (2005b) proponen que la cantidad de lípidos en el histotrofo de *Myliobatis* es significativamente mayor que la de especies más primitivas como *Urobatis jamaicensis* (Conrath y Musick, 2012).

Cabe destacar que, aunque la pesquería es frecuente en la actualidad, la baja fecundidad, el desconocimiento del periodo de gestación y periodos de reproducción pueden mermar la disponibilidad. Como consumidores secundarios, su desaparición podría desestabilizar la dinámica comunitaria del ecosistema marino local y el problema viene a ser mayor teniendo en cuenta que la población de *M. peruvianus* tardaría años en recuperarse debido a su bajo número de crías. Por ello un estudio de su reproducción ayudaría al manejo pesquero y óptimo aprovechamiento de la especie.

OBJETIVOS

General:

- Conocer la Biología reproductiva de la “raya águila” *Myliobatis peruvianus* proveniente del puerto Salaverry

Específicos:

- Determinar la composición de tallas, proporción sexual y talla media de madurez gonadal en ambos sexos.
- Determinar los índices reproductivos como: índice gonadosomático (IGS), Índice Hepatosomático (IH) factor de condición (FC).
- Determinar la fecundidad ovárica.
- Describir y analizar la morfología externa e interna de los aparatos reproductores masculinos y femeninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Los muestreos se realizaron en Salaverry (Figura 1), distrito ubicado en las coordenadas $8^{\circ} 13' 42.35''$ S, $078^{\circ} 58' 50''$ W en plena costa norte de Perú, departamento La Libertad, provincia Trujillo.

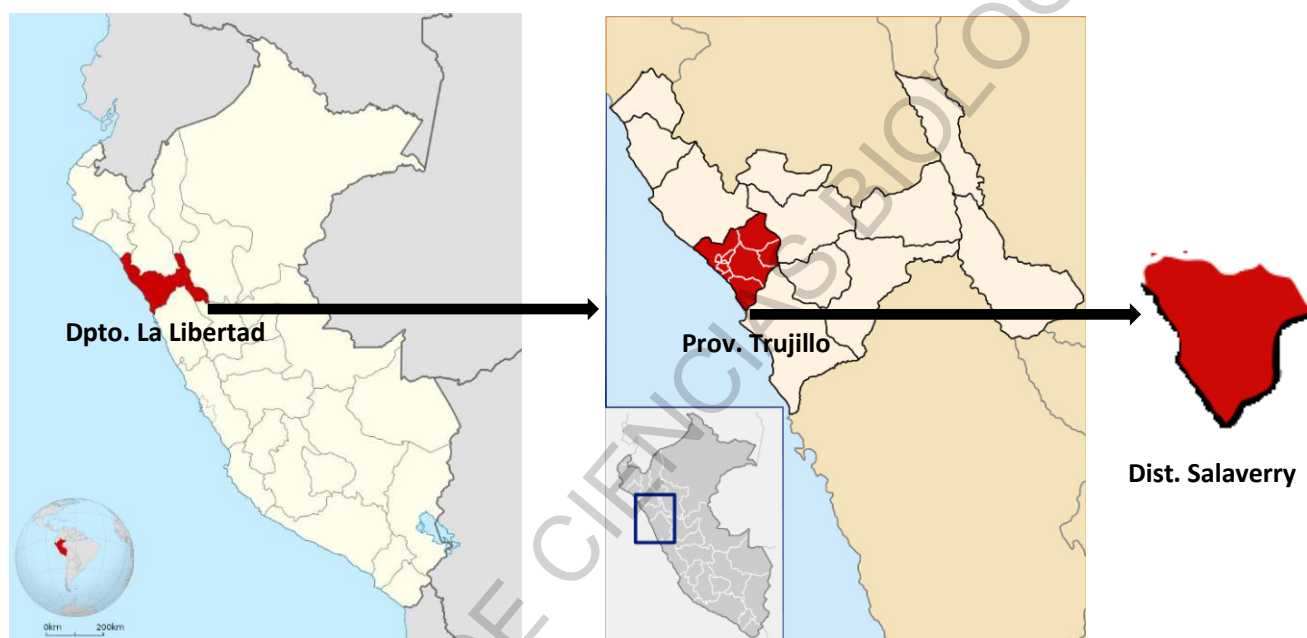


Figura 1. Localización del distrito de Salaverry, provincia de Trujillo, departamento de La Libertad en el norte de Perú. Fuente: Wikipedia

Asentado en las inmediaciones del valle del río Moche, Salaverry se ubica en la ecorregión Desierto Semicálido Tropical (Brito, 2017). El clima es cálido con inviernos suaves con temperaturas entre 14 a 20°C y veranos que van desde los 19 a 30°C , con una humedad relativa casi constante de 74 a 96% para el verano y de 82 a 97% en invierno (Gerencia Regional de Agricultura, 2010) debido a su localización en el litoral.

El mar que baña la costa de Salaverry pertenece a la ecorregión Mar Frío de la Corriente Peruana caracterizado por la influencia de la corriente de Humboldt que lleva aguas frías desde Chiloé, Chile hasta Punta Pariñas, Perú (Brack, 2006) desviándose después hacia el oeste para resurgir en las costas de las Islas Galápagos. Las aguas templadas que promedian 17°C en invierno y 21°C verano (Morón, 2000) más la presencia de los vientos alisios del sureste hacen que la precipitación sea escasa (tan solo se dan en febrero y marzo), pero hacen de la nubosidad y, por ende, la humedad relativa constantes. Asimismo, la presencia de los afloramientos (subida de nutrientes desde las profundidades hacia las capas superficiales) hace de estas aguas bastante productivas (Brack, 2006).

La importancia de la localidad se debe a que actúa como principal puerto de la ciudad de Trujillo dados los escasos 14 kilómetros que los separan. Mientras que el 50% de sus 20 000 habitantes (Municipalidad Distrital de Salaverry, 2017) depende de la actividad portuaria (Castro, 2017), la pesca viene a ser otro importante ingreso para la población local. Tradicionalmente, un pueblo de pescadores espineleros, Salaverry cambió a la "pesca de cortina" usando cada vez más artes de pesca (redes) en lugar de aparejos (líneas y anzuelos) extrayendo especies como *Mugil cephalus* "lisa", *Scomber japonicus* "caballa", *Sarda chilensis chilensis* "Bonito", *Paralanchurus peruanus* "sucó", *Prionace glauca* "Tiburón Azul" (ANEXOS - Figura 4) entre otros.

La localidad posee tres muelles: Uno administrado por el Gremio de Pescadores Artesanales a través del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES) utilizado para descargas de pesca artesanal de especies pequeñas como lorna, suco (ANEXOS - Figura 2), machete, pintadilla, guitarra (ANEXOS - Figura 3) y ocasionalmente raya águila (ANEXOS - Figura 8). Los otros dos muelles son industriales y estuvieron administrados por la Empresa Nacional de Puertos (ENAPU) hasta agosto del 2018 y

posteriormente por el consorcio privado TRAMARSA¹. Los mencionados son utilizados para carga y descarga de embarcaciones de gran calado como portacontenedores y a su vez para la carga de hielo y descarga de pesca artesanal de especies de mayor tamaño: tiburones, peces espada, pota o calamar Humboldt (ANEXOS - Figura 6), perico o mahi mahi, manta y raya águila (ANEXOS - Figura 7).

¹ A pesar que la transición se dio 3 meses antes de acabar el estudio, el complejo naviero será referido como ENAPU ya que localmente se le denomina así.

Trabajo de Campo

Los muestreos fueron realizados durante el periodo de un año, desde octubre 2017 hasta noviembre 2018, con individuos descargados de la pesca comercial para consumo humano directo. Usualmente las rayas fueron capturadas con artes de pesca llamadas popularmente “redes rayeras”, las cuales son de 14 -15 pulgadas de coco y de 80 - 100 brazadas de largo, su uso puede ser de fondo, a media agua (10 metros de profundidad aproximadamente) o en superficie. En ocasiones se utilizaba un arte de pesca alternativo: las “redes robaleras” de ocho pulgadas de coco y 50 brazadas de largo.



Figura 2. Descarga de una embarcación “rayera” atada al muelle 1 de ENAPU.

La pesca que tenía una duración de 10 a 15 días se realizaba en embarcaciones con un promedio de 10 metros de eslora y 15 toneladas de capacidad de bodega, mientras que

para la pesca de tres a cuatro días de duración se utilizaban embarcaciones con un promedio de cinco metros de eslora y seis toneladas de capacidad de bodega.

Los pescadores llevan a puerto las rayas congeladas y completas (Figura 2), por lo que se participó en el proceso de evisceramiento (retirado de órganos internos) para la toma de datos y extracción de órganos requeridos para el estudio. El evisceramiento se realizaba una vez anclada la embarcación o atada alguno de los dos muelles de ENAPU. Se hizo uso de los tres muelles según donde anclaban las embarcaciones que traían raya: mayormente en el muelle 1 o muelle 2 de ENAPU mientras que el artesanal se utilizó raramente ya que descargas de ejemplares sin eviscerar se dieron muy pocas veces.



Figura 3. Descarga de un ejemplar de gran tamaño: Una hembra de 2 metros AD.

Frecuentemente los muelles de ENAPU estaban ocupados por portacontenedores, lo que hacía que los pescadores opten por no atar la embarcación, sino anclarla y se procedía a eviscerar las rayas a bordo de la embarcación y éstas sean posteriormente llevadas por

botes pequeños con motor fuera de borda (llamados localmente “chalanas”) hasta el muelle artesanal para su distribución y comercio.

Estando a bordo de la embarcación o en el muelle (previa autorización del patrón de la embarcación y/o gerente de ENAPU), se seleccionaban ejemplares al azar. Se empezó identificando la especie por medio de las placas dentales ya que, si bien *M. peruvianus* es la más frecuente, de vez en cuando se captura a su pariente, *Myliobatis chilensis* cuya morfología es idéntica, distinguiéndose rápidamente por la disposición y forma de los dientes.



Figura 4. Toma de longitud de uno de los ejemplares más grandes encontrados.

Una vez identificada la especie, con ayuda de una cinta métrica graduada al milímetro (Figura 4), se tomó el ancho de disco y con una balanza Patrick's TCS-K2² (en caso de no contar con ella ya que era exclusiva de los muelles se usaba una romana manual de 100kg) se tomó el peso del ejemplar, en caso de ser un macho se medía el largo del clasper (órgano copulador masculino llamado también gonopterigio, mixopterigio, pterigopodio o abrazaderas) (Figura 5) y por medio del tacto se verificaba su calcificación y la presencia de semen.

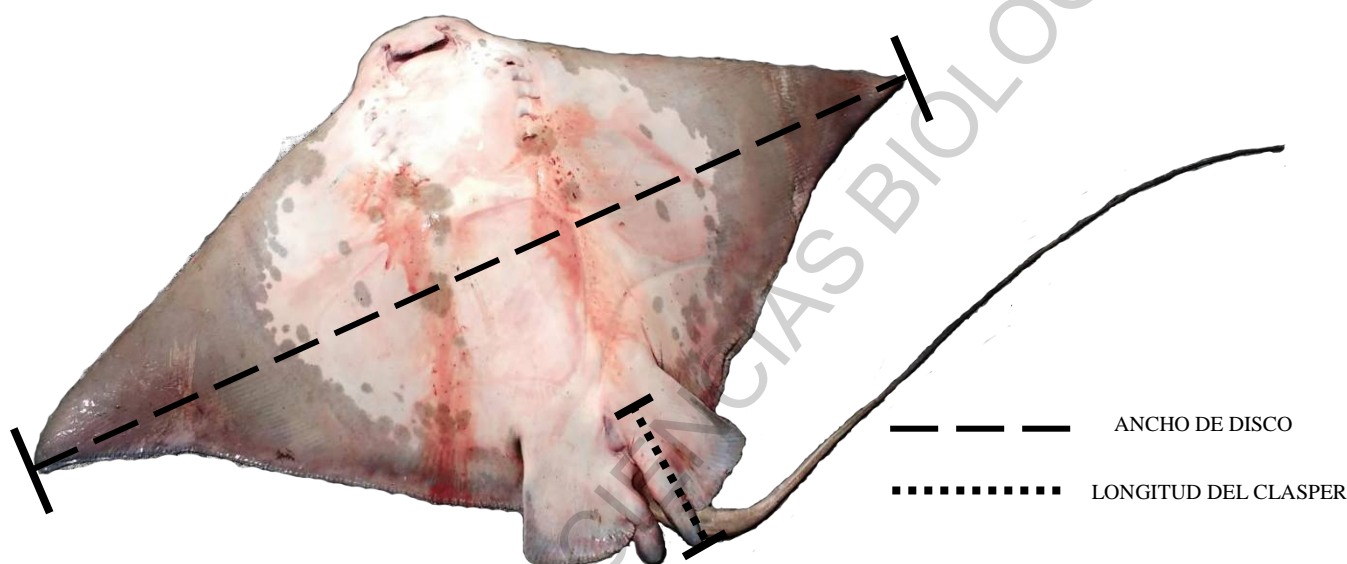


Figura 5. Datos morfométricos a tomar en un ejemplar macho de *Myliobatis peruvianus*.

El ejemplar era luego colocado boca arriba y con un cuchillo de cocina de 28 cm de hoja, se realizaba la incisión desde la cintura escapular hasta el ano. Este procedimiento es realizado por los pescadores para ahorrar tiempo y sacar todos los órganos internos de manera efectiva y para estos muestreos resultó bastante eficiente. Se extrajeron el hígado y el aparato reproductor y se colocaron en bolsas herméticas ZipLock.

² Ejemplares mayores a 80kg fueron seccionados y pesados en esta balanza, a este peso se le restó el de las cajas de pesca que eran contenidos y se le agregó el peso de sus órganos internos.

Trabajo de Laboratorio

Los primeros ejemplares fueron adquiridos y llevados al laboratorio de Biología Pesquera de la Universidad Nacional de Trujillo, ello porque eran relativamente pequeños y por contar con escasa muestra (ANEXOS - Figura 9). No obstante, los costos de adquirir ejemplares, la preservación de la muestra y la dificultad de transportar ejemplares de mayor tamaño hizo que solo los órganos sean analizados en el laboratorio. En aquel ambiente, con una regla graduada al milímetro se realizó la toma de largo y ancho de gónadas. El peso hepático y de ovarios se tomó con una balanza Kambor KFS-1000 de 0.1 g de sensibilidad.

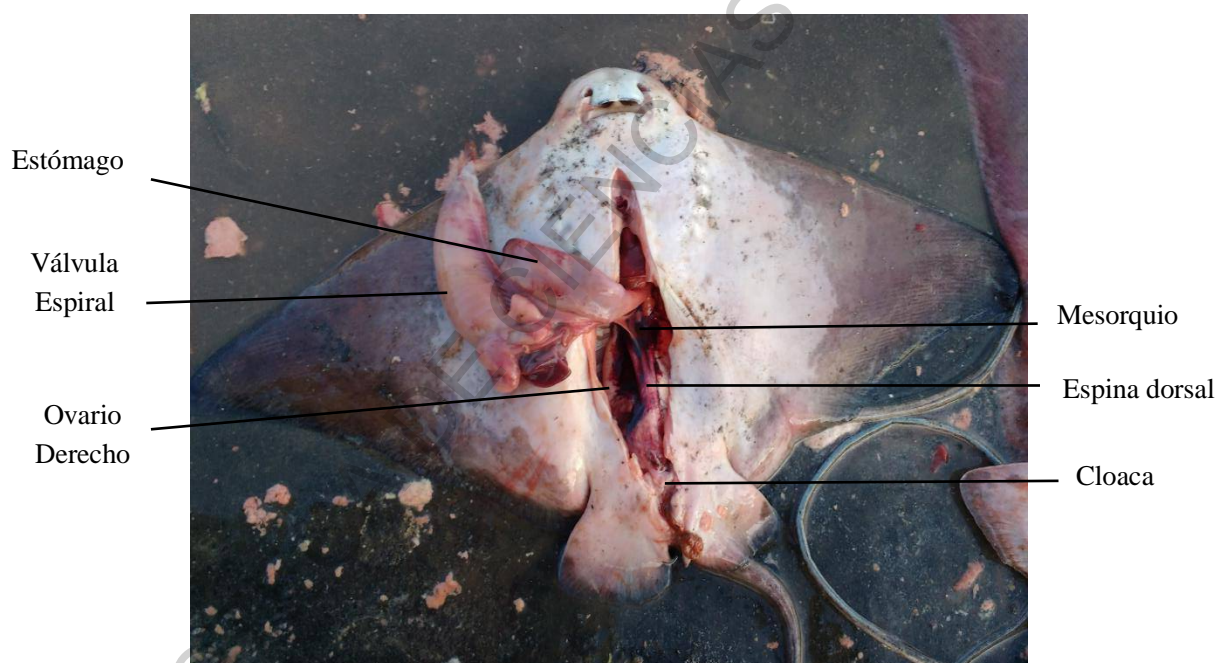


Figura 6. Hembra inmadura al ser eviscerada: se remueve el aparato digestivo, donde detrás de la válvula espiral y suspendidos por el mesovario, se encuentran los ovarios visiblemente inmaduros.

Se presentaron ocasiones donde estas medidas fueron tomadas en el muelle, sobre todo cuando los hígados eran demasiado grandes para ser transportados en una bolsa.

Para determinar la fecundidad, se contaron los ovocitos vascularizados ya que son éstos los de mayor probabilidad de ser los que estén listos para ser fecundados, asimismo se obtuvo el diámetro de cada uno con un vernier digital modelo OP002 (Figura 7).



Figura 7. Toma de diámetro de ovocitos. Solo se contabilizaron aquellos que presentaron vitelo y vascularización.

Se escogieron siete ejemplares para estudios de histología: una hembra madura, una juvenil, una inmadura, un dos machos maduros de diferente talla, un macho juvenil y un inmaduro; los cuales fueron determinados según largo y calcificación del clasper para machos y estadio ovárico para las hembras. Se obtuvieron muestras de un ovario maduro, un ovocito vitelogénico, órgano epigonal, útero; parte anterior, media y posterior de un

testículo maduro, un testículo inmaduro, un epidídimo y el órgano epigonal rodeando a un testículo inmaduro. Todas estas muestras fueron conservadas en formalina neutra al 4% cubriendo totalmente la estructura para posteriormente prepararlos con histosec, para ello, se contó con el servicio del técnico José Soldado Muro (marcha en Anexo 2).

Las láminas obtenidas fueron llevadas al laboratorio costero del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en Chimbote, Ancash. Con la ayuda de un microscopio compuesto Leica ICC50 HD se realizó la observación de cada lámina. Las micrografías fueron tomadas con el software Leica Application Suite Version 45.0.

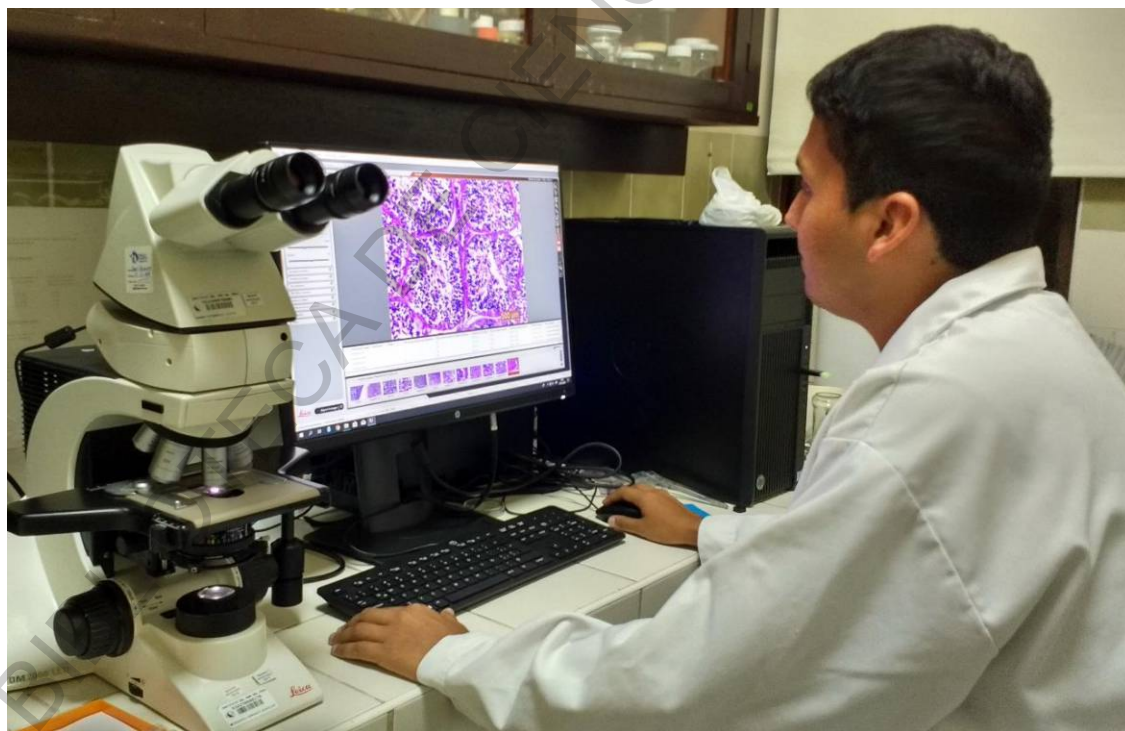


Figura 8. Observación al microscopio y toma de micrografías.

Fase de Análisis

Se obtuvo la composición de tallas y se calculó la proporción sexual según la fórmula de Wenner, (1972) citado por Tresierra et al. (2014).

$$\% \text{ machos} = \left(\frac{Nm}{Nt} \right) * 100$$

Donde:

Nm = Número de machos

Nt= Número total de individuos registrados

Se aplicó posteriormente una prueba de X^2 con 95% de nivel de confianza siendo la proporción esperada de 1:1 la hipótesis nula (H_0).

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde:

O = Valor Observado

E= Valor Esperado

Tabla 1. Escala de desarrollo de condición reproductiva de peces cartilaginosos según Holden y Raitt (1975), Tresierra y Culquichicón (1993), Acevedo *et al.* (2007), Colonello *et al.* (2007) y Grijalba-Bendeck *et al.* (2008).

HEMBRAS	
I	INMADURA: Ovarios pequeños, poco desarrollados, acuosos con oviductos poco diferenciados.
II	EN MADURACIÓN: Ovarios delgados, consistentes y con ovocitos pre vitelogénicos. La glándula nidamental y los oviductos se desarrollan.
IIIa	MADURA SIN EMBRIONES: Ovarios con ovocitos visibles, oviductos visibles y gruesos, glándulas nidamentales formadas. Útero parcialmente ensanchado y con paredes delgadas.
IIIb	MADURA CON EMBRIONES: Ovarios con ovocitos visibles, embriones dentro de úteros, éstos últimos parcialmente ensanchados.
IV	EXPULSANTE O POSTPARTO: Útero ensanchado con presencia de material placentario. Paredes sanguinolentas y flácidas. Abertura cloacal expandida.
MACHOS	
I	INMADURO: Claspers pequeños y flácidos, no sobrepasan la aleta caudal y su rotación es menor a 360°. Rifiodón cerrado. Testículos acuosos, ductos poco diferenciados.
II	EN MADURACIÓN: Claspers aumentan de tamaño, se extienden hasta el borde anterior de las aletas pélvicas y están parcialmente calcificados. Testículos consistentes con vesículas espermáticas desarrolladas, pero con abundante órgano epigonal entre éstas. Ductos bien desarrollados, epidídimos enrollados en la porción anterior y media del ducto eferente.
III	MADURO: Calcificación total de claspers con rotación igual a 360° y se extienden mucho más allá del borde anterior de las aletas pélvicas, rifiodón abierto y presencia de semen. Testículos con lóbulos prominentes indicativos de activa producción espermática, conducto deferente se extiende adyacente a la columna vertebral, epidídimo enrollado a lo largo de todo el conducto hasta llegar a la vesícula seminal.

Para los estadios de desarrollo se utilizaron como referencia las escalas de Holden y Raitt (1975) citado por Tresierra *et al.* (2014); Tresierra y Culquichicón (1993), Acevedo *et al.* (2007), Colonello, Christiansen y Macchi (2007) y Grijalba-Bendeck *et al.* (2012) que

tienen en cuenta el desarrollo gonadal y de órgano copulador en el caso de machos (Tabla 1). Las escalas macroscópicas son validadas posteriormente con los estudios histológicos y se construyó una nueva escala para *M. peruvianus*.

Por medio del programa Excel 2013 se realizaron diagramas de proporción general y mensual de los estadios de madurez en hembras y machos encontrados (Grijalba – Bendeck *et al.*, 2012). Se construyeron también gráficos de dispersión comparando ancho de disco y el peso corporal, la longitud total y la longitud de clasper, ancho de disco y longitud de clasper, ancho de disco y largo de gónadas, ancho de disco y ancho de gónadas, ancho de disco y número de ovocitos, ancho de disco y diámetro de ovocitos; con todo esto se corrobora la madurez (Vélez, 2015). La relación entre número de ovocitos y ancho de disco, así como número de ovocitos longitud de ovario fue evaluada mediante regresión lineal.

Al ser una especie de aparente crecimiento isométrico, se obtuvo el factor de Condición de Fulton (K) según Tresierra, Culquichicón y Veneros (2014).

$$K = 100 * \frac{W}{L^3}$$

Donde:

W = Peso Corporal

L = Longitud

Los pesos corporales fueron expresados en gramos para obtener decimales más altos. Este factor permitió conocer el bienestar de los individuos por mes (Tresierra *et al.*, 2014), mientras que el índice gonadosomático resulta útil para la expresión de fases de madurez gonadal, así como la relación de éstas con el peso corporal (Tresierra *et al.*, 2013).

El índice gonadosomático (IGS) se obtuvo relacionando el peso gonadal con el peso corporal total como indica Tresierra, Culquichicón y Veneros (2014).

$$\text{IGS} = \frac{P_G}{P_C} * 100$$

Donde:

P_G = Peso Gonadal

P_C = Peso Corporal

Similar a este y teniendo en cuenta que el hígado es gran tamaño en elasmobranquios (Alva *et al.*, 2012), se podría deducir que juega un papel importante en síntesis lipídica y por tanto en la síntesis de vitelogenina para el embrión, por lo que se obtuvo el índice Hepatosomático (IH) como indican Tresierra, Culquichicón y Solano (2013).

$$\text{IH} = \frac{P_H}{P_C} * 100$$

Donde:

P_H = Peso Hepático

P_C = Peso Corporal

Se estimó la talla media de madurez gonadal o simplemente talla media de madurez con la fórmula

$$P = \frac{1}{1 + e^{a + (b * L)}}$$

Donde:

P = Probabilidad de madurez

a, b = Parámetros de modelo

L = Longitud (Ancho de Disco)

Este modelo logístico permite estimar una longitud a partir de la cual los ejemplares maduran ya que representa un tamaño donde el 50% de los individuos están en condiciones de reproducirse.

Las correlaciones entre estructuras fueron evaluadas según el R^2 obtenido en la ecuación que describía el ordenamiento de datos. Se evaluó diferencia significativa en longitudes testiculares por medio del Test de Wilcoxon utilizando el programa SPSS V. 25.0.

RESULTADOS

Composición por Género y Talla de Organismos Muestreados

Un total de 160 organismos fueron muestreados entre octubre 2017 y noviembre 2018.

La pesquería fue casi en su totalidad dirigida. Los desembarques podían incrementarse o disminuir intensamente pero no cesaron en ningún mes, sin embargo, durante los meses de enero y febrero no se obtuvieron ejemplares por inaccesibilidad a las embarcaciones.

Tabla 2. Registro de organismos muestreados por mes desde octubre 2017 a noviembre 2018.

MES	MACHOS (♂)	HEMBRAS (♀)	TOTAL	TALLA PROMEDIO (AD) ♂	DESV. EST ♂	TALLA PROMEDIO (AD) ♀	DESV. EST ♀
OCTUBRE	2	4	6	63.5	4.19	57	4.42
NOVIEMBRE	9	5	14	48.41	31.13	48.38	31.14
DICIEMBRE	4	7	11	79.5	60.27	154.14	59.21
ENERO	0	0	0				
FEBRERO	0	0	0				
MARZO	8	7	15	75.5	16.13	65.93	16.14
ABRIL	2	5	7	106.00	31.99	108.4	31.98
MAYO	5	7	12	65.86	7.73	62.01	7.72
JUNIO	2	5	7	68	9.06	69.3	9.06
JULIO	3	4	7	63.27	6.26	57.825	6.22
AGOSTO	17	11	28	103.53	44.00	140.05	44.29
SETIEMBRE	7	8	15	67	40.06	100.75	40.01
OCTUBRE	7	7	14	84.51	12.47	78.17	12.47
NOVIEMBRE	14	10	24	79.63	15.51	77.45	15.52
TOTAL	80	80	160	84.64	36.66	93.47	36.66

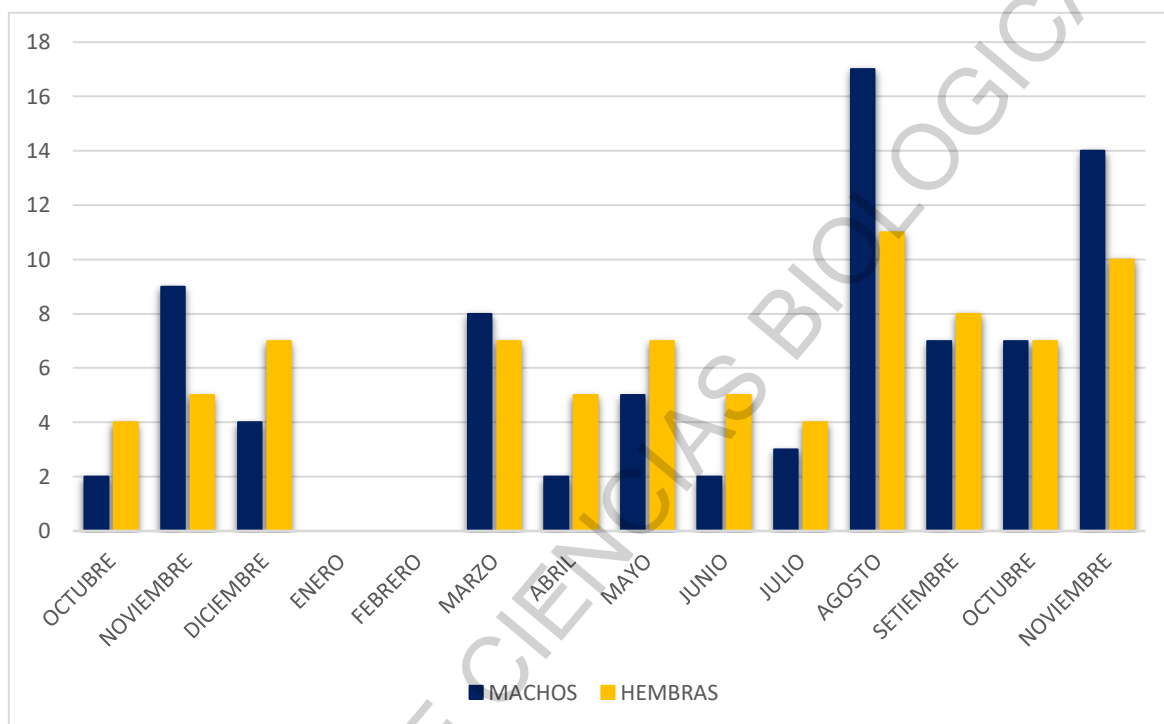


Figura 9. Número de individuos por mes entre octubre 2017 y noviembre 2018

Composición de Tallas

Se observó un predominio de las tallas menores, siendo el mayor grupo entre 40 - 90 cm AD. La hembra con menor talla registrada fue de 42 cm AD, medida que apenas superó al macho con menor talla, 41 cm AD. La hembra de mayor talla alcanzó los 221.6 cm AD, mientras que el macho de mayor talla registrada fue de 150 cm AD. El promedio de tallas para hembras fue de 93.63 cm AD mientras que en machos fue 84.63 cm AD. Las medianas y modas fueron casi similares en ambos sexos, siendo 75.75 y 61 cm AD la mediana y moda respectivamente para las hembras y 75.5 y 60 cm AD para machos.

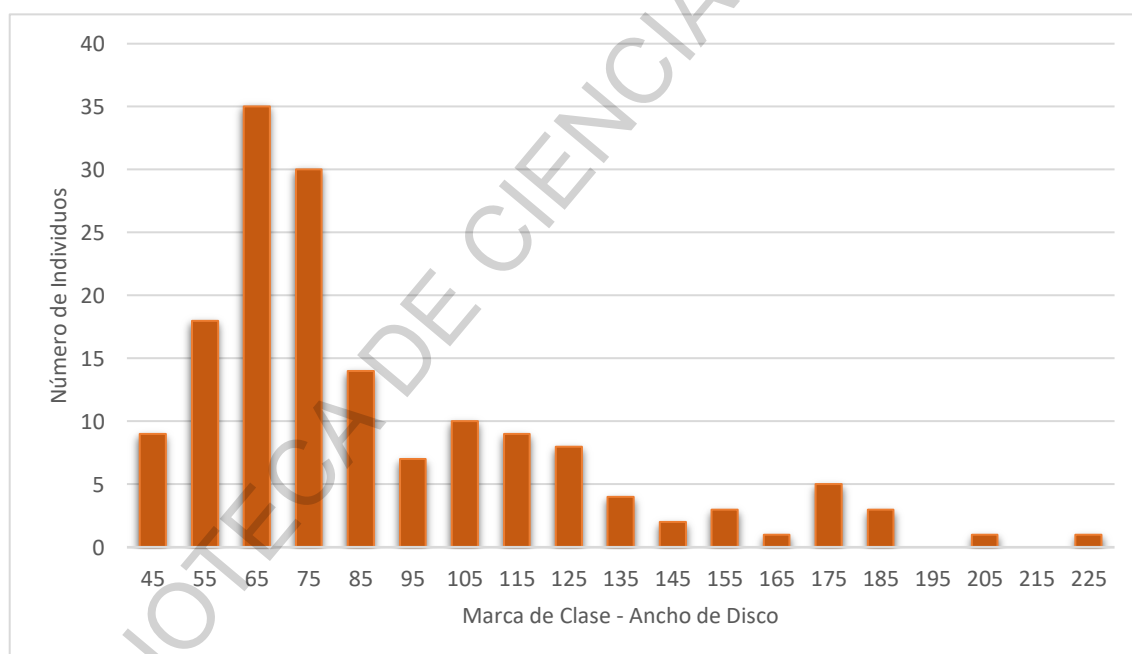


Figura 10. Composición total de tallas de individuos muestreados.

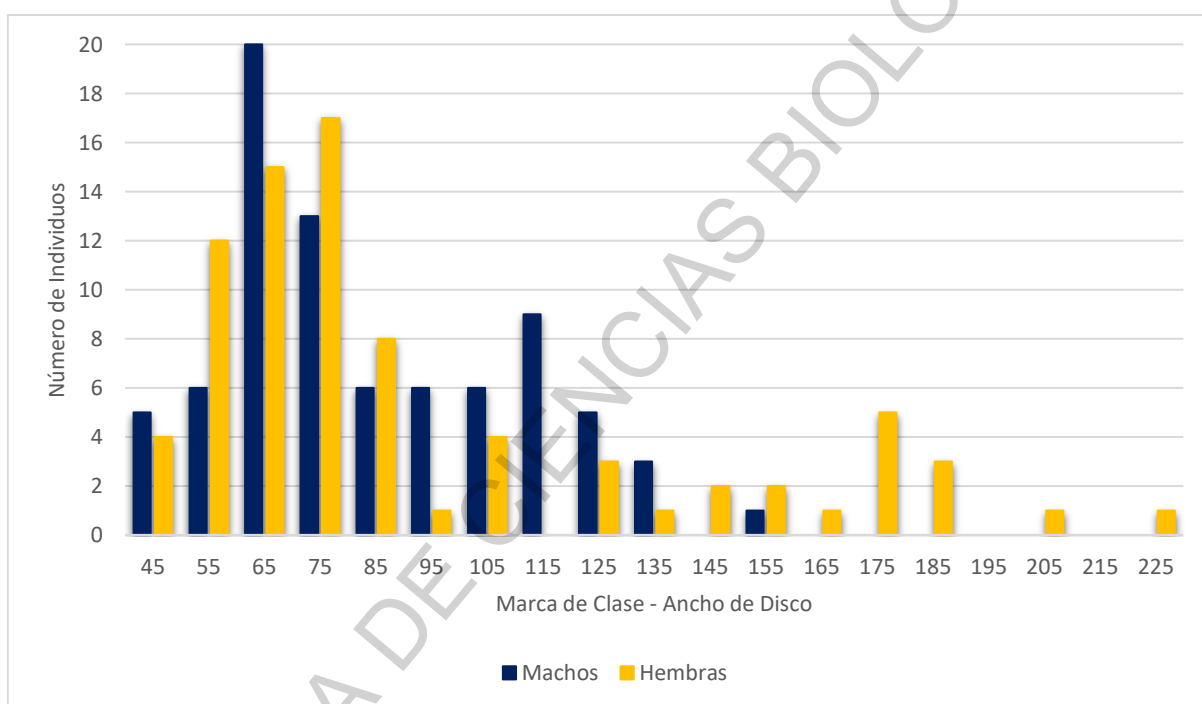


Figura 11. Composición de tallas por sexo de individuos muestreados. Nótese la amplitud de tallas de hembras en comparación a los machos.

