



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIBIC: **PIB-B/0096/2012-2013**

**MORFOLOGIA DOS OVÁRIOS E ÚTEROS DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE DA
FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE (CHONDRICHTHYES: ELASMOBRANCHII)
DA BACIA DO RIO NEGRO, MÉDIO RIO NEGRO**

Bolsista: Maria Isabel da Silva
Agência: FAPEAM

Manaus, 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**MORFOLOGIA DOS OVÁRIOS E ÚTEROS DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE DA
FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE (CHONDRICHTHYES: ELASMOBRANCHII)
DA BACIA DO RIO NEGRO, MÉDIO RIO NEGRO**

Bolsista: Maria Isabel da Silva.

Orientador: Wallice Luiz Paxiúba Duncan.

Co-Orientadora: Maria Inês Braga de Oliveira.

Co-Orientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa.

Manaus, 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho a Deus, meu Pai, que me fez querer, acreditar e realizar.

Sou grata a todos que participaram dessa experiência, me ensinando e revelando o mundo científico. Hoje, amo a pesquisa e o que ela pode fazer e mudar.

Ao meu orientador Wallice L. P. Duncan, grande em conhecimento e disposição, agradeço-lhe as oportunidades, ensinamentos e experiências que me fizeram permanecer na biologia, amar as arraias de água doce e que me direcionam a sonhar bem mais além. A linda e doce professora Maria Inês B. de Oliveira, minha mãe na universidade e co-orientadora, não tenho palavras para agradecer seu enorme auxílio na minha vida e na histologia desse projeto. Ao professor Oscar T. F. Costa, colaborador-chave desse trabalho, que com grande paciência me ensinou o uso da poderosa estereologia.

Agradeço também ao apoio financeiro do CNPq (processo #484374/2011-7/Universal-CNPq) e FAPEAM (Programa Primeiros Projetos & Universal-Amazonas) para a realização dessa pesquisa. À FAPEAM pela oportunidade de ser bolsista de iniciação científica (PIBIC/UFAM/FAPEAM) e por fim, agradeço as arraias utilizadas nesse trabalho, que foram motivo para eu aprender a admirar, respeitar, pesquisar e principalmente preservar.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	9
2. INTRODUÇÃO.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Geral.....	11
3.2 Específico.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Locais de captura.....	12
4.2 Coleta das amostras.....	12
4.3 Análise Microscópica.....	13
4.4 Estereologia.....	14
4.5 Análise Estatística.....	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Descrição Macroscópica dos Ovários.....	16
5.2 Descrição Microscópica dos Ovários.....	18
5.3 Análise Estereológica Ovários e Órgãos Epigonais.....	24
5.4 Descrição Macroscópica dos Úteros.....	26
5.5 Descrição Microscópica dos Úteros.....	28
5.6 Fecundidade Ovariana e Uterina.....	30
6. DISCUSSÃO.....	31
7. PERSPECTIVAS.....	35
8. BIBLIOGRAFIA.....	36
9. CRONOGRAMA.....	39
10. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS DE COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Morfometria ovariana (cm) das seis espécies de potamotrigonídeos: Comprimento (Comp.), Largura (Larg.) e Peso e dimensões do exemplar: Largura do disco (Ldi) e Comprimento do disco (Cdi). Espécies com asterisco (*) apresentam apenas um exemplar.....	16
Tabela II. Análise quantitativa do volume massa-específico ($\text{mm}^3/\text{g} \pm \text{desvio padrão}$) dos componentes do ovário direito e esquerdo da arraia cururu (<i>Potamotrygon</i> sp. C).....	24
Tabela III. Morfometria uterina (cm) das seis espécies de potamotrigonídeos estudados: Comprimento (Comp.), Largura (Larg.) e Peso e dimensões dos exemplares: Largura do disco (Ldi) e Comprimento do disco (Cdi). Espécies com asterisco (*) apresentam apenas um exemplar e para <i>Paratrygon aiereba</i> (#) os úteros não foram coletados inteiros devido a presença de embriões.....	26
Tabela IV. Fecundidade nos ovários direito (D) e esquerdo (E) e fecundidade uterina das arraias grávidas (*) nos 12 exemplares coletados. (Ldi) Largura do disco e (-) exemplares não grávidos.....	30
Tabela V. Fecundidade uterina (N=11), média $\pm$ desvio padrão, número mínimo (mín.) e máximo (Max.) de embriões no útero direito (L. Direito) e esquerdo (L. Esquerdo) em <i>Potamotrygon</i> sp. C “arraia cururu”	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies de potamotrigonídeos coletados: *Paratrygon aiereba* (A), *Potamotrygon orbignyi* (B), *P. scobina* (C) *P. motoro*(D), *P. shcoroederi* (E) e *P. sp.* C “arraia cururu”. Barra de escala: 10 cm.....13
- Figura 2.** Metodologia estereológica. [A] A amostra de tecido foi dividida em 10 sessões de igual distância (T) calculadas pelo comprimento total do material (CT) dividido por 10. Cada sessão produziu uma lâmina histológica, que juntas, representam todo o material. [B] O gride foi sobreposto sobre a lâmina histológica para a contagem de pontos que tocam no material estudado. A área dos pontos (a) foi calculada pela distância entre pontos (d) ao quadrado.....15
- Figura 3.** [A] Esquema anatômico proporcional da localização e associação do ovário e folículos maduros (F) e órgão epigonal dispostos paratateralmente à coluna vertebral (CV). Glândulas oviducais direita (GD) e esquerda (GE), úteros direito (UD) e esquerdo (EU), Rins direito (RD) e esquerdo (RE) e canal vaginal (CVA) – *Ilustração: Maria Isabel da Silva*.....16
- Figura 4.** Órgãos associados: ovário e epigonal do lado direito (OED) e esquerdo (OEE). [A] Ovário e epigonal indiferenciáveis em *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu”. [B] Presença de folículos ovarianos no associado ovário-epigonal em *Potamotrygon motoro*.....17
- Figura 5.** Visão histológica da relação epigonal (asterísticos) e ovário (seta preta). Coloração: Azul de toluidina (0,1%) e safranina (0,1%).....18
- Figura 6.** [A] Diferenciação das oogônias (seta branca) a partir do epitélio germinativo (seta preta) formando um agregado (asterístico). [B] Agregado de oogônias (asterísticos) revoltos pelo epitélio germinativo (seta preta). Coloração em Azul de toluidina (0,1%).....19
- Figura 7.** [A] Organização estrutural da teca (T), camada folicular (asterísticos), células globosas (setas pretas) e zona pelúcida (setas brancas) no folículo primordial (1), primário (2) e secundário tipo I (3) – Coloração Azul de toluidina (0,1%).. [B] Estrutura da teca (T), camada folicular (asterísticos) com células globosas (setas pretas) e zona pelúcida definida (seta branca) no folículo secundário tipo II – Coloração Azul de toluidina (0,1%). [C] Células globosas (asterísticos) secretoras de glicoproteínas neutras (PAS-positivas) depositadas no citoplasma juntamente com o vitelo (V) – Coloração em PAS. [D] Formação das projeções (P) da camada folicular no estágio secundário tipo III – Coloração Azul de toluidina (0,1%).....20
- Figura 8.** [A] Ilustração de um folículo maduro envolvido pela teca (1), camada folicular ramificada para o interior (2), estoque de vitelo no citoplasma (3), cavidade folicular (4) e disco germinativo (5) – *Ilustração retirada de Babel, 1967*. [B] Folículo maduro com teca composta em teca externa (estrela branca) e interna (estrela preta), camada folicular projetada interiormente e preenchida pela teca interna (asterístico), zona pelúcida (seta branca) e reserva vitelínica (V). [C] Camada folicular ramificada (asterístico) unida pela grande quantidade de vitelo (V). [D] Células globosas (seta branca) e células cilíndricas (seta preta) constituintes da camada folicular. Coloração Azul de toluidina (0,1%).....21

Figura 9: [A] Estágio 1 do corpo lúteo, de aspecto glandular, com as projeções da camada folicular vascularizadas (setas pretas) em processo de aderência. [B] Células com núcleo apical (asterístico) e pontes de tensão (seta branca) promovendo a aderência da camada folicular vascularizada (seta preta) no estágio 1 do corpo lúteo. [C] Estágio 2 do corpo lúteo, com camadas totalmente unidas e aspecto esbranquiçado. [D] Células da camada folicular vascularizada (seta preta), produzindo vesículas secretoras hormonal em estágio 2 do corpo lúteo. [E] Vascularização ao redor do corpo lúteo em degradação, estágio 3. [F] Fragmentação celular e degeneração do estágio 3 do corpo lúteo. Coloração Azul de toluidina (0,1%).....22

Figura 10. [A] Atresia folicular em folículos primários. [B] Atresia com fragmentação celular em folículo secundário. [C] Absorção lipídica, projeções da camada folicular próximas umas das outras e presença de infiltrado atrésico em folículo maduro não ovulado (seta preta). [D] Aumento da vascularização e infiltrado em atresia folicular. Coloração em Azul de toluidina (0,1%).....23

Figura 11. Volume ocupado pelo ovário e órgão epigonal no lado direito e esquerdo da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C). (*) Ovário e o órgão epigonal direito são significativamente menores que os do lado esquerdo. No lado direito, o volume ovariano é significativamente menor que o órgão epigonal ($P = 0,029$; Teste U de Mann-Whitney).....24

Figura 12. Representação em porcentagem das quantidades de ovário e epigonal nos lados direito e esquerdo.....25

Figura 13. Análise em porcentagem dos componentes do ovário direito e esquerdo da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C).....25

Figura 14. Esquema anatômico da localização dos úteros no trato reprodutivo das arraias de água doce – *Ilustração: Maria Isabel da Silva*.....26

Figura 15. [A] Úteros direito (UD) e esquerdo (EU) precedidos pelas glândulas oviducais direita (GD) e esquerda (GE) que compõem os ovidutos. [B] Visualização da mucosa uterina com numerosos trofonematas.....27

Figura 16. Útero aberto, com embrião (E) em contato com trofonematas (T) da mucosa uterina.....28

Figura 17. [A] Camada adventícia (seta preta), camada muscular (M) e mucosa uterina formando trofonemata (*). [B] Fibras musculares dispostas em sentidos opostos formando duas camadas: uma externa (CE) e uma interna (CI). [C] Feixe de músculo liso (FM) no eixo do trofonemata – Coloração em Azul de toluidina (0,1%).....29

Figura 18. [A] Trofonemata com células cilíndricas (seta branca) e vasos pouco dilatados (seta preta). [B] Células epiteliais de trofonemata em organização glandular (seta preta) com vasos dilatados superficiais (seta branca). [C] Células em organização glandular alongadas (seta preta) sem visualização de vasos sanguíneos – Coloração em Azul de Toluidina (0,1%).....29

Figura 19. [A] Trofonemata corado em PAS. [B] Trofonemata corado em Azul de Alcian pH 2,5.....30

1. RESUMO

Não existe um consenso na literatura se os dois ovários (direito e esquerdo) das arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Elasmobranchii) são igualmente funcionais. Além disso, são escassas as informações sobre a morfologia, histologia e fecundidade dos ovários e úteros de ambos os lados do animal. Assim, o presente trabalho descreve morfologicamente (por meio da histologia convencional e anatomia topográfica) os ovários, órgão epigonal e úteros direito e esquerdo em diferentes espécies de potamotrigonídeos coletados em diferentes sistemas aquáticos da Amazônia Ocidental. Especialmente em *Potamotrygon* sp. C (arraia cururu, espécie endêmica do Médio Rio Negro) utilizou-se a Estereologia para comparar quantitativamente o volume dos componentes ovarianos nos dois lados. Histologicamente, os ovários estão associados ao órgão epigonal. Tal relação não pode ser visualizada macroscopicamente. De fato, os ovários são quantitativamente assimétricos em todas as espécies estudadas. Na arraia cururu, o ovário esquerdo é volumetricamente 55 vezes maior que o direito. No lado direito, o volume tecidual (ovário-epigonal) é constituído por 7,3% de ovário e 92,7% de órgão epigonal. O ovário esquerdo é constituído predominantemente por corpo lúteo > estroma > folículos atresícos. No lado esquerdo, ovário ocupa 51,2%, enquanto o órgão epigonal apenas 48,8% do volume tecidual total. Ainda assim, o volume do órgão epigonal esquerdo é 4 vezes maior que do lado direito. O ovário direito é constituído predominantemente por epitélio germinativo > folículos atresícos. Histologicamente, identificou-se 7 fases do desenvolvimento da foliculogênese no ovário esquerdo: oogônias, folículo primordial, primário, secundário tipos I, II, III e maduro, caracterizando ainda, o processo de atresia folicular e formação do corpo lúteo. Não existe assimetria quantitativa entre os dois úteros. Os úteros são constituídos pelas camadas adventícia, muscular e mucosa, apresentam um arranjo único com a formação de projeções uterinas chamadas de trofonematas. Microscopicamente, tal estrutura modifica-se dependendo do estágio reprodutivo, variando de um epitélio cilíndrico simples com vasos pequenos a um epitélio glandular com vascularização superficial. Na arraia cururu, a despeito da assimetria na fecundidade ovariana de 0:4 (direito:esquerdo), a fecundidade uterina foi de 0,9:1,1 (direito:esquerdo). Ainda que o ovário direito seja volumetricamente menor que o esquerdo e não apresente folículos visíveis, a presença de embriões no útero direito com a mesma frequência do esquerdo sugere que os dois ovários são igualmente funcionais, pois o potencial reprodutivo não pode ser mensurado apenas por meio de critérios quantitativos, tais como número de folículos maduros visíveis. Essa curiosa observação parece um padrão reprodutivo bem definido dentro da família Potamotrygonidae. Certamente, esses aspectos têm provocado inúmeras discussões contraditórias sobre a biologia reprodutiva das arraias de água doce.