Proporción Sexual

Sorprendentemente la proporción sexual total fue equitativa: 80 individuos hembras y 80 individuos machos, ajustándose exactamente a 1H:1M. La proporción sexual por mes si varió, siendo los meses de abril y junio, donde se encontraron un mayor porcentaje de hembras (71.43% en ambos meses), cabe resaltar que durante estos meses las cantidades descargadas bajaron considerablemente y durante el mes de junio solo se observaron inmaduros. Los machos tuvieron un mayor predominio en noviembre 2017 (64.29%), esta superioridad porcentual también se observó durante el mismo mes durante el año 2018 (58.33%). Entre los estadios determinados (Inmaduro, Juvenil, Maduro) se presentó también proporción 1H:1M sin diferencia significativa ($X^2 = 0.243$; $p > 0.05$) (Figura 13), obteniendo los machos una ligera ventaja porcentual. En cuanto a la proporción sexual a la talla, el patrón es cuadrático, presentando un mayor dominio de machos entre los 90 – 130 cm AD, luego el porcentaje decrece por su ausencia a partir de los 150 cm AD.

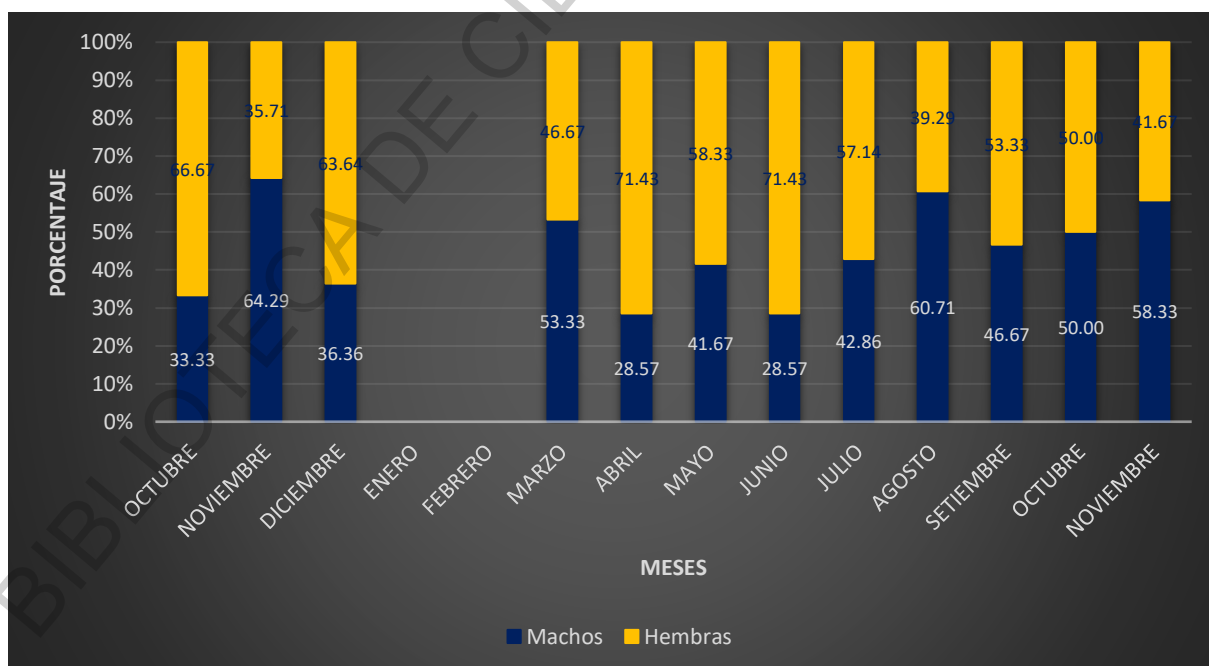


Figura 12. Proporción sexual por mes de *M. peruvianus*.

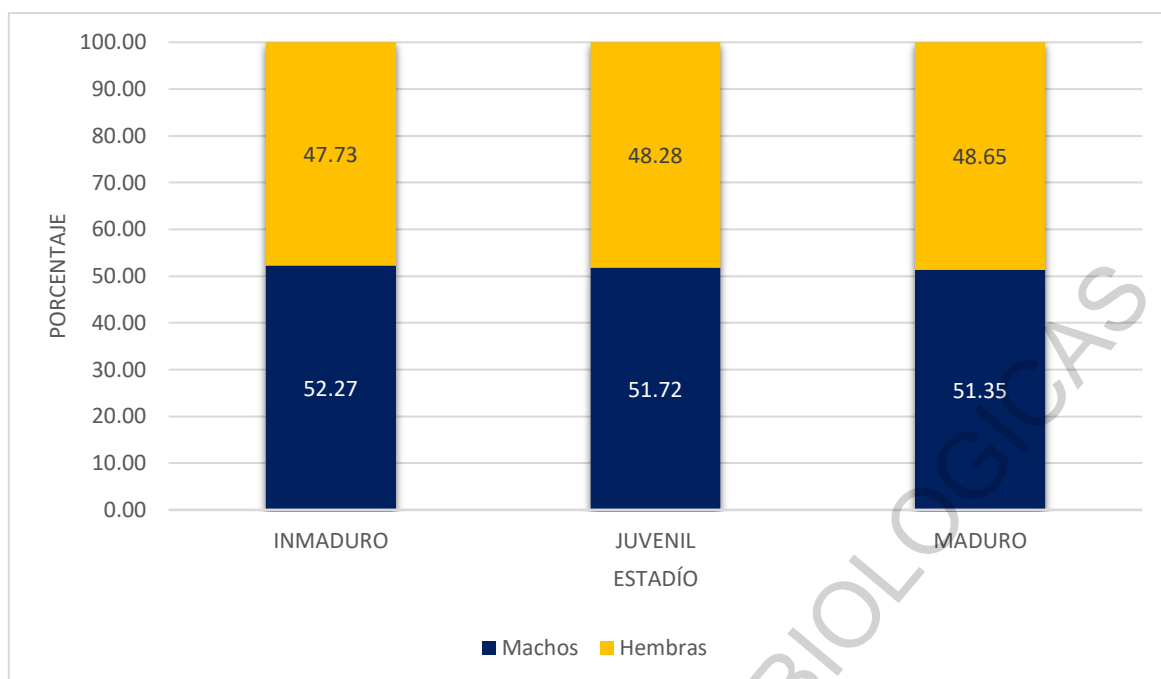


Figura 13. Proporción sexual por estadío de madurez de *M. peruvianus*.

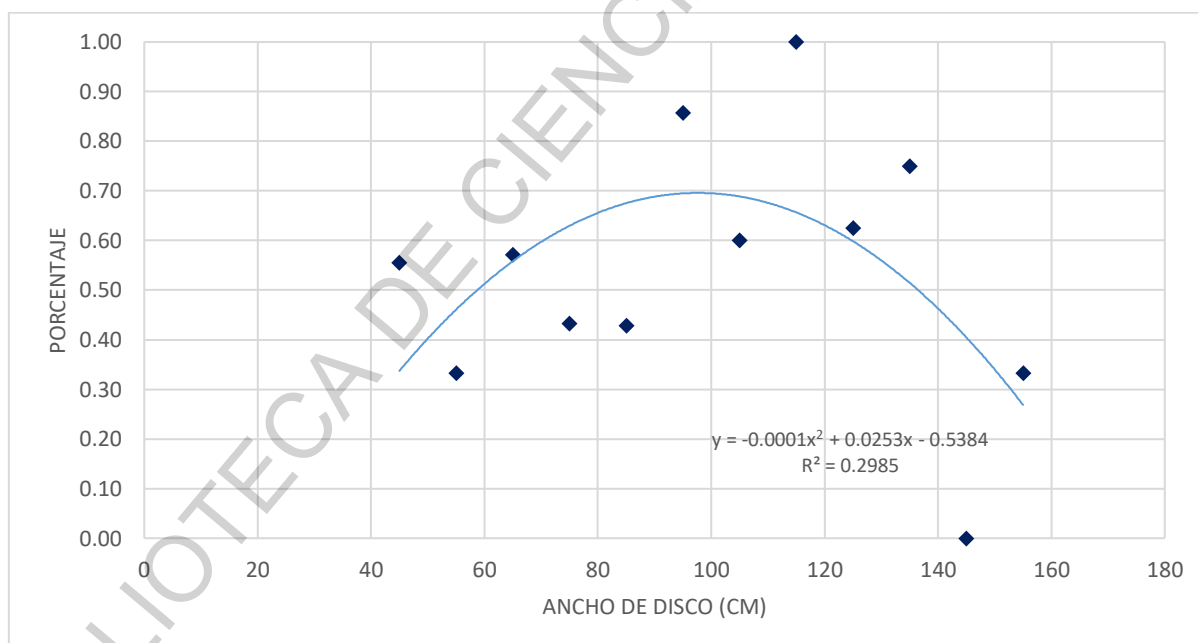


Figura 14. Proporción sexual a la talla en *M. peruvianus*. El patrón es cuadrático, mostrando un dominio de machos entre los 90 y 130 cm AD que posteriormente decrece. Los puntos fueron evaluados solo en machos ya que se sobreentiende el porcentaje contrario como el perteneciente a hembras.

Relación Peso – Longitud

Las rayas inmaduras son morfológicamente idénticas a las adultas, pero en tamaño reducido. Por ello, se presume que su crecimiento sería isométrico. Esto se comprobó mediante la relación peso – longitud. Tanto en hembras como en machos, las curvas se ajustaron a un modelo exponencial ($r^2=0.9287$ en hembras y $r^2= 0.9374$ en machos), donde ambos exponentes (b) dieron un valor 3, indicando que el crecimiento es isométrico para ambos, por lo que, para comprobar el bienestar de los organismos, el factor de condición ideal a aplicar sería Fulton (K). Finalmente, ambos modelos fueron linearizados.

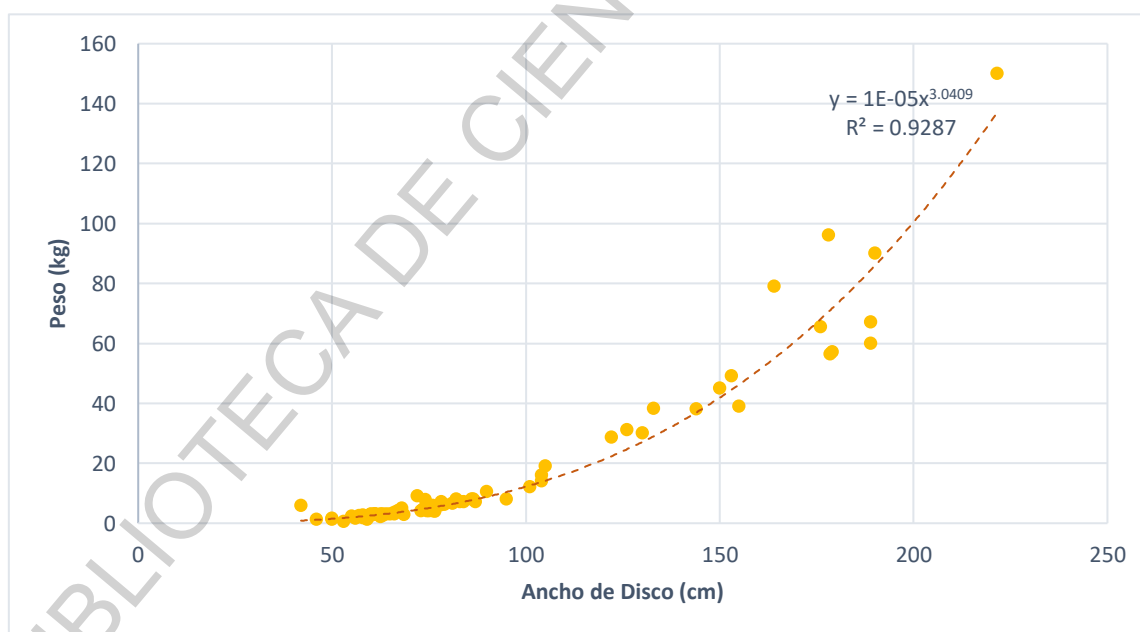


Figura 15. Relación peso – longitud en hembras de *M. peruvianus*.

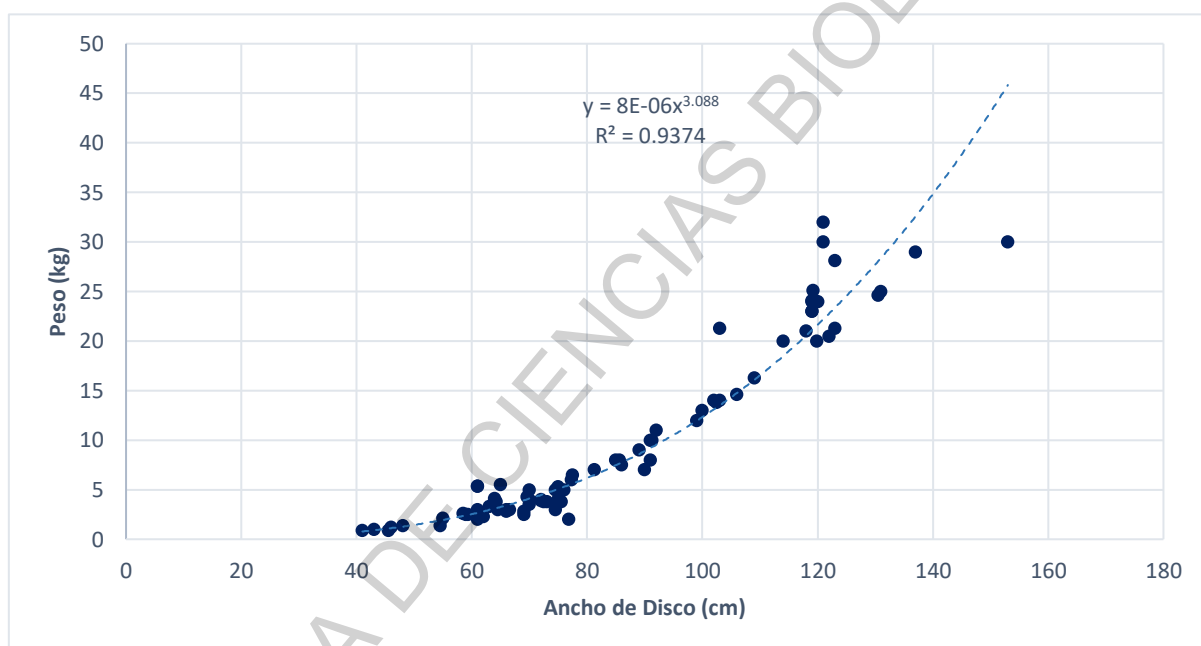


Figura 16. Relación peso – longitud en machos de *M. peruvianus*.

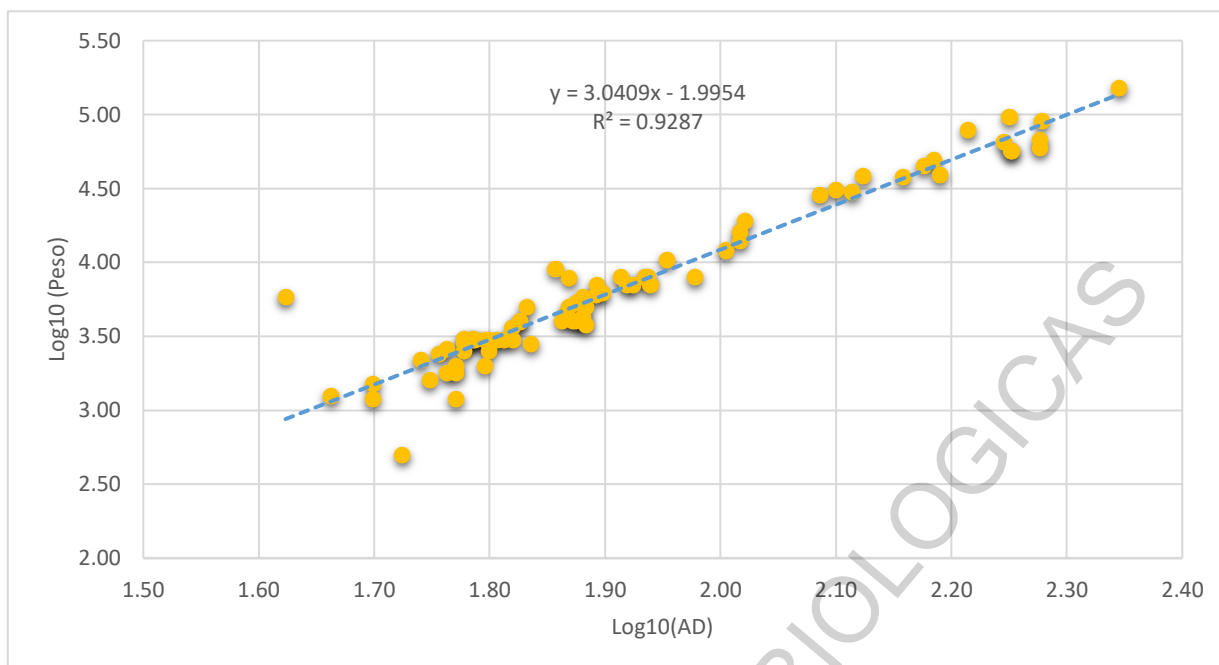


Figura 17. Relación peso – longitud linealizada en hembras de *M. peruvianus*.

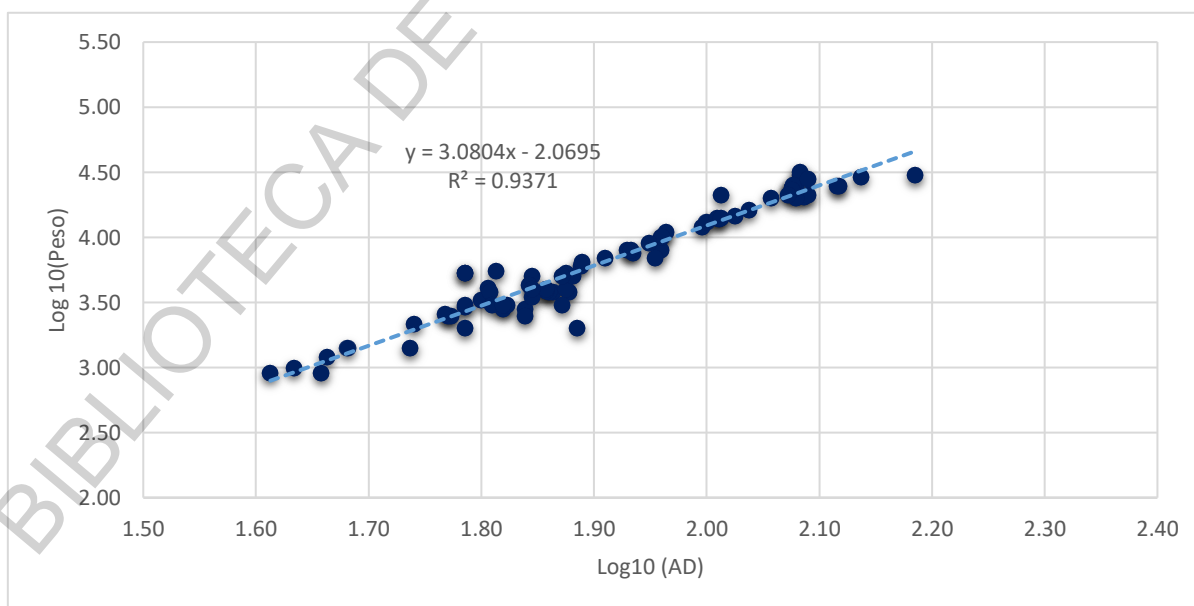


Figura 18. Relación peso – longitud linealizada en machos de *M. peruvianus*.

Factor de Condición

Debido al crecimiento isométrico que presentan las rayas, se utilizó el factor de condición de Fulton (K). Los valores tanto para hembras como para machos no variaron considerablemente entre sí. Los valores más altos fueron alcanzados durante octubre 2018 (6.306 para hembras y 6.345 para machos).

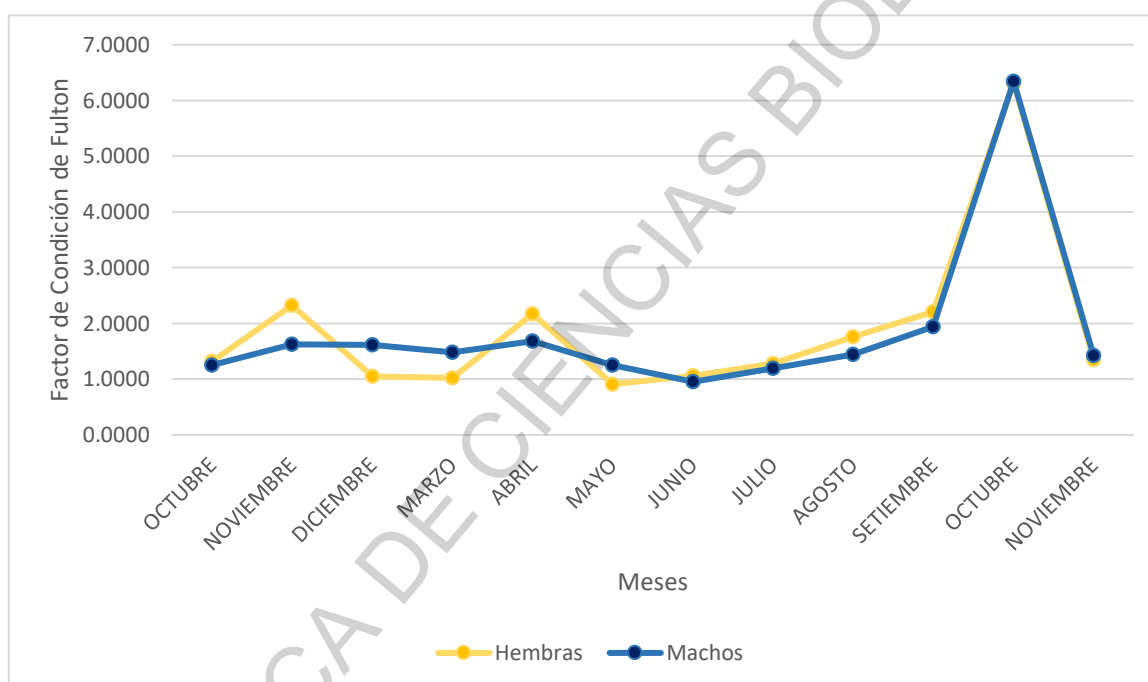


Figura 19. Variación del factor de condición de Fulton (K) por mes. Nótese que hembras y machos mostraron una tendencia similar.

Índice Gonadosomático

El índice Gonadosomático (IGS) fue evaluado en 111 ejemplares. Los valores más altos de en hembras se obtuvieron en diciembre 2017. En este periodo, los machos incrementaron su IGS, pero no alcanzaron su mayor punto ni los valores logrados por las hembras. El valor más alto para machos fue obtenido en el mes de julio, sin embargo, todos los individuos muestreados en aquel periodo fueron ejemplares inmaduros. Ambos sexos llegaron a valores similares entre octubre y noviembre de 2018.

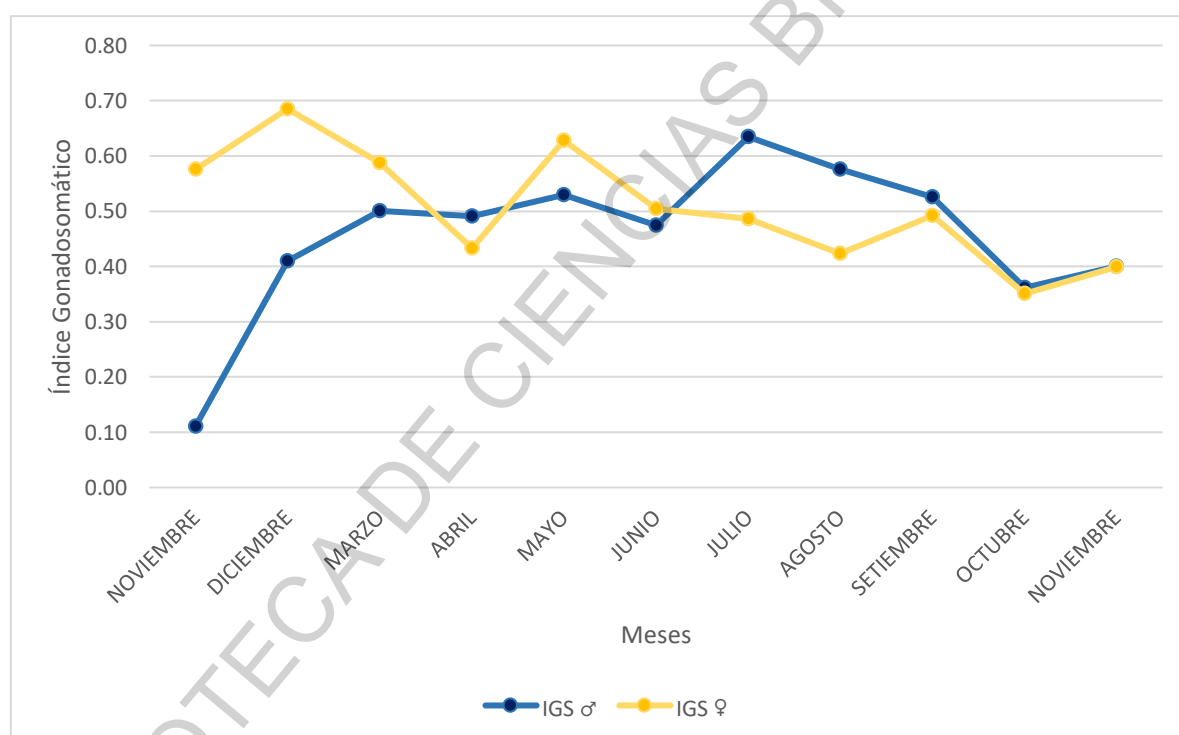


Figura 20. Variación de Índice Gonadosomático (IGS) por mes de *M. peruvianus*.

Índice Hepatosomático

La relación entre peso hepático y el peso corporal se evaluó en 156 ejemplares. En octubre 2017 presentaron valores similares, que para hembras se mantuvo y disminuyó en machos para ambos aumentar durante diciembre y marzo. A partir del fin del verano austral y hasta el comienzo del invierno, los valores se intercalaron: mientras que los valores de IH para hembras aumentaban, en machos disminuían y para el siguiente mes mientras los machos tenían valores más altos, las hembras tenían valores más reducidos. Para el inicio del invierno, ambos valores disminuyeron para aumentar luego en agosto. La propensión de transponerse volvió a presentarse en setiembre para luego equipararse en octubre, terminando en noviembre con valores similares nuevamente.

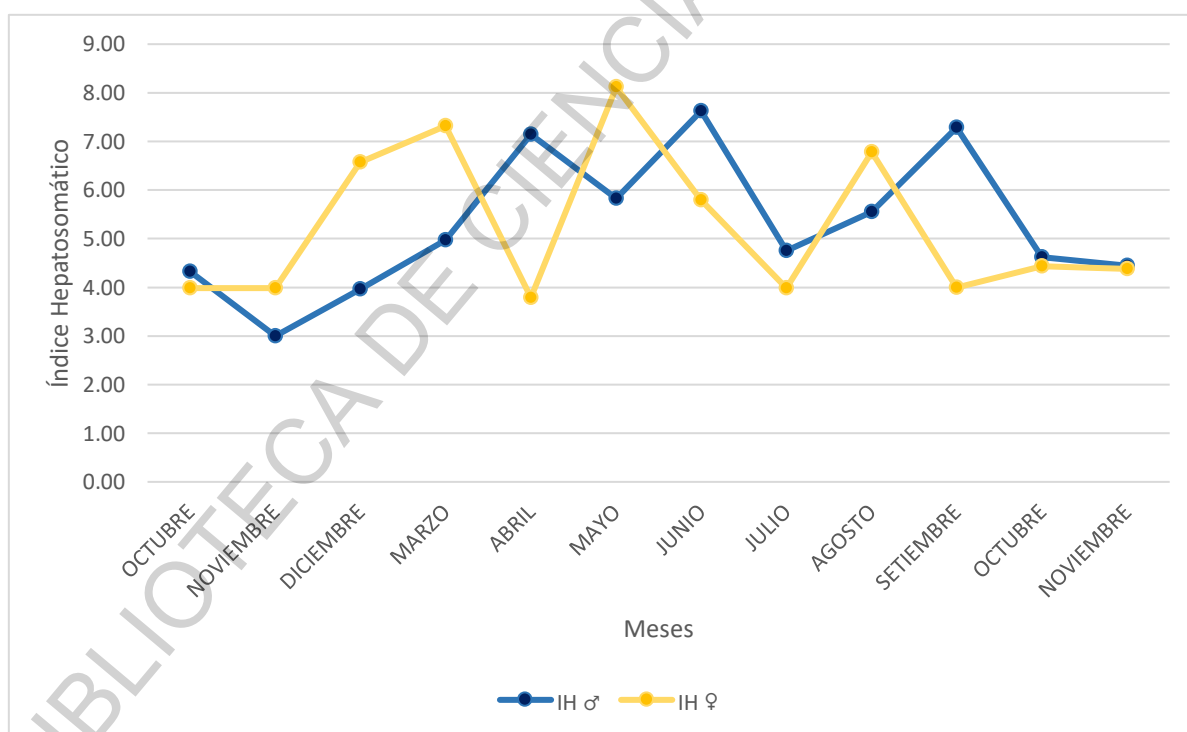


Figura 21. Variación de Índice Hepatosomático (IH) por mes de *M. peruvianus*.

Se observa una tendencia lineal positiva.

Sistema Reproductor en Hembras

El aparato reproductor femenino puede ser dividido en cuatro partes principales: ovarios, conductos, útero y cloaca.

Como es usual en los sistemas reproductores en vertebrados, este se compone de estructuras pareadas que, sin embargo, al crecer la ejemplar, el mayor desarrollo se da en las estructuras del lado izquierdo. Esto no significa que las estructuras del lado derecho desaparezcan, pero en el caso del ovario derecho, la estructura es reducida e inservible para la producción de óvulos. Aquello no viene a ser la única extrañeza encontrada en el sistema reproductor femenino de *M. peruvianus*: no se encontró glándula oviducal o nidamental.

Ambos ovarios están sujetos en la sección anterior-dorsal del cuerpo por el mesovario o pliegue mesovárico y recubiertos por órgano epigonal, este último varía en su cantidad siendo más abundante en el ovario derecho y en los ovarios inmaduros. Blandos al tacto y bastante delicados, los folículos en diferentes fases están en el parénquima, encontrándose los más desarrollados cerca de la corteza o pared ovárica.

La coloración de los ovocitos viene a ser un indicador de desarrollo: translúcidos-blanquecinos para los inmaduros y amarillentos para los vitelogénicos. Llegan a alcanzar tamaños bastante considerables: el más grande encontrado midió 42 mm, lo que es casi la medida mínima de una pelota de golf oficial. El ovocito maduro presenta abundante irrigación y varias capas de células envolviéndolo (zona granulosa).

Los oviductos o conductos de Müller continúan hasta el útero, estructura bifurcada con un mayor desarrollo de la sección izquierda. En ejemplares inmaduros, no es posible la distinción macroscópica entre oviductos y útero al ser prácticamente imposible determinar dónde termina una estructura y empieza la otra. Al madurar, las paredes

desarrollan varias capas de tejido por lo que se ensanchan y se vuelven rígidas y toman una forma cilíndrica que se torna ovalada conforme se va desarrollando y entonces, el útero se vuelve evidente. El interior del útero es bastante vascularizado y se desarrollan las trofonemas: vellosidades planas y delgadas de color rojizo, especializadas en la alimentación de los embriones que se gestan en el interior. El histótrofo es una secreción de las trofonemas que nutre a los embriones en Myliobatidos, este líquido translucido-blanquecino fue encontrado en los úteros más grandes. Finalmente, ambas secciones uterinas (izquierda y derecha) conducen a la cloaca, donde las crías serían expulsadas.

a) **Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho de Ovarios**

Se analizaron 55 hembras con las cuales se compararon el ancho de disco (AD) con la longitud (LO) y ancho (AO) del ovario izquierdo ya que es el único funcional. Las más abundantes fueron las inmaduras, que constaron de 33 ejemplares, siendo la más pequeña de 50 cm AD con un ovario de 7 cm LO y 1 cm AO. La inmadura más grande alcanzó los 105 cm AD y su ovario llegó a los 14 cm LO y 3 cm AO. La transición de estadio se dio entre los 76 y 79 cm AD. La juvenil más pequeña fue de 73.5 cm AD, el ovario midió 10 cm LO y 3 AO mientras que la más grande alcanzó los 126 cm AD y portó un ovario de 19 cm LO y 4.5 cm AO. Las juveniles fueron las de menor abundancia: solo se muestrearon 9 individuos. La última transición se dio a los 130 cm AD, talla alcanzada por la madura más pequeña, cuyo ovario midió 12 cm LO y 4 cm AO. La mayor hembra alcanzó los 202 cm AD, el ovario llegó a los 23 cm LO y 8 cm AO. Presenta correlación AD y LO (lineal, $r = 0.9039$) como AD y AO ($r = 0.8373$).

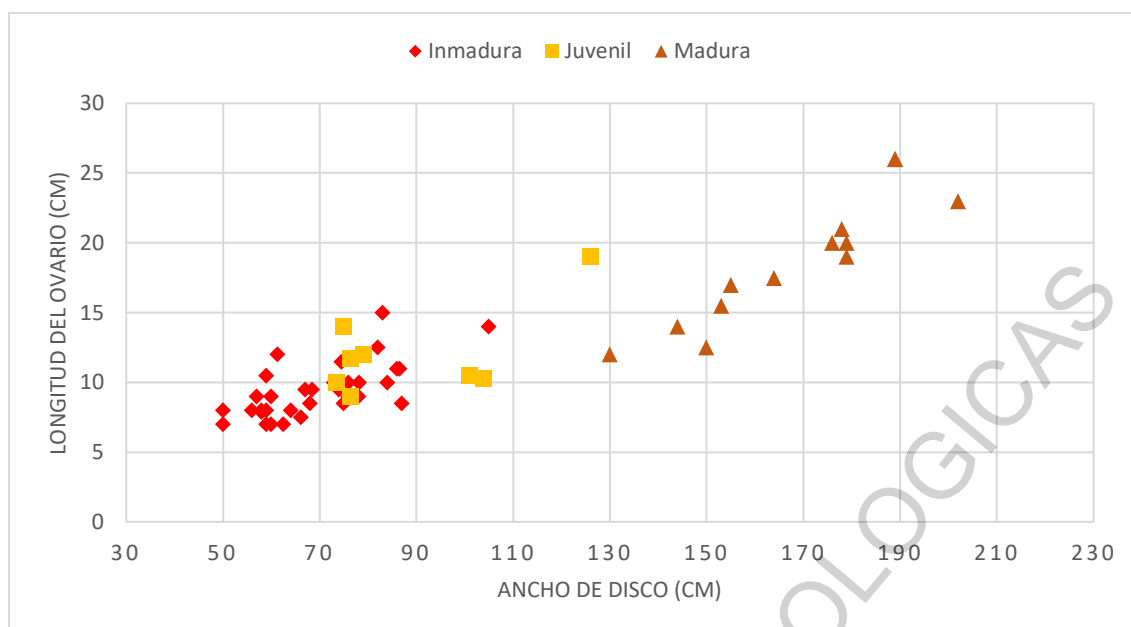


Figura 22. Relación entre el ancho de disco (AD) y la longitud del ovario izquierdo (LO)

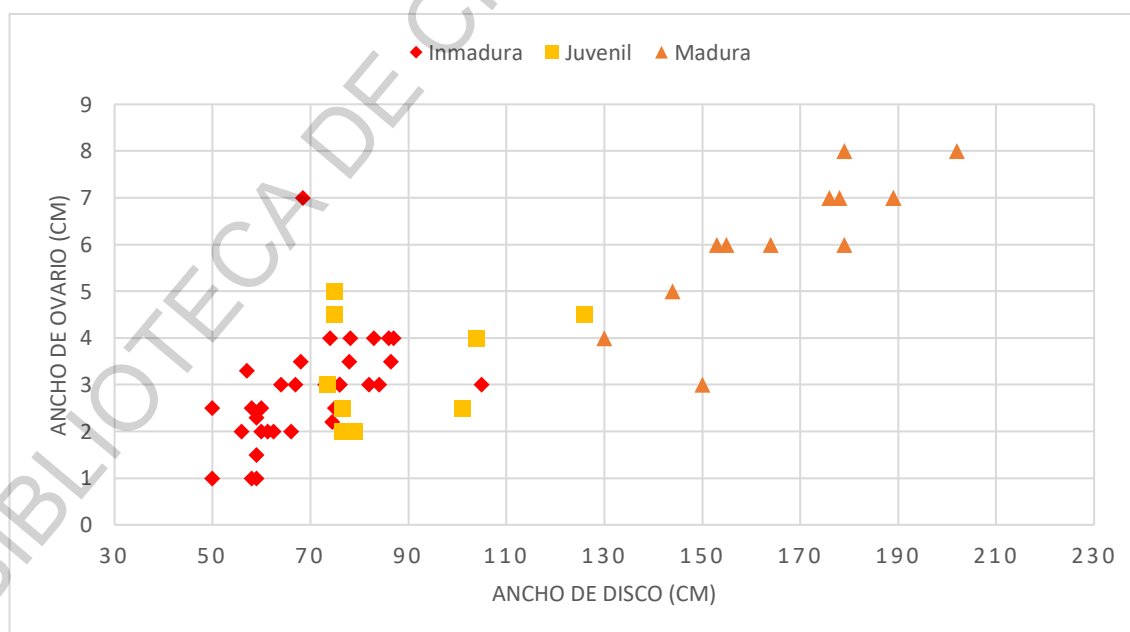


Figura 23. Relación entre el ancho de disco (AD) y la longitud del ovario izquierdo (LO)

b) Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho del Útero

Muy pocos úteros fueron colectados, apenas 8 llegaron a estudiarse. Durante los primeros meses de muestreo fueron desechados, ello por el desconocimiento de la estructura. La hembra con menor tamaño que presentó un útero desarrollado alcanzó los 150 cm AD. Los úteros derechos fueron ligeramente más pequeños que los úteros izquierdos, pero al mantener una proporción entre ellos y el desarrollo de las estructuras internas sin mayor diferencia entre un lado y el otro, lo más probable es que ambos sean funcionales. Como es de esperarse, existe una relación entre el largo y ancho del útero (Izquierdo, reg. Lineal, $r = 0.9745$; Derecho, reg. Lineal, $r = 0.9630$) así como al comparar LU con el AD (Izquierdo, reg. Lineal, $r = 0.7483$; Derecho, reg. Lineal, $r = 0.6347$) y AU con el AD (Izquierdo, reg. potencial, $r = 0.8241$; Derecho, reg. potencial, $r = 0.6115$).

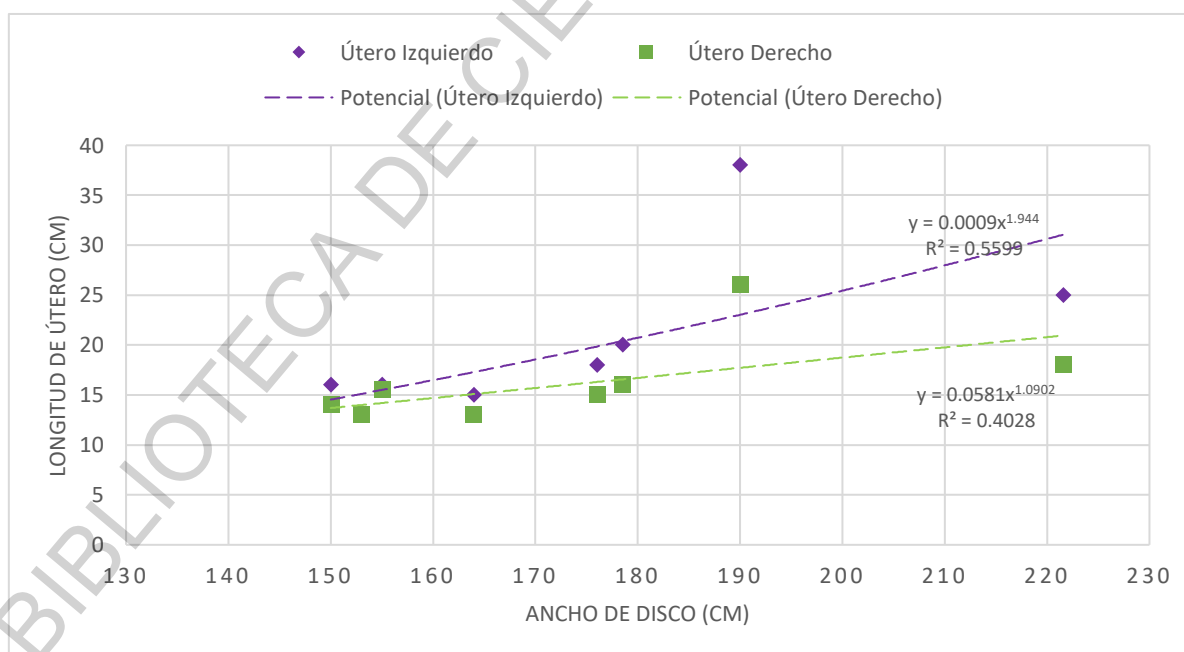


Figura 24. Relación entre el ancho de disco (AD) y la longitud del útero (LU).

Nótese que los valores del útero izquierdo y derecho presentan una proporción entre sí.

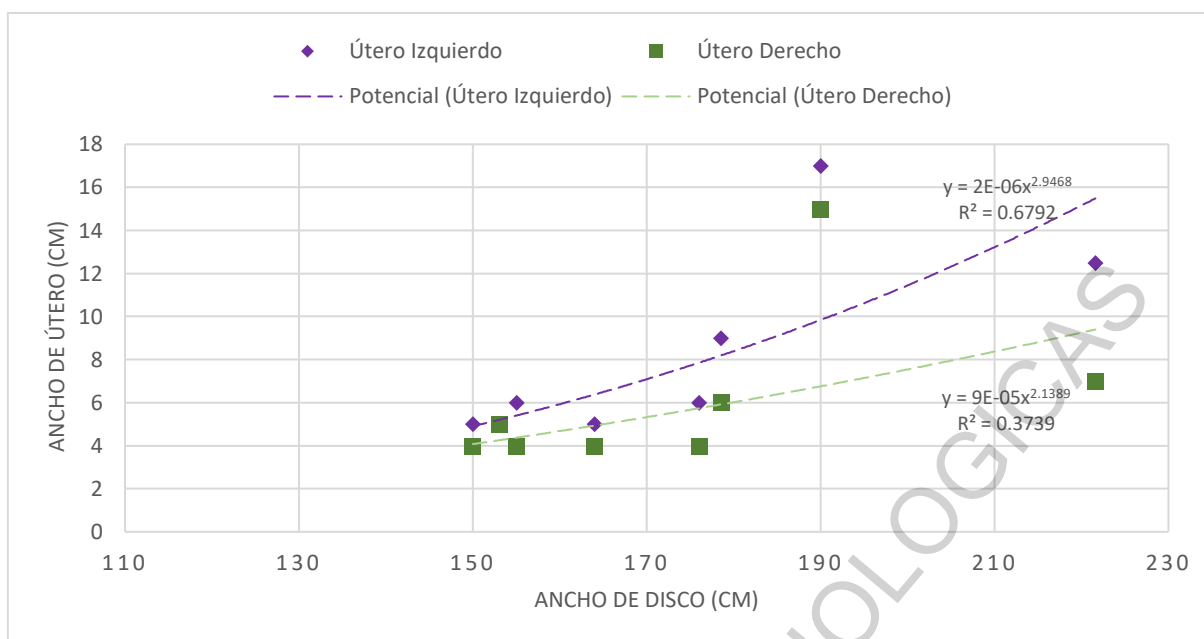


Figura 25. Relación entre el ancho de disco (AD) y ancho del útero (AU). Nótese que los valores del útero izquierdo y derecho presentan una proporción entre sí.

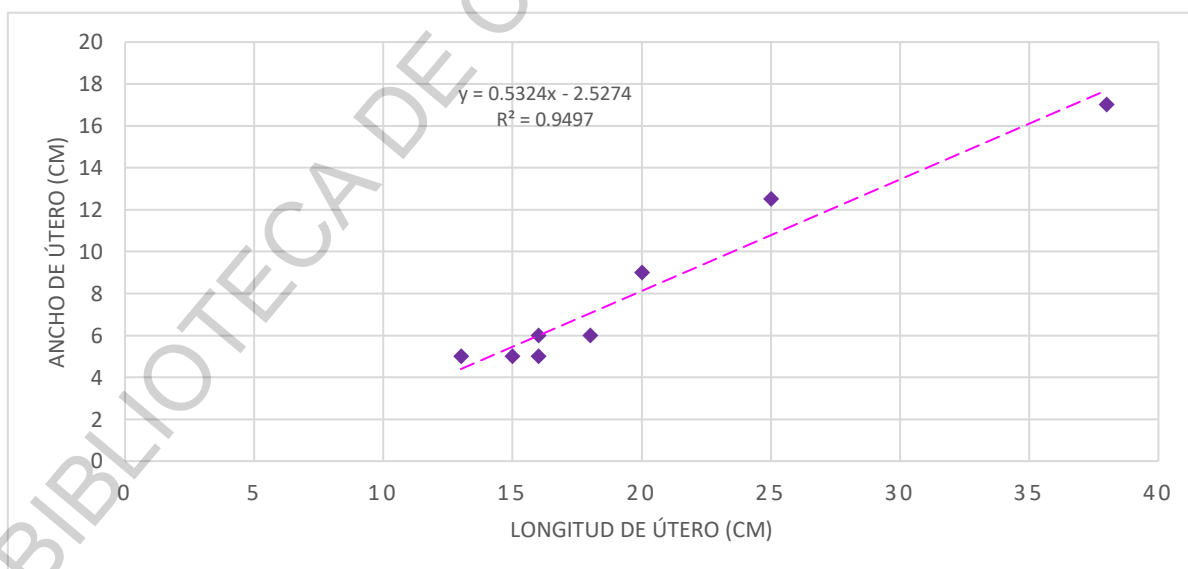


Figura 26. Relación entre longitud y ancho de útero izquierdo.

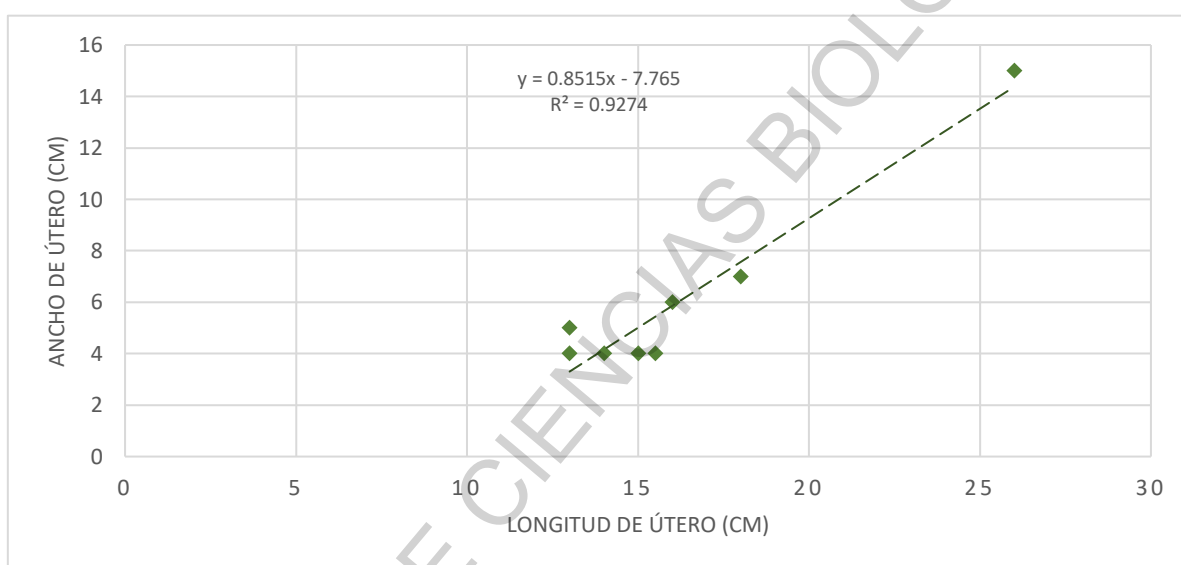


Figura 27. Relación entre longitud y ancho de útero derecho.

c) Relación Ancho de Disco – Número y Diámetro de Ovocitos

Este análisis solo se llevó a cabo con 10 ejemplares. Solo los ovocitos considerados como vitelogénicos fueron contados. En promedio, la raya águila desarrolla 32 ovocitos. La hembra más pequeña con ovocitos vitelogénicos midió 150 cm AD y se contaron 26 ovocitos. La hembra de mayor talla fue de 202 cm AD y se contaron 35 ovocitos. Se halló relación entre el tamaño del ejemplar y la cantidad de ovocitos desarrollados (patrón potencial, $r = 0.5049$) y obviamente, con el tamaño del ovario (potencial, $r = 0.53$). Sin embargo, no se encontró relación entre el ancho de disco y el diámetro promedio de ovocitos ($r = 0.0245$).

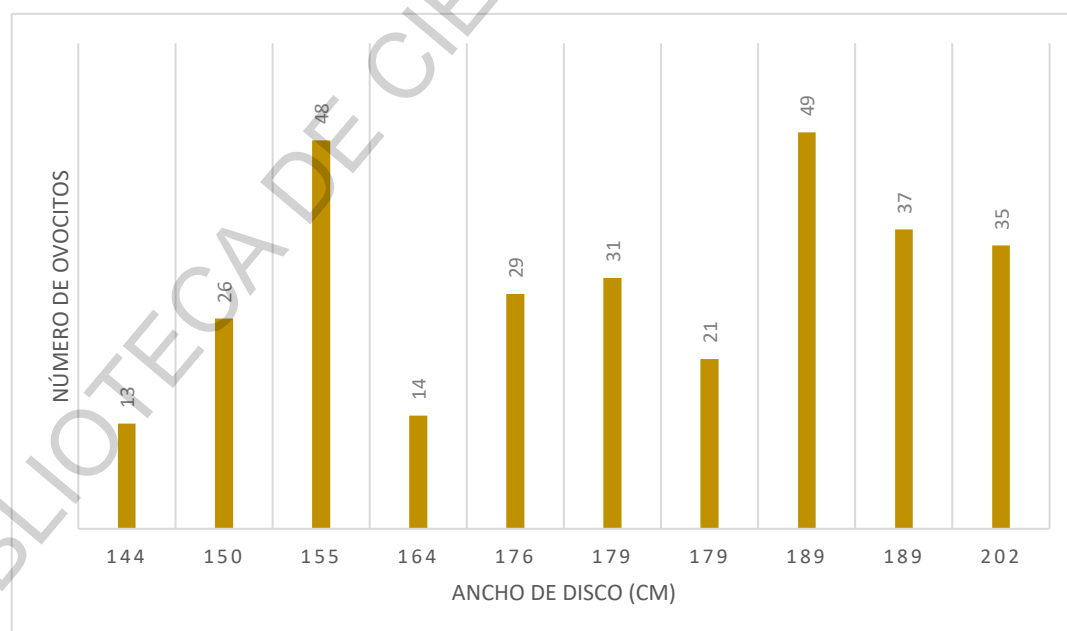


Figura 28. Fecundidad por ejemplar según su ancho de disco (AD).

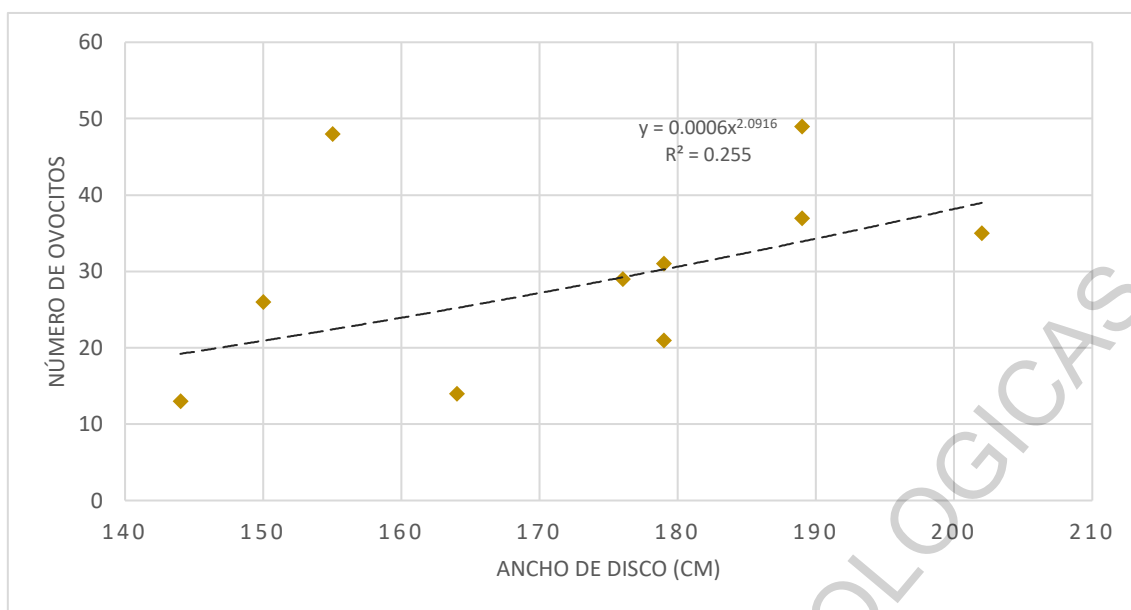


Figura 29. Relación entre ancho de disco (AD) y número de ovocitos.

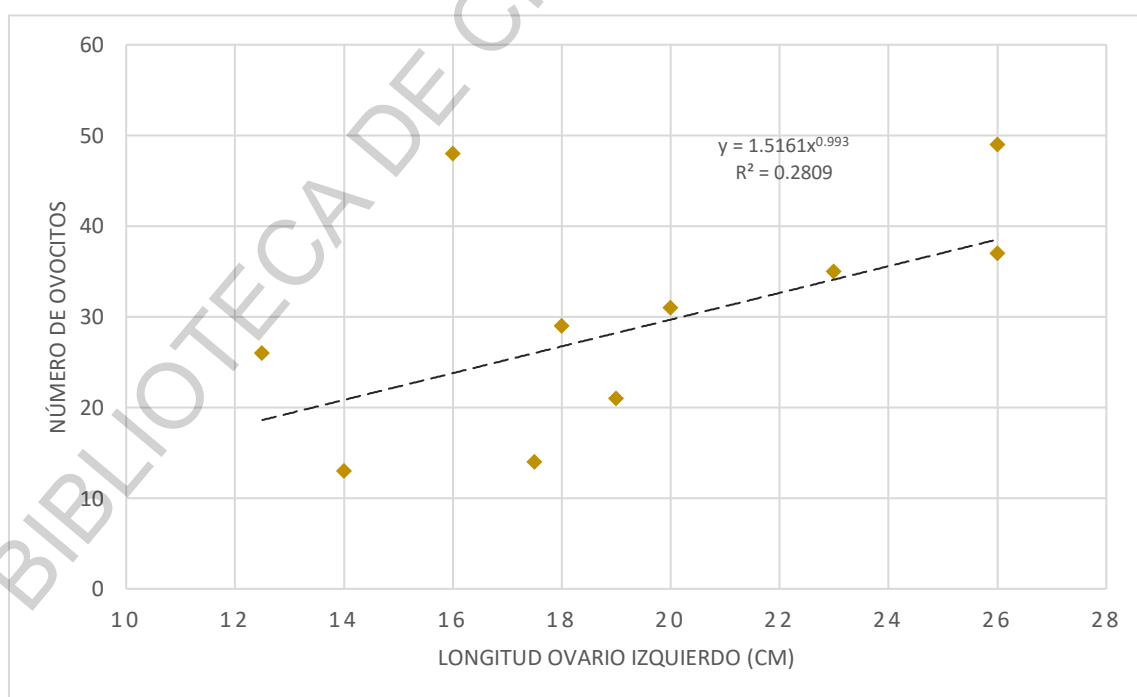


Figura 30. Relación entre longitud de ovario izquierdo (LO) y número de ovocito.

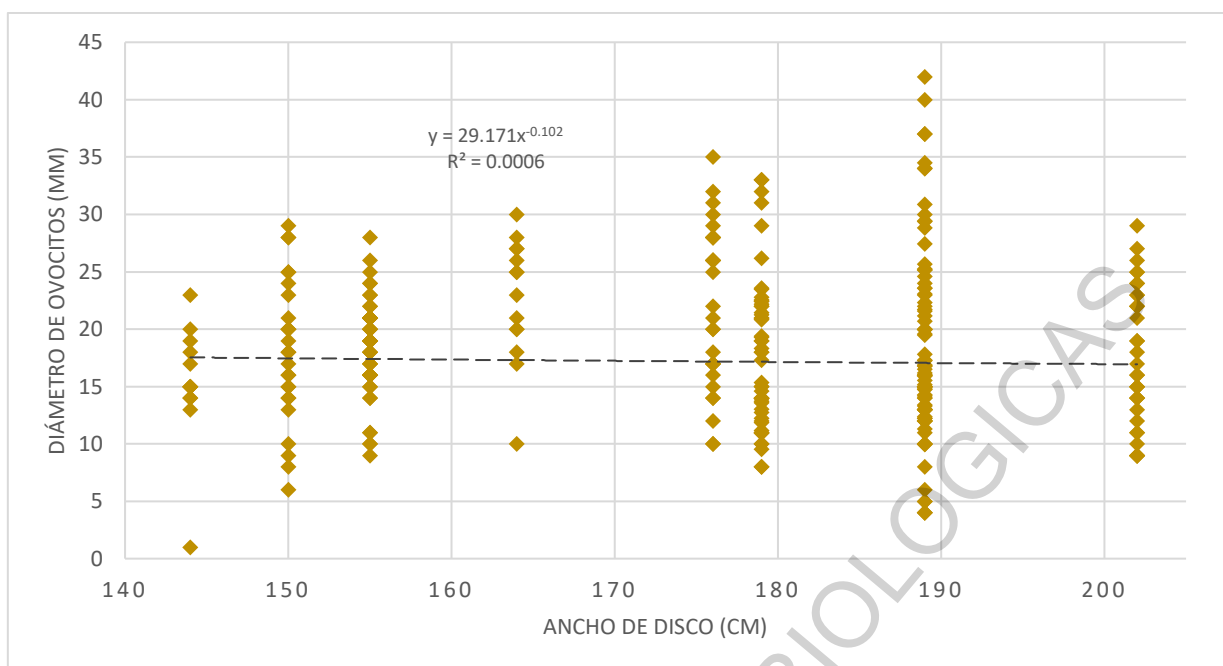


Figura 31. Relación entre ancho de disco (AD) y diámetro promedio de ovocitos por ejemplar.

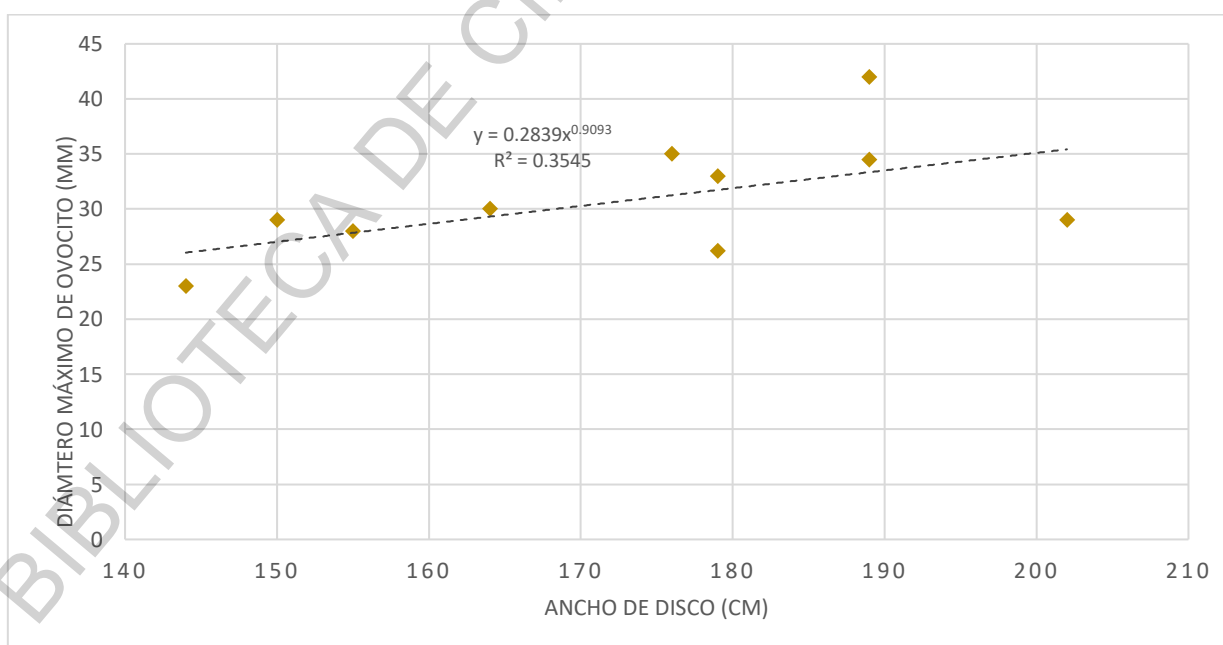


Figura 32. Relación entre ancho de disco (AD) y diámetro máximo de ovocitos por ejemplar.

d) Estadíos de Madurez Gonadal

Se dividieron en 5 estadíos, sin embargo, los estadíos finales (Hembras Grávidas y Postparto) no fueron encontradas.

i) Estadío I: Virgen o Inmadura

Gónadas: El ovario virgen se caracteriza por presentar abundante órgano epigonal y ser bastante frágiles debido a su estructura acuosa. Son color blanquecino y el órgano hematopoyético que lo rodea es rojo oscuro. Los oviductos son indistinguibles. La diferencia de tamaños entre el ovario izquierdo y derecho es mínima.

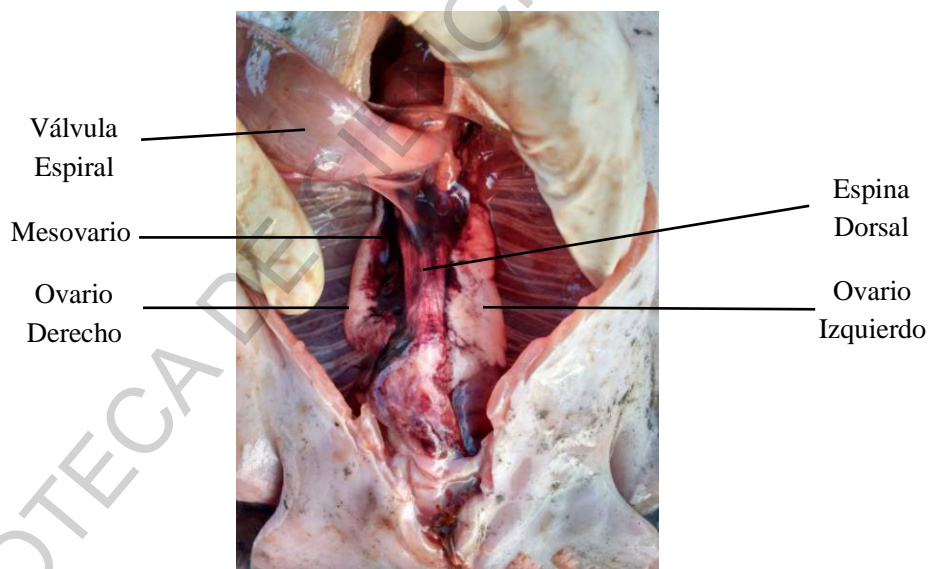


Figura 33. Ovarios visiblemente inmaduros (inferior), sin diferenciación de talla entre el izquierdo y derecho

ii) Estadío II: En Maduración

Gónadas: Los ovarios aumentan de tamaño, y su color varía entre blanquecino-anaranjado y ya existe un mayor desarrollo del ovario izquierdo. Los ovocitos pre-vitelogenados apenas se diferencian. Se puede visualizar los oviductos y la formación de lo que será posteriormente el útero. Los ovarios juveniles en etapas más tardías muestran algunos ovocitos vitelogenados pequeños visibles a simple vista y no irrigados (ANEXO – Figura 12).

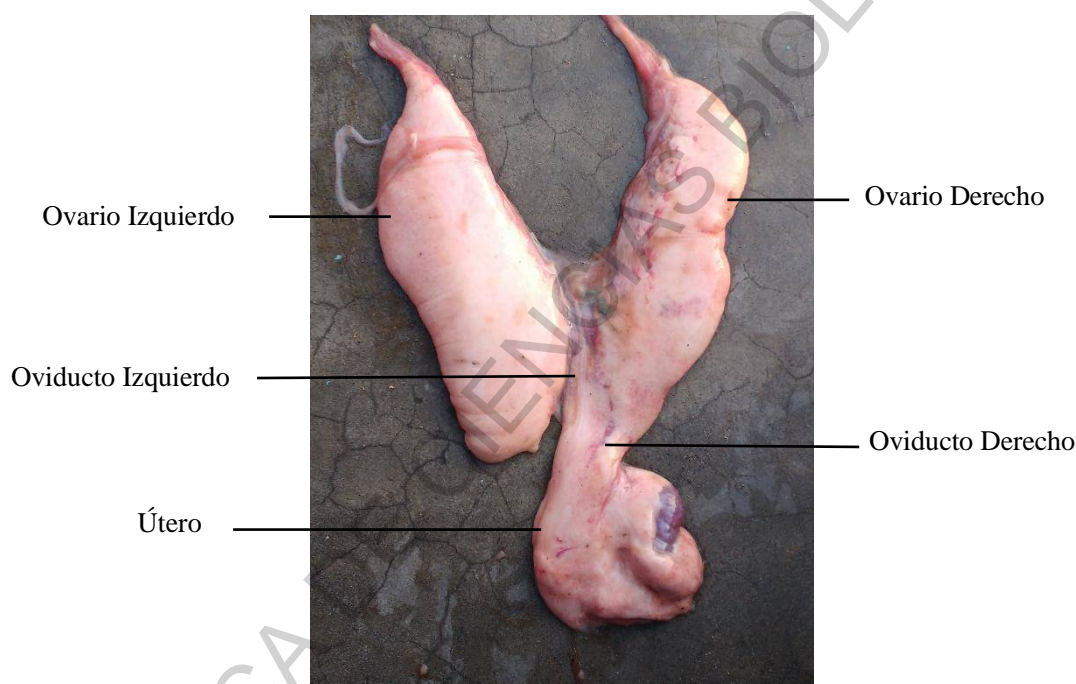


Figura 34. Gónadas femeninas en maduración de *M. peruvianus*. Notar que empieza a haber una diferencia de tamaños entre el lado izquierdo y derecho.

iii) Estadío III: Madura No Grávida o Sin Embriones

Gónadas: El órgano epigonal cubre totalmente al remanente del ovario derecho que no es más que una estructura compacta reducida. Por el contrario, el ovario izquierdo es notablemente grande (llega a alcanzar los 26 cm de largo y 8cm de ancho), de color translucido y su forma es almendrada. Los ovocitos se distinguen a simple vista siendo color amarillento-anaranjado y están altamente vascularizados.

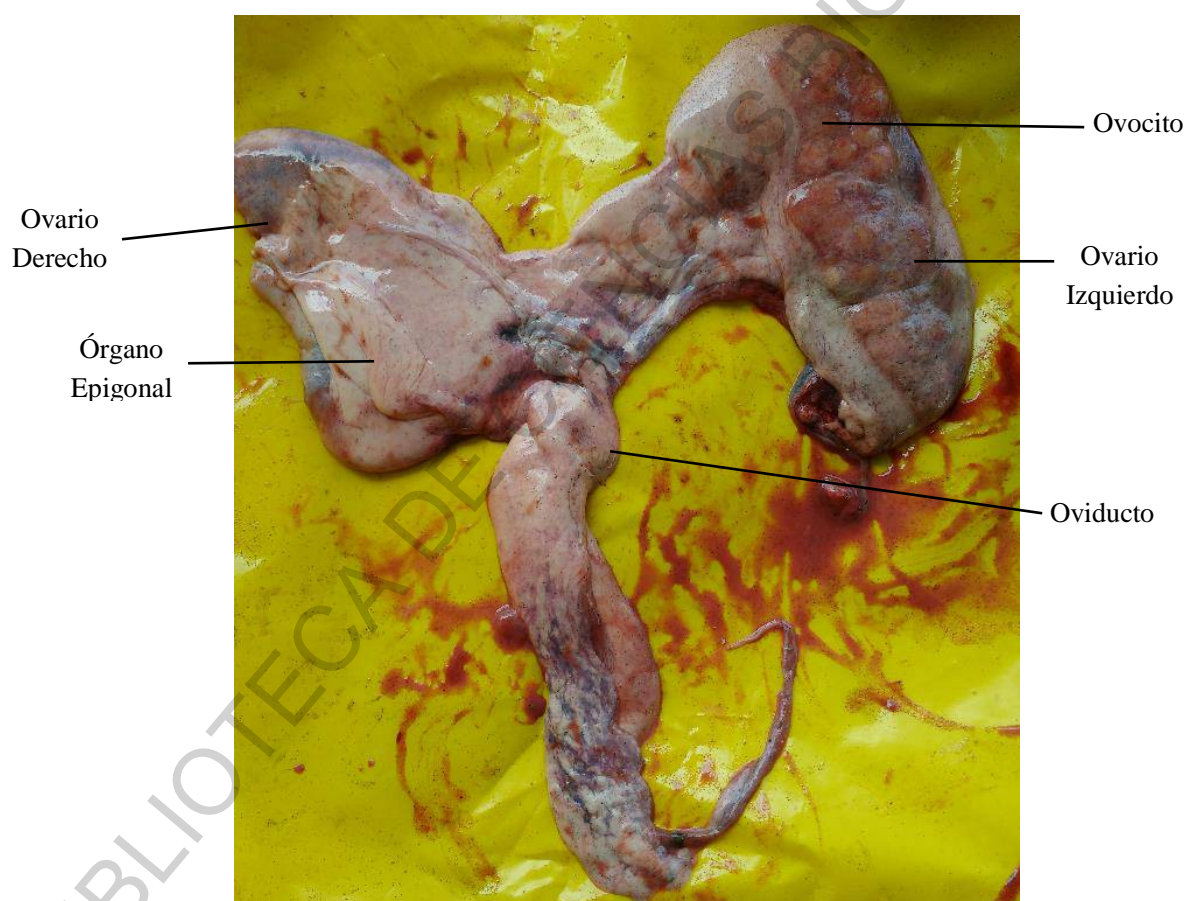


Figura 35. Ovarios y oviductos de *M. peruvianus*. Nótese la diferencia entre el ovario izquierdo y el derecho. El izquierdo es el único productor de ovocitos.

Útero: Los úteros son evidentes, su forma es cilíndrica-ovalada y poseen varias capas de tejido, por ello son duros al tacto. En su interior altamente vascularizado, se encuentran las trofonemas: vellosidades color rojo oscuro especializadas para la alimentación de los embriones.