Palavras-Chave: Potamotrigonídeos, biologia reprodutiva, histologia do ovário, histologia do útero.

2. INTRODUÇÃO

As arraias da família Potamotrygonidae são um grupo dentre os Elasmobrânquios que se adaptaram exclusivamente à água doce das regiões Neotropicais (Carvalho et al., 2003; Rosa et al., 2010), sendo constituída por quatro gêneros: *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon* (Carvalho et al., 2003; Carvalho e Lovejoy, 2011). De origem marinha, essas arraias possuem algumas similaridades com as demais espécies de elasmobrânquios como, baixa taxa de crescimento populacional, maturação tardia, baixa fecundidade e período gestacional longo (Compagno e Cook, 1995; Charvet-Almeida et al., 2005; Araújo et al., 2004). No entanto, a biologia reprodutiva do grupo é pouco conhecida, apresentando grandes lacunas de informações em diferentes aspectos, tais como a morfologia funcional dos órgãos reprodutivos.

Sabe-se que todos os Potamotrygonídeos apresentam viviparidade aplacentária por trofonemata caracterizada por uma gravidez uterina matrotrófica onde projeções – trofonemas – partem da parede uterina e secretam o “leite uterino” que alimenta o embrião (Wourms et al., 1977). Entretanto, para a morfologia do sistema reprodutor feminino, as informações encontram-se fragmentadas, sendo os aspectos reprodutivos citados em diferentes espécies, não havendo dados anatômicos e histológicos concisos que proporcionem uma caracterização e melhor entendimento da morfologia reprodutiva geral do grupo.

A composição do trato reprodutivo é descrita com a presença de duplos ovários e ovidutos (Wourms et al., 1977). Uma característica interessante é que os ovários estão intimamente associados ao tecido hematopoiético do órgão epigonal. A razão dessa interrelação histológica ainda não é conhecida. Os limites físicos entre as duas estruturas não são visíveis macroscopicamente (Serra-Pereira et al., 2011). Poucos trabalhos como de Lutton e Callard (2008) apresentaram a importância morfofisiológica dessa curiosa associação histológica. No entanto, aspectos quantitativo-volumétricos de ambos os órgãos, ainda não realizados, trariam melhor entendimento à descrita assimetria ovariana, onde os dois ovários possuem tamanhos e produções de folículos diferentes, sendo o ovário esquerdo funcional, possuindo mais folículos, e o direito vestigial contendo nenhum ou poucos folículos (Wourms, 1977; Thorson et al., 1983) como em *Potamotrygon motoro* (Castex e Maciel, 1965). Em *Potamotrygon orbignyi* as gônadas são assimétricas (uma maior que a outra), ou seja, em 36% das fêmeas analisadas o ovário esquerdo foi observado mais desenvolvido (funcional) que o ovário direito (Rincon, 2006). Em contraste, *Potamotrygon magdalenae*, uma espécie endêmica da bacia do Rio Atrato-Magdalena na Colômbia, foi relatado que ambos os ovários são funcionais (Teshima e Takeshita, 1992).

Os ovidutos são estruturas pares e tubulares relacionados com os ovários, percorrendo lateralmente a coluna vertebral em uma forma de funil se diferenciando em: óstio, oviduto anterior,

glândula nidamental ou oviducal, istmo, útero, colo uterino e seio urogenital (Hamlett e Koob, 1999). Dentre essas diferenciações são os úteros os órgãos de grande importância que define o modo reprodutivo de potamotrigonídeos (viviparidade aplacentária por trofonemata), como também auxiliam na determinação da fecundidade uterina (contagem de embriões alocados nos úteros). Até o momento, descrições correspondentes às características uterinas em arraias de água doce são escassas e os resultados de fecundidade uterina não foram estimados em cada útero (direito e esquerdo) separadamente. Assim, informações morfológicas e de fecundidade em ambos os úteros para as arraias de água doce, quando realizadas, podem trazer uma diferente visão comparativa ao que se tem descrito em elasmobrânquios marinhos ovíparos (Storrie et al., 2009), bem como auxiliar no entendimento da assimetria de tamanho e produção de folículos entre os ovários direito e esquerdo desses animais.

Considerando esses aspectos e as abordagens controversas sobre a funcionalidade ovariana e uterina, bem como a íntima associação histológica entre o ovário e o órgão epigonal, o presente trabalho compara e descreve a morfologia dos ovários, órgão epigonal e úteros direito e esquerdo de diferentes espécies de Potamotrigonídeos de ocorrência no Estado do Amazonas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho descreve e discute a morfologia funcional dos ovários e úteros em seis espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Elasmobranchii) de ocorrência na Bacia Amazônica (Estado do Amazonas): *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi*, *P. scobina*, *P. motoro*, *P. schroederi* e *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu”.

3.2 Específicos

- (i) Comparar morfometricamente os ovários e órgão epigonal direito e esquerdo das espécies de potamotrigonídeos;
- (ii) Por meio da Estereologia, quantificar e comparar o volume ocupado pelos ovários e órgão epigonal direito e esquerdo, bem como estimar a proporção dos componentes (epitélio germinativo, folículos atrésicos e estroma) nos dois ovários da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C);
- (iii) Caracterizar anatômica e histologicamente os ovários e úteros das espécies de potamotrigonídeos;

- (iv) Na arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C), estimar a fecundidade ovariana e fecundidade uterina;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de Captura

Os exemplares foram coletados no Estado do Amazonas – Brasil, em expedições financiadas pelas agências FAPEAM e CNPq, ao Rio Jutai (Município de Jutai: 3° 28' 51''S; 66° 04' 08''W – Setembro de 2012), Rio Solimões (Municípios de Iranduba: 3° 17' 6''S; 60° 11' 9''W e Município de Manauí: 3° 25' 41''S; 60° 27' 34''W – Novembro de 2012) e Rio Negro (Município de Barcelos: 58° 30''S; 62° 55' 26''W – Março de 2013), tendo permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio Autorização Nº 22055-4)) e em conformidade com as normas de tratamento do Comitê de Ética e Experimentação Animal, CEAA – UFAM protocolo Nº. 070/2012.

4.2 Coleta das amostras

As coletas foram feitas no período noturno (das 18:00 pm às 04:00 am) utilizando apetrechos convencionais de pesca, como espinhéis (com 100 anzóis de nº6 e comprimento de 100 metros), arrasto de praia, rapichés, puçás e malhadeiras (com malha 80 e 100 mm; fio de nylon Nº 12 e com 100 m de comprimento). No total, 12 fêmeas foram capturadas, distribuídas em seis espécies de potamotrygonídeos (Figura 1) em diferentes estágios reprodutivos: *Paratrygon aiereba* (N=1 – Rio Jutai), *Potamotrygon orbignyi* (N=2 – Rio Jutai), *P. scobina* (N=1 – Rio Jutai) *P. motoro* (N=1 – Rio Solimões e N=2 – Rio Negro), *P. shcoroederi* (N=1 – Rio Negro) e *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu” (N=4 – Rio Negro). Essa última ainda em fase de descrição taxonômica.

Após a captura, os animais foram mantidos em um tanque rede (na água do próprio rio) por 24 a 48 horas para a aclimatização e em seguida, foram eutanaziados por meio de anestesia irreversível com 0,05 g/l de MS-222 (Sigma Co.). Os animais foram identificados segundo Rosa (1985). Após isso, foram pesados (g), mensurados (cm) em comprimento total e largura do disco e fotodocumentados. Para a coleta dos tecidos, foi feita uma incisão abdominal para a exposição da cavidade visceral, removendo o fígado, estômago e válvula espiral (intestino) para a visualização do sistema reprodutor. Posteriormente, os ovários e úteros foram removidos, observados nos aspectos de forma, coloração e localização, fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado (pH 7,4),

em baixa temperatura (8 °C) por um período de 24 horas e por fim, mantidos em álcool 70% para análises laboratoriais posteriores. A fecundidade uterina foi estimada pela contagem dos embriões das fêmeas em estágio de gravidez após o aborto espontâneo, evento comumente ocasionado pelo estresse de captura das fêmeas (Charvet-Almeida et. al, 2005 e Garrone Neto, 2010) ou ainda no momento da dissecação dos órgãos, quando as fêmeas preservavam os embriões nos úteros.

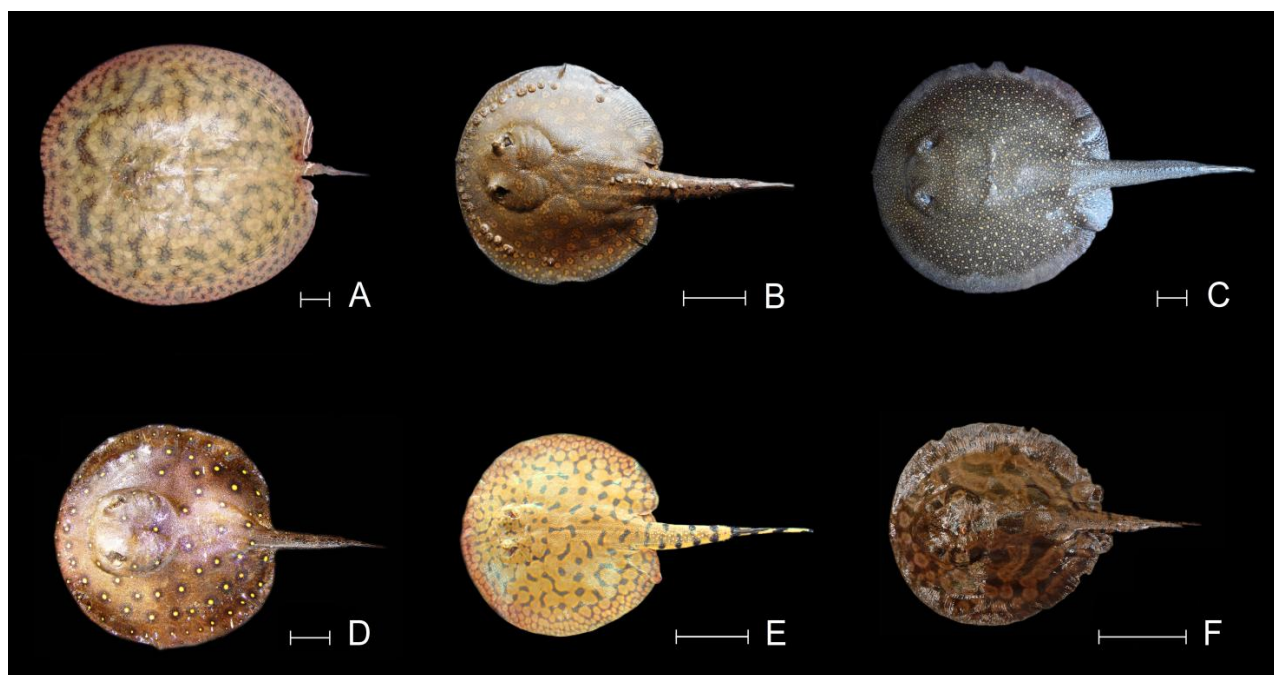


Figura 1. Espécies de potamotrygonídeos coletados: *Paratrygon aiereba* (A), *Potamotrygon orbignyi* (B), *P. scobina* (C) *P. motoro*(D), *P. shcoroederi* (E) e *P. sp. C* “arraia cururu”. Barra de escala: 10 cm.