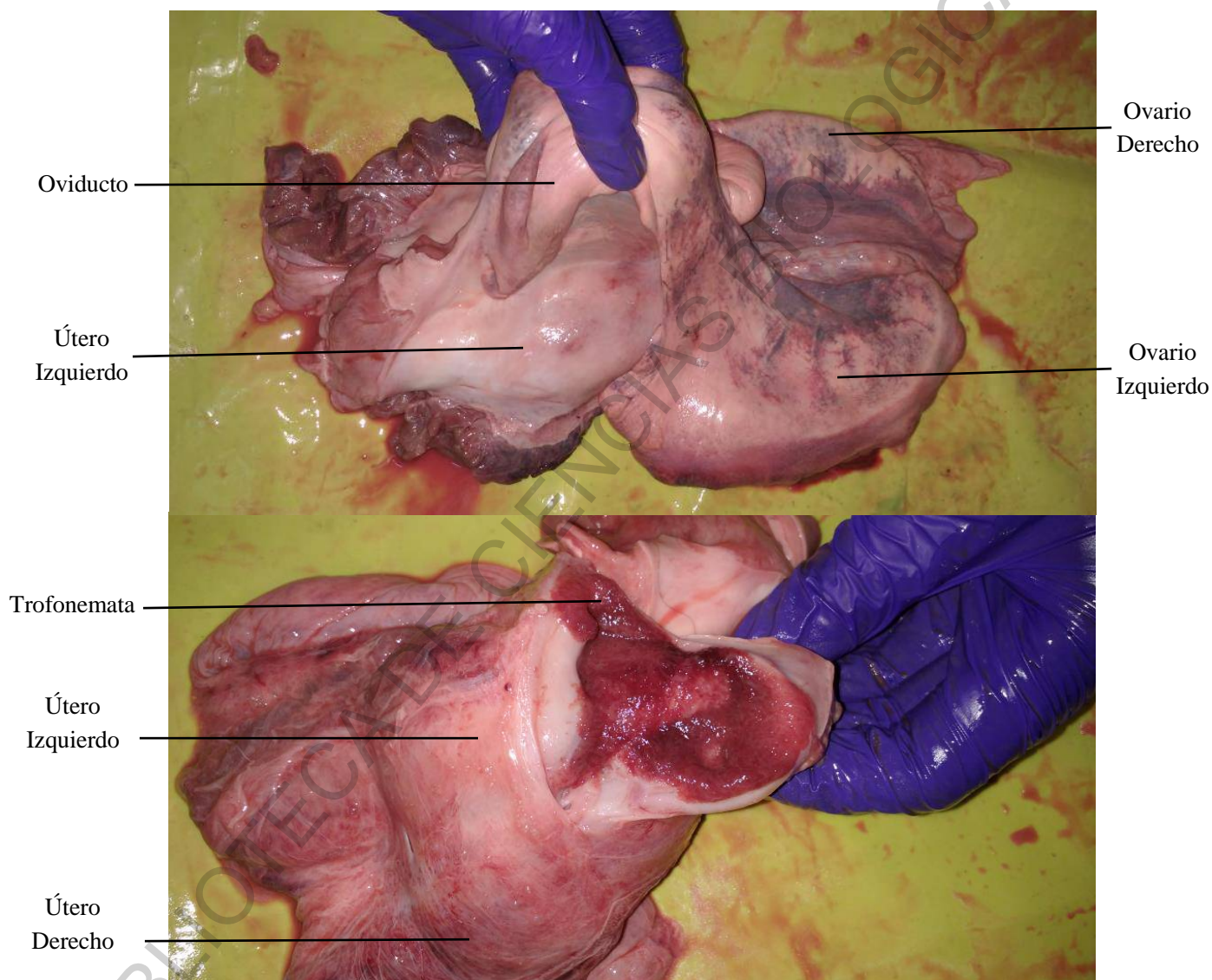


Figura 36. Aislamiento del útero: El útero se encuentra detrás de los demás órganos que forman el sistema reproductor, se localiza junto a los riñones y hace falta retirar los oviductos y los ovarios para poder aislarlo (superior). El útero, aún sin alcanzar la talla máxima de crecimiento, presenta trofonematas.

e) Microestructura

Los ovarios inmaduros están recubiertos casi en su totalidad de órgano epigonal, por lo que no se llegó a encontrar ovocitos en primeros estadios de madurez. La túnica albugínea tampoco fue hallada. El órgano epigonal se observa como una estructura que recuerda al timo humano, con agrupaciones de hematíes en pseudolóbulos sin borde definido ni tejido conjuntivo continuo (ANEXOS – Figura 13). Se encuentra tejido conjuntivo denso en el lugar de la formación de la cápsula.

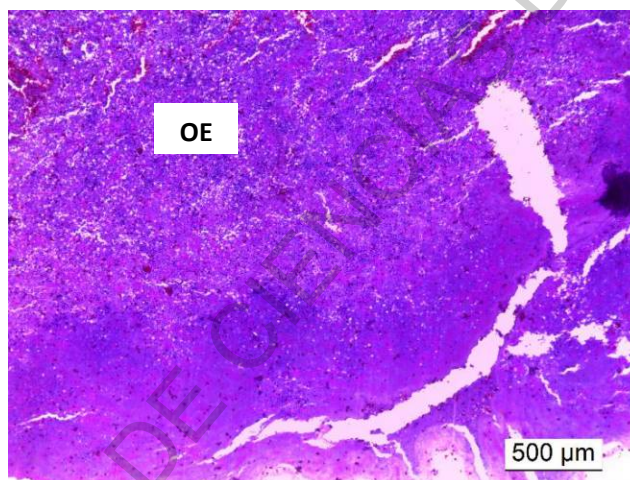


Figura 37. Ovario inmaduro, no se distingue zona germinal y se encuentra rodeado casi totalmente por órgano epigonal (OE). Aumento 4x

El órgano epigonal sigue presente en gran parte de un ovario juvenil, pero el tejido conjuntivo del borde ovárico aumenta de tamaño. Aparentemente es esta la zona germinal ya que se encontraron ovocitos desarrollándose hasta la etapa de ovocito vitelogenado. Los ovocitos en esta etapa han desarrollado la zona granulosa, pero el folículo ovárico aún no está listo para ovular.

El ovario derecho aún posee el órgano epigonal y tejido conjuntivo denso en los bordes, sin desarrollo ovocitario alguno. Algunas zonas interiores también desarrollan fibras colágenas lo que da rigidez a la estructura a formar.

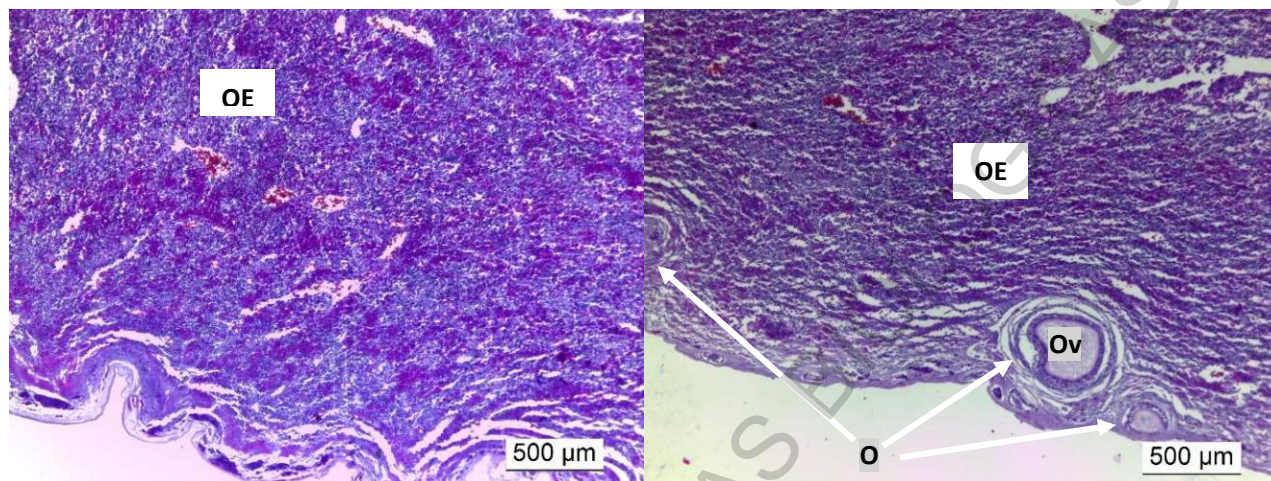


Figura 38. Ovario izquierdo juvenil, con abundante órgano epigonal (izquierda) (OE) pero con ovocitos (O) desarrollándose en la periferia (derecha) en la llamada Zona Germinal, incluso se encontró uno vitelogenado (Ov). Aumento 4x

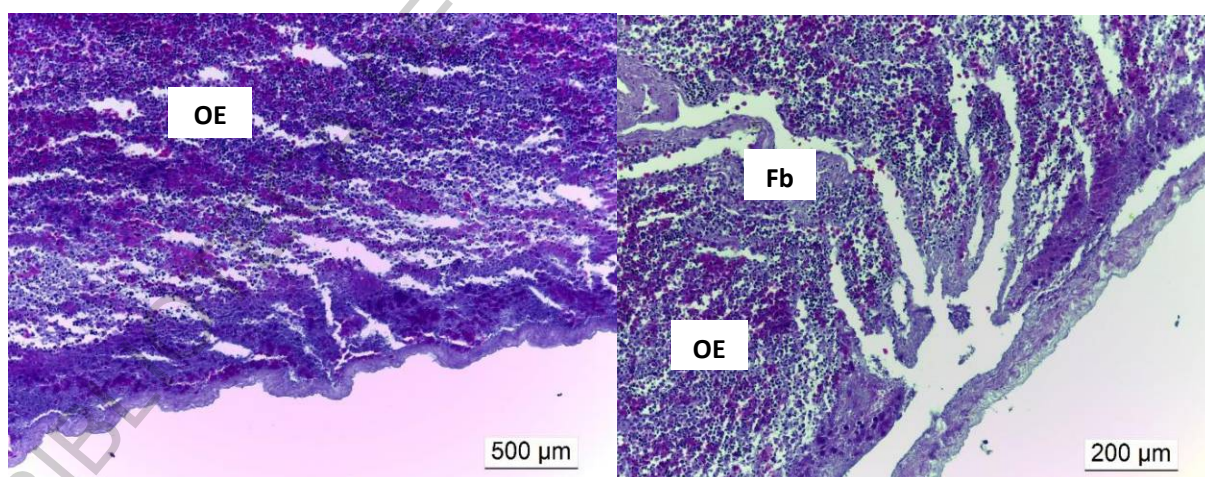


Figura 39. Ovario derecho juvenil, con abundante órgano epigonal (OE) (izquierda) y sin ovocitos en la periferia. Algunas zonas interiores desarrollan fibroblastos (Fb) (derecha). Aumentos 4x Derecha y 10x Izquierda

En un ovario maduro, el órgano epigonal se reduce a parte de los bordes y la zona que converge con el mesovario. Las paredes del ovario, ahora más ensanchadas son ricas en fibra colágena, seguido por fibroblastos y finalmente células cúbicas. La falsa albugínea, la cual se ubica debajo del epitelio, consta de tejido conjuntivo denso, rico en colágena y elastina. El interior del ovario viene a ser la corteza, compuesta por parénquima (células con capacidad multiplicativa) y estroma (células sin capacidad de dividirse). Los ovocitos en la corteza ovárica son bastante grandes y resultan difíciles de realizar un corte histológico completo de ellos. En la periferia se localizan los ovocitos madurantes ya que las células cúbicas generarán las células que lo rodearán al pasar a desarrollarse el folículo. Varios ovocitos grandes fueron encontrados juntos a otros más pequeños, al parecer tienden a juntarse y fusionarse para la formación de una estructura masiva. En el ovario derecho no se observa ovocito desarrollado alguno, tan solo fibroblastos en la periferia, estroma (tejido incapaz de multiplicarse) y lobulillos con ascinos, limitados por epitelio.

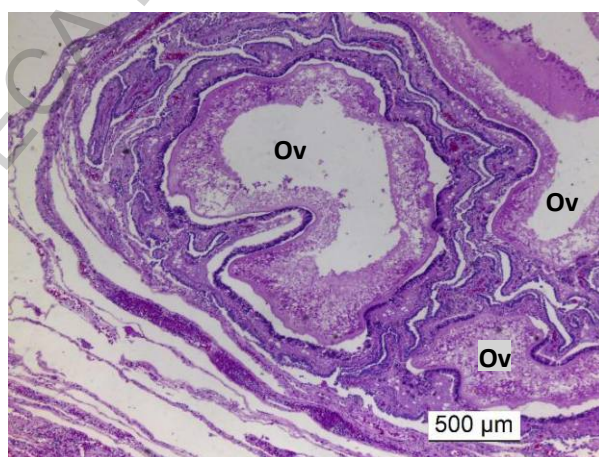


Figura 40. Ovario maduro, se observan tres ovocitos vitelogenados (Ov) uno a lado del otro en un probable proceso de fusión. Aumento 4x

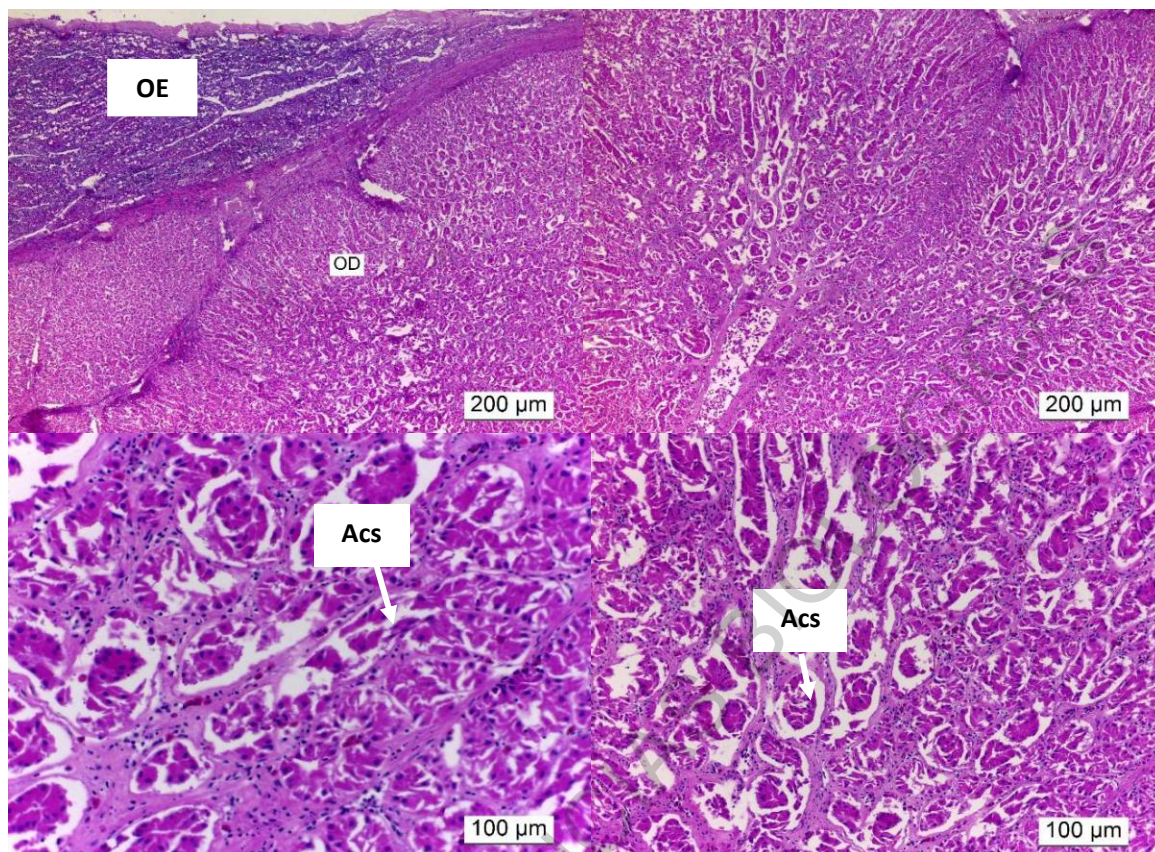


Figura 41. Ovario derecho maduro (OD), con órgano epigonal (OE) delimitándolo (superior, izquierda) y dividido por tabiques (superior derecha). Sin presencia de ovocitos en la periferia ni en el estroma (inferiores), el cual solo contiene ascinos (Acs) eosinófilos serosos o conjuntos de células organizadas limitadas por epitelio . Aumentos 10x Superior 20x Inferior

Se observaron cinco estadios ovocitarios:

1. Ovocito en estado I: Evidentemente, con un tamaño reducido. Rodeado de células planas y con núcleo cerca del borde celular.

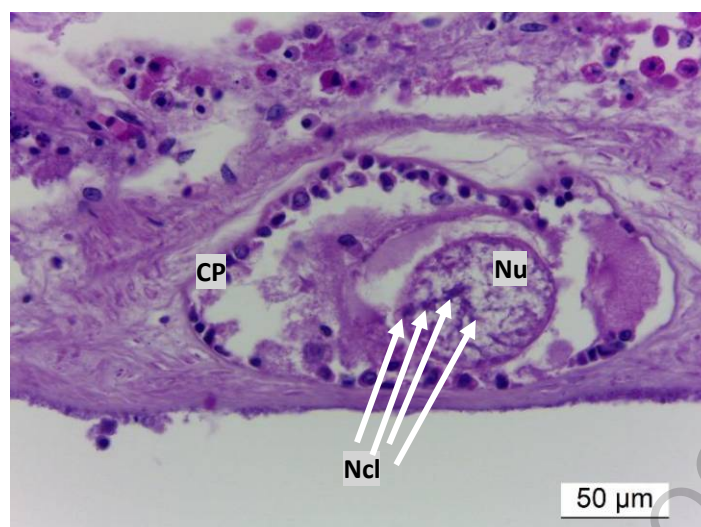


Figura 42. Primer estado ovocitario, donde empieza a estar rodeado de células planas (CP) y se distingue el núcleo (Nu) con cuatro nucleolos (Ncl) visibles.

Aumento 63x

2. Ovocito en estado II: Se observa la zona pelúcida con epitelio cúbico simple y tejido conjuntivo. Núcleo con nucléolos visibles.

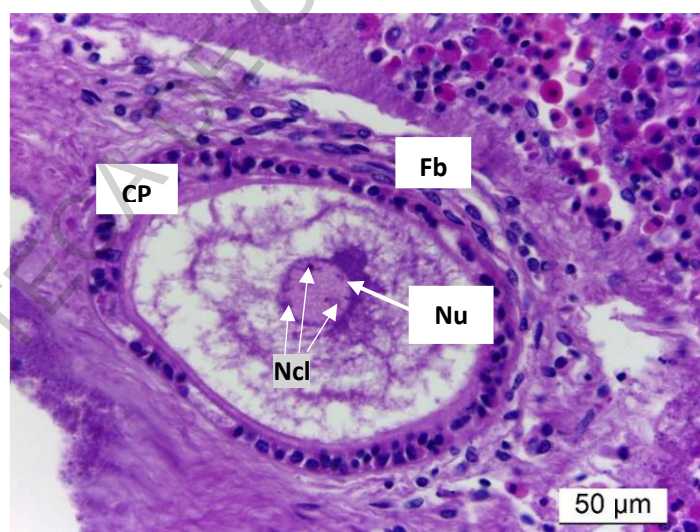


Figura 43. Segundo estado ovocitario, donde el ovocito está rodeado de fibroblastos (Fb) y células planas (CP). Se distingue el núcleo (Nu) en el centro de la célula con tres nucleolos (Ncl) visibles. Aumento 63x

3. Ovocito en estado III: Ovocitos pre-vitelogénicos, donde el núcleo no sufre mayores cambios, pero los nucléolos ya no son perceptibles. La zona pelúcida aumentó de tamaño con la multiplicación de células cúbicas. Parte de estas darán lugar al epitelio columnar, compuesto por células cilíndricas. En la periferia se encuentran fibroblastos y fibras colágenas.

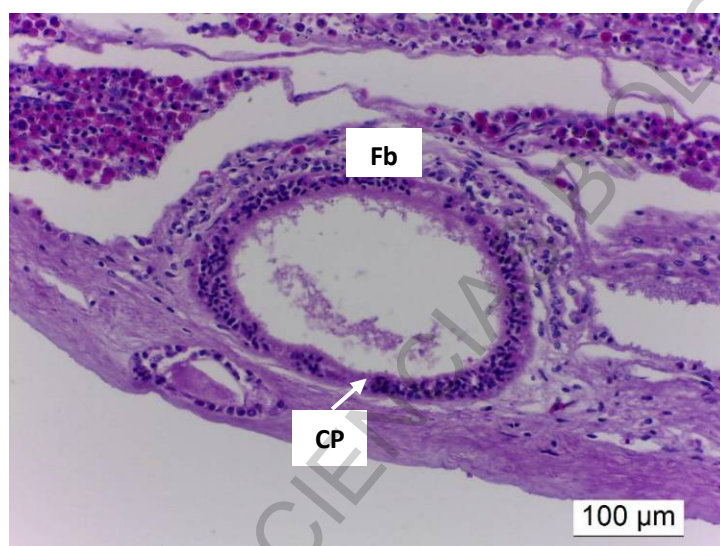


Figura 44. Tercer estado ovocitario, donde ambas capas celulares del ovocito, las compuestas por fibroblastos (Fb) y células planas (CP) han aumentado en grosor y darán lugar posteriormente a células de características diferentes. En este corte no se pudo visualizar el núcleo. Aumento 20x

4. Ovocito en estado IV: El ovocito aumentó de tamaño y se observan gránulos de vitelo en el citoplasma. Las capas celulares se engrosaron y ahora se distinguen la zona pelúcida o radiata, zona granulosa o corona radiata, teca interna y teca externa. Cada capa se distingue por el tipo de células que la conforman: la zona

radiata, compuesta por glucoproteínas, bastante acidófila por lo que se tiñe con eosina; la granulosa compuesta por el epitelio columnar, células cilíndricas con núcleos basófilos en su base; continúa la membrana basal, lámina proteica y se observan la presencia de algunas células sanguíneas; la teca interna compuesta de tejido conjuntivo laxo, fibras colágenas acidófilas y finalmente; la teca externa con células cúbicas.

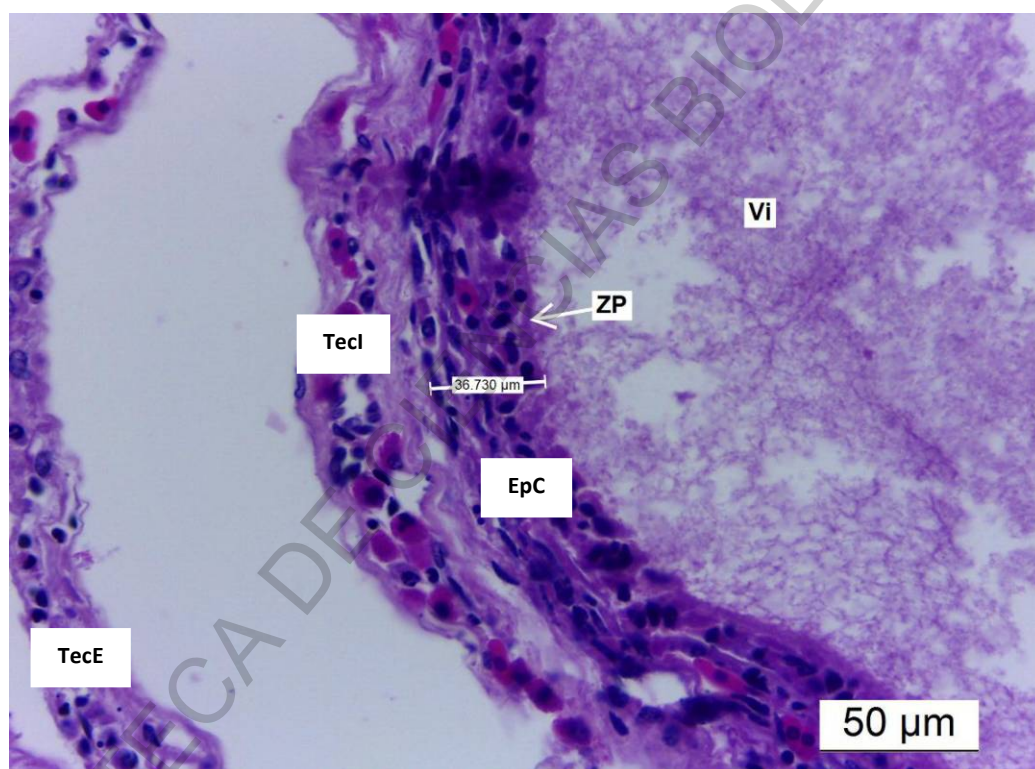


Figura 45. Detalle del folículo en un ovocito estado IV. El citoplasma está lleno de vitelo (Vi). Se señala la zona pelúcida (ZP), que continúa con la granulosa de epitelio columnar simple (EpC), donde los núcleos de las células empiezan a migrar a la base. Sigue la membrana basal para continuar con la teca interna (TecI), con algunos hematíes en su interior (irrigación sanguínea) y por último la teca externa (TecE), separada durante el corte. Aumento 63x

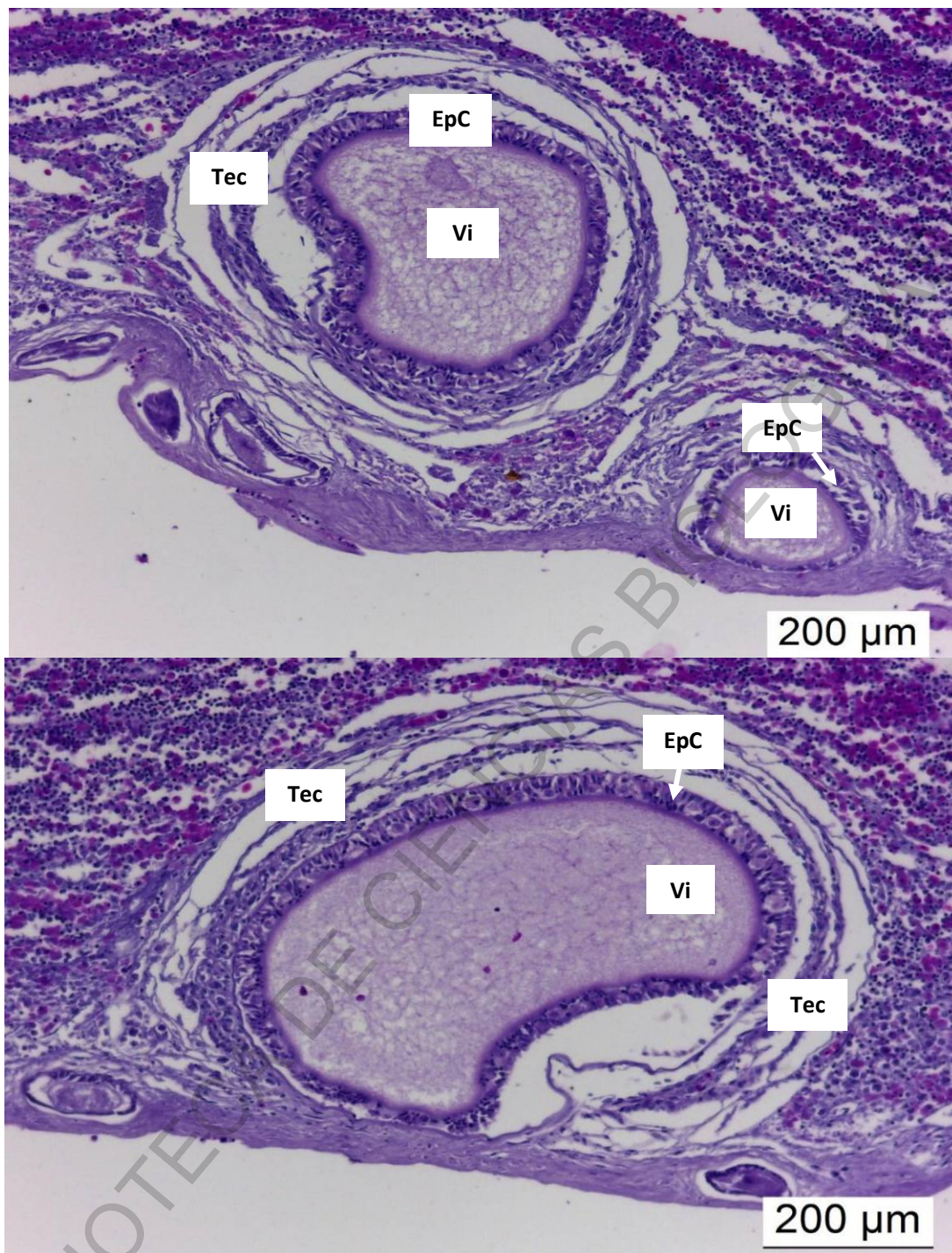


Figura 46. Cuarto estado ovocitario, se desarrolló el epitelio columnar simple (EpC) de la granulosa y las células colagenas y cúbicas de las tecas (Tec). El citoplasma contiene gránulos de vitelo (Vi). Aumento 10x ambos

5. Ovocito en estado V: La estructura folicular es básicamente la misma que en el estadio anterior, pero el tamaño varía enormemente: un ovocito vitelogenado en estado IV puede medir 400 - 500 μm , mientras que uno en estado V llega a los 30 - 40 mm. Para alcanzar tan masivas dimensiones, el ovocito tiende a fusionarse con otros. Las capas celulares deben asegurar una continua nutrición a una célula tan grande y por ello aumentan de grosor, la teca externa se encuentra ahora bastante vascularizada e incluso la granulosa tiende a formar pliegues y desarrollar células caliciformes secretoras de mucoproteínas.

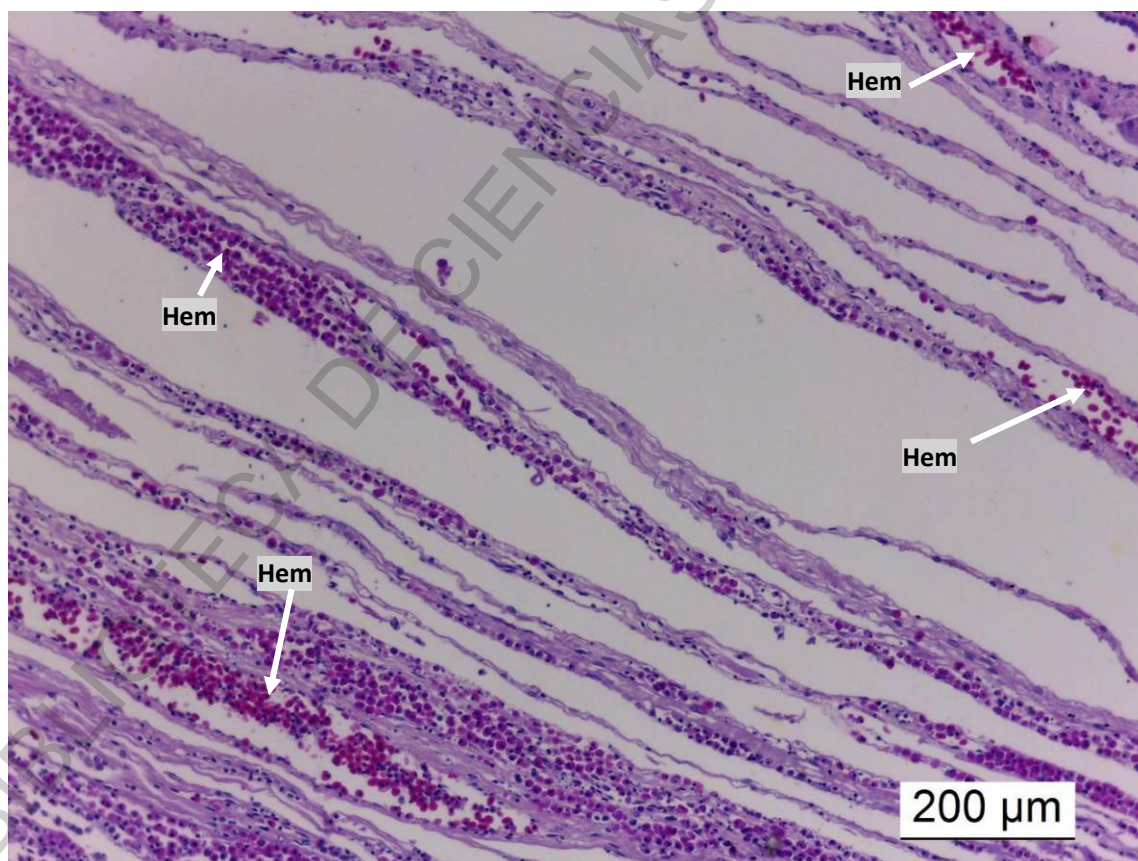


Figura 47. Detalle de la teca interna de un folículo listo para ovular. Los pliegues son numerosos y su irrigación es abundante. Se observa un gran número de hematíes (Hem). Aumento 10x

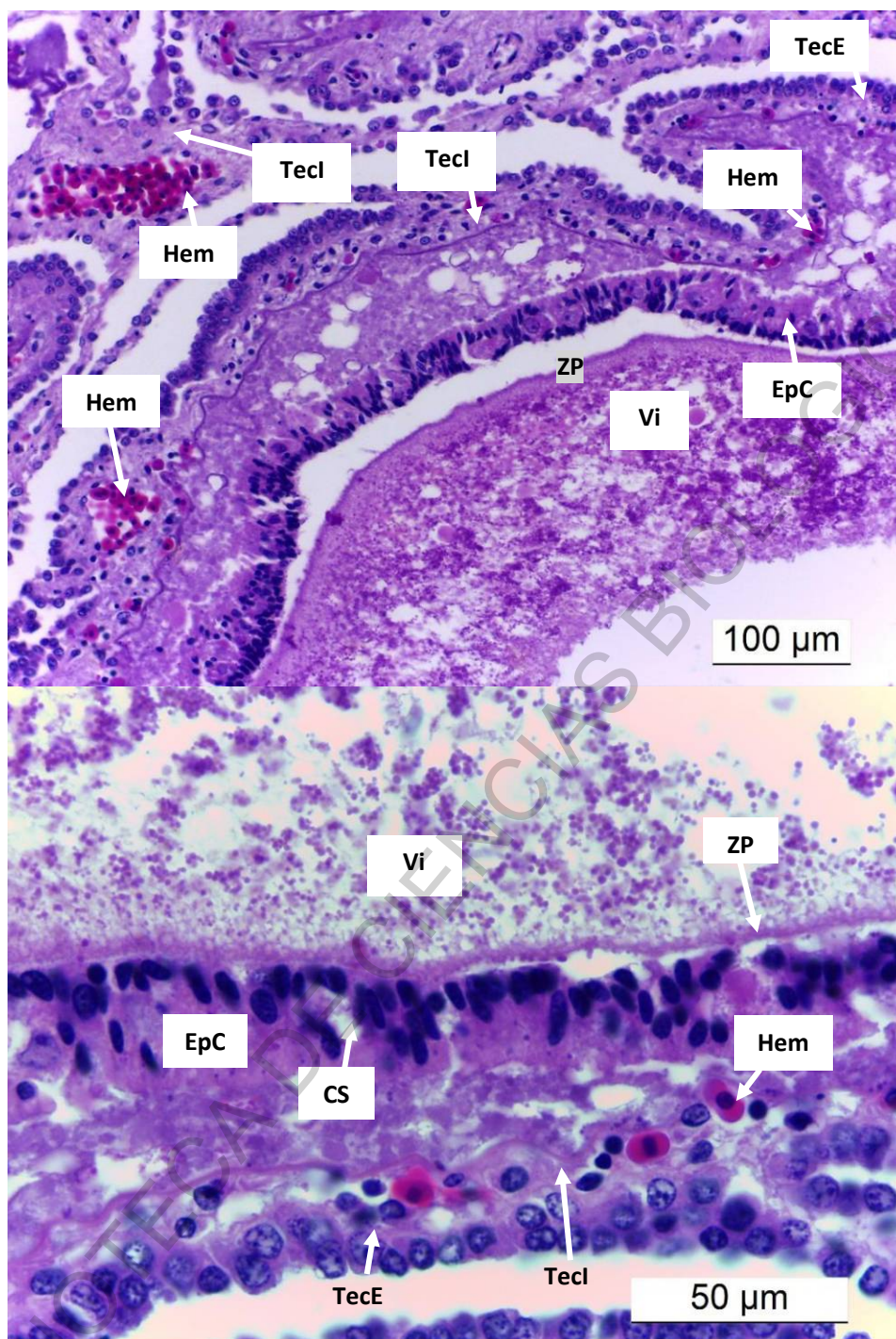


Figura 48. Detalle del folículo de un ovocito estado V. El citoplasma está repleto de vitelo (Vi), seguido por la zona pelúcida y luego la granulosa (EpC) compuesta por células cilíndricas y células secretoras (CS). Continúa la membrana basal y la teca interna (TecI), ya bastante vascularizada (Hem) y finalmente la teca externa (TecE) compuesta por células cúbicas. Aumentos 40x Superior 63x Inferior

Se obtuvo un corte del útero cerca de los trofonemas: vellosidades que tendrán como función la alimentación al embrión en gestación. Estas estructuras se prolongan desde el endometrio basal hacia la luz uterina y varían en longitud. Su borde exterior está compuesto por epitelio pseudoestratificado cilíndrico. Aparte de las células de sostén, se encuentran células secretoras, las cuales producirán el histótrofo o leche uterina que alimentará al embrión en su formación. Continúa la membrana basal y luego, tejido conjuntivo laxo compuesto en por fibroblastos. El interior de las trofonemas es bastante vascularizado y de allí que su color a simple vista sea rojo intenso.

Por último, se tiene el miometrio, la parte media del útero constituida por células musculares lisas y tejido conjuntivo denso. No se obtuvo corte histológico del perimetrio.

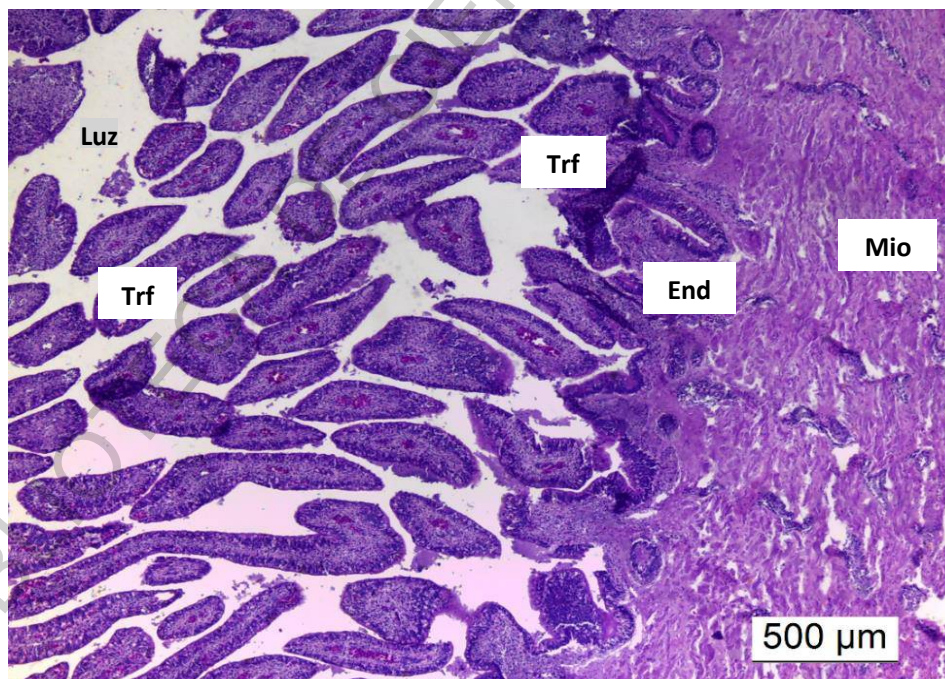


Figura 49. Útero de *M. peruvianus*, se observan los trofonemas (Trf) sobresaliendo del endometrio (End) hacia la luz uterina (Luz), del lado opuesto se encuentra el miometrio (Mio). Aumento 4

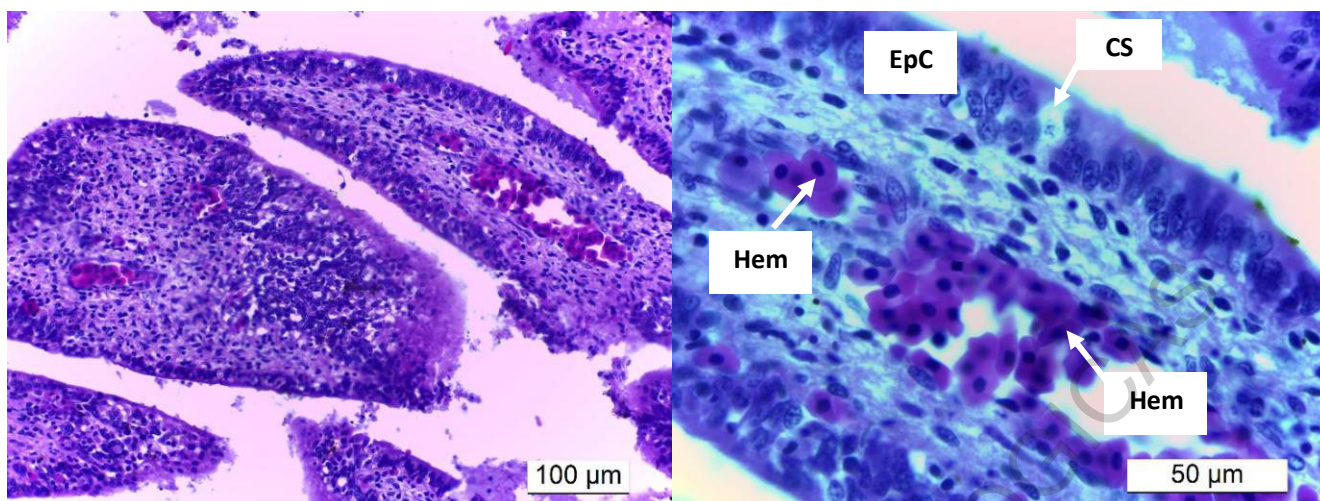


Figura 50. Detalle de los trofonemas, el borde está recubierto por el epitelio cilíndrico (EpC) con algunas células secretoras (CS). El interior está recubierto por tejido conjuntivo laxo y se encuentra bastante irrigado (Hem). Aumentos 40x Izquierda 63x Derecha

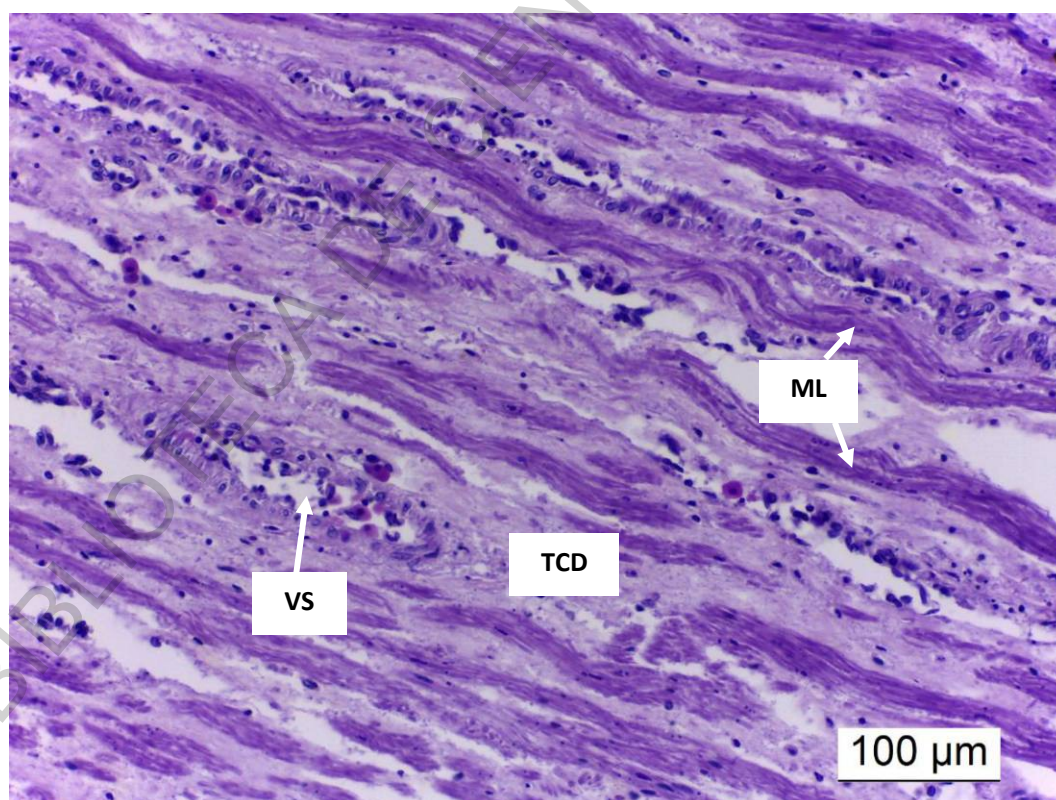


Figura 51. Estructura del miometrio, compuesto por músculo. Tejido conjuntivo denso (TCD), músculo liso (ML) y vasos sanguíneos (VS). Aumento 40x

Sistema Reproductor en Machos

La estructura básica del aparato reproductor masculino consta de cinco partes: testículos, epidídimo, conductos, vesícula seminal y órganos copuladores.

Las estructuras reproductoras en los machos también son pareadas sin gran diferencia en cuanto a tamaño entre el lado izquierdo y el derecho. Destacan acá los testículos de tipo compuesto (Engel y Callard, 2005; Prat, 1988; Conrath y Musick, 2012): estructuras alargadas y aplanadas que dan el aspecto de un racimo de uvas comprimido lateralmente. Están suspendidos por el mesorquio y su coloración es rosada clara. Al contrario de las hembras, la diferencia entre el testículo izquierdo y derecho es mínima, aunque como en los ovarios, es el testículo izquierdo el que alcanza un tamaño ligeramente mayor.

Los conductos eferentes conectan a los testículos con el epidídimo, una estructura de 15 cm en promedio de color rosado claro a casi anaranjado y está incrustado cerca de la columna vertebral. Continúan los conductos deferentes hasta la vesícula seminal, lugar de almacén de espermatozoides antes de pasar a los claspers y ser expulsados mediante la eyaculación.

Los claspers son extensiones de las aletas pélvicas que actúan como órganos copuladores bastante especializados: Llegan a medir 15 cm y al madurar se encuentran totalmente calcificados por lo que permanentemente están rígidos. Durante el acto sexual, uno de ellos se levanta y se introduce en la cloaca de la hembra, la eyaculación ocurre dentro del cuerpo de la hembra. En la parte anterior de cada clasper y cerca de la unión con la aleta pélvica hay una abertura: el apópilo y en la posterior, cerca de la punta, otra abertura más evidente: el hipópilo, que, a su vez, está ligeramente cubierta por el rifiodón. La cobertura total del hipópilo por el rifidón indica que el ejemplar aún no está preparado para reproducirse. En la cópula, el agua marina entra por el apópilo y los sacos sifonales

encontrados dentro del clasper ayudan a la expulsión del semen por el hipopilo hacia el oviducto de la hembra (Gilbert y Heath, 1972; Conrath y Musick, 2012).

a) Relación Ancho de Disco – Longitud de Clasper

La longitud del clasper (LC) fue tomada en todos los individuos machos encontrados (80 ejemplares). El tamaño mínimo fue de 4 cm, una constante para las tallas entre 40 y 60 cm AD. La transición se dio a los 7 cm LC y entre los 80 y 90 cm AD. Entre los juveniles existió una mayor variedad de tallas de órgano copulador que oscilaron desde 7 cm hasta 14 cm. Los clasper presentes en este estadio se encontraban en fase de calcificación, algunos ya bastante rígidos, pero aún con el rifiodón cerrado. Un clasper maduro es bastante evidente por su tamaño y grosor, el rifiodón se encontraba ya abierto y la rotación era posible. La última transición se dio a los 14 cm LC y 114 cm AD. A partir de estas tallas, todos los individuos encontrados fueron maduros. Se encontró correlación entre AD y LC (Reg. Lineal, $r = 0.9320$).

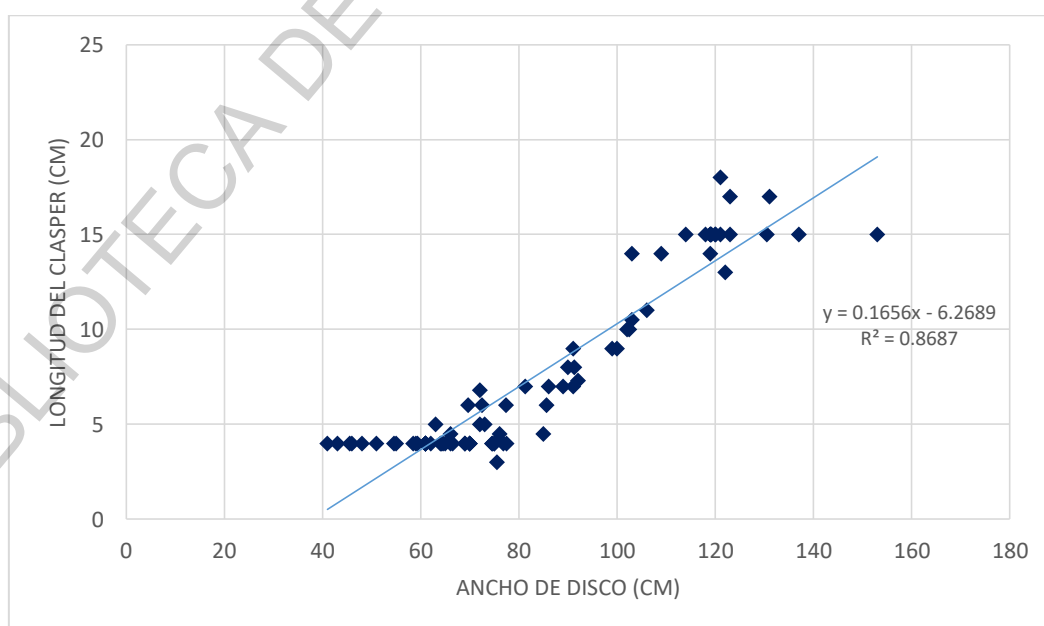


Figura 52. Relación entre ancho de disco (AD) y longitud de clasper (LC) del total de machos.

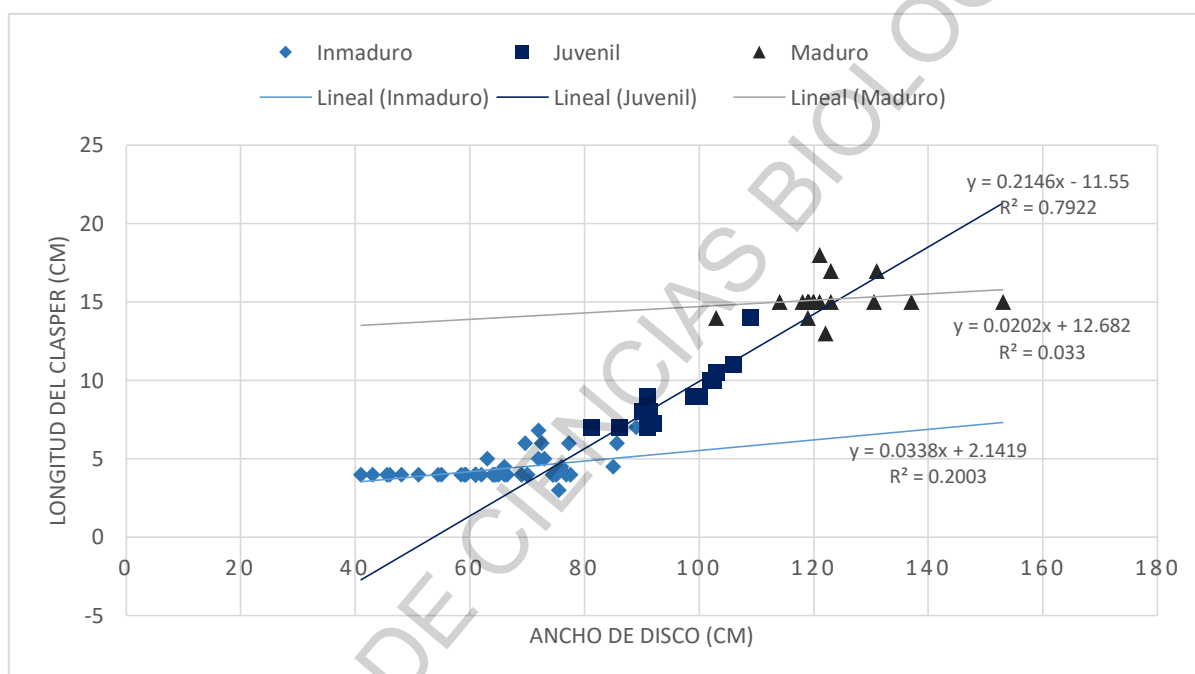


Figura 53. Relación entre ancho de disco (AD) y longitud de clasper (LC) por estadio.

b) Relación Ancho de Disco – Largo y Ancho de Testículos

El análisis se realizó con 53 individuos. En el caso de los machos, ambos testículos son funcionales y la diferencia de medidas entre un lado y el otro es mínima, aun así, se compararon el ancho de disco (AD) con la longitud de testículo izquierdo (LTI) y derecho (LTD) y el ancho de testículo izquierdo (ATI) y derecho (ATD). Como puede ser evidente, el macho con menor AD registró la menor longitud de testículo y ancho de testículo. La transición se dio entre los 14 y 15 cm LTI, 12 cm LTD, 3 cm ATI y ATD. Las medidas de LTI de juveniles y maduros son similares, por lo que más que la longitud, la determinación se daría por observación de la estructura. En el caso de LTD, la transición final se dio a los 14 cm. Tanto el ancho izquierdo como el derecho tuvieron su transición final a los 4 cm. La longitud de testículo demostró ser mejor para determinar el estadio a comparación del ancho. Existe diferencia significativa entre LTI y LTD ($W = -6,151302$, $P < 0.005$) así como en ATI y ATD ($W = -3,098144$, $P = 0,002$).

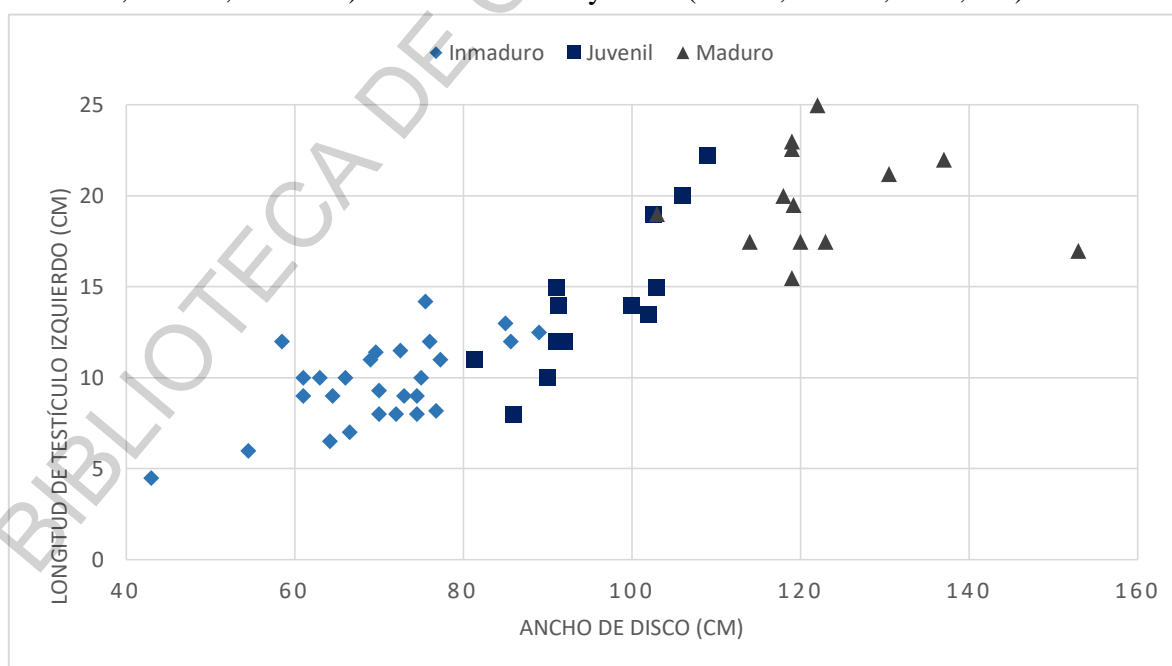


Figura 54. Relación entre ancho de disco (AD) y longitud de testículo izquierdo (LTI).

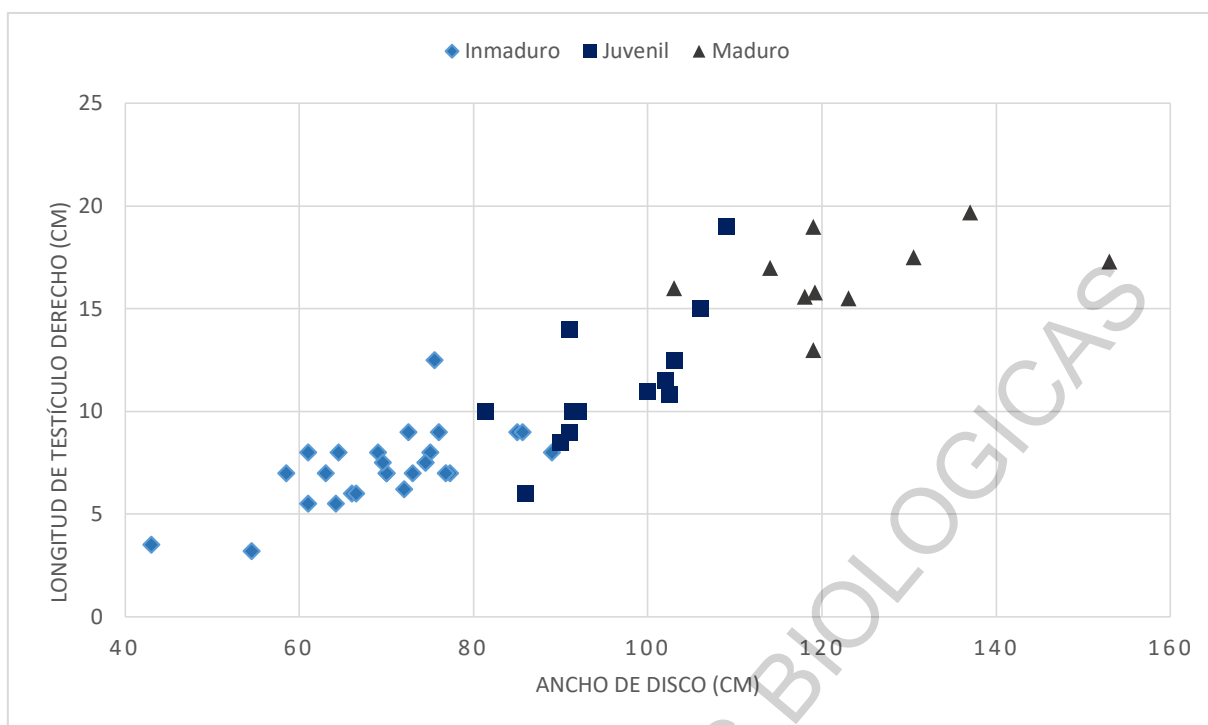


Figura 55. Relación entre ancho de disco (AD) y longitud de testículo derecho (LTD).

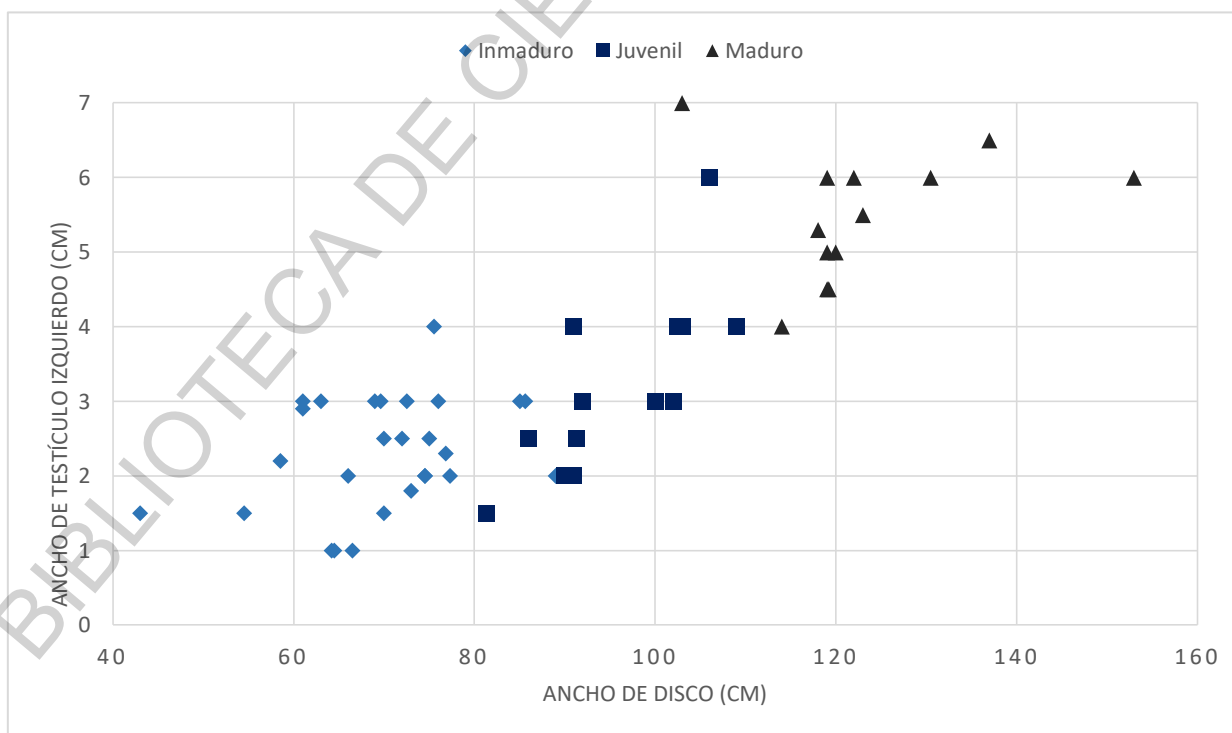


Figura 56. Relación entre ancho de disco (AD) y ancho de testículo izquierdo (ATI).

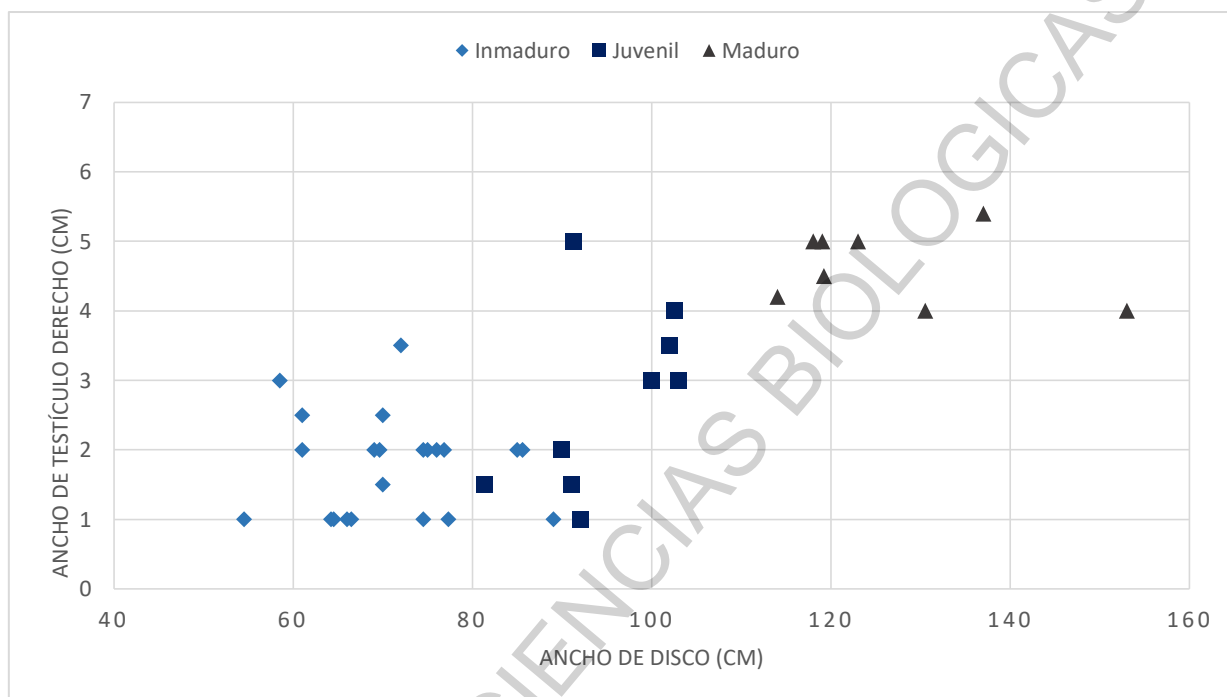


Figura 57. Relación entre ancho de disco (AD) y ancho de testículo derecho (ATD).

c) Relación Longitud de Clasper – Largo y Ancho de Testículo

Una comparación que resultó bastante interesante fue la del desarrollo del órgano copulador y el desarrollo testicular. Con esta relación se evalúa la diferencia de tamaño de los testículos por cada tamaño de clasper. Las mayores amplitudes de diferencia entre el menor y mayor testículo registrado la tuvieron los claspers de 4, 8 y 15 cm LC. Los claspers de 4cm LC estuvieron relacionados a tallas entre 4.5 y 11 cm LTI, 3.5 y 8 cm LTD y 1 a 3 cm para anchos en ambos lados. En el caso de los claspers de 8 cm LC, las tallas testiculares estuvieron entre 10 y 14 cm LTI, 8.5 y 10 LTD, 2 y 2.5 cm ATI y 2 y 5 cm ATD. Para claspers de 15 cm LC los rangos estuvieron entre 15.5 y 22.6 cm LTI, 13 y 19.7 cm LTD, 4 y 6.5 cm ATI y 4 a 5.4 cm ATD. Se encontró correlación entre el LC y LTI (Reg. Lineal, $r = 0.7472$), LC y LTD (Reg. Lineal, $r = 0.8983$) así como en LC y ATI (Reg. Lineal, $r = 0.8280$) y en LC y ATD (Reg. Lineal, $r = 0.7544$).

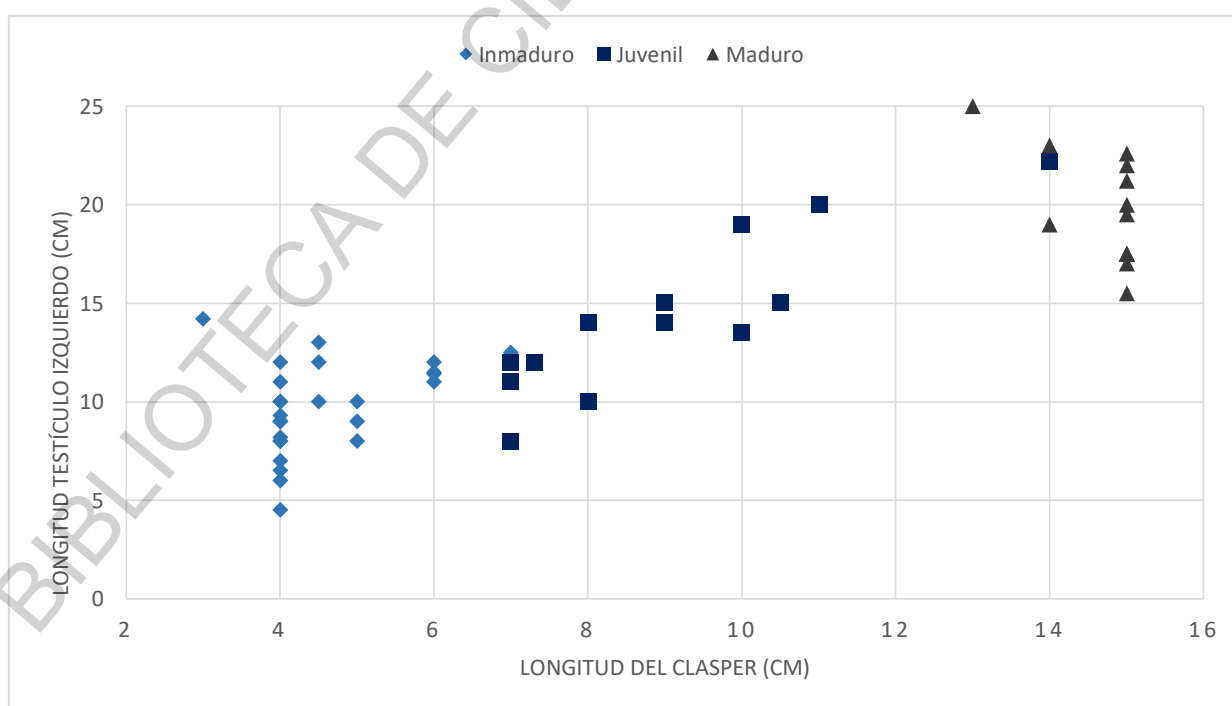


Figura 58. Relación entre longitud de clasper (LC) y longitud de testículo izquierdo (LTI).

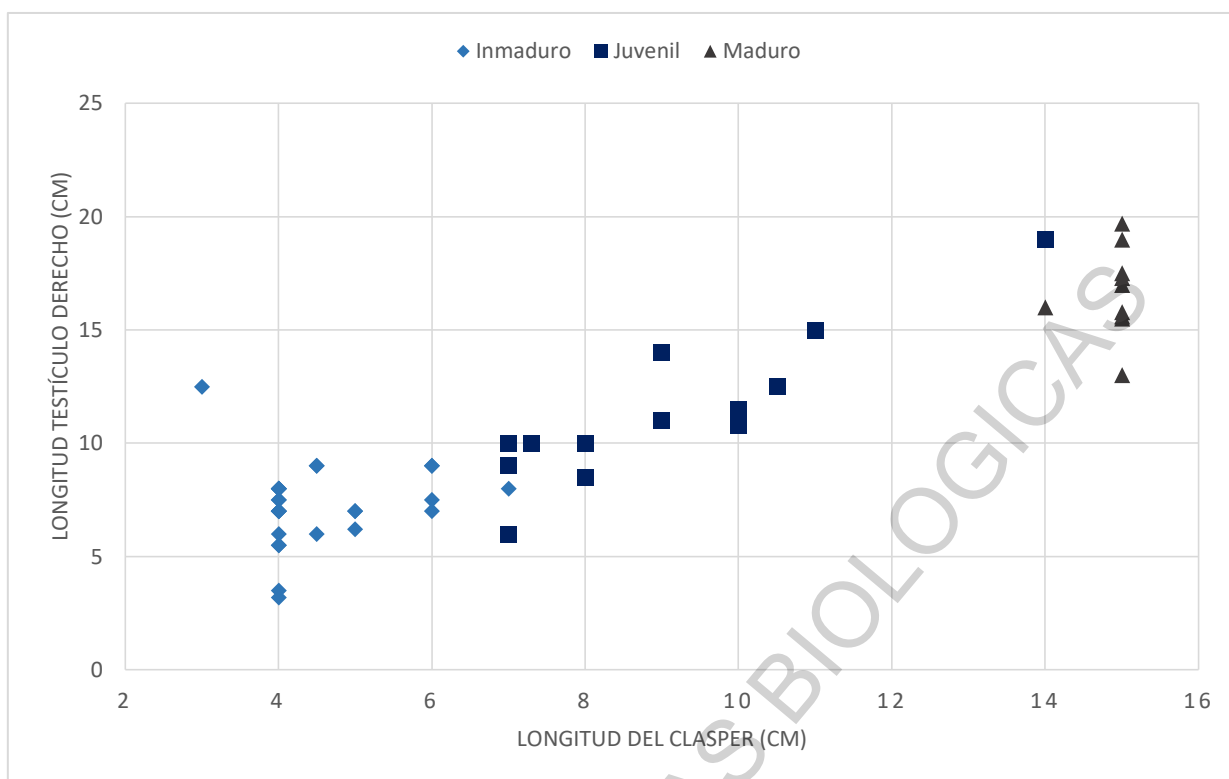


Figura 59. Relación entre longitud de clasper (LC) y longitud de testículo derecho (LTD).

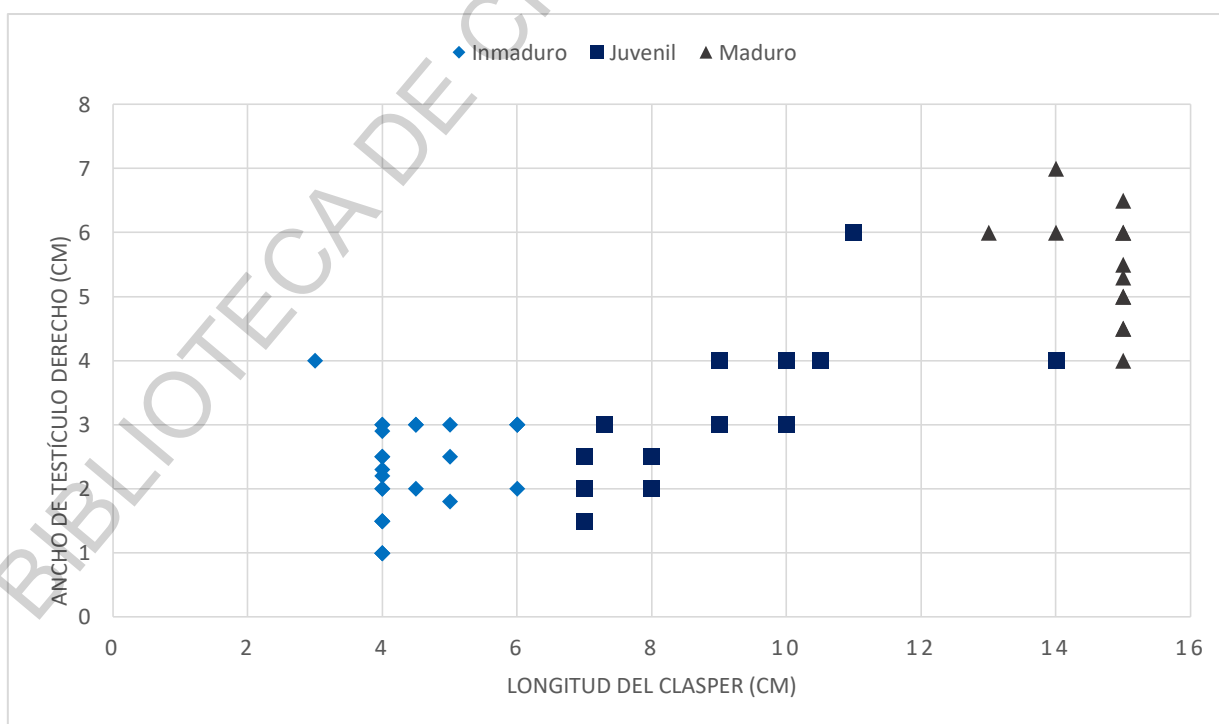


Figura 60. Relación entre longitud de clasper (LC) y ancho de testículo izquierdo (ATI).