4.3 Análise Microscópica

Em laboratório, os ovários e úteros foram pesados em balança analítica Ohaus – Scout Pro 400g (0,0001 g precisão) e medidos com o uso de um paquímetro digital (0,1 mm de precisão). Nos ovários, os ovócitos visíveis foram contados e medidos para a estimativa da fecundidade ovariana. Em seguida, foram removidos pequenos fragmentos dos órgãos para a desidratação em séries crescentes de álcool, finalizando-os com a inclusão em historesina. As seções de 5 µm foram cortadas em micrótomo Leica RM 2125RT e coradas utilizando os corantes Azul de toluidina (0,1%), Azul de Alcian pH 2,5 e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas produzidas foram fotografadas no microscópio óptico Olympus BX51 com câmera digital acoplada para a descrição morfológica dos folículos ovarianos e dos componentes teciduais dos úteros. A morfometria dos tipos celulares ovarianos e seus componentes (zona pelúcida, teca e epitélio folicular) bem como a espessura da parede uterina foram realizadas nas imagens calibradas (em µm) utilizando o software Bell Image Analyzer®.

4.4 Estereologia

O uso da Estereologia neste trabalho foi aplicado em ambos os ovários dos quatro exemplares da espécie *Potamotrygon* sp. “arraia cururu” com o objetivo de estimar o volume e entender a relação histológica entre os dois tecidos: ovário e órgão epigonal. Para isso, os ovários foram processados histologicamente e emblocados em historesina (utilizando o mesmo protocolo para análise microstópica). Cada bloco de material foi dividido em 10 partes de distâncias iguais com a finalidade de se obter uma seção histológica de 5 µm de cada parte, resultando em 10 seções representativas de todo o material. O material foi corado com Azul de Toluidina (0,1%) e fotografado em estereomicroscópio Leica com câmera digital aclopada.

Com o auxílio do programa IMOD, distribuído gratuitamente pelo Boulder Laboratório de Eletro-Micrografia Celular em 3D nos EUA (bio3d.colorado.edu/imod), foi sobreposto sobre as imagens das seções, um sistema teste de contagem de pontos (gride) segundo Howard e Reed (2005) (Figura 2). Os pontos foram computados em diferentes categorias ao coincidirem com o órgão epigonal e ovário, representado pela somatória do epitélio germinativo, corpo lúteo, folículos e estroma. O volume (V) de cada tecido e componentes foi determinado (em mm³/g) de acordo com a fórmula de Cavalieri:

$$V = T \cdot \frac{a}{p} \cdot \sum_{i=1}^m P_i$$

Onde: T = distância entre as sessões, calculada pelo comprimento do material (em mm) dividido por 10; a/p = área entre pontos, calculada pela distância entre dois pontos do gride elevado ao quadrado de ΣP = somatório dos pontos, que equivale à soma de pontos que coincidem sobre o tecido analisado (órgão epigonal e ovário).

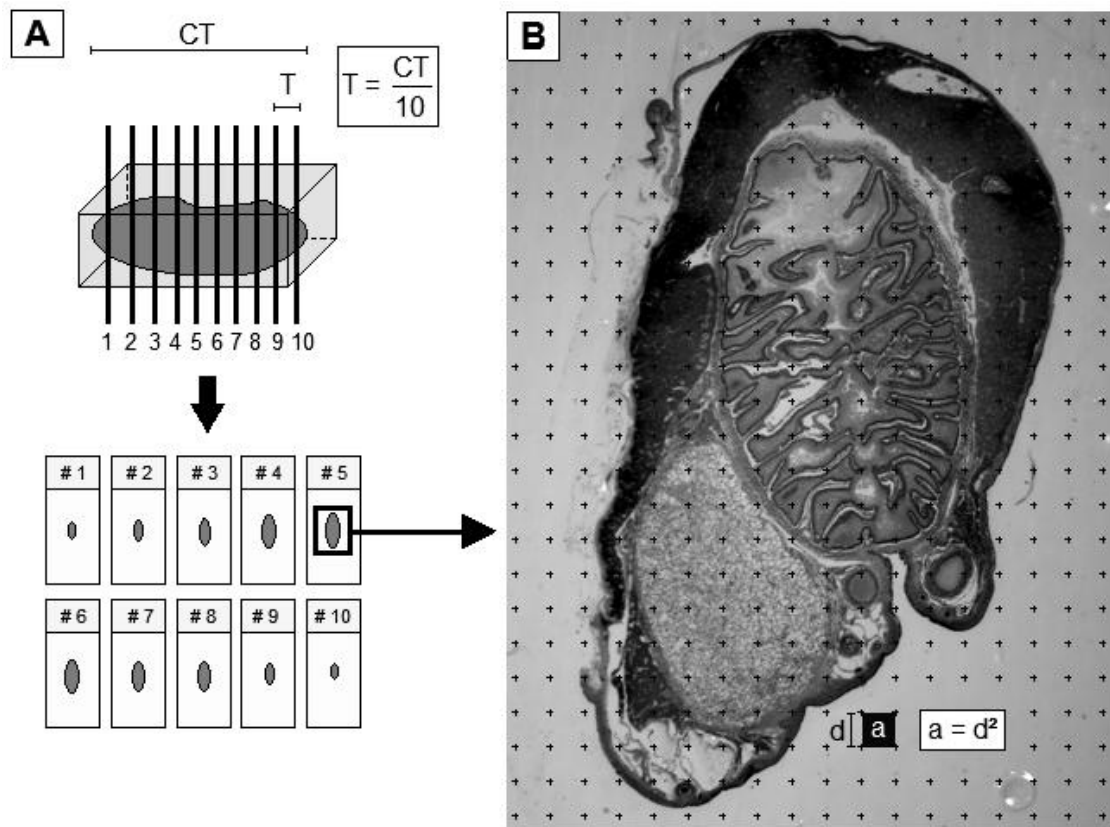


Figura 2. Metodologia estereológica. [A] A amostra de tecido foi dividida em 10 sessões de igual distância (T) calculadas pelo comprimento total do material (CT) dividido por 10. Cada sessão produziu uma lâmina histológica, que juntas, representam todo o material. [B] O grille foi sobreposto sobre a lâmina histológica para a contagem de pontos que tocam no material estudado. A área dos pontos (a) foi calculada pela distância entre pontos (d) ao quadrado.

4.5 Análises Estatísticas

Os resultados morfométricos estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. No entanto, para a Estereologia, os resultados foram dispostos em média $\pm$ coeficiente de erro. Os dados morfométricos do útero direito foi comparado ao mesmo órgão do lado esquerdo do animal. Procedimento igual foi realizado com os ovários e órgãos epigonais dentro da mesma espécie. Os dados foram submetidos a priori a um teste de normalidade e homogeneidade das variâncias. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado aos dados para testar a significância entre os órgãos localizados nos dois lados do animal. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

O coeficiente de erro (C.E) foi calculado para avaliar a variância do volume dos tecidos, de acordo com Gundersen e Jensen (1987):

$$C.E. = \frac{\sqrt{\text{Var noise} \sum(P) + \text{Var SURS} \sum(a)}}{\sum P}$$

Onde: $Var\ noise\ \Sigma\ (P) =$ inexactidão do sistema teste, descrita por: $0,0724 \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \Sigma P}$, sendo $(b/\sqrt{a})$ a forma do perfil médio, “n” o número de seções e “ ΣP ” a soma de todos os pontos contados; $Var\ SURS\ \Sigma(a)$ é a variância das somas das áreas através de uma amostragem aleatória sistemática uniforme (Howard e Reed, 2005). Para essa análise, os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Descrição Macroscópica do Ovário

Macroscopicamente, os ovários entre os potamotrigonídeos apresentam o mesmo padrão morfológico geral. São órgãos pares, fixados pelo mesovário na região superior da cavidade visceral e dispostos paralateralmente à coluna vertebral. Com colorações amarelo claro, são órgãos alongados e achatados dorsoventralmente (Figura 3), apresentando assimetria de tamanho entre os lados, sendo o direito menor que o esquerdo (Tabela I). Os ovários estão associados ao órgão epigonal, um componente do sistema imunológico. No entanto, macroscopicamente, não se diferencia ovário de epigonal, aparentando ser apenas uma única massa tecidual. Quando as fêmeas estão prontas para a fecundação, observa-se a ocorrência de numerosos folículos vitelogênicos amarelo-alaranjado ao longo dos órgãos, facilitando assim a identificação do ovário (Figura 4).

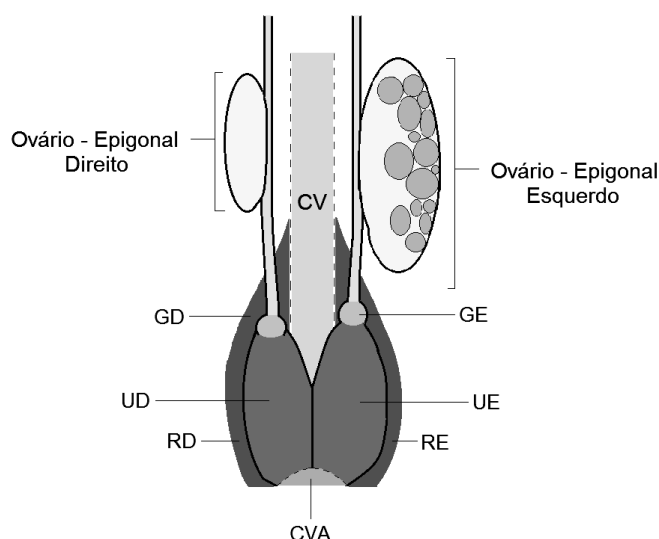


Figura 3. [A] Esquema anatômico proporcional da localização e associação do ovário e folículos maduros (F) e órgão epigonal dispostos paralateralmente à coluna vertebral (CV). Glândulas oviducais direita (GD) e esquerda (GE), úteros direito (UD) e esquerdo (EU), Rins direito (RD) e esquerdo (RE) e canal vaginal (CVA) – *Ilustração: Maria Isabel da Silva.*

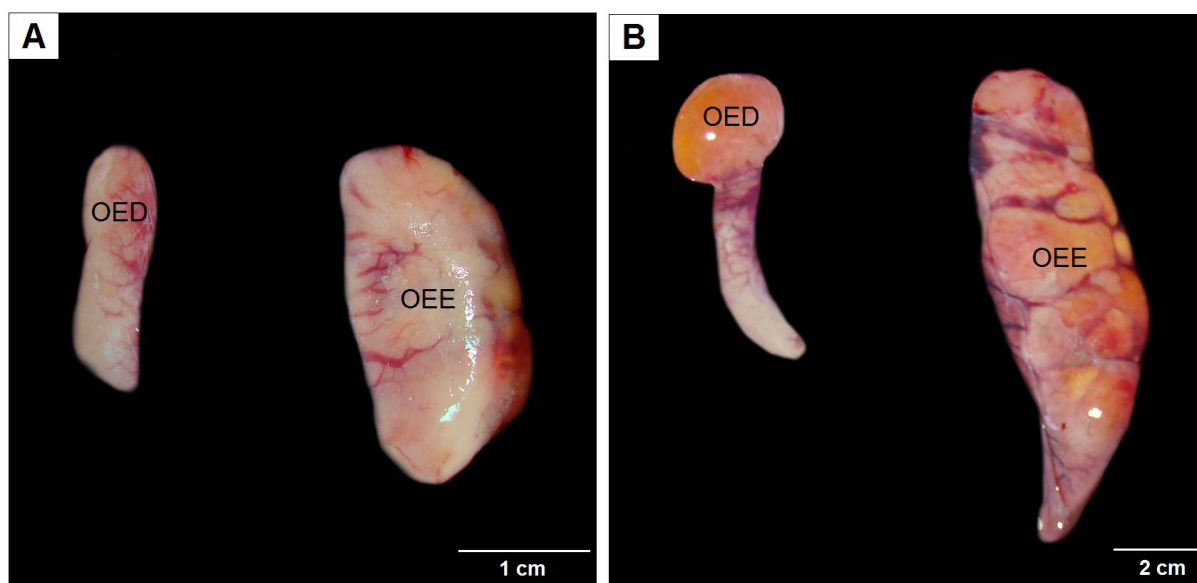


Figura 4. Órgãos associados: ovário e epigonal do lado direito (OED) e esquerdo (OEE). [A] Ovário e epigonal indiferenciáveis em *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu”. [B] Presença de folículos ovarianos no associado ovário-epigonal em *Potamotrygon motoro*.

Tabela I. Morfometria ovariana (cm) das seis espécies de potamotrigonídeos: Comprimento (Comp.), Largura (Larg.) e Peso e dimensões do exemplar: Largura do disco (Ldi) e Comprimento do disco (Cdi). Espécies com asterisco (*) apresentam apenas um exemplar.