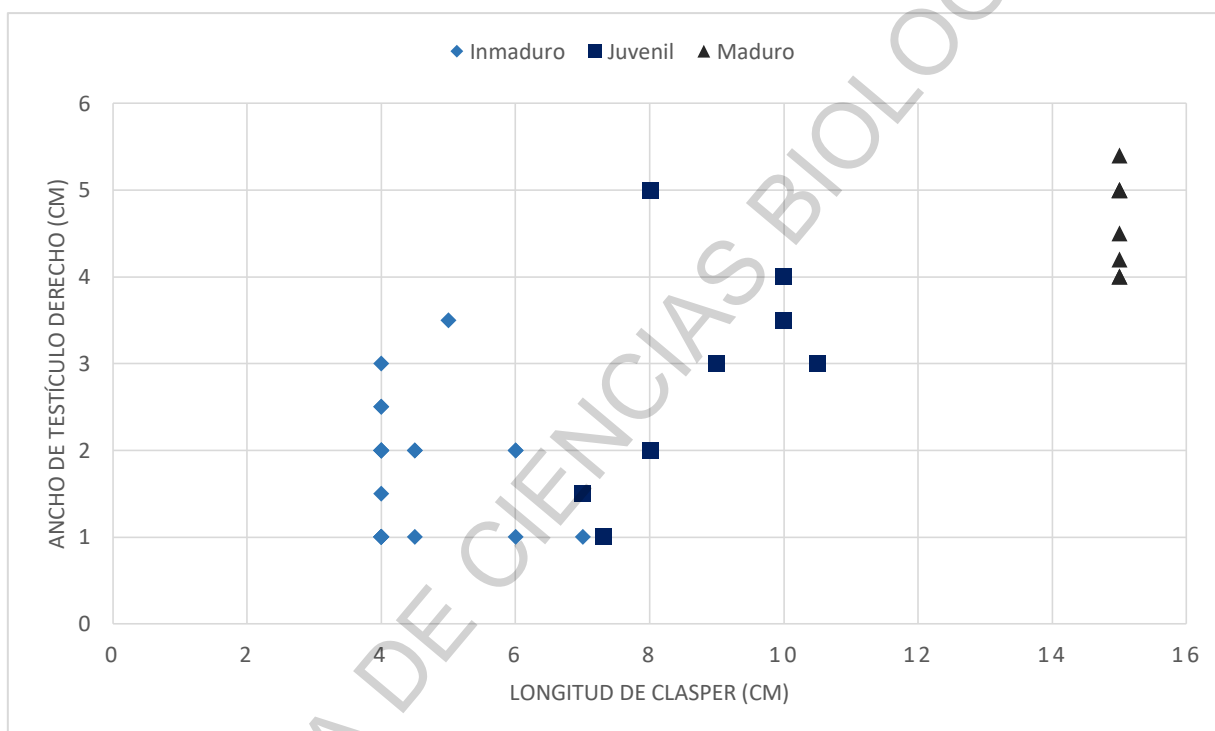


Figura 61. Relación entre longitud de clasper (LC) y ancho de testículo derecho (ATD).

d) Estadíos de Madurez Gonadal

Se determinaron 3 estadíos de madurez gonadal, a diferencia de las hembras, todos los estados pudieron ser observados.

i) Estadío I: Virgen o Inmaduro

Clasper: Pequeños, no sobrepasan los 6 cm. Una referencia más precisa para los batoides en general es la comparación entre el tamaño del órgano copulador y las aletas pélvicas, así como su calcificación. En este estadío, los claspers son tan reducidos que no sobrepasan el borde posterior de la aleta pélvica y son evidentemente flácidos. El rifiodón está cerrado.



Figura 62. Clasper en macho inmaduro. Nótese que la punta no sobrepasa el borde posterior de las aletas pélvicas, representado con una línea discontinua amarilla.

Gónadas: La estructura testicular es acuosa, frágil y de color blanquecina. Se pueden observar algunas vesículas espermáticas poco desarrolladas mientras que la mayoría de la estructura está cubierta por órgano epigonal. Los ductos apenas pueden ser diferenciados y no se observa epidídimo ni vesícula seminal.

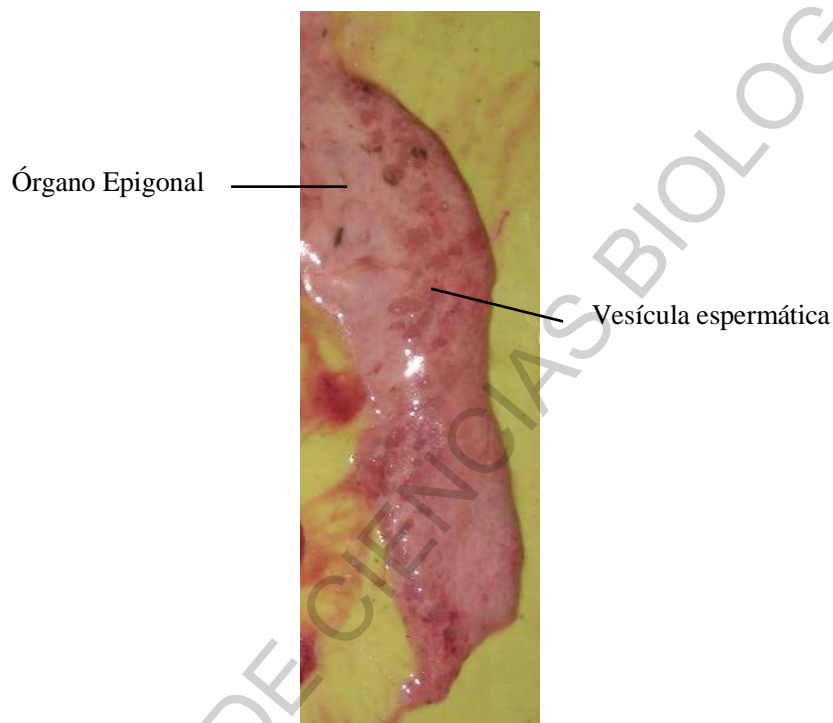


Figura 63. Testículo inmaduro, de estructura acuosa y vesículas espermáticas poco desarrolladas y apenas distinguibles.

ii) Estadío II: Juvenil o En Maduración

Claspers: Hay un aumento de tamaño, llegando a sobrepasar las aletas pélvicas. Al tacto, se nota una mayor rigidez, pero aún no están totalmente calcificados. El rifiodón permanece cerrado.



Figura 64. Clasper de individuos juveniles. El extremo final del órgano copulador ya sobrepasa el borde posterior de las aletas pélvicas (izquierda) e incluso parte del rifiodón en algunos ejemplares (derecha).

Gónadas: Aumento de tamaño de los testículos y las vesículas espermáticas ya se van distinguiendo claramente. Van adoptando una forma deprimida y un color rosáceo mientras que el color crema-blancuecino se restringe en el órgano epigonal.

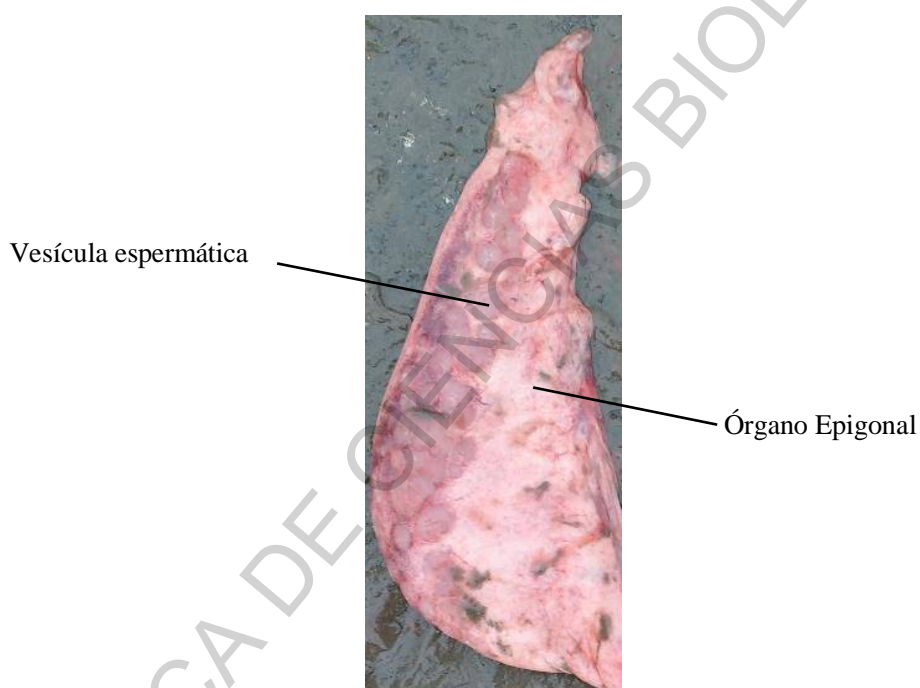


Figura 65. Testículo de un individuo juvenil, presenta vesículas espermáticas fácilmente distinguibles y una reducción del órgano epigonal.

iii) Estadío III: Adulto o Maduro

Claspers: Medidos desde su base, llegan a los 17cm, aunque la mayoría de los colectados midieron 15 cm. Están calcificados en su totalidad y es posible hacerlos rotar en un ángulo de 360°. Es evidente la distancia que separa la punta de los claspers del borde de las aletas pélvicas. El rifiodón está abierto.



Figura 66. Claspers de un individuo maduro, indudablemente grandes y calcificados, sobrepasando el borde anterior de la aleta pélvica (izquierda) y con el rifiodón abierto (derecha).

Gónadas: Vesículas espermáticas prominentes fácilmente distinguibles, lo que ello sumado a su forma deprimida dorso-ventralmente hace recordar a un racimo de uvas. El órgano epigonal disminuyó tremendamente y se restringe a la periferia testicular. Los epidídimos están bien aferrados al borde de la espina dorsal y estructuras como los conductos y vesícula seminal son fácilmente distinguibles.

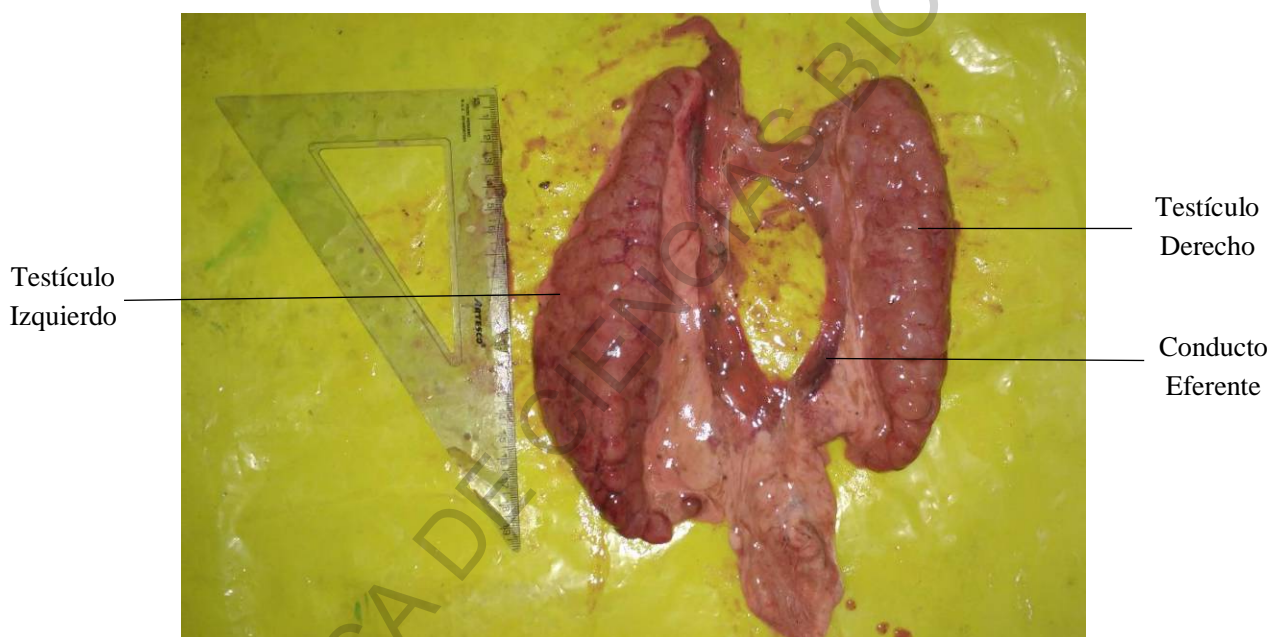


Figura 67. Testículos maduros de *M. peruvianus*. Existe una diferencia de tamaños entre el izquierdo y el derecho, sin embargo no llega a ser tan marcada como en el caso de ovarios.

e) Microestructura

Los testículos inmaduros están recubiertos de órgano epigonal. En ciertas zonas próximas al borde testicular, rodeadas de tejido conjuntivo laxo, se desarrollan las primeras vesículas espermáticas y dentro de estas se encuentran pequeños túbulos seminíferos o cistos que contienen espermatozonias y células de Sertoli.

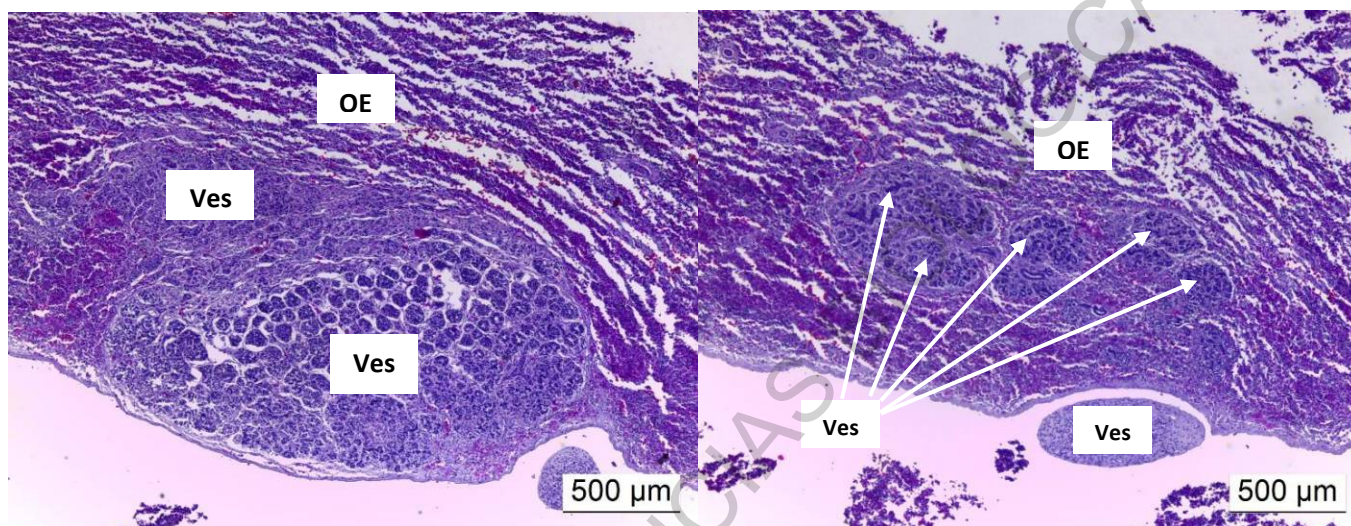


Figura 68. Testículo inmaduro de *M. peruvianus*. Las pocas vesículas (Ves) existentes, rodeadas de abundante órgano epigonal (OE). Aumento 4x Ambos

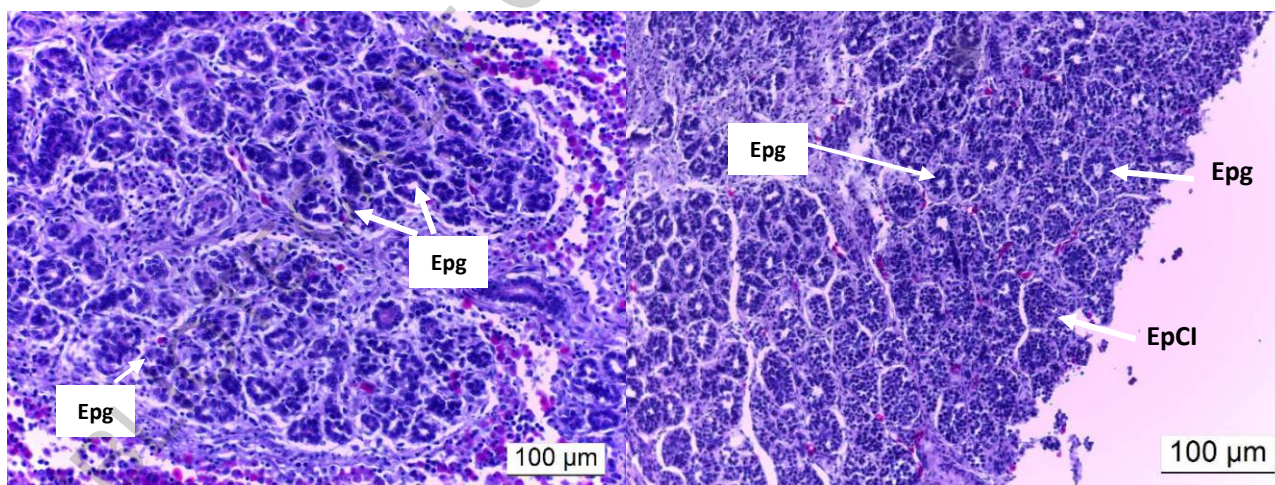


Figura 69. Acercamiento a las vesículas. Al empezar a desarrollarse, los cistos solo contienen algunas espermatozonias (Epg) y células de Sertoli (izquierda). Las vesículas con mayor desarrollo presentan numerosos cistos, algunos incluso desarrollando espermatozonias I (EpcI) (derecha). Aumento 20x Ambos

El testículo juvenil, con vesículas seminales que adquirieron mayor tamaño, desarrollaron un mayor número de cistos y algunos de ellos ya producen espermatozoides. El desarrollo testicular es mucho más precoz a comparación del desarrollo de ovarios en hembras ya que un testículo juvenil produce espermatozoides en las pocas vesículas espermáticas. Así mismo es importante resaltar que dentro de un cisto, todas las células están en un mismo estado de desarrollo. En el parénquima testicular pueden encontrarse las células de Leydig, productoras de testosterona.

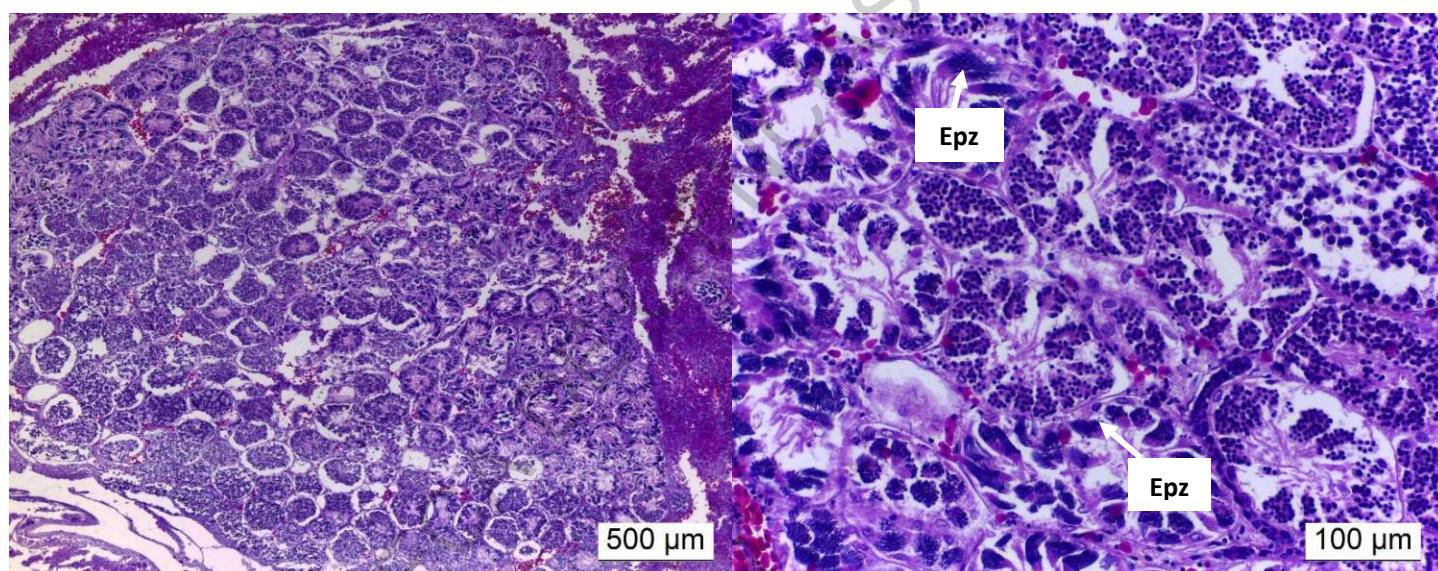


Figura 70. Testículo juvenil. Vista general de una vesícula seminal, la cual aumentó en tamaño estructural y número de cistos (izquierda). Cada cisto posee células en el mismo estado de desarrollo (derecha), un testículo juvenil tiene la capacidad de desarrollar espermatozoides (Epz) pero el número producido no es significativo a comparación de un testículo maduro. Aumentos 4x Izquierda 20x Derecha

Un testículo maduro posee abundantes vesículas seminales, cada una desarrollando nuevos espermatozoides en cada uno de los cistos. Se hace evidente la superioridad numérica de los que contienen espermatozoides maduros. Aunque el órgano epigonal está reducido a la parte que limita con el mesorquio, los testículos están bien irrigados.

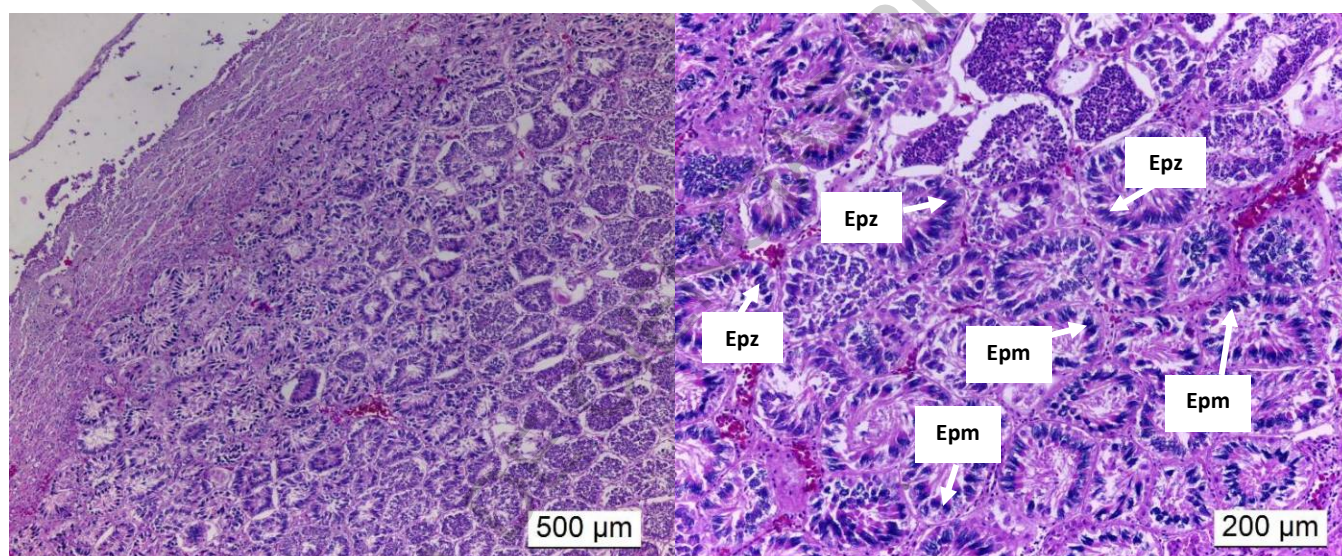


Figura 71. Testículo maduro. La vesícula seminal aumentó de tamaño y se encuentran numerosos cistos (izquierda). Varios de estos producen espermatozoides (Epz) y los paquetes espermáticos o espermatozeugmata (Epm) que serán liberados en el lumen (derecha). Aumentos 4x Izquierda 10x Derecha

Para el desarrollo espermático se establecieron once fases:

1. Fase I: Los cistos van desarrollando espermatogonias, caracterizadas por un amplio núcleo basófilo y con cromatina laxa.

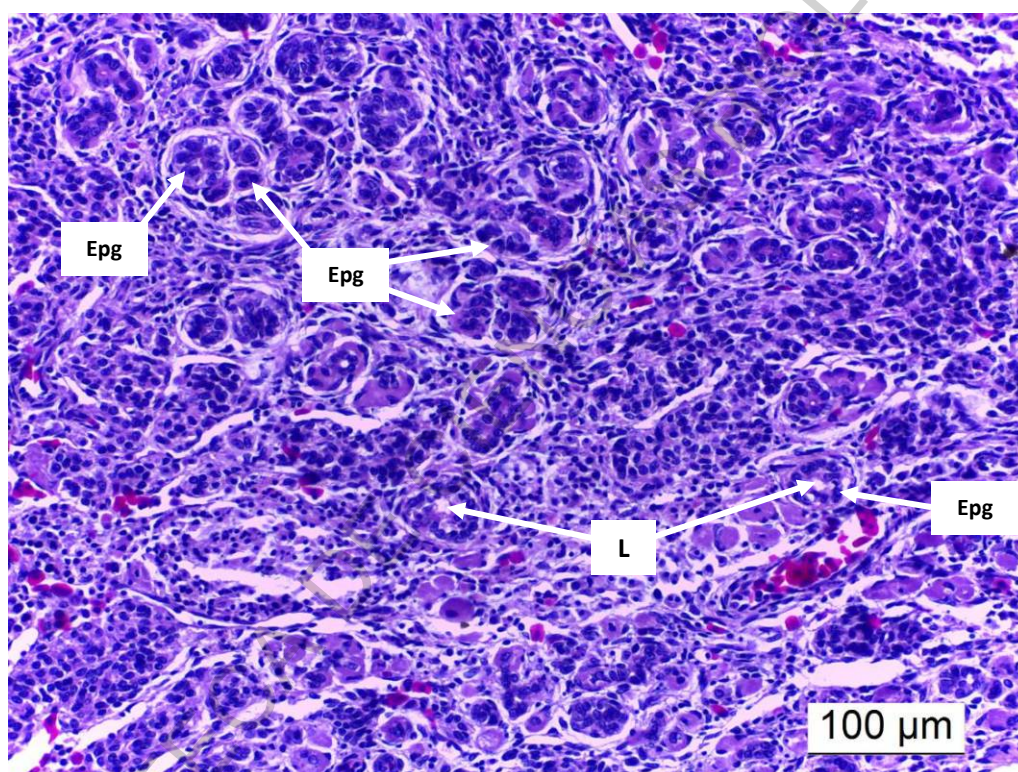


Figura 72. Cistos en formación conteniendo las primeras espermatogonias (Epg).

Notese que migran a la periferia dejando el centro como lumen (L). Aumento 20x

2. Fase II: Arreglo de las espermatogonias alrededor del cisto, dejando un lumen central. Las células de Sertoli (de color blanquecino) también migran hacia la periferia.

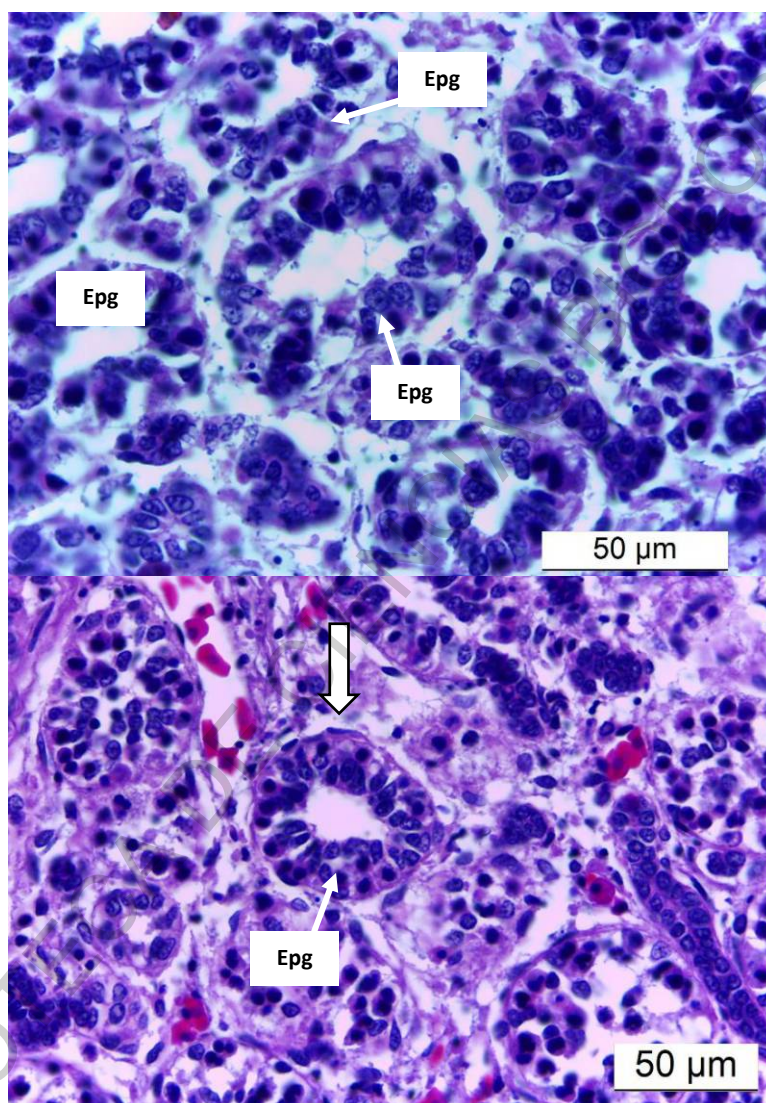


Figura 73. Cistos en Fase II. Un conjunto de cistos cuyas espermatogonias (Epg) están terminando de disponerse alrededor (superior) y un cisto al medio con la disposición terminada típica de la Fase II (inferior). Aumento 63x Ambos

3. Fase III: Condensación de la cromatina en las espermatogonias y la división de estas, terminarán colocándose una encima de otra.

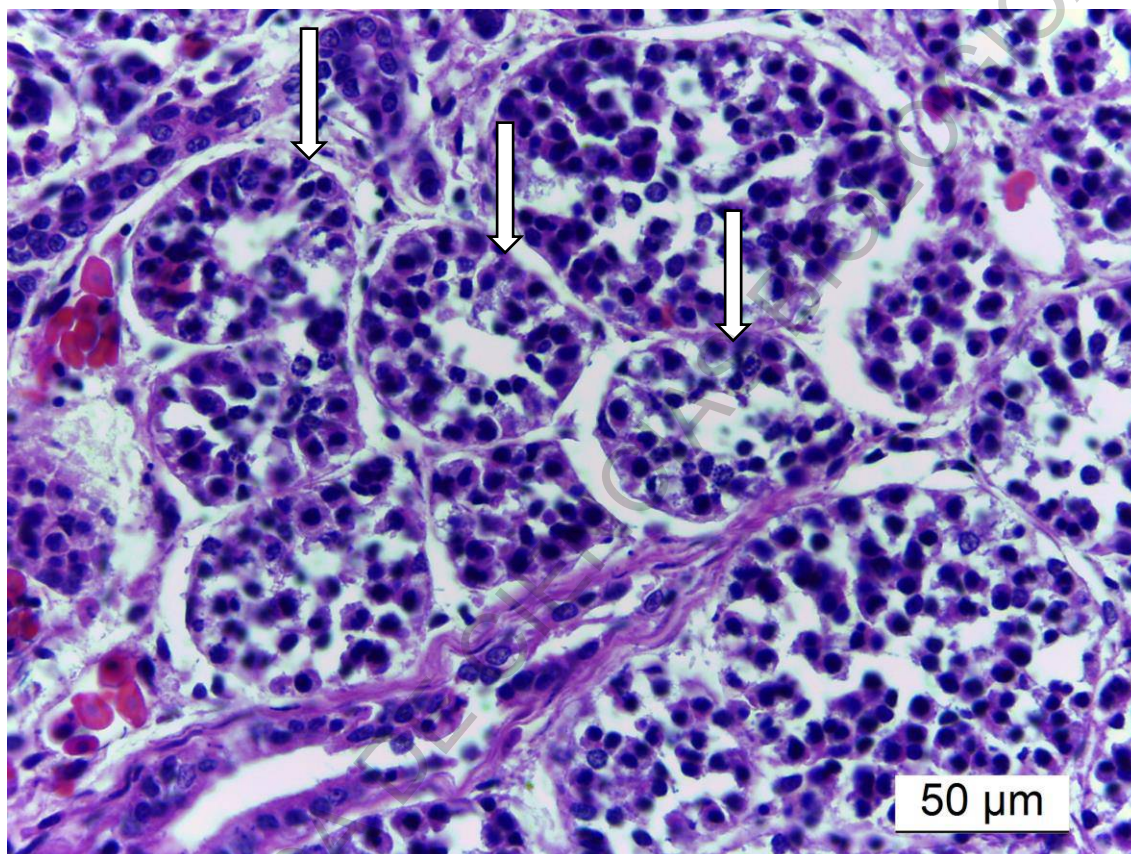


Figura 74. Cistos en Fase III. Tres cistos en esta vesícula presentan espermatogonias dispuestas una sobre otra y en división. Nótese que conforme se hacen más abundante, los núcleos se condensan. Aumento 63x

4. Fase IV: Las divisiones meióticas dieron como resultado los espermatocitos I, células más pequeñas y con un núcleo con cromatina bastante condensada. El cisto aumenta en tamaño.

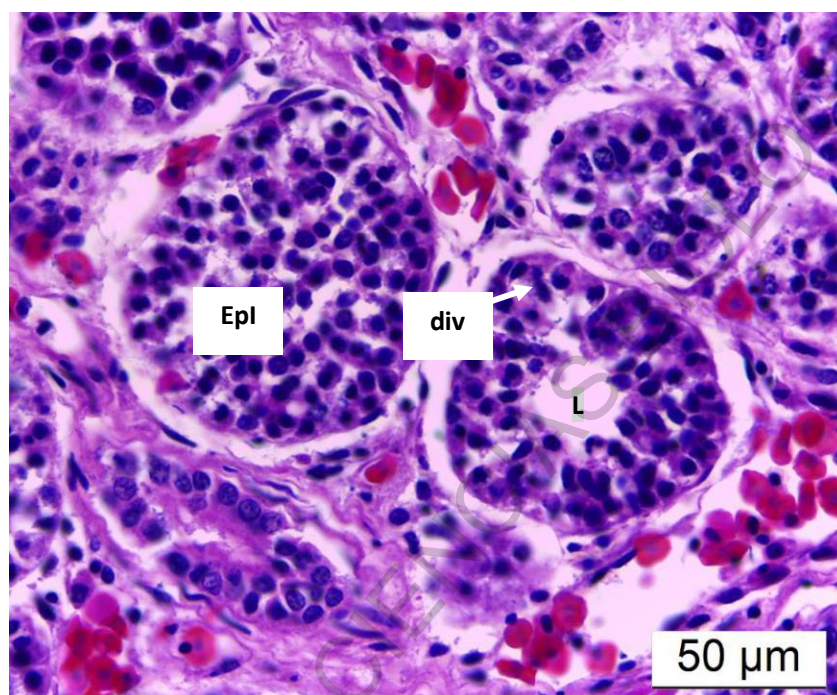


Figura 75. Cistos en Fase IV y Fase III. Dos cistos muestran perfectamente la diferencia entre fases: el cisto localizado en la derecha aún posee el lumen central (L) y espermatogonias dividiéndose (div) y desarrollándose como espermatocitos. El cisto izquierdo muestra los espermatocitos I (Epl) (con un núcleo más compacto) ocupando el mayor espacio disponible. Aumento 63x

5. Fase V: Las nuevas divisiones dan lugar a los espermatocitos II, células con núcleos condensados y más pequeñas.

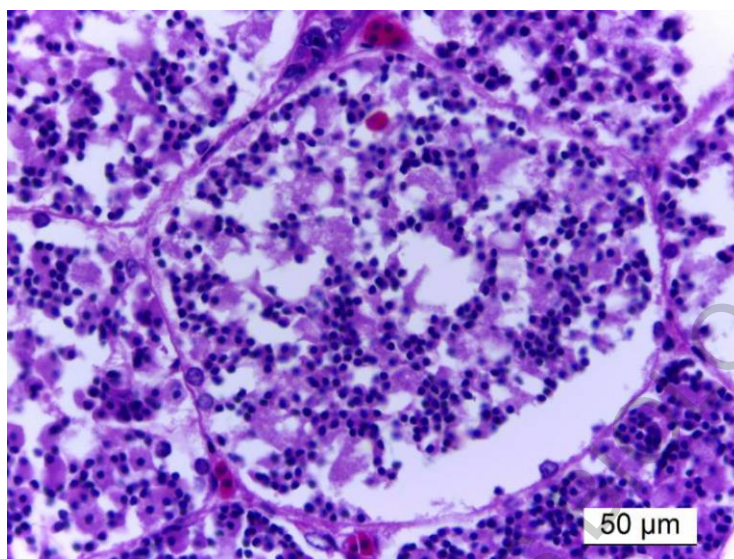


Figura 76. Cisto en Fase V. Los espermatocitos II abundan, su tamaño es menor y su núcleo es condensado. Aumento 63x

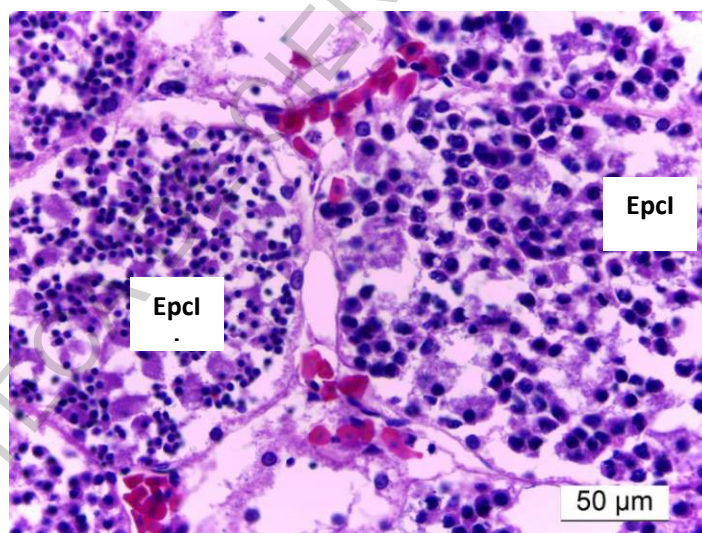


Figura 77. Cistos en Fase V y Fase IV. El cisto derecho (en Fase IV) contiene células que a comparación del cisto izquierdo (en Fase V) son más grandes y con núcleos menos condensados, esto muestra la diferencia entre los espermatocitos I (EpcI) y II (EpcII). Aumento 63x

6. Fase VI: Los espermatoцитos II se van alargando y reduciendo en tamaño.

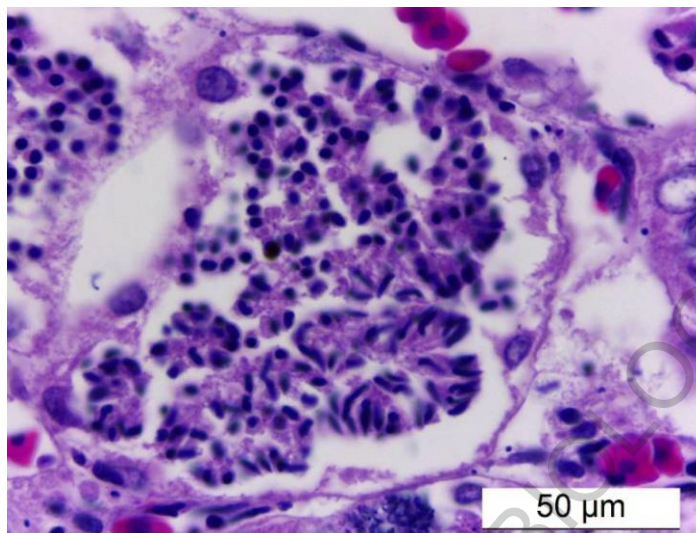


Figura 78. Cisto en Fase VI. Los espermatoцитos II se alargan a medida que van sufriendo la división meiótica que dará lugar a células haploides. Aumento 63x

7. Fase VII: La célula haploide, espermátida, termina de desarrollarse.

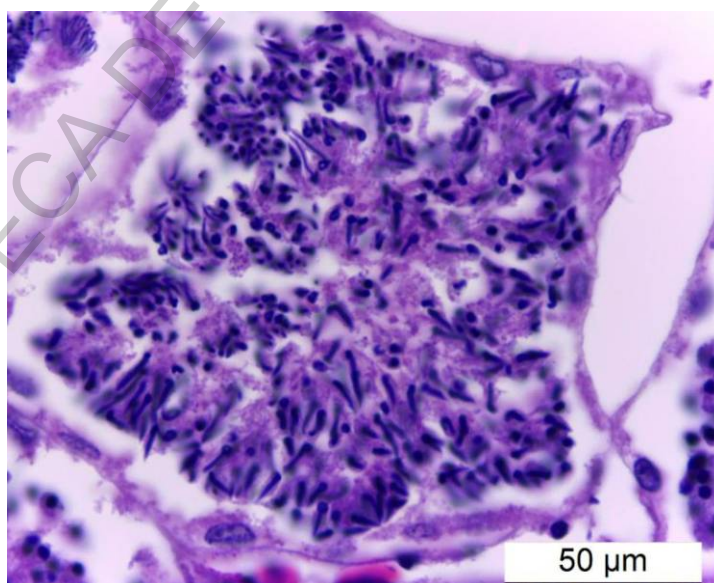


Figura 79. Cisto en Fase VII. Espermátidas desarrolladas, poseen cabeza y cola.

Aumento 63x

8. Fase VIII: Reducción de la cabeza y alargamiento de los flagelos de las espermátidas para desarrollarse como espermatozoides. La cabeza va al citoplasma de las células de Sertoli y los flagelos apuntando al lumen.

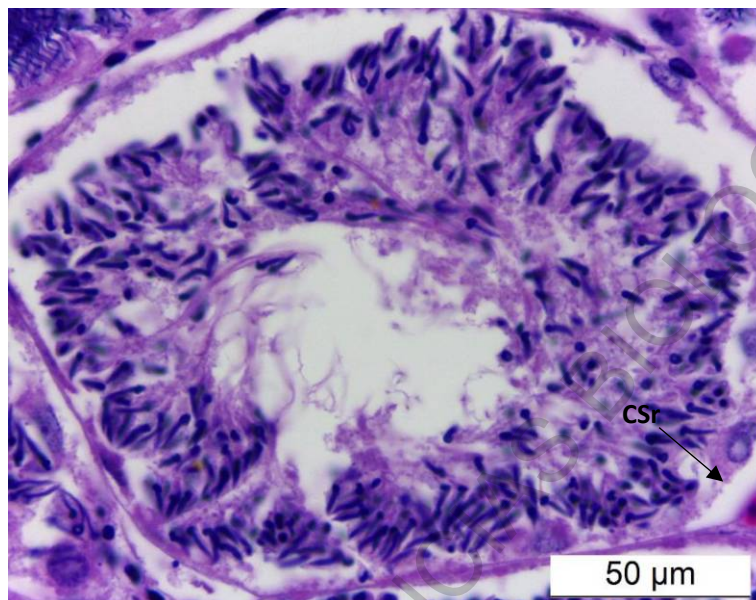


Figura 80. Cisto en Fase VIII. Espermátidas migran en dirección a las células de Sertoli (CSr), asimismo van alargándose y la cabeza se reduce. Aumento 63x

9. Fase IX: Los espermatozoides se desarrollaron completamente y están en una disposición llamados “arreglo espiral”.

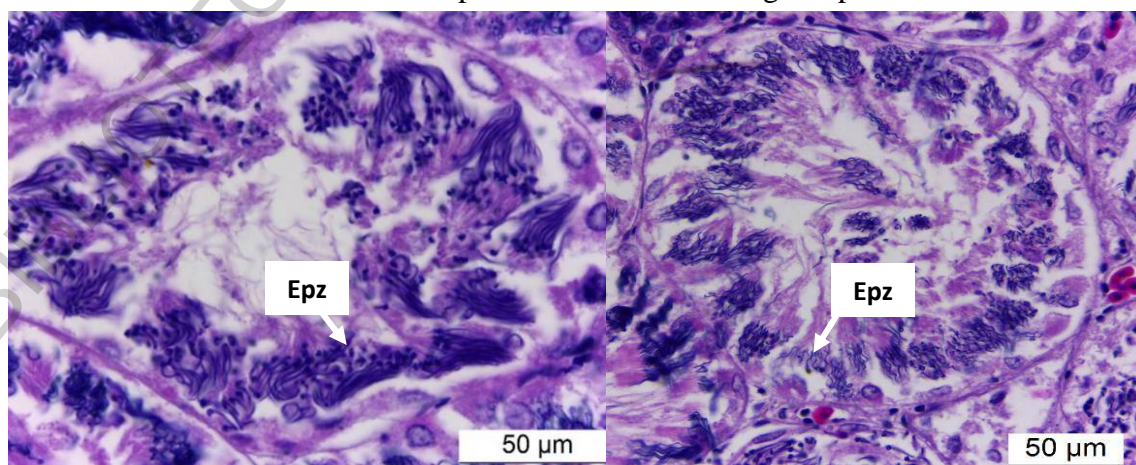


Figura 81. Cisto en Fase IX. Espermatozoides (Epz) en arreglo espiral. Aumento 63x Ambos

10. Fase X: Los espermatozoides se compactan uno con otro para formar la espermatozeugmata, paquetes que serán expulsados mediante un proceso llamado espermiación.

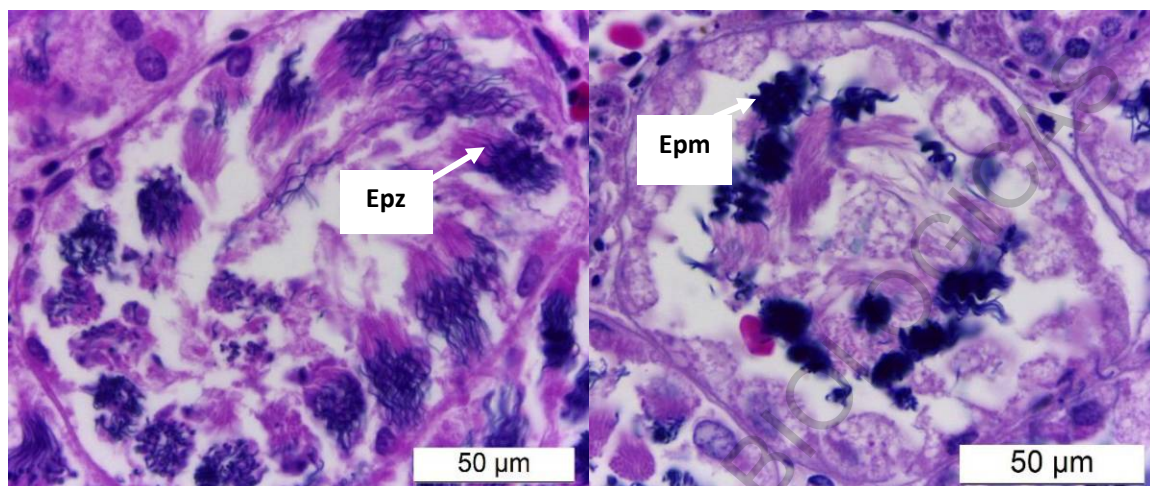


Figura 82. Formación preliberación. Espermatozoides (Epz) en arreglo espiral se juntan (izquierda) y forman la Espermatozeugmata (Epm) (derecha), paquete espermático característico de la Fase X, de este modo serán liberados hacia el epidídimo. Aumento 63x Ambos

11. Fase XI: Los cistos son ahora folículos residuales con algún espermatozoide o células de Sertoli remanentes. Estas células serán reabsorbidas.

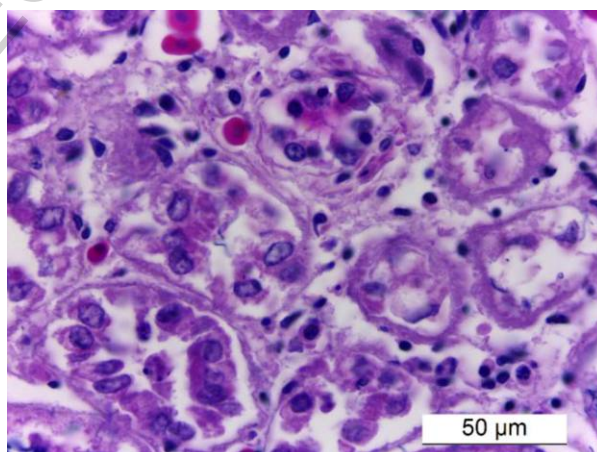


Figura 83. Cisto con células remanentes. Aumento 63x

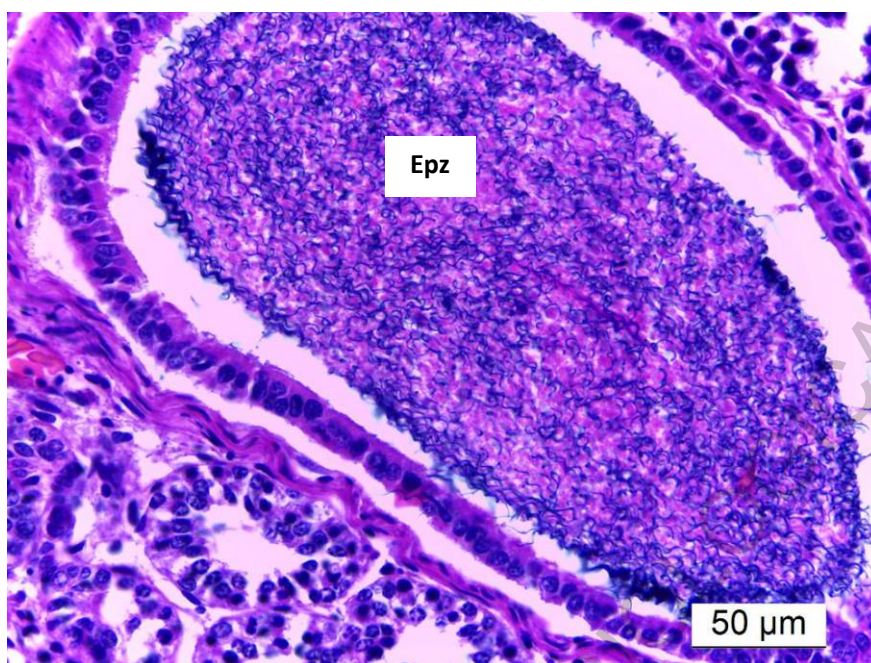


Figura 84. Túbulo transportando espermatozoides (Epz) maduros al epidídimo.

Aumento 63x

Se realizó un corte de un epidídimo de un individuo maduro. Es estructura de forma tubular (ANEXOS – Figura 14) de color rosáceo pálido, situada al lado del testículo y fijada entre los riñones y la espina dorsal. Se encontraron las glándulas de Leydig, estructuras tubulares donde recorrerán los espermatozoides y obtienen su motilidad. No se encontraron paquetes espermáticos, pero se pudo observar las células que componen la estructura: epitelio columnar simple que agrupa células pseudociliadas (con núcleo basal) principalmente y células secretoras. Los estereocilios o pseudocilios son prolongaciones del citoplasma de las células cilíndricas, no están conectadas con el citoesqueleto por lo que no tienen motilidad propia y su función es básicamente el amortiguamiento y facilidad de transporte de los espermatozoides.

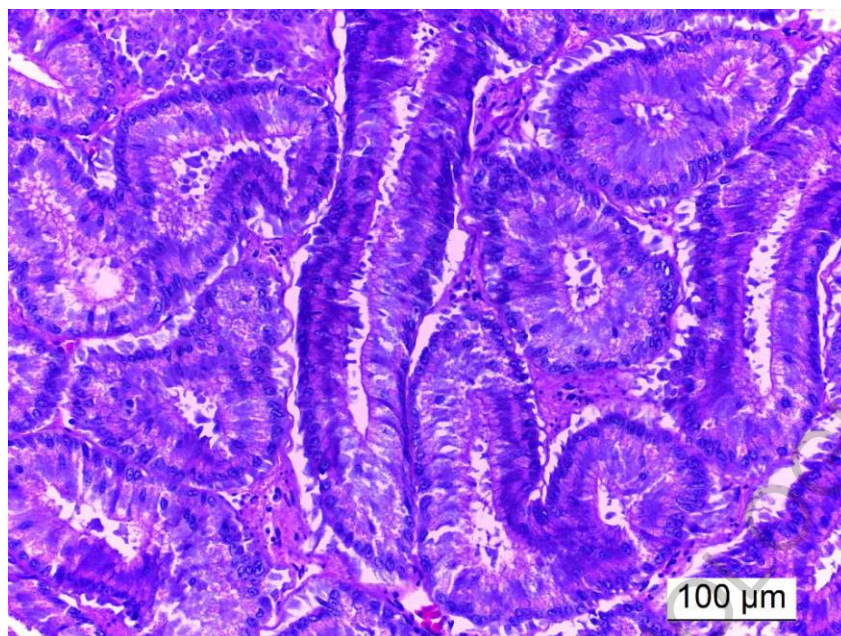


Figura 85. Epidídimo de *M. peruvianus*. Conformado por estructuras tubulares, las glándulas de Leydig . Aumento 40x

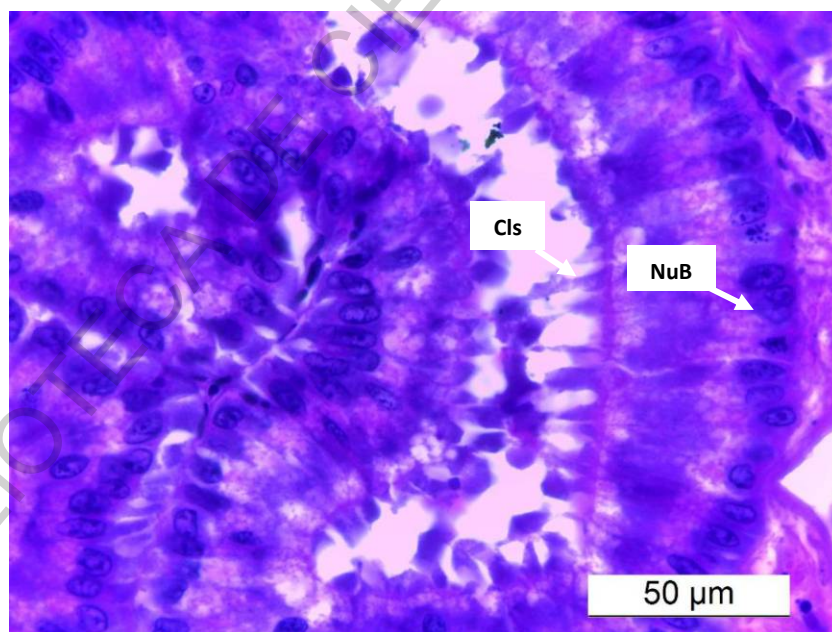


Figura 86. Detalle de una glándula de Leydig. El tejido que lo compone es cilíndrico con núcleo basal (NuB) y estereocilios en la parte apical (Cls), los que facilitarán el tránsito espermático a través del lumen. Aumento 63x

Talla de Madurez Gonadal

Uno de los resultados que genera mayor interés es la determinación de la talla en la que el 50% de los individuos es maduro. Se determinó esta medida en 122.22 cm AD para machos y 163.16 cm AD para hembras. La hembra más pequeña con ovocitos vitelogénicos fue de 144 cm AD, mientras que las hembras a partir de los 160 cm AD poseían un ovario izquierdo mayor de 17 cm LO y 6 cm AO, así como úteros bien diferenciados y mayor a 15 cm de largo y 5 cm de ancho.

El macho más pequeño con clasper desarrollado fue de 103 cm AD y a partir de los 114 cm AD todos los ejemplares poseían claspers totalmente calcificados, rotables y con el rifiodón abierto. A partir de los 120 cm AD, los testículos ya habían alcanzado un mínimo de 17 cm LTI, 15cm LTD y 4 cm de ancho.

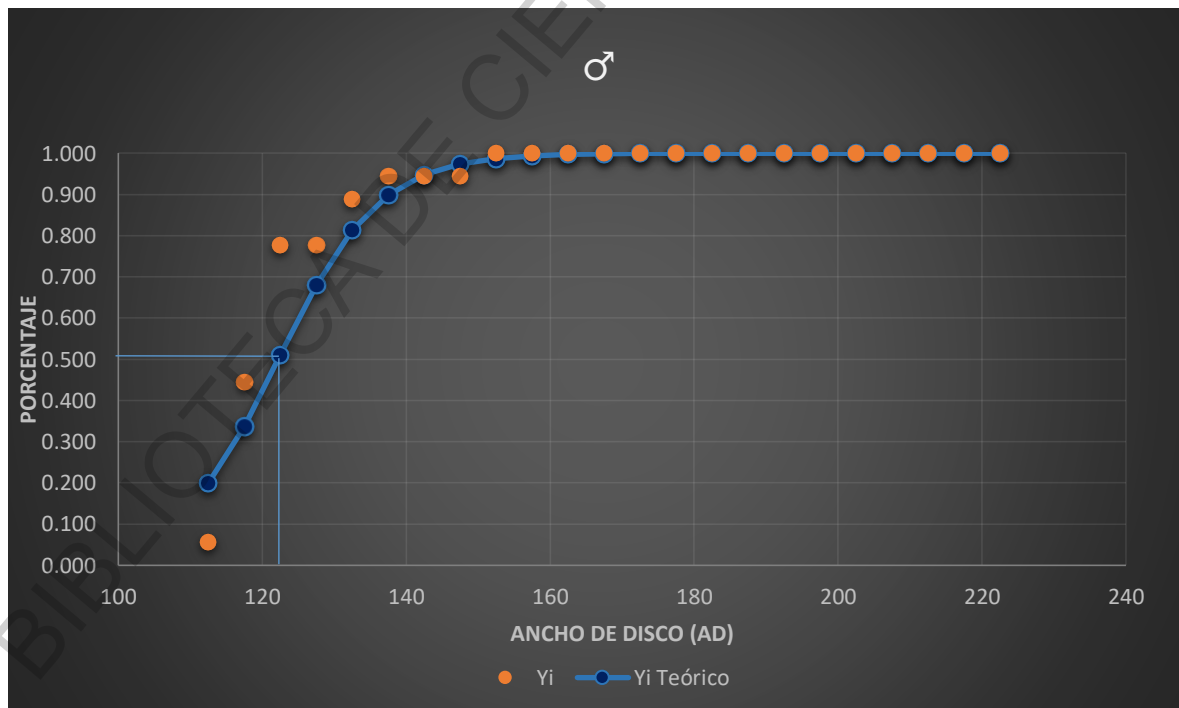


Figura 87. Talla Media de Madurez Gonadal en machos de *M. peruvianus*, mostrando valores reales (Y_i) y calculados (Y_i Teórico).

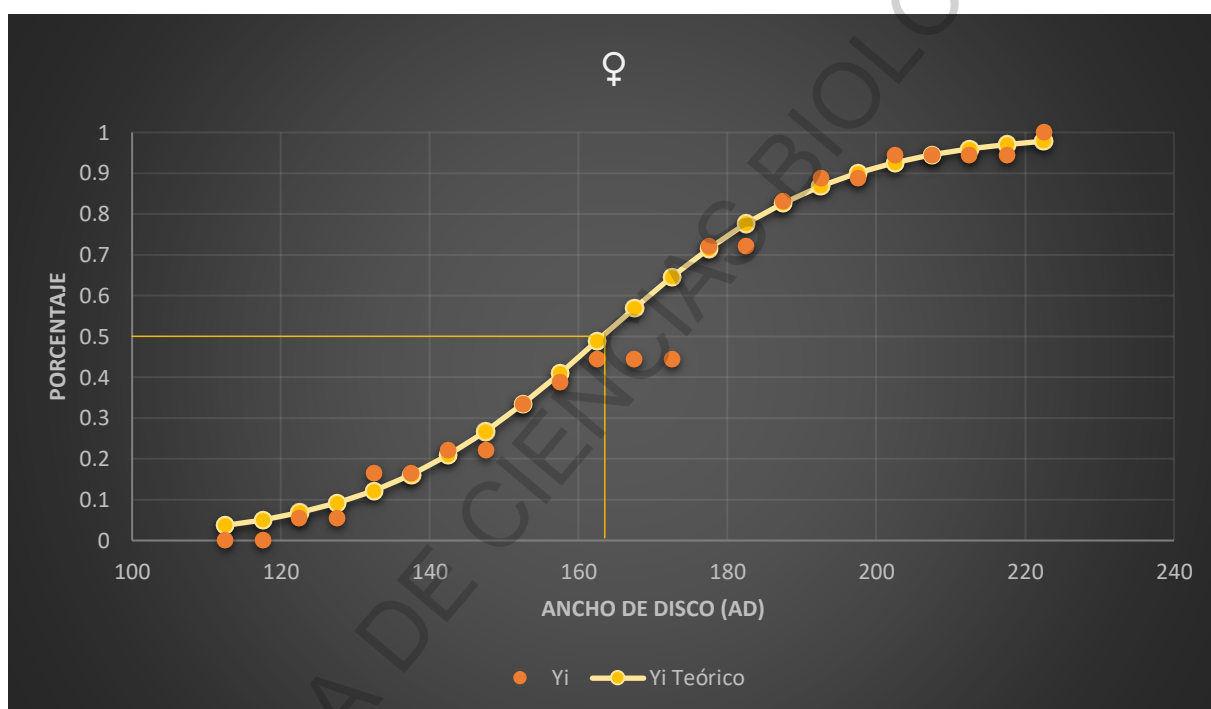


Figura 88. Talla Media de Madurez Gonadal en hembras de *M. peruvianus*, mostrando valores reales (Y_i) y calculados (Y_i Teórico).

DISCUSIÓN

Durante el periodo octubre 2017 – noviembre 2018, las condiciones del mar fueron normales. Los eventos extraordinarios de El Niño Costero del verano del 2017 ya se habían normalizado para octubre de aquel año (Grupo de Trabajo Institucional El Niño, 2017). En el transcurso del año 2018, tampoco se registraron condiciones anormales, por lo que los parámetros biológicos-reproductivos evaluados son los que se presentan usualmente en la especie.

Composición por Género y Talla de Organismos Muestreados

La mayoría de descargas pesqueras de raya águila se dio entre las 6 am y 9 pm, estas fueron constantes durante todo el año, bajando el tonelaje en algunos periodos, pero no ausentándose. A pesar de ello, los meses de enero y febrero no se obtuvo ejemplares por la inaccesibilidad: todas las descargas se dieron a altas horas de la madrugada y sin certeza que se permita el ingreso a la embarcación. En algunas ocasiones, las descargas constantes de una pesquería en aquellas horas son por la presencia de especies cuyo ordenamiento pesquero indica una veda para aquel periodo. La raya águila no posee veda, pero otras especies de elasmobranquios cuya pesquería está relacionada, si las tienen durante el periodo enero – marzo (RM N° 008-2016-PRODUCE, 2016). Para evitar posteriores conflictos se prefirió esperar la normalidad de periodos de descarga.

El número total de ejemplares (160), dista bastante de los números evaluados en peces óseos. Nureña (2018) estudió la biología reproductiva en *Ethmidium maculatum* evaluando 471 ejemplares en el periodo de un año. Estos números pueden ser colectados fácilmente y en poco tiempo en teleósteos, en elasmobranquios, sin embargo; la disponibilidad, el tamaño de la muestra (que de ello depende el tiempo de muestreo de cada ejemplar, la facilidad de transporte y/o fijación) y el menor número de

embarcaciones que tienen como objetivo peces cartilaginosos hacen que equiparar el número de ejemplares muestreados sea cuestión de alargar los periodos de muestreo. Oddone *et al.* (2008) evaluaron la biología reproductiva de *Atlantoraja castelnaui*, un rajado que no alcanzó tallas mayores de 116 cm de longitud total, llegando a coleccionar y analizar un total de 107 ejemplares durante el periodo de un año y un mes entre 2015 y 2016. En el caso de Myliobatidos, siendo un taxón que incluye especies de mayor talla, la colección de muestras tomó más tiempo. Incluso siendo las mobulas una de las principales especies de elasmobranquios capturadas en el Golfo de California, Serrano (2009) quien comparó la reproducción de 3 Myliobatidos: *Mobula japonica* (hoy *Mobula mobular*), *Mobula munkiana* y *Mobula thurstoni*, llegó a coleccionar 162 de *M. mobular*, 146 de *M. munkiana* y 139 de *M. thurstoni* entre 2001 y 2007. Entre 1990 y 1992, Villavicencio (1996) evaluó los aspectos reproductivos de *Myliobatis californica* y *Myliobatis longirostris* llegando a muestrear en 143 ejemplares de *M. californica* y 71 ejemplares de *M. longirostris*.

La estacionalidad es una constante para la mayoría de los estudios, en este, la mayor abundancia fue durante agosto – noviembre, periodo de invierno y primavera austral. Capapé *et al.* (2007) quienes trabajaron con *Myliobatis aquila* coinciden en una mayor abundancia entre agosto – octubre, periodo de verano - otoño boreal donde las temperaturas se equiparan a las del mar frente a la costa de La Libertad, Perú durante la primavera (Observatoire National de la Mer et du Littoral, 2016). Villavicencio (1996), por su parte obtuvo mayores números de ejemplares durante mayo – junio (primavera - verano boreal) en *M. californica* y entre agosto – diciembre (verano – principios de invierno austral) en *M. longirostris*. A diferencia de *M. aquila*, estas rayas fueron constantes. Cabe resaltar que las temperaturas de la zona del muestreo son cálidas (promedio de 20°C) (INAPESCA, 2013).

Composición de Tallas

El cuadro de composición de tallas de individuos colectados muestra de 3 a 4 grupos bien definidos en distribuciones normales. Petersen señaló “que la distribución de las frecuencias de tallas de peces de una misma edad se aproxima a una curva normal (Gausiana)” (citado por Tresierra et al., 2013, pp.77-78) por lo que estaríamos ante un mínimo de 4 grupos etarios, esto se ratificaría con un estudio de edad y crecimiento. Se observa que tanto hembras como machos están presentes en los primeros rangos, pero a partir de los 155 cm AD, solo hembras están presentes. Por lo tanto, las hembras alcanzan tallas mayores que los machos, algo usual en peces en general y en elasmobranchios en particular. Existe también la posibilidad de un desarrollo más lento por parte de las hembras. La IUCN (2006) propuso que la talla máxima que puede alcanzar sería de por lo menos 131 cm AD. El ejemplar más grande encontrado fue una hembra de 221.6 cm AD.

Trabajando únicamente con descargas se limita el acceso a muestras de ejemplares maduros. Esto porque los pescadores suelen trozar a los ejemplares mayores para quedarse únicamente con las alteas (que es lo que comercian) ya que así tienen mayor espacio en bodega para colocar ejemplares más pequeños. En el caso que durante un viaje de pesca se hubieran capturado solo ejemplares grandes (maduros y juveniles), estos no serían seccionados y la evisceración se llevaría a cabo en el puerto. Ello sucedió en algunos muestreos durante los meses de diciembre y agosto y en contraparte, entre los meses de abril y mayo no se observó ningún ejemplar grande (ni siquiera seccionado) entre las descargas pesqueras.

Las principales tallas de organismos muestreados fueron pertenecientes a inmaduros, de los cuales no se tuvo ausencia de ellos en ningún mes del año. Esto puede deberse a dos posibilidades: La primera es que la zona de pesca frente a Salaverry pueda ser un área de

crianza. Al estudiar la biología reproductiva de *Carcharhinus falciformis* “tiburón piloto” y obtener ejemplares pequeños en la costa de Chiapas y Oaxaca en México, Hoyos (2013) planteó la posibilidad que las zonas de pesca sean áreas de crianza, en otras palabras, lugares donde viven desde su nacimiento, se desarrollan como juveniles (área primaria) hasta que alcanzan la madurez (área secundaria). Esta posibilidad encuentra sustento al tener en cuenta que las áreas de cría son usualmente en aguas poco profundas y por la amplitud de la plataforma continental frente a la costa de La Libertad, donde alcanza más de 120 km (Martillo *et al.*, 2011), siendo las áreas entre los departamentos de La Libertad y Ancash donde la plataforma es más extensa (GEF *et al.*, 2002). Sin embargo, faltaría estudiar otras poblaciones de *M. peruvianus* a lo largo de la costa peruana para observar la segregación de tallas capturadas, estudiar la variabilidad dietaria ontogénica (ya que la preferencia por ciertos alimentos puede condicionar a los juveniles a permanecer en una u otra zona) y realizar seguimiento a las hembras maduras para corroborar el planteamiento. La segunda posibilidad es más fácil de confirmar, y es que las artes de pesca utilizadas no segregan a los individuos según estado de madurez. Entrevistando a los pescadores de Salaverry se obtuvo información del arte utilizado: un paño cortinero de 14 -15 pulgadas de coco. Teniendo en cuenta que esta medida es menor al ancho de disco del ejemplar más pequeño encontrado (41 cm), es de suponer que estas redes capturan todos los ejemplares de un cardumen y no los de ciertas tallas o cohortes. Una presión continua sobre los ejemplares inmaduros podría terminar en la eventual desaparición de la especie ya que los individuos habrían sido reclutados antes de haber tenido la oportunidad de reproducirse.

Proporción Sexual

Se esperó encontrar una proporción equitativa y esto fue así. Con un total de 80 hembras y 80 machos, la proporción fue exactamente 1:1.

Al observarse los resultados de la proporción sexual durante cada estadio, se comprueba una vez más que *M. peruvianus* es una especie en la que el número de hembras tiende a ser lo más cercano al número de machos. En la naturaleza esto aumenta las posibilidades reproductivas para cada individuo.

Al analizar cada mes por separado, se observa dominancias de hembras o machos por mes. Las hembras predominaron en abril y junio, mientras que los machos en agosto y noviembre. La poca cantidad de ejemplares muestreados entre abril y junio podría estar sesgando los datos, en noviembre en cambio, coincide la superioridad de machos en ambos años, pero con porcentajes diferentes (64.29% en 2017 y 58.33% en 2018). La diferencia de porcentajes puede deberse a la cantidad de individuos muestreados en cada año, pero la tendencia persiste.

Resultados similares en elasmobranchios (presencia de la proporción 1:1) se dieron en *Zapteryx xyster* proveniente de Santa Rosa, Ecuador (Vélez, 2015), *Rhinobatos percellens* proveniente de Santa Marta, Colombia (Grijalba-Bendeck et al., 2012), *Narcine entemedor* (Burgos-Vásquez et al., 2018) y en *Rhinoptera steindacheri* (Burgos-Vásquez et al., 2018), estos últimos, provenientes del sur del golfo de California. Los estudios también coinciden en estacionalidad de las proporciones.

Relación Peso – Longitud y Factor de Condición

La relación peso longitud no es un factor que se evalúe frecuentemente en los estudios de biología reproductiva, sin embargo, es importante para obtener información del bienestar de los ejemplares y la tendencia de crecimiento (Leyton *et al.*, 2015).

La relación peso-longitud muestra un patrón potencial, cuyo exponente (b) dieron 3.04 para hembras y 3.09 para machos. Cuando el valor de la pendiente de la ecuación exponencial, es igual a 3, el crecimiento es isométrico (Cifuentes *et al.*, 2012), en otras palabras, las proporciones corporales, así como del peso y la longitud se mantienen conforme el organismo crece. En la mayoría de las especies de peces, los neonatos pasan por un estado larvario e incluso al ser alevines, son en gran parte de los casos, morfológicamente diferentes de sus padres. Esto no sucede en la mayoría de elasmobranquios, las rayas águila inmaduras son idénticas a las maduras. Otras especies evaluadas como *Aetobatus narinari* del archipiélago de Los Frailes en Venezuela, mostraron la misma tendencia, con un $b=2.948$ (Tagliafico, 2012) y en otro estudio realizado en el sur de África, se obtuvo $b=3.13$ (Torres, 1991). Torres (1991) también encontró estos valores en *Dasyatis pastinaca* ($b=3.11$) y *Gymnura natalensis* ($b=3.02$).

El factor de condición aplicado, fue entonces Fulton (K), que es el ideal para crecimiento isométrico. Los valores constantes, sin decrecimientos significativos indican que la especie no sufre de desgaste físico dados por periodos de escasez de alimentos o de competencia por espacio. Un crecimiento del valor durante octubre muestra que durante este periodo hay una probable abundancia de recursos.

Los valores no variaron significativamente entre machos y hembras, por lo que se puede deducir que ambos comparten ambiente y recursos a lo largo del año. Esto se refuerza

con los datos obtenidos de proporción sexual, donde no hubo ausencia de machos o hembras durante mes alguno.

Índices Biológicos

Los índices son útiles como un método indirecto de estimación de periodos reproductivos (Tresierra *et al.*, 2002) ya que no siempre pueden observarse los ejemplares la naturaleza.