Espécies	Ldi	Cdi	# Ovário Direito			Ovário Esquerdo		
			Comp.	Larg.	Peso	Comp.	Larg.	Peso
<i>Paratrygon aiareba</i> *	84	92	8,19	3,19	21,22	7,65	3,07	50,25
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	36 ± 7	40,5 ± 9,1	2,73 ± 0,79	1,23 ± 0,18	2,3 ± 0,95	4,34 ± 1,16	2,33 ± 0,31	3,81 ± 2,38
<i>Potamotrygon scobina</i> *	65	69,8	5,36	1,47	13,37	10,87	2,53	59,12
<i>Potamotrygon motoro</i>	48,8 ± 9,3	51,6 ± 10,5	4,2 ± 1,45	2,2 ± 0,7	5,01 ± 4,32	9,09 ± 2,71	2,53 ± 1,25	36,05 ± 35,85
<i>Potamotrygon schroederi</i> *	29,5	27,5	3,14	1,32	0,47	3,88	1,41	1,07
<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu"	23,1 ± 2,2	25,3 ± 2,4	1,83 ± 0,46	0,92 ± 0,22	0,24 ± 0,07	3,15 ± 0,11	1,3 ± 0,32	1,12 ± 0,39

5.2 Descrição Microscópica do Ovário

Histologicamente, em todas as espécies estudadas os ovários estão intimamente associados ao órgão epigonal com ausência de delimitação ou área de transição entre os dois tecidos. A porção ovariana tem localização periférica, caracterizada pela presença de um epitélio cúbico simples que reveste o estroma de tecido conjuntivo vascularizado. Este dá suporte aos folículos ovarianos em diferentes fases de maturação. Essa porção ovariana é contínua, porém histologicamente bem distinta da porção epigonal que consiste num agregado de células hematopoiéticas (Figura 5).

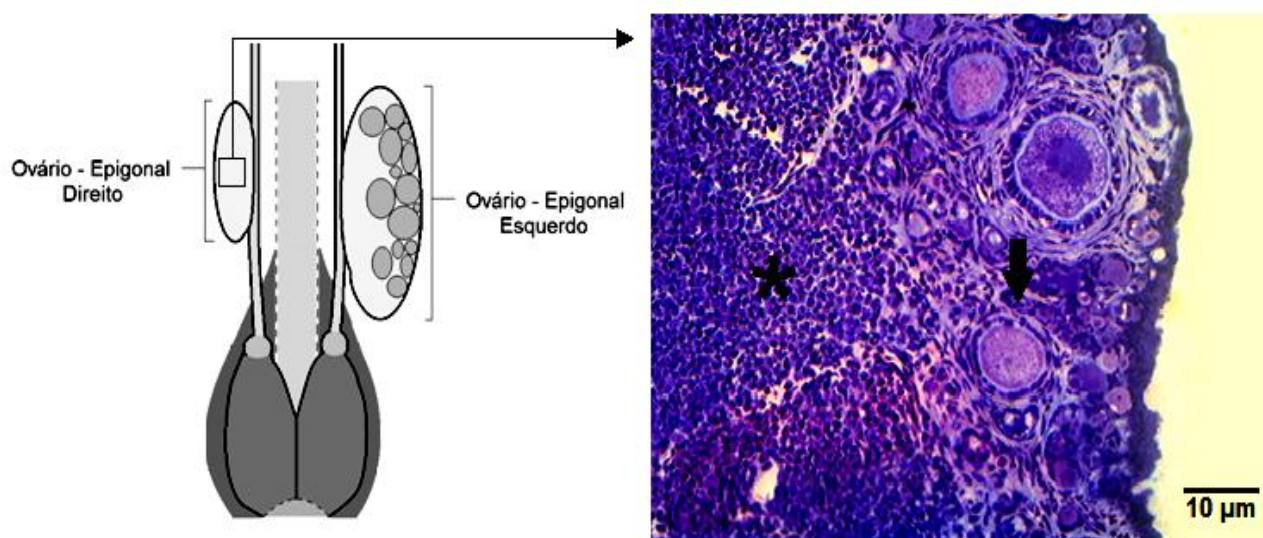


Figura 5. Visão histológica da relação epigonal (asterísticos) e ovário (seta preta). Coloração: Azul de toluidina (0,1%) e safranina (0,1%).

Os ovários das seis espécies de potamotrigonídeos (em todas as fases reprodutivas) são compostos por epitélio germinativo, estroma ovariano, oogônias e folículos em diferentes estágios de maturação. No entanto, alguns componentes como: folículos maduros, folículos atresícos e corpo lúteo, apenas compõem o ovário nas fases madura e gravídica, respectivamente. Morfologicamente, pode-se resumir as principais características dos componentes ovarianos como:

(i) Epitélio germinativo: formado por uma camada simples de células cúbicas das quais se diferenciam as oogônias (Figura 6A);

(ii) Oogônias: são originadas a partir de células do epitélio germinativo que reveste o ovário, organizando-se em ninhos subjacentes ao epitélio. São caracterizadas por serem células arredondadas com $\sim 0,91 \mu\text{m}$ de diâmetro, contendo núcleo central grande, citoplasma homogêneo. (Figura 6B). Esse tipo celular foi encontrado nos ovários de todas as espécies analisadas nesse trabalho.

(iii) Folículo primordial: São ovócitos individualizados com $\sim 43 \mu\text{m}$ de diâmetro, dispostas mais distantes do epitélio ovariano e delimitadas por uma simples camada descontínua de células foliculares pavimentosas (Figura 7A-1). O núcleo é grande, evidente, com citoplasma homogêneo.

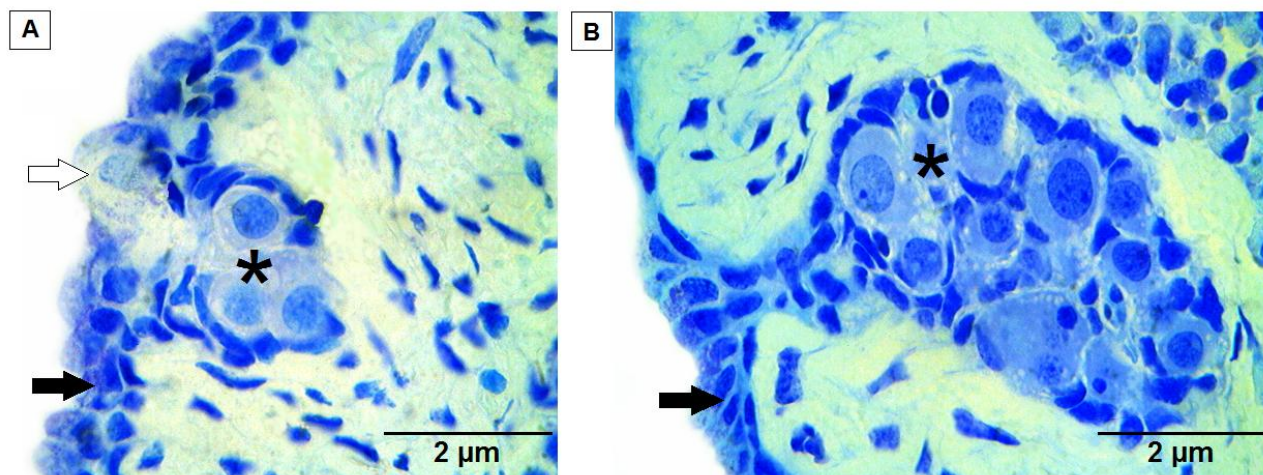


Figura 6. [A] Diferenciação das oogônias (seta branca) a partir do epitélio germinativo (seta preta) formando um agregado (asterístico). [B] Agregado de oogônias (asterísticos) revoltos pelo epitélio germinativo (seta preta). Coloração em Azul de toluidina (0,1%).

(iv) Folículo primário: Folículo individualizado com $\sim 88 \mu\text{m}$ de diâmetro. As células foliculares mudam de pavimentosas para cúbicas e entre estas surgem células grandes, arredondadas, chamadas de células globosas. Há ainda, entre a camada folicular e o citoplasma do ovócito um espaço correspondente à zona pelúcida em formação com $\sim 0,55 \mu\text{m}$ de espessura e ao redor do folículo percebe-se uma organização em camadas concêntricas de tecido conjuntivo, chamada de teca (Figura 7A-2).

(v) Folículo secundário Tipo I: Com diâmetro de $\sim 196 \mu\text{m}$, nesse estágio a camada folicular é multilaminar, com células foliculares agora variando de cubóides a cilíndricas, intercaladas pelas células globosas. A zona pelúcida apresenta $\sim 0,75 \mu\text{m}$ de espessura, o citoplasma ovocitário está mais granuloso e a teca circundante ao ovócito, encontra-se mais evidente, fixando-se ao estroma ovariano para dar suporte ao ovócito (Figura 7A-3).

(vi) Folículo secundário Tipo II: Com diâmetro de $\sim 295 \mu\text{m}$. Em seu citoplasma, visualiza-se vesículas de vitelo, as células foliculares cilíndricas intercaladas pelas células globosas dispõem-se como um epitélio pseudoestratificado, circundando uma estreita e nítida zona pelúcida com $\sim 0,25 \mu\text{m}$ de espessura (Figura 7B).

(vii) Folículo secundário Tipo III: Folículo com diâmetro maior ou igual que $\sim 2 \text{ mm}$. A camada folicular desenvolvida forma dobras (vilos) projetados para o interior do ovócito (Figura

7D). No interior de cada vilo há preenchimento por tecido conjuntivo vascularizado considerado uma expansão da teca. O citoplasma está completamente preenchido por vesículas de vitelo circundadas pelo mesmo material glicoprotéico das células globosas contendo mucinas neutras PAS-positivas (Figura 7C).

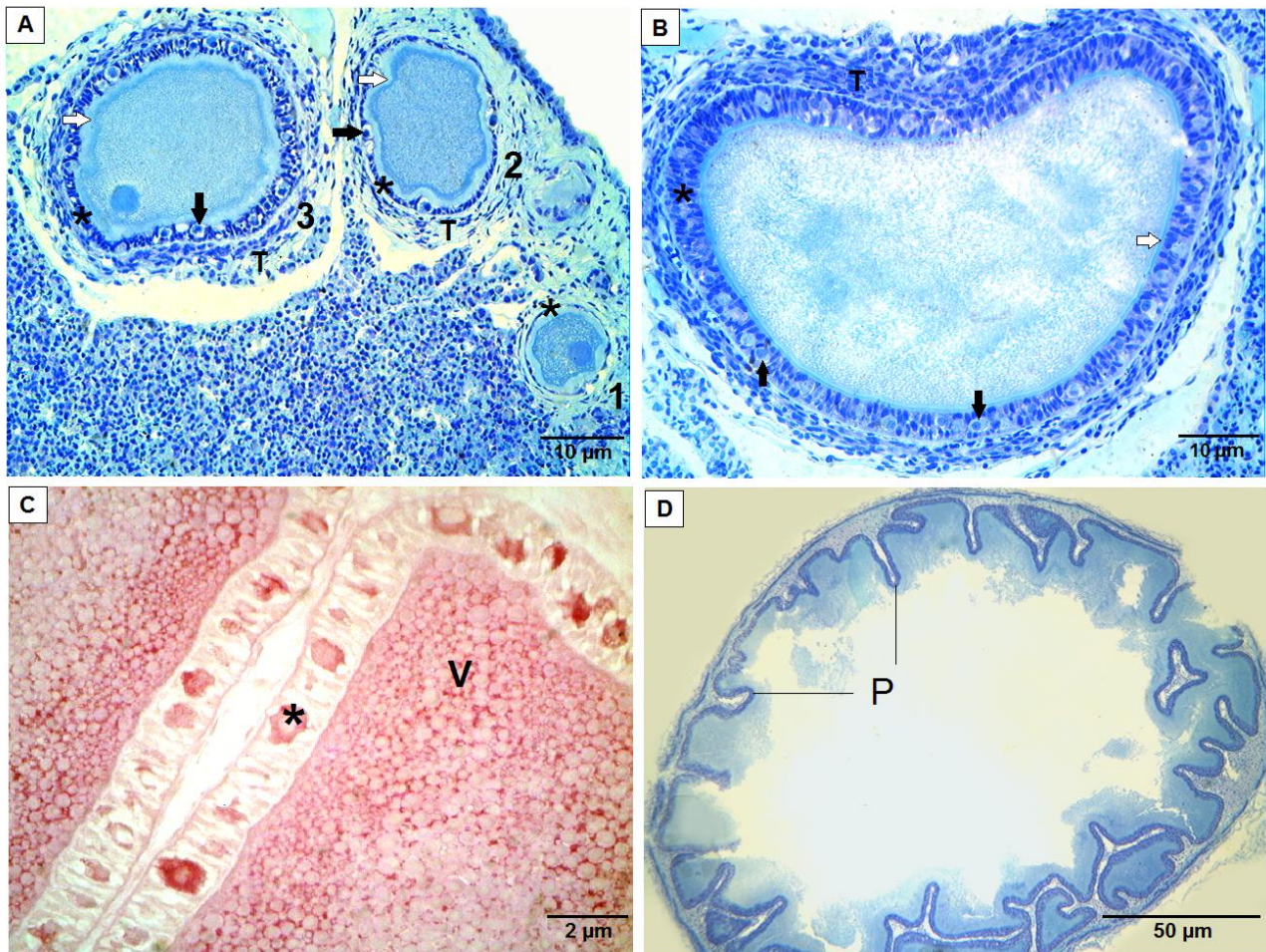


Figura 7. [A] Organização estrutural da teca (T), camada folicular (asterísticos), células globosas (setas pretas) e zona pelúcida (setas brancas) no folículo primordial (1), primário (2) e secundário tipo I (3) – Coloração Azul de toluidina (0,1%). [B] Estrutura da teca (T), camada folicular (asterísticos) com células globosas (setas pretas) e zona pelúcida definida (seta branca) no folículo secundário tipo II – Coloração Azul de toluidina (0,1%). [C] Células globosas (asterísticos) secretoras de glicoproteínas neutras (PAS-positivas) depositadas no citoplasma juntamente com o vitelo (V) – Coloração em PAS. [D] Formação das projeções (P) da camada folicular no estágio secundário tipo III – Coloração Azul de toluidina (0,1%).

(viii) Folículo maduro: Macroscopicamente visível, bem amarelado, com formato oval alcançando diâmetro mínimo de $\sim 0,5$ cm para *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu” e diâmetro máximo de $\sim 1,28$ cm em *P. motoro*. Histologicamente, as dobras da camada folicular estão unidas, ramificadas e maiores no interior do ovócito. O citoplasma está totalmente preenchido por vesículas

vitelínicas e grânulos glicoproteicos (visíveis em coloração PAS). Esse estágio está pronto para a ovulação e fecundação (Figura 8).

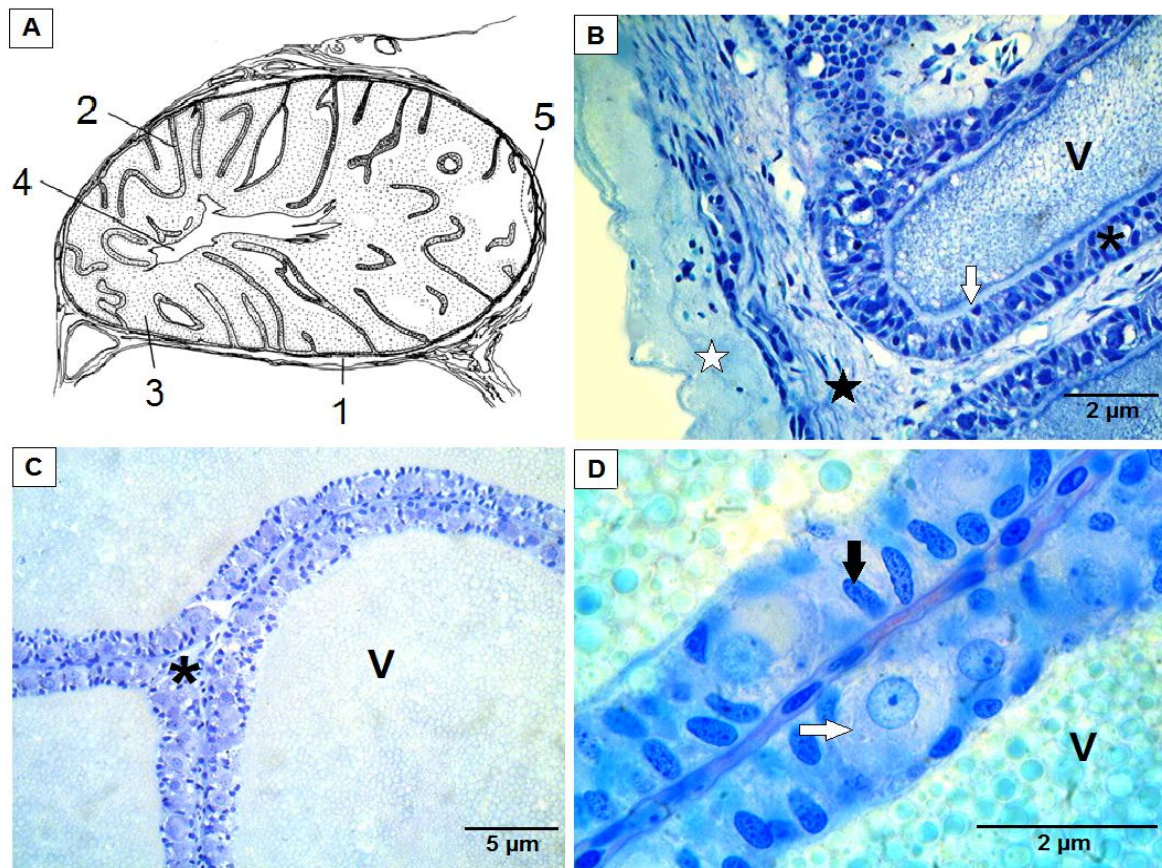


Figura 8. [A] Ilustração de um folículo maduro envolvido pela teca (1), camada folicular ramificada para o interior (2), estoque de vitelo no citoplasma (3), cavidade folicular (4) e disco germinativo (5) – *Ilustração retirada de Babel, 1967*. [B] Folículo maduro com teca composta em teca externa (estrela branca) e interna (estrela preta), camada folicular projetada interiormente e preenchida pela teca interna (asterístico), zona pelúcida (seta branca) e reserva vitelínica (V). [C] Camada folicular ramificada (asterístico) unida pela grande quantidade de vitelo (V). [D] Células globosas (seta branca) e células cilíndricas (seta preta) constituintes da camada folicular. Coloração Azul de toluidina (0,1%).

(ix) Corpo lúteo: Foi encontrado apenas no estágio de gravidez. É caracterizado por células da camada folicular que permanecem no ovário após a liberação do ovócito (ovulação). No material analisado foi observado vários estágios do desenvolvimento do corpo lúteo:

* **Fase 1:** As projeções da camada folicular ainda são visíveis, com um pequeno espaço entre si, tendendo a se unirem em um encaixe tensionado por estruturas semelhantes a “pontes”. Observa-se a ausência das células globosas, enquanto as demais células da camada folicular tornam-se cilíndricas com todos os núcleos posicionados no polo apical formando um corpo lúteo de aspecto glandular (Figura 9 A e B).

* **Fase 2:** Observa-se levemente vestígios das projeções que agora estão totalmente unidas formando um corpo lúteo muito grande, vascularizado, com formato oval. Nas células ainda

cilíndricas os núcleos se localizam no polo apical e no interior dessas células, observa-se a presença de vesículas de coloração esbranquiçada (Figura 9 C e D).

*** Fase 3:** Representa a involução do corpo lúteo, não se visualiza o padrão das projeções ou produção de vesículas hormonais, sendo caracterizada por total fragmentação nuclear e apoptose (Figura 9 E e F).

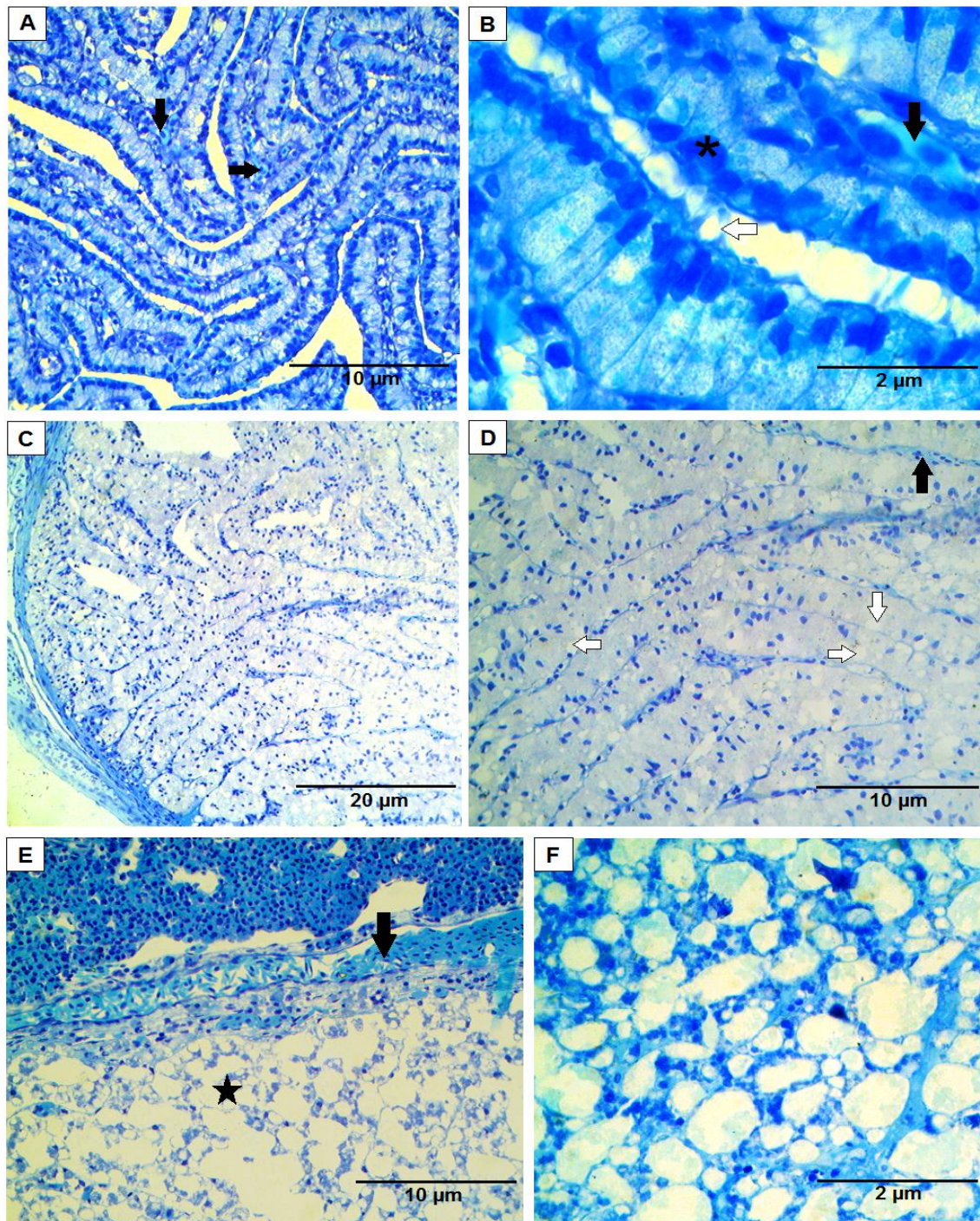


Figura 9: [A] Estágio 1 do corpo lúteo, de aspecto glandular, com as projeções da camada folicular vascularizadas (setas pretas) em processo de aderência. [B] Células com núcleo apical (asterístico) e pontes de tensão (seta branca) promovendo a aderência da camada folicular vascularizada (seta preta) no estágio 1 do corpo lúteo. [C] Estágio 2 do

corpo lúteo, com camadas totalmente unidas e aspecto esbranquiçado. [D] Células da camada folicular vascularizada (seta preta), produzindo vesículas secretoras hormonal em estágio 2 do corpo lúteo. [E] Vascularização ao redor do corpo lúteo em degradação, estágio 3. [F] Fragmentação celular e degeneração do estágio 3 do corpo lúteo. Coloração Azul de toluidina (0,1%).

(x) Folículos atrésicos: A atresia folicular é caracterizada principalmente pela reabsorção do vitelo. Esse processo é visível devido à forma distorcida do citoplasma ovocitário. Observou-se essa característica em todos os estágios foliculares, exceto para as oogônias. Em folículos em maturação avançada (secundário, tipo III) e maduros, observa-se no interior das projeções da camada folicular, um aumento da vascularização e presença de infiltrado sanguíneo. As projeções estão próximas umas das outras tendendo a um colapso. (Figura 10).

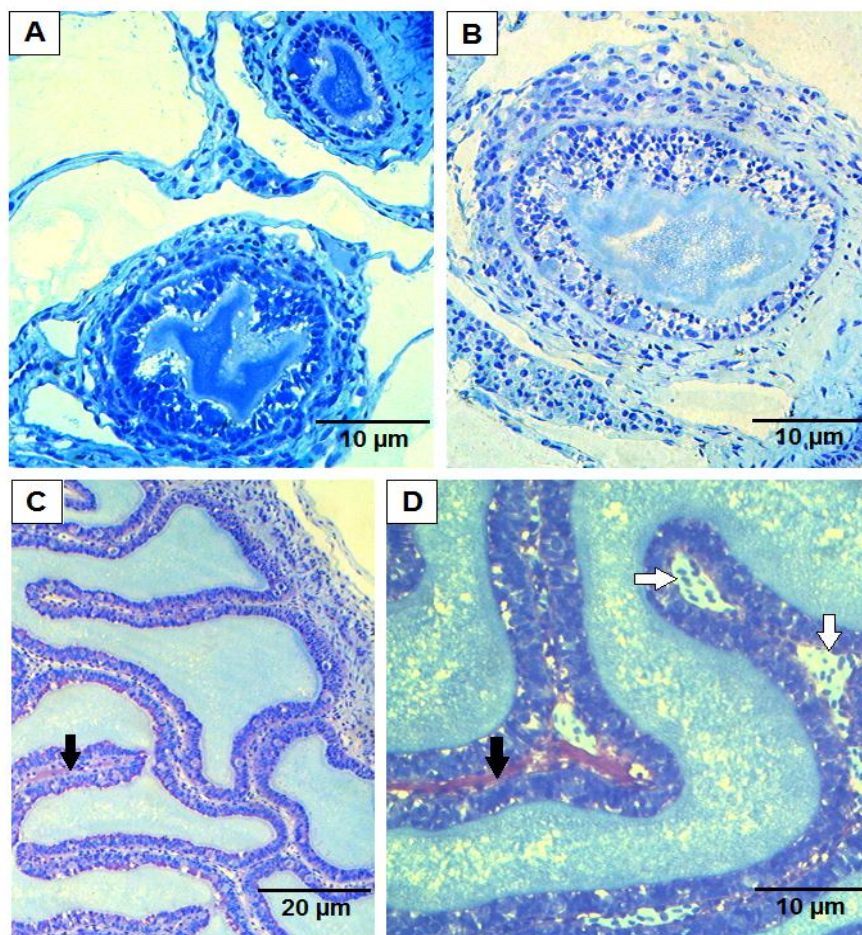


Figura 10. [A] Atresia folicular em folículos primários. [B] Atresia com fragmentação celular em folículo secundário. [C] Absorção lipídica, projeções da camada folicular próximas umas das outras e presença de infiltrado atrésico em folículo maduro não ovulado (seta preta). [D] Aumento da vascularização e infiltrado em atresia folicular. Coloração em Azul de toluidina (0,1%).

5.3 Análises Estereológicas dos ovários e órgãos epigonais

Devido ao maior número de exemplares disponíveis, a análise estereológica foi realizada apenas na espécie *Potamotrygon* sp. C (arraia cururu). As demais espécies não foram analisadas devido à insuficiência amostras. Baseado em dados estereológicos, observa-se que na arraia cururu os tecidos ovarianos e órgãos epigonais são assimétricos em termos de volume massa-específico ($P = 0,029$; Teste U de Mann-Whitney) entre o lado direito e esquerdo (Figura 11). No lado direito, o órgão epigonal ocupa a maior parte do volume total da massa tecidual, representando 92,7% do volume total ($0,227 \text{ mm}^3/\text{g} \pm 0,046$) enquanto o ovário ocupa apenas 7,3% ($0,018 \text{ mm}^3/\text{g} \pm 0,013$). Em contraste, no lado esquerdo, o ovário possui representa 51,2% (volume de $0,983 \text{ mm}^3/\text{g} \pm 0,468$) da massa tecidual, enquanto o órgão epigonal ocupa 48,8% ($0,953 \text{ mm}^3/\text{g} \pm 0,465$) (Figura 12).

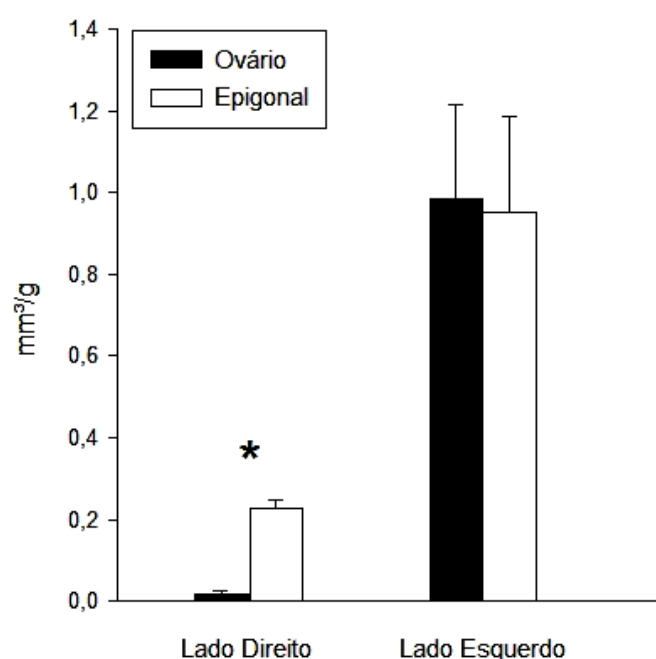


Figura 11. Volume ocupado pelo ovário e órgão epigonal no lado direito e esquerdo da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C). (*) Ovário e o órgão epigonal direito são significativamente menores que os do lado esquerdo. No lado direito, o volume ovariano é significativamente menor que o órgão epigonal ($P = 0,029$; Teste U de Mann-Whitney).

Da mesma forma, a assimetria entre os dois lados também foi observada na quantificação dos componentes ovarianos (Tabela II). No lado direito, o epitélio germinativo ocupar o maior volume ($P < 0,05$) e, consequentemente maior proporção (90%) em relação aos demais componentes. Em contraste, o outro lado (esquerdo) possui significativamente maior ($P < 0,05$) volume de corpo lúteo, estroma ovariano e folículo atresico que o lado direito (Figura 13). É importante observar que o volume de epitélio germinativo no ovário direito ($0,064 \text{ mm}^3/\text{g}$) é significativamente maior que o

esquerdo ($0,011 \text{ mm}^3/\text{g}$). Portanto, o ovário esquerdo só é maior que o direito devido ao grande volume de corpo lúteo, estroma ovariano e folículos atrésicos.

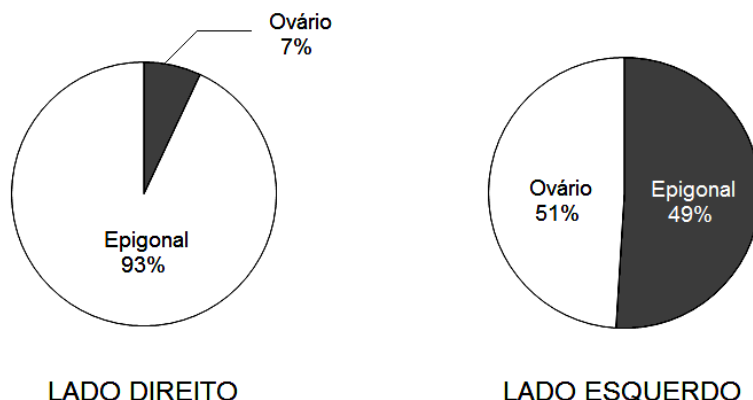


Figura 12. Representação em porcentagem das quantidades de ovário e epigonal nos lados direito e esquerdo.

Tabela II. Análise quantitativa do volume massa-específico ($\text{mm}^3/\text{g} \pm \text{desvio padrão}$) dos componentes do ovário direito e esquerdo da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C).

Componente	Lado Direito	Lado Esquerdo
Epitélio germinativo	$0,064 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,006$
Estroma ovariano	$0,001 \pm 0,001$	$0,189 \pm 0,125$
Corpo lúteo	0,000	$0,57 \pm 0,366$
Folículos atrésicos	$0,007 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,080$
TOTAL	0,072	0,93

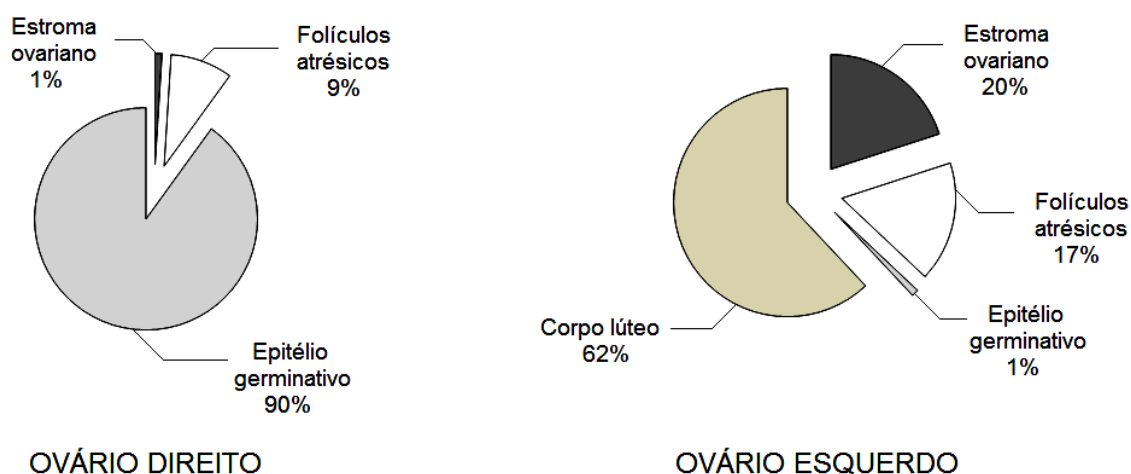


Figura 13. Análise em porcentagem dos componentes do ovário direito e esquerdo da arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C).

5.4 Descrição Macroscópica do Útero

Assim como o ovário, o útero das arraias de água doce é um órgão par que constitui a porção final dos ovidutos, localizando-se na região inferior da cavidade visceral, sobre dos rins (Figura 14) e, em geral, morfometricamente o útero esquerdo e direito foram equivalentes em tamanho (Tabela III).

Com coloração esbranquiçada, os úteros são compartimentos ovais, individualizados, posicionados muito próximos lateralmente, sendo sua região anterior precedida pelas glândulas oviducais e a região posterior com a presença de um esfíncter muscular (em cada útero) que controlam as aberturas dos úteros para o canal vaginal. Internamente, observou-se a presença de numerosas projeções digitiformes da mucosa uterina, chamadas trofonemas, que se estendem para o interior do órgão (Figura 15). Nos exemplares em estágio de gravidez o trofonemata está circundado pelo líquido uterino que envolve o feto (Figura 16).

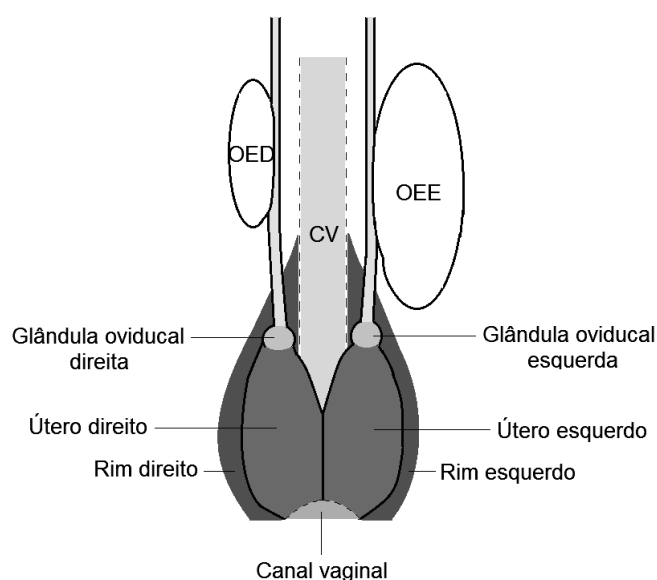


Figura 14. Esquema anatômico da localização dos úteros no trato reprodutivo das arraias de água doce – *Ilustração: Maria Isabel da Silva.*

Tabela III. Morfometria uterina (cm) das seis espécies de potamotrigonídeos estudados: Comprimento (Comp.), Largura (Larg.) e Peso e dimensões dos exemplares: Largura do disco (Ldi) e Comprimento do disco (Cdi). Espécies com asterisco (*) apresentam apenas um exemplar e para *Paratrygon aiereba* (#) os úteros não foram coletados inteiros devido a presença de embriões.

Espécies	Ldi	Cdi	Útero Direito			Útero Esquerdo		
			Comp.	Larg.	Peso	Comp.	Larg.	Peso
<i>Paratrygon aiereba</i> #	84	92	-	-	-	-	-	-
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	36 ± 7	40,5 ± 9,1	3,39 ± 1,33	1,52 ± 0,8	3,7 ± 0,39	4,23 ± 2,32	2,15 ± 1,12	4,89 ± 0,39
<i>Potamotrygon scobina</i> *	65	69,8	3,74	2,02	2,32	4,82	2,34	3,87
<i>Potamotrygon motoro</i>	48,8 ± 9,3	51,6 ± 10,5	3,3 ± 1,55	2,06 ± 1,43	4,18 ± 0,96	3,95 ± 2,43	1,8 ± 0,92	4,84 ± 2,2
<i>Potamotrygon schoroederi</i> *	29,5	27,5	2,21	0,34	0,35	1,38	0,48	0,17
<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu"	23,1 ± 2,2	25,3 ± 2,4	2,37 ± 0,27	1,33 ± 0,19	2,03 ± 0,97	2,36 ± 0,2	1,34 ± 0,16	2,11 ± 0,18

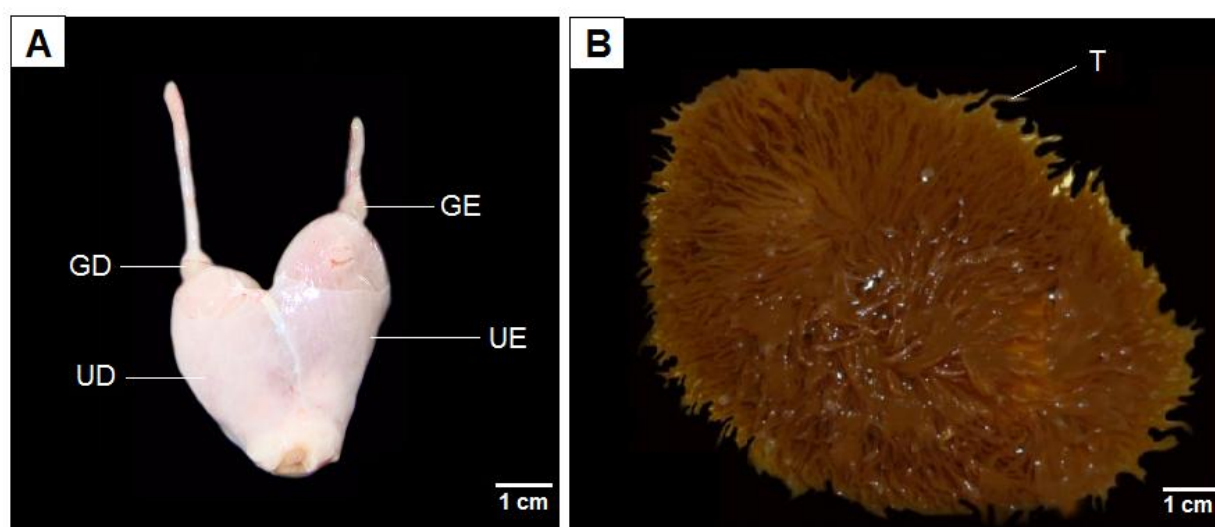


Figura 15. [A] Úteros direito (UD) e esquerdo (EU) precedidos pelas glândulas oviducais direita (GD) e esquerda (GE) que compõem os ovidutos. [B] Visualização da mucosa uterina com numerosos trofonematas.

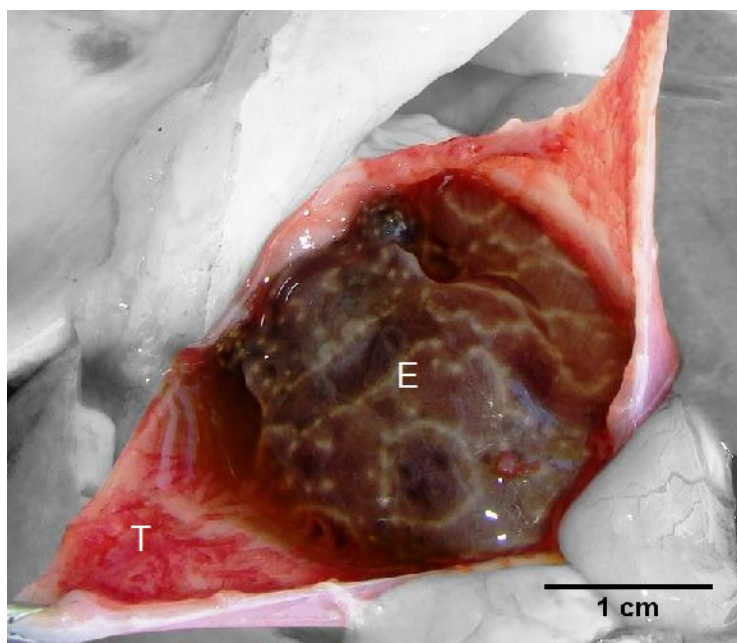


Figura 16. Útero aberto, com embrião (E) em contato com trofonemas (T) da mucosa uterina.

5.5 Descrição Microscópica do Útero

A parede uterina é formada por três camadas concêntricas: adventícia, muscular e mucosa (Figura 17 A). A camada adventícia é constituída por tecido conjuntivo frouxo vascularizado que reveste todo o útero externamente. A camada muscular representa a camada mais espessa da parede uterina e é formada por músculo liso organizados em duas subcamadas com feixes musculares dispostos em sentidos opostos (Figura 17 B). Mais internamente, a mucosa uterina é a camada em contato com a luz do órgão da qual se desenvolvem os trofonemas.

De forma geral, os trofonemas consistem de um “recheio” de tecido conjuntivo frouxo revestido por um epitélio cilíndrico simples. O tecido conjuntivo frouxo é uma extensão da lâmina própria e contém um feixe central de células musculares lisas, além de fibroblastos, células de defesa e capilares sanguíneos (Figura 17 C). Dentre as espécies, observou-se ainda, algumas variações na disposição das células epiteliais, bem como no grau de vascularização tanto na superfície quanto no interior do trofonemata.

Para *P. orbignyi* e *P. motoro* não grávida, o trofonemata é revestido por um epitélio cilíndrico simples com núcleos na posição basal e porção mediana e apical com secreção evidente voltada para a luz do útero. Os capilares sanguíneos tanto no tecido conjuntivo frouxo que preenche o trofonemata quanto os localizados na superfície da mucosa são menos evidentes e calibrosos (Figura 18 A). Em *P. scobina* o epitélio cilíndrico de revestimento apresentou organização glandular, com glândulas tubulares simples, alongadas, paralelas uma das outras e separadas por

finos septos de tecido conjuntivo cuja extremidade contém capilares poucos calibrosos. A luz dessas glândulas se abre na superfície da mucosa uterina, visualizando também capilares no eixo central do trofonemata (Figura 18 B). Em *P. orbignyi*, *Paratrygon aiereba*, *P. sp* “arraia cururu”, todas em estágio de gravidez, o epitélio do trofonemata também se dispôs em arranjo glandular, porém as glândulas tubulares são curtas intercaladas por septos de tecido conjuntivo frouxo que dão suporte a capilares calibrosos dispostos superficialmente e no interior do trofonemata, o tecido conjuntivo frouxo de preenchimento também apresentou vasos bem dilatados (Figura 18 D).

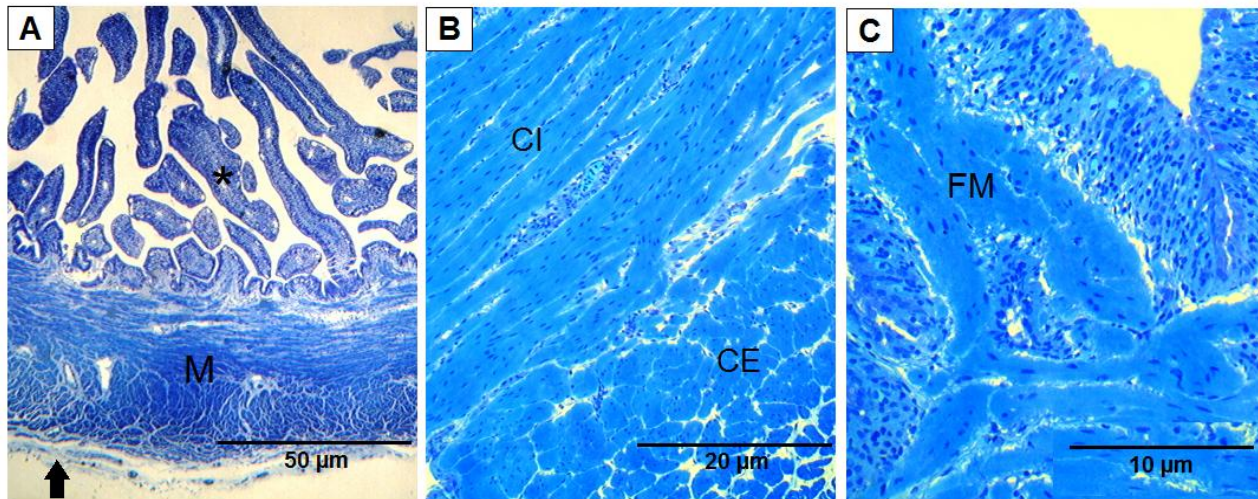


Figura 17. [A] Camada adventícia (seta preta), camada muscular (M) e mucosa uterina formando trofonemata (*). [B] Fibras musculares dispostas em sentidos opostos formando duas camadas: uma externa (CE) e uma interna (CI). [C] Feixe de músculo liso (FM) no eixo do trofonemata – Coloração em Azul de toluidina (0,1%).

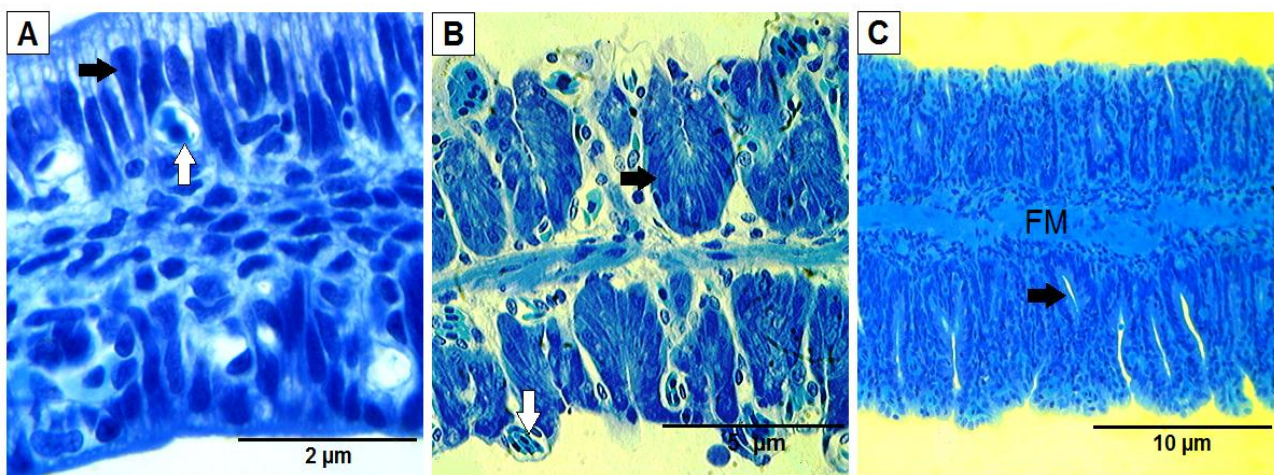


Figura 18. [A] Trofonemata com células cilíndricas (seta branca) e vasos pouco dilatados (seta preta). [B] Células epiteliais de trofonemata em organização glandular (seta preta) com vasos dilatados superficiais (seta branca). [C] Células em organização glandular alongadas (seta preta) sem visualização de vasos sanguíneos – Coloração em Azul de Toluidina (0,1%).

Em teste de coloração histoquímica para a identificação de células secretoras de glicoproteínas neutras (oxidação com ácido periódico e reação de Schiff, PAS) e glicoproteínas ácidas (Azul de Alcian em pH 2,5, AB-pH2,5), o trofonemata caracterizou-se pela ausência de células secretoras de glicoproteínas ácidas (reação AB-pH 2,5-negativa), e com pouco teor de mucinas neutras (fracamente PAS-positiva) (Figura 18 A e B).

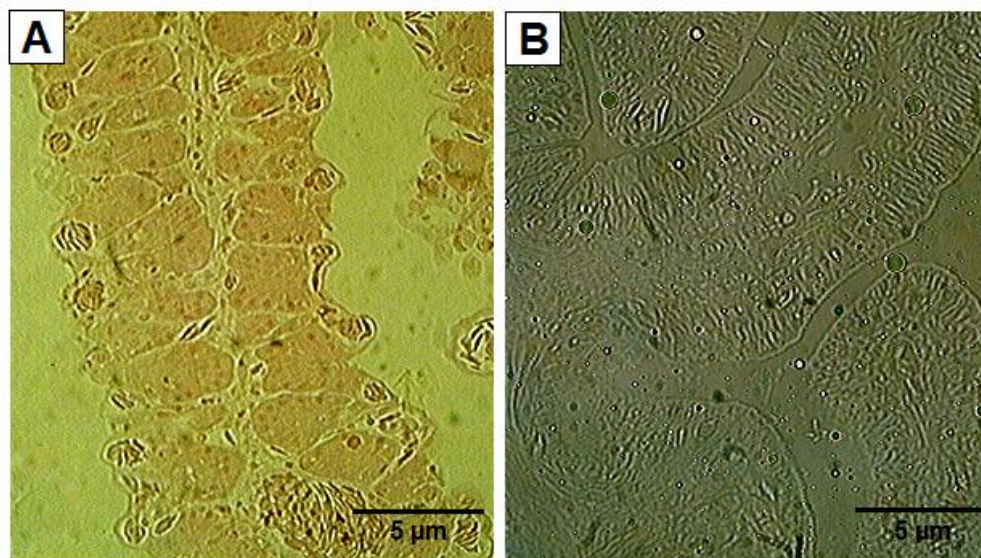


Figura 19. [A] Trofonemata corado em PAS. [B] Trofonemata corado em Azul de Alcian pH 2,5.

5.6 Fecundidade Ovariana e Uterina

A fecundidade ovariana para os dois lados de cada exemplar coletado evidenciou o ovário esquerdo como o lado com maior produção de folículos, enquanto no lado direito, na maioria dos exemplares, não houve folículos visíveis, com exceção de *P. motoro*, o único exemplar que apresentou apenas 1 folículo visível (Tabela IV). Em *Potamotrygon* sp. C, a fecundidade ovariana no lado esquerdo foi em média 4, e não se observou folículos maduros no ovário direito. Nos exemplares em estágio de gravidez, a fecundidade uterina foi de N=4 embriões em *Paratrygon aiereba*, N=2 em *P. orbignyi*, N=4 em *P. motoro* e em média N=2,3 em *P. sp. C* “arraia cururu”. Para a espécie *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu”, utilizando dados de coletas anteriores, observou-se uma equivalência na fecundidade uterina dos dois úteros (direito e esquerdo), com uma proporção média de 0,9:1,1 embrião em cada útero (Tabela V). A fecundidade média total foi de 1,82 embriões por fêmea.

Tabela IV. Fecundidade nos ovários direito (D) e esquerdo (E) e fecundidade uterina das arraias grávidas (*) nos 12 exemplares coletados. (Ldi) Largura do disco e (-) exemplares não grávidos.

Nº	Espécie	Local	Ldi	Fec. Ovariana		Fec. Uterina
				D	E	
1	<i>Paratrygon aiereba</i> *	Rio Jutáí	84	0	0	4
2	<i>Potamotrygon orbignyi</i> *	Rio Jutáí	41	0	3	2
3	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Rio Jutáí	31	0	5	-
4	<i>Potamotrygon scobina</i>	Rio Jutáí	65	0	18	-
5	<i>Potamotrygon motoro</i>	Rio Solimões	39	0	0	-
6	<i>Potamotrygon motoro</i>	Rio Negro	57,5	0	20	-
7	<i>Potamotrygon motoro</i> *	Rio Negro	50	1	7	4
8	<i>Potamotrygon schoroderi</i>	Rio Negro	27,5	0	4	-
9	<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu" *	Rio Negro	20,5	0	0	2
10	<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu" *	Rio Negro	23	0	3	3
11	<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu" *	Rio Negro	23	0	6	2
12	<i>Potamotrygon</i> sp. C "arraia cururu"	Rio Negro	22	0	6	-

Tabela V. Fecundidade uterina (N=11), média $\pm$ desvio padrão, número mínimo (mín.) e máximo (Max.) de embriões no útero direito (L. Direito) e esquerdo (L. Esquerdo) em *Potamotrygon* sp. C “arraia cururu”.

Fecundidade Uterina	Média $\pm$ Desv. Pad	Mín. - Máx.
Útero Direito	0,91 $\pm$ 0,7	0 - 2
Útero Esquerdo	1,09 $\pm$ 0,54	0 - 2

6. DISCUSSÃO

Estudos sobre biologia reprodutiva dos potamotrigonídeos são escassos quando comparados aos representantes marinhos. A maioria dos trabalhos sobre esse tema apenas trazem informações relacionadas ao ciclo reprodutivo, fecundidade uterina e ovariana (Thorson et al., 1983; Charvet-Almeida et al., 2005; Lasso et al., 1996). Apesar dos inúmeros relatos sobre a assimetria ovariana nos potamotrigonídeos (Wourms, 1977; Thorson et al., 1983), ainda não há um consenso se o ovário direito é realmente menor que o esquerdo (Rincon, 2006). Até a presente data, os resultados contidos nesse trabalho representam a primeira descrição detalhada e ilustrada sobre a anatomia e histologia das estruturas e tipos celulares que compõem os ovários e úteros em seis espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae. Além disso, é primeira vez que se utiliza uma

metodologia (Estereologia) para quantificar e comparar, sem viés amostral, o volume dos componentes estruturais dos ovários e órgãos epigonais nos dois lados do animal (direito *versus* esquerdo).

De forma geral, a morfologia básica dos ovários e úteros das arraias estudadas correspondem aos padrões anatômicos e histológicos descritos nas demais arraias marinhas como as famílias Rajidae (Pratt, 1988; Díaz Andrade et al., 2011; Serra-Pereira et al., 2011) e Batoidea (Prisco et al., 2007). Em relação aos potamotrigonídeos, podemos destacar as seguintes observações: (i) os ovários das arraias de água doce estão anatômica e histologicamente associados aos órgãos epigonais; (ii) Em *Potamotrygon* sp. C (arraia cururu), o ovário esquerdo é volumetricamente 55 vezes maior que o direito; (iii) Nessa espécie, o ovário esquerdo é constituído principalmente por corpo lúteo>estroma>folículos atrésicos, enquanto o ovário direito é constituído predominantemente por epitélio germinativo>folículos atrésicos; (iv) o volume de epitélio germinativo no ovário direito é quase 6 vezes maior que o do lado esquerdo; (v) o órgão epigonal ocupa ~ 90% da massa total do tecido ovario-epigonal no lado direito; (vi) ainda assim, o volume do órgão epigonal do lado direito é 4 vezes menor que o esquerdo; (vii) No lado esquerdo, o ovário e órgão epigonal apresentam valores equivalente em termos volumétricos; (viii) Os ovários são constituídos por epitélio germinativo (altamente desenvolvido no ovário direito), estroma ovariano, oogônias e folículos em diferentes estágios de maturação. Porém, folículos maduros, folículos atrésicos e corpo lúteo são observados apenas nas fases madura e gravídica, respectivamente; (ix) o útero direito é ligeira menor que o esquerdo; (x) a parede uterina com cerca de ~ 11 µm de espessura é constituída por duas camadas de tecido muscular liso (externa e interna, organizadas em sentidos opostos); (xi) Os trofonemas se desenvolvem a partir da camada uterina mais interna e o epitélio é caracterizado pela ausência de células secretoras de glicoproteínas ácidas e células que produzem poucos mucopolissarídeos neutros; (xii) Apesar da assimetria ovariana e uterina, em *Potamotrygon* sp. C (arraia cururu) não há diferença na fecundidade entre o útero direito e esquerdo.

O epitélio germinativo ovariano das arraias de água doce (Potamotrygonidae) é semelhante ao da arraia marinha vivípara da família Urolophidae, *Urolophus jamaicensis* (Hamlett et al., 1999), e diferentemente das espécies ovíparas, há ausência de cílios (Díaz Andrade et al., 2009 e Díaz Andrade et al., 2011). O epitélio foi visualizado como o ponto de origem de pequenas células arredondadas (possivelmente oogônias) que formam agregados. Díaz Andrade et al. (2009) e (Díaz Andrade et al. (2011), descrevem as oogônias, em *Sympterygia acuta* e *Sympterygia bonapartii*, como células com ~ 20 µm de diâmetro, encontradas apenas em exemplares imaturos e em maturação, com núcleo grande e evidente organizadas em agrupamentos como ninhos próximos ao epitélio ovariano. Tais características celular foram encontradas em todos exemplares desse trabalho, mas com diâmetro de ~ 0,91 µm. No entanto, para a identificação desse tipo celular, a

principal evidência a ser encontrada deve ser a diploidia, caráter evidenciado com uso de marcadores imuno-histoquímicos. Infelizmente, tal método não foi utilizado nas amostras de potamotrigonídeos. Dessa forma, observa-se uma difícil caracterização das oogônias utilizando técnicas histológicas, correspondendo a falta de citação dessas células em artigos de descrição histológica da foliculogênese, sendo apenas citadas as características a partir do folículo primordial.

A foliculogênese, normalmente caracterizada em 4 estágios (Díaz Andrade et al., 2009; Chatchavalvanich e Visuttiapat, 1997; Hamlett et al., 1999; Acero et al., 2008; Díaz Andrade et al., 2011; Serra-Pereira et al., 2011). Nos potamotrigonídeos, foram visualizadas 7 estágios: Oogônia, folículos primordial, primário, secundário tipo I, tipo II, tipo III e maduro, onde em cada fase se observa o aumento em dobro do tamanho folicular. Além disso, com o surgimento das células globosas secretoras de glicoproteínas neutras (PAS+), algumas gotículas de lipídios passam a ser depositados no citoplasma, onde mais tarde, com a vascularização da teca folicular, a vitelogênese se intensifica para a grande armazenagem de vitelo (Prisco et al., 2007).

Registros da formação do corpo lúteo em elasmobrânquios são bem antigos (Hisaw e Hisaw, 1959). Mas os aspectos do desenvolvimento desse corpo ovariano ainda são controversos. Para a maioria dos vertebrados, a gestação é mantida pela presença do hormônio progesterona, secretado pelo corpo lúteo que se forma a partir da camada folicular pós-ovulatória (Gemmell, 1995; Bowen-Shauver e Telleria, 2003). Portanto, o corpo lúteo assume um aspecto glandular, secretando progesterona para a corrente sanguínea dos vasos adjacentes, ocupando grande espaço no ovário e que com o tempo regride até desaparecer (Bacarri, et al., 1992; Chatchavalvanich e Visuttiapat, 1997; Díaz Andrade et al., 2009; Díaz Andrade et al., 2011). No caso das arraias, a múltipla ovulação desenvolve um corpo lúteo para cada óvulo liberado que, no entanto, não são sincronizados. Nos potamotrigonídeos, foram observados corpos lúteos apenas no lado esquerdo, um deles apresentando grandes dimensões, enquanto outros aparentavam um estágio de regressão ou mesmo em formação. Isso sugere uma não simultaneidade das ovulações e uma longa manutenção da secreção hormonal.

Na atresia, os níveis sanguíneos de vitelogenina, indicam o retorno do vitelo para o fígado (Craik, 1978). Isso corresponde ao aumento da vascularização, a presença de infiltrado sanguíneo trazendo macrófagos para a degeneração celular e proximidade das vilosidades da camada folicular como um esvaziamento do lipídio estocado. Dessa forma, quando um folículo não é ovulado, o fenômeno da atresia se caracteriza pela regressão, desorganização, degeneração e morte celular, com o objetivo principal de absorver as substâncias investidas como reserva energética para a formação do embrião (Bacarri, et al., 1992; Díaz Andrade et al., 2011). Todavia, o volume de folículos atrésicos quantificados principalmente para o lado esquerdo, gera dúvidas a respeito da necessidade de grande investimento energético em produção de numerosos folículos, os quais podem não ser fecundados.

Nos úteros, a musculatura circular em duplo sentido da parede uterina proporciona uma ampla expansão multidirecional para o alocamento dos embriões. Os diferentes tipos morfológicos dos trofonematas, formados com um eixo de músculo liso, revelam curiosamente uma estrutura de que no estágio de gravidez assume morfologia e fisiologia glandular. Além disso, diferentemente aos trofonematas de espécies ovíparas como do tubarão *Mustelus antarcticus* (Storrie et al., 2009), os tipos celulares observados em Potamotrygonidae podem não sintetizar, acumular e secretar mucinas ácidas. Na verdade, são capazes apenas produzir uma pequena quantidade de mucinas neutras. É bem provável que essas células possam secretar substâncias lipídicas, como se é descrito na literatura para a formação do leite uterino (Hamlett & Koob, 1999).

Assimetria ovariana é considerada uma característica comum entre os Myliobatiformes (Wourms, 1977). A assimetria ovariana nas arraias de água doce da família Potamotrygonidae é ainda objeto de grandes controvérsias na literatura especializada. Até o presente momento, nenhum autor quantificou e/ou comparou os ovários (direito e esquerdo). Porém, a maioria dos autores considera apenas o ovário esquerdo como funcional (Wourms, 1977; Thorson et al., 1983; Lasso et al., 1996). A única exceção foi descrita para *Potamotrygon magdalenae* (uma arraia endêmica da bacia Atrato-Magdalena na Colômbia onde ambos os ovários são igualmente funcionais (Teshima e Takeshita, 1992). De fato, o ovário direito é menor e normalmente não possui folículos maduros visíveis. Por outro lado, no ovário esquerdo desenvolvem-se numerosos folículos anatomicamente visíveis. Na arraia cururu (*Potamotrygon* sp. C, uma arraia ainda não descrita e endêmica da região do Médio Rio Negro