Un aumento del índice gonadosomático (IGS) mostraría épocas donde los ovarios están produciendo ovocitos, por lo tanto, su peso aumenta y con ello, el índice de relación entre el cuerpo y la gónada. Una disminución del IGS indicaría que se realizó el desove (Tresierra *et al.*, 2013). El índice hepatosomático (IH) permite observar los cambios en cuanto a peso hepático en relación al cuerpo, siendo el hígado donde los lípidos se almacenan y se sintetiza la vitelogenina (Tresierra *et al.*, 2013; Henningsen, 1999), es de suponer que juega un papel importante en cuanto a la reproducción. Valores de IH que muestran picos de aumento muestran un hígado preparándose para la producción de ovocitos y valores de disminución muestran actividad reproductiva ya que ello significa gasto energético.

En *M. peruvianus* se observó que el tamaño de los hígados de las hembras era mayor que en machos aun con ejemplares de la misma talla.

Las variaciones de IH e IGS no mostraron picos significativos. Esto puede deberse a que el mar bajo la influencia de la corriente de Humboldt no presenta una gran variación de temperaturas durante las estaciones anuales o que el área de desplazamiento de *M. peruvianus* no presente épocas en las que las condiciones les resulten adversas y requieran que la reproducción se de en un determinado periodo del año.

Los índices evaluados (IH e IGS) demuestran que no existe una estacionalidad para la reproducción de *M. peruvianus*. Esto puede deberse a la poca cantidad de ejemplares maduros muestreados a lo largo del estudio, que definitivamente sesga los datos. Sin embargo, las constantes entrevistas a los pescadores volvieron a plantear esta posibilidad ya que reportaron la presencia de rayas gestantes durante todo el año, las cuales, en caso de ser capturadas, no llegan al puerto completas.

Sistema Reproductor en Hembras

La estructura básica es casi la misma que en otros elasmobranquios y en especial, Myliobatidos. Estudiar la madurez en hembras requirió el análisis de los órganos reproductores, ya que, al contrario de los machos, no se encontró característica anatómica que distinga cada estadio encontrado. La diferencia de tamaño podría ser un dimorfismo sexual, esto debería comprobarse mediante un estudio de edad y crecimiento.

Las estructuras como el ovario y el útero presentaron correlación con el ancho de disco, lo que indica que estas mantienen una relación y proporción con el crecimiento del organismo. Sin embargo, las medidas (largo y ancho) ováricas no vienen a ser un factor determinante al evaluar el estadio: Por ejemplo, longitudes entre 10 y 15 cm LO fueron observadas tanto en inmaduras como juveniles y esto también se observó al evaluar el ancho, donde anchos entre 2 y 5 cm AO fueron observados incluso en los 3 estadios. Por esto, la medida de ovarios no debe ser utilizada como factor determinante, en lugar de ello, la morfología del ovario es la que determina el estadio.

Los ejemplares inmaduros presentaron abundante órgano epigonal, este al ser un órgano hematopoyético, tiene la función de irrigación y protección de las estructuras en

formación, por ello, conforme el individuo va creciendo, el órgano epigonal tiende a reducirse a medida que las gónadas adquieren grosor y vascularidad. En maduros, el órgano epigonal cubrió totalmente al ovario derecho, que no se desarrolló y no produjo ovocitos, mientras que en el izquierdo se redujo a la sección que colindaba con la columna vertebral.

La característica de desarrollar solo un ovario fue descrita en *Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna zygaena*, donde solo el derecho es funcional (Hoyos, 2003; Bejarano, 2007). Es también común en especies del orden Myliobatiformes, como en *Rhinoptera steindacheri* y en especies del género *Mobula*, donde el izquierdo es funcional (Burgos-Vasquez *et al.*, 2018; Serrano, 2009). Estas son especies que alcanzan grandes dimensiones, por lo que existe un elevado costo energético en alcanzar el tamaño adulto y generar ovocitos grandes, por lo que la producción se concentra más en la calidad que en la cantidad de los ovocitos generados. Tener dos ovarios funcionales requeriría un mayor esfuerzo de producción o la disminución del contenido de cada ovario. Entonces, el ovario izquierdo viene a ser el único capaz de producir ovocitos, reducidos en número, pero de gran tamaño. Especies más pequeñas pueden desarrollar dos ovarios funcionales, incluso en Myliobatidos ocurre esto, como en el caso de *Myliobatis aquila* donde se describe que ambos ovarios son funcionales (Capapé *et al.*, 2007).

La ausencia de glándula oviducal es algo menos frecuente pero también fue descrita en *Narcine entemedor* (Burgos-Vásquez *et al.*, 2018). La glándula oviducal o glándula nidamental es una estructura que se encuentra al inicio de los oviductos, su función es de la encapsulación de huevos (en especies ovíparas), lugar de fertilización del óvulo y de almacén de espermia (Conrath & Musick, 2012). Las especies ovíparas tienen una

glándula oviducal bien desarrollada, mientras que, en especies ovovivíparas y vivíparas, se encuentran reducidas (Alva *et al.*, 2012). Es probable que, durante la evolución de la especie, este órgano terminó por desaparecer, sin embargo, no se encontró ni siquiera un vestigio de la presencia del órgano en inmaduros e incluso en otras especies del mismo género como en *Myliobatis aquila*, está la presencia del órgano (Capapé *et al.*, 2007).

El número de ovocitos producidos guarda relación con el tamaño del ejemplar y el tamaño del ovario pero el promedio del diámetro no guarda relación con el tamaño de la hembra, lo que puede deberse a la asincronía, la hembra no expulsa todos los ovocitos producidos al alcanzar cierto AD o durante cierto periodo, sino que produce pocos ovocitos vitelogenados que serán expulsados cada cierto tiempo a lo largo del año.

Los óvulos expulsados tienen la característica de ser bastante grandes. El estudio histológico confirmó que las capas que recubren al ovocito son numerosas y tienen la función de protección y nutrición. Estos entrarían por el ostium hacia los oviductos o conductos de Müller donde probablemente se dé la fertilización y pueda pasar al endometrio del útero.

Los úteros son pareados sin aparente conexión entre la sección izquierda con la derecha. Colonello (2013) quien estudió el útero de *Myliobatis goodei*, mencionó que es usual que los Myliobatiformes presenten asimetría en los úteros. Son duros al tacto y la sección izquierda es ligeramente mayor a la derecha, sin embargo, ambos parecen ser funcionales ya que ambos presentaron trofonemas desarrolladas. Durante los primeros meses no se colectaron úteros por el desconocimiento de la apariencia del órgano. A pesar de no encontrar embriones en formación, se infirió que son vivíparas con nutrición lipídica histotrófica. Esto porque los trofonemas de los úteros más grandes poseían una secreción

blanquecina, la llamada “leche uterina” o histótrofo, elemento nutricional característico de las rayas del orden Myliobatiformes. Estas secreciones permitirían el desarrollo de embriones bastante grandes. Colonello (2013) sugirió que en *Myliobatis goodei*, los embriones pasaban por tres fases nutricionales en el útero: una que se alimentan del saco vitelino, otra en la que combina la nutrición por vitelo e histotrofo y finalmente una que solo se alimentaba de la “leche uterina”. Las hembras encontradas con histotrofo y con los úteros vacíos, probablemente estaban preparadas para gestar o habrían estado gestado y sufrieron un aborto al momento del reclutamiento. Al no poder asegurar ello, se prefirió por clasificarlas simplemente como “Maduras”. Es incluso posible que los individuos obtenidos con tallas más pequeñas sean en realidad neonatos.

Los pescadores reportan la presencia de hembras gestantes a lo largo del año y cuando se les preguntó por los meses donde más abundaban, respondieron que entre junio y julio es más fácil encontrarlas. También especificaron que suelen encontrar 2 a 6 embriones al seccionar gestantes. Los neonatos y embriones tienen incluso un nombre local comercial “rayas mariposas” o simplemente “mariposas” (no debe confundirse con la “raya mariposa” *Gymnura marmorata*, cuya pesca no fue registrada en Salaverry para el año de muestreo) y son alimento usual en alta mar o de los estibadores del muelle. De ser cierto, sería una fecundidad ovárica relativamente alta a comparación de otros Myliobatidos: al evaluarse la cantidad de embriones gestados en dos especies del género *Rhinoptera*, ambas gestaban solo a un embrión (Pérez-Jiménez, 2011; Burgos-Vasquez *et al.*, 2018). Esto significaría que urge un mayor estudio de la especie y tener también en cuenta el tiempo de diapausa entre camadas producidas, que es posible que exista en *M. peruvianus* al ser una especie con un gran gasto energético en la producción de crías.

Aún se debate sobre las ventajas que llevaría la producción de pocos embriones grandes, así como la gestación de estos. *Myliobatis* es un género reciente en la filogenia de rayas (Dulvy & Reynolds, 1997) y al ser animales bastante grandes, la presión recibida naturalmente no exigía una transición a puesta de huevos o una estrategia R para la supervivencia de la especie. Lamentablemente, la presión de la pesca artesanal va en aumento y ésta especie recién madura a una talla bastante considerable.

La talla media de madurez gonadal obtenida, indica que existe una fuerte presión sobre los individuos inmaduros. La gran mayoría de los extraídos no lograron reproducirse a lo largo de su vida.

La presión pesquera, una población humana en constante aumento y con demanda de carne de pescado y de otro lado, una especie con una estrategia reproductiva K vista como recurso, son los elementos que podrían llevar a la sobreexplotación de la especie.

Sistema Reproductor en Machos

Los machos presentaron una estructura básica que no difirió de otros elasmobranchios. Según la forma testicular y el desarrollo de los cistos, el testículo fue clasificado como compuesto según los criterios de Pratt (citado por Conrath & Musick, 2012).

En los claspers maduros se observaron y se distinguieron los dos canales: apopilo e hipopilo. En la cópula, el agua marina entra por el apopilo y los sacos sifonales encontrados dentro del clasper ayudan a la expulsión del semen por el hipopilo hacia el oviducto de la hembra (Gilbert y Heath, 1972; Conrath y Musick, 2012). Por ello, la abertura del rifiodón y la calcificación fueron indicadores esenciales en la determinación de si un ejemplar estaba apto a reproducirse. Es por ello, que gracias a la presencia de los

claspers, los indicadores utilizados (rotación, abertura del rifiodón y calcificación) permiten la identificación de cada estadio sin la necesidad de la aplicación de un método destructivo. Las regresiones lineales mostraron que si existía relación entre el tamaño de gónadas y la longitud del clasper. Como se observó en hembras, tampoco es posible determinar el estadio según las medidas testiculares ya que la variación es mínima sobretodo en los primeros estadios.

Al estudiar la madurez en machos, el análisis de órganos reproductores se enfocó más como corroboración de la determinación según los órganos copuladores. Sin embargo, en *Rhinobatos steindachneri*, se reportó desestimación, lo que quiere decir que se encontraron individuos con el clasper sin estar calcificado totalmente, pero con testículos ya desarrollados (Burgos-Vasquez *et al.*, 2018). Esto también se observó en *Myliobatis peruvianus*, estos ejemplares según su madurez gonadal serían clasificados como maduros. Aun así, la falta de rigidez en los claspers y poseer los canales (apopilo e hipopilo) cerrados no permitirían la eyaculación en el interior del cuerpo de la hembra, por lo que el individuo no se habría reproducido. Por ende, el reconocimiento de la madurez según los claspers es la mejor manera de discriminar a los ejemplares a la hora del reclutamiento.

Es importante saber que el desarrollo espermático en los cistos se da incluso antes de llegar a la madurez, ello tampoco debería significar que el ejemplar está listo para reproducirse ya que la producción de cada vesícula de un testículo juvenil es menor que en un maduro y la diferencia se amplifica aún más si se tiene en cuenta el número de vesículas desarrolladas en un testículo maduro.

El desarrollo espermático es usualmente descrito en cinco fases (Tresierra *et al.*, 2002; Acero *et al.*, 2008), sin embargo, otros autores describieron siete fases (Hoyos, 2003) e

incluso nueve (Grijalba-Bendeck *et al.*, 2008). La clasificación en once fases parece ser más específica a la hora de describir el desarrollo espermático.

El desarrollo de espermatozoides se dio en ambos testículos, a pesar de la diferencia entre las dimensiones de uno con el otro. Luego del desarrollo en cada cisto, los espermatozoides pasan del testículo hacia el epidídimo. Alva (2012) describe que en conductos, parte de los riñones anteriores se modificaron para generar el epidídimo, por lo que, los conductos eferentes o de Wolff son en realidad conductos mesonefríticos adaptados y las glándulas de Leydig son secciones renales modificadas para la capacitación de los espermatozoides. No se llegó a observar espermatozoides dentro de las glándulas de Leydig en las láminas obtenidas. Hoyos (2003) encontró no solo espermatozoides en el interior, sino también material particulado a los que llamó “cuerpos de Sertoli” por su origen que se da en las células homónimas.

Varios estudios se concentraron en la vesícula seminal para la observación de los espermatozeugmatas, en este caso, el paquete espermático fue encontrado en los cistos. Esta formación permitiría la supervivencia de mayor número de espermatozoides y evitaría su pérdida en el agua marina al momento de la eyaculación.

Por último, la talla menor en machos puede deberse a que estos no deben producir gametos tan grandes ni llevar a cabo la gestación de los embriones.

CONCLUSIONES

- La proporción de sexual de *Myliobatis peruvianus* es de 1H:1M.
- Existe segregación de tallas, siendo las hembras las que alcanzan tallas mayores.
- Predominan los especímenes inmaduros. Esto posiblemente por las artes de pesca utilizadas.
- Se puede suponer que no hay una marcada época de reproducción, por lo que, la actividad reproductiva es durante todo el año.
- El desarrollo ovocitario se da en cinco estadios y el espermático en once fases.
- La fecundidad promedio fue de 32 ovocitos
- El tamaño de las gónadas está relacionado al tamaño del individuo.
- Las hembras poseen solo un ovario funcional.
- La disposición de los testículos de la raya águila es de tipo compuesto según la clasificación de Pratt (1988).
- En machos, los claspers son excelentes indicadores de la madurez del individuo.
- Las Tallas Medias de Madurez Gonadal son 122 cm de Ancho de Disco para machos y 163 de Ancho de Disco para hembras.
- Es una especie vivípara no placentada, la nutrición matrotrofica es por histotrofia lipídica.

RECOMENDACIONES

- El participar de las evisceraciones ya sea a bordo o en el muelle es la mejor opción para las colectas ya que abarata enormemente los costos del estudio al evitarse la compra de ejemplares y se toma contacto con los pescadores al ayudarles en sus labores.
- El estudio debe prolongarse hasta por lo menos 2 años, en varios puntos de la costa peruana y chilena, teniendo en cuenta la variación de condiciones climáticas y oceanográficas (Oscilación del Sur – El Niño y La Niña).
- Es necesario un estudio de poblaciones por medio de análisis de procedencia de capturas, marcación de ejemplares y mapeados de distribución y movimientos de poblaciones.
- Realizar un estudio de edad y crecimiento para complementar estudios de reproducción para así obtener la edad de reproducción.
- Se debería contar con un mayor equipo humano, por lo menos tres observadores en campo: dos en el muelle y uno a bordo.
- Ampliar la cartera de stakeholders: la información de descargas y procedencias de la pesca no es exclusiva de los pescadores, observadores del IMARPE o controladores de radio; sino que también resulta bastante útil contactar con los compradores mayoristas y minoristas, vendedores, estibadores y operarios de las cámaras de hielo. Éstos últimos son los que están atentos a las descargas, ya que cada embarcación contacta con ellos antes de llegar a puerto.
- Las redes rayeras deben ampliar sus dimensiones para evitar así la captura de ejemplares inmaduros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alva, R., Lujan, L., Díaz M., Angulo, E. (2012) Ictiología. Trujillo: El Gráfico.

Lund, Richard & Grogan, Eileen. (2015). Origin and relationships of early chondrichthyans. 10.1201/9780203491317.pt1.

Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2018). FishBase. Elasmobranchii. Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=10193> on 2018-03-09

Lamilla, J. y C. Bustamante. 2005. Guía para el reconocimiento de: tiburones, rayas y quimeras de Chile. Oceana 17(nov. 2005):1-80

Chirichigno N, Velez J. (1998). Clave para Identificar los Peces Marinos del Perú. 2ed. Lima, Perú: IMARPE.

Castro, W. (2017). Salaverry: 50% de población depende de actividad portuaria. Trujillo, Perú: Diario La República. Recuperado de: <https://larepublica.pe/sociedad/1071529-salaverry-50-de-poblacion-depende-de-actividad-portuaria>

Municipalidad Distrital de Salaverry, (2017). *Plan Local de Seguridad*

Ciudadana del Distrito de Salaverry - Actualizado. Trujillo: CODISEC, pp.12-13.

Clemente, L. (2010). Estudio de Mercado de Productos Artesanales en Seis Regiones Del Perú La Libertas – Salaverry. Trujillo: CETMAR – PRODUCE-DGPA – DEDA, pp 3-16.

Morón, O. (2000). Características del ambiente marino frente a la costa peruana. Bol Inst Mar Perú 19(1-2): 179 – 204.

Brack, A. (2006). Ecología. Lima: Editorial El Comercio.

Brito, B. (2017). Actualización de Las Ecorregiones Terrestres de Perú propuestas en el Libro Rojo de Plantas Endémicas del Perú. Gayana Bot. 74(1): 15-29 pp.

Gerencia Regional de Agricultura. (2010). La Libertad: Clima y Ríos en Cifras Estadísticas de Seis Décadas. Trujillo: Oficina de Estadística Agraria e Informática, 26,41 pp.

Culquichicón, Z. (2008) Estadística Pesquera. Trujillo: UNT.

Tresierra, A., Culquichicón, Z., Veneros, B. (2014) Manual de Evaluación de Recursos Pesqueros. Trujillo: CONCYTEC.

- Colonello, J.H., Christiansen, H.E., Macchi, G.J. (2007) Escala de madurez sexual para peces cartilaginosos de la Plataforma Continental Argentina. (Informe N° 74). Argentina: INIDEP.
- Tresierra, A., Culquichicón, Z., Solano, A. (2013). Métodos para la Gestión de los Recursos Pesqueros. Trujillo: CONCYTEC.
- Tresierra, A., Culquichicón, Z., Veneros, B. (2002). Biología Reproductiva en Peces. Trujillo: CONCYTEC.
- Grijalba – Bendeck, M., Acero, A., González, E. (2008) Biología reproductiva de *Rhinobatos percellens* (Walbaum, 1792) (Batoidea: Rajiformes) en el Caribe colombiano. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 43 (3): 469 – 481.
- Nureña, M.S. (2018). Biología Reproductiva de *Ethmidium maculatum* “Machete” (Valenciennes, 1847) Proveniente de la Región La Libertad, de Mayo 2017 a Abril 2018. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Vélez, J. (2015). Aspectos Reproductivos de la raya ocelada *Zapteryx xyster* (Jordan & Evermann, 1896) en Santa Rosa, Salinas, Ecuador. (Tesis de pregrado). Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Manta, Ecuador.
- Grijalba – Bendeck, M., Polo-Silva, C., Acevedo, K., Moreno, F & Mojica, D. (2012) Aspectos tróficos y reproductivos de algunos batoideos

capturados en Santa Marta, Mar Caribe de Colombia. Lat. Am. J. Aquat.
Res, 40 (2): 300 – 315.

Conrath, C & Musick, J. (2012). Reproductive Biology of Elasmobranchs. En. J.C.
Carrier, J.A. Musick, M.R. Heithaus. (Ed). *Biology of Sharks and Their Relatives*.
(pp 291-306) Boca Raton, Florida: CBC Press.

Grupo de Trabajo Institucional El Niño (octubre del 2017). Informe de las Condiciones
Oceanográficas y Biológico Pesqueras Octubre del 2017. Boletín informativo
IMARPE. Recuperado de:
http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_atism_gti_mens_octubr_e2017.pdf

Resolución Ministerial N° 008–2016-PRODUCE. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú,
14 de enero de 2016.

Observatoire National de la Mer et du Littoral. (2016). VARIABILITÉ DE LA
TEMPÉRATURE ET DE LA SALINITÉ DANS LES EAUX
MÉTROPOLITAINES. Recuperado el 20 de diciembre de 2018, de:
http://www.onml.fr/onml_f/fiches/Variabilite_de_la_temperature_et_de_la_Salinite_dans_les_eaux_metropolitaines/temperature-salinite.pdf

Humason, G. (1979). Animal tissue techniques. W. Freeman Eds. 4ta Ed. 661 pp.

INAPESCA (2013). Boletín hidrometeorológico noviembre 2013. Recuperado de:
<https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/BOLETINES/hidroclimatico/TEMPERATURA/boletin-hidrometeorologico-noviembre-2013-temperatura.pdf>

Martillo, C., Pazmiño, A., Chunga, K. & Resl, R. (2011). Descripción Morfológica de la Plataforma Continental del Ecuador y Análisis Comparativo con la Plataforma Jurídica Mediante la Aplicación de Sistemas de Información Geográfica. Acta Oceanográfica del Pacífico. 16 (1): 109-118.

GEF, ONUDI, IMARPE & FOP. (2002). Proyecto Manejo Integrado Gran Ecosistema Marino de la Corriente de Humboldt Módulo I: Productividad. Recuperado de:
<http://humboldt.iwlearn.org/es/informacion-y-publicacion/GEFMODULOIProductividadVol1.pdf>

Whitney, N. M., & Crow, G. L. (2007). Reproductive biology of the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) in Hawaii. Marine Biology, 151(1), 63–70.
<https://doi.org/10.1007/S00227-006-0476-0>

Burgos-Vásquez, M.I., Chávez-García, V.E., Cruz-Escalona, V.H., Navia, A.F. & Mejía-Falla, P.A. (2018). Reproductive strategy of the Pacific cownose ray *Rhinoptera steindachneri* in the southern Gulf of California. Marine and

Freshwater Research. *Marine and Freshwater Research*, 70(1), 93-106.

<https://doi.org/10.1071/MF18096>

Leyton, S.A., Muñoz, E., Gordillo, M., Sánchez, G., Muñoz, L. & Soto, A. (2015).

Estimación del Factor de Condición de Fulton (K) y la Relación Peso-Longitud en Tres Especies Ícticas Presentes en un Sector Sometidos a Factores de Estrés Ambiental en la Cuenca Alta del Río Cauca. *Rev. Asoc. Col. Cienc.(Col.)*, 27: 24-31.

Cifuentes, R., Gonzalez, J., Montoya, G., Jara, A., Ortiz, N., Piedra, P. & Habit, E. (2012).

Relación peso-longitud y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenta del río Valdivia, Chile) *Gayana* 75(2), 101-110.

Tagliafico, A. (2012). Exploitation and reproduction of the spotted Eagle ray (*Aetobatus narinari*) in the Los Frailes Archipelago, Venezuela. *Fish. Bull.* 110:307–316

Torres, F. S. B., Jr. (1991). Tabular data on marine fishes from Southern Africa, Part I.

Length-weight relationships. *Fishbyte* 9:50–53.

Bejarano, M. (2007). Biología Reproductiva del Tiburón Martillo *Sphyrna lewini*

(Griffith y Smith, 1834) en Salina Cruz, Oaxaca, México. (Tesis de Maestría).

Instituto Politécnico Nacional, La Paz, México.

Colonello, J., Christiansen, M., Cousseau, M. & Macchi, G. (2013). Uterine dynamics of the Southern Eagle Ray *Myliobatis goodei* (Chondrichthyes: myliobatidae) from the southwest Atlantic Ocean. *Italian Journal of Zoology* 80:187-194.

Burgos-Vázquez, M., Mejía-Falla, P., Cruz, V., & Brown-Peterson, N. (2017). Reproductive Strategy of the Giant Electric Ray in the Southern Gulf of California. *Marine and Coastal Fisheries Dynamics Management and Ecosystem Science*. 9. 10.1080/19425120.2017.1370042.

Serrano, J. (2009) Estudio Comparativo de la Reproducción de Tres Especies del Género *Mobula* (Chondrichthyes: Mobulidae) en el suroeste del Golfo de California, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, La Paz, México.

Martinez-Dallos, I., Neira-Álvarez, M. & Acero, A. (2012) Aspectos Biológicos de *Rhizoprionodon lalandii* y *Rhizoprionodon porosus* (Carcharhinidae-Carchariniformes) Capturados Mediante la Pesca Artesanal en Isla Fuerte, Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 41(1).179-191.

Henningsen, A. (1999) Levels of recirculating reproductively-related steroid hormones in female elasmobranchs. Implications for reproduction in a captive environment. *Aquarium Sciences and Conservation*, 2: 97-116.

- Acero, P., Grijalba-Bendeck, F., Moreno, F., Acevedo, K & Gonzalez, E. (2008) Histología Comparada del Sistema Reproductivo de Cuatro Especies de Rayas Caribeñas (Chondrichthyes: Batoidea). Rev. Acad. Colom. Cienc. Vol 32 (125). 581-596.
- Hoyos, E. (2003) Biología Reproductiva del Tiburón Piloto *Carcharhinus falciformis* (BIBRON, 1839) de Baja California Sur. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional, La Paz, México.
- Pérez-Jiménez J.C. (2011). Biología reproductiva de la raya *Rhinoptera bonasus* (Elasmobranchii) en el sureste del Golfo de México. Hidrobiológica 21(2):159-167.
- Capapé, C., Guélorget, O., Vergne, Y. & Quignard, J.P. (2007). Reproductive Biology of the Common Eagle Ray *Myliobatis aquila* (Chondrichthyes: Myliobatidae) from the Coast of Languedoc (Southern France, Northern Mediterranean). Vie et Milleu, 57(3):125-130.
- Villavicencio, C. (1996). Tallas, proporción de sexos y reproducción de *Myliobatis californica* y *M. longirostris* (Pisces: Myliobatidae) en Baja California Sur, México. Rev. Biol. Trop., 43(2): 291-295.

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(2):327-334.

Dulvy & Reynolds (1997) Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and material inputs in sharks and rays. *Proc. R. Soc. Lond.* 294, 1309-1315.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANEXOS

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANEXO 1:

Fotos



Figura 1. Puerto Salaverry, localizado a 14 kilómetros del centro de Trujillo. Se señalan los 2 sitios de descarga pesquera: en verde el muelle de FONDEPES y en rojo el muelle 2 de ENAPU. Fuente: Google Earth.



Figura 2. Descarga de dos de las especies costeras más frecuentes: *Paraluchurus peruanus* “suco” y *Sciaena deliciosa* “lorna”.



Figura 3. Aunque no se da todos los días, las descargas de elasmobranquios de By-Catch son usuales. Estas guitarras (*Pseudobatos planiceps*) fueron capturadas durante la pesca de lenguado y se aprovechan para consumo humano directo.



Figura 4. Descarga de *Prionace glauca* "tiburón azul" en el muelle artesanal.



Figura 5. Embarcaciones pesqueras listas a descargar en el muelle 2 de ENAPU.

La mayoría descargarían pota aunque algunas descargaron rayas.



Figura 6. Lavado uno de los organismos más frecuentemente desargados:

Dosidiscus gigas "pota" en el muelle 2 de ENAPU.



Figura 7. Eviscerado y lavado de ejemplares de *Myliobatis peruvianus* en el muelle 2 de ENAPU.



Figura 8. Ejemplares de *M. peruvianus* siendo descargados en el muelle artesanal de Salaverry.



Figura 9. Toma de datos de los primeros ejemplares en el Laboratorio de Biología Pesquera de la Universidad Nacional de Trujillo.



Figura 10. Hígado de un ejemplar inmaduro. Notése que el órgano es liboludado.



Figura 11. Ovario izquierdo formolizado de *M. peruvianus*. A parte de conservar el órgano, la fijación permitía hacer un mejor conteo de los ovocitos que en un ovario fresco, serían muy frágiles y difíciles de extraer.



Figura 12. Ovario juvenil fresco de *M. peruvianus*. Se observa la presencia de los primeros ovocitos producidos, notoriamente reducidos de tamaño. El órgano epigonal aún es abundante.

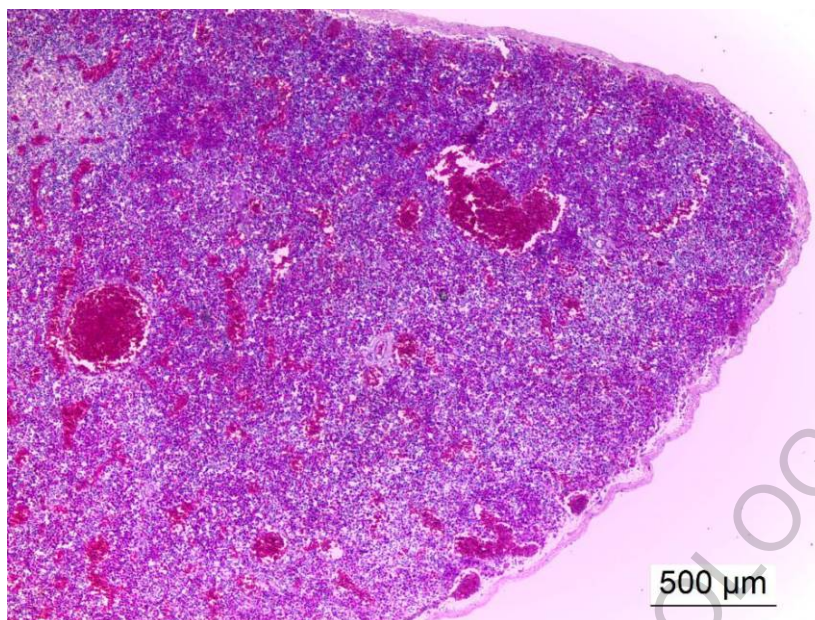


Figura 13. Micrografía del órgano epigonal, estructura hematopoyética que rodea total o parcialmente a las gónadas según su estadio de desarrollo. Aumento 4x.



Figura 14. Epididímo extraído de *M. peruvianus*.

ANEXO 2: Marcha Utilizada en Histología

DESHIDRATACIÓN, DIAFANIZACIÓN, INCLUSIÓN EN HISTOSEC Y CORTE

Una de las técnicas **más utilizadas en la histología animal** es la tinción de hematoxilina y eosina. Las características de los compuestos que la componen hacen posible observar al **microscopio óptico** las células individualizadas y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada. Gracias a esta técnica se han podido observar gran cantidad de tejidos animales. Se han descrito, bajo esta tinción, la gran mayoría de tejidos musculares y glandulares del cuerpo. Aportando con ella la morfología de las células que forman el tejido y la posición relativa y la forma del núcleo dentro de ellas.

(Resumen)

Fijación Histológica: La pieza anatómica fue colocada inmediatamente después de la muerte de la especie animal durante 24 horas para su endurecimiento en Formaldehído reactivo al 4%, lo que permitió realizar secciones más pequeñas debidamente seleccionadas para continuar con el proceso de fijación renovando la solución.

Deshidratación.

Los especímenes debidamente clasificados y retirados del fijador acuoso y después de lavadas al chorro con agua corriente, están embebidas en agua que impide sean penetradas por el histosec. Para que esta penetración ocurra es necesario, en primer lugar, eliminar el agua de los tejidos o deshidratarlos. La deshidratación se obtiene sumergiendo los especímenes en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar las alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando alcohol etílico de graduación creciente:

- | | |
|--------------------|-----------|
| a) Alcohol de 70% | 1 ½ horas |
| b) Alcohol de 80% | 1 ½ horas |
| c) Alcohol de 96% | 1 ½ horas |
| d) Alcohol de 96% | 1 ½ horas |
| e) Alcohol de 96% | 2 horas |
| f) Alcohol de 96% | 2 horas |
| g) Etanol absoluto | 2 horas |
| h) Etanol absoluto | 2 horas |
| i) Etanol absoluto | 2 horas |

La renovación de los alcoholes y el tiempo de duración de los baños deben ser exactos. Es fundamental obtener una deshidratación completa.

Impregnación por un solvente del histosec (aclaración o diafanización)

Los especímenes perfectamente deshidratados se sumergen en el xilol.

Al agregarse al xilol no debe aparecer ninguna turbiedad (Los especímenes se tornan traslúcidos). Si se pone blanco lechoso significa que la deshidratación no ha sido bien lograda.

- | | |
|--------------|-----------|
| j) Xilol I | 1 ½ horas |
| k) Xilol II | 1 ½ horas |
| l) Xilol III | 2 horas |

Penetración del Histosec

Se sumergen los especímenes en Histosec a 56°C de punto de fusión exacto, mantenida líquida en la estufa.

- | | |
|-----------------------------|---------|
| m) Primer baño de histosec | 2 hora |
| n) Segundo baño de histosec | 2 hora |
| o) Tercer baño de histosec | 2 horas |

Inclusión definitiva o formación del bloque

En moldes de metal se vierte el histosec no usado y fundido del mismo punto de fusión de la que ha servido para la penetración, calentándola previamente a 60-65°C. Se colocan los especímenes orientándolos apropiadamente.

A los 30 minutos, el histosec se habrá solidificado completamente. Recortar los bloques en forma de pirámide cuadrangular truncada y luego realizar los cortes.

Corte del espécimen

Hay que llevar a cabo una serie de procesos sobre el bloque de histosec antes de hacer el primer corte útil al espécimen con el Micrótopo de Parafina o Histosec Tipo Minot.

- 1) Proceso de desbastado, es decir, la eliminación del espesor de histosec que hay entre la superficie del bloque y el espécimen.
- 2) Orientación de la cuchilla respecto a la superficie de corte.
- 3) Obtener las secciones unidas por las caras paralelas a la cuchilla.
- 4) Aprovechando la hidrofobicidad del histosec las secciones se colocan en agua calentada a 48°C en un termostato y el calor las hará extenderse sin llegar a su punto de fusión.
- 5) La superficie del portaobjetos donde se colocaran las secciones cortadas ha de estar previamente tratada para que el espécimen quede adherido durante el procesamiento ulterior. Para ello los cubre objetos se recubren previamente con glicerina albúmina de Jelly y al medio ambiente hasta que se evapora el exceso de agua, sin que lleguen a secarse.
- 6) Una vez que el agua se ha evaporado y habiendo quedado extendida la sección en el portaobjetos, se procede a un secado exhaustivo en una estufa a 40°C

durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones quedan listos para el procesamiento de coloración.

COLORACIÓN

MÉTODO DE LA HEMATOXILINA DE HARRIS Y EOSINA

Este método da imágenes clarísimas excepcionalmente brillantes y muchos investigadores la prefieren. (Bescome, 1954, Según Masson).

Fijación: De preferencia Solución acuosa de Formaldehído Reactivo al 4% marca Merck.

Técnica: Histosec, secciones de 7 micrometros.

Los reactivos se preparan como sigue:

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina en polvo	5.0 g.
Alcohol absoluto	50.0 cc.
Sulfato de aluminio y potasio	100.0 g.
Agua destilada	1,000.0 cc.
Óxido de mercurio rojo	2.5 g.
Ácido acético glacial	5.0 ml.

Solución Alcohólica de Eosina al 0.5 %

Eosina Y	0.5 g.
Alcohol etílico de 80 %	100.0 ml.
Ácido acético glacial	0.5 ml.

Diferenciador

Ácido clorhídrico reactivo	0.5 ml.
Alcohol etílico de 80%	100.0 ml.

Virador

Amoniaco reactivo	0.5 ml.
Agua destilada	100.0 ml.

Método de Coloración

1. Desparafinar en xilol I, 5 minutos.
2. Desparafinar en xilol II, 5 minutos.
3. Hidratar en alcohol etílico del 96%, 5 minutos.
4. Continuar la hidratación en agua destilada x dos cambios, 5 minutos c/u.
5. Colorear con hematoxilina de Harris, 2 minutos.

6. Se enjuaga con agua de llave, 5 minutos
7. Se diferencia rápidamente con solución diferenciadora, 5 segundos
8. Se enjuaga con agua de llave, 5 minutos.
9. Viraje breve, 10 segundos.
10. Se enjuaga con agua de llave x dos cambios, 5 minutos c/u´.
11. Control de la coloración nuclear, al microscopio.
12. Se colorea con Eosina x 10 minutos.
13. Se diferencia en alcohol etílico al 80%, brevemente.
14. Se deshidrata cuidadosamente en cuatro baños de alcohol etílico de 96%, 5 minutos c/u.
15. Se continúa la deshidratación en cuatro baños de etanol absoluto, 5 minutos c/u.
16. Diafanizar o Aclarar en tres baños de xilol, 5 minutos c/u.
17. Montaje en bálsamo del Canadá.

Resultados:

Núcleos de color azul oscuro o violeta.

Colágeno: Rosado pálido

Músculo: rosado fuerte.

Queratina: Rojo intenso.

Citoplasma: Rosado fuerte.

Eritrocitos: Rojo.

JOSÉ SOLDADO MURO

Tecnólogo Médico

Histólogo

www.josesoldadomuro.com 044-616329 /949052330

Correo: tm.jsoldado@gmail.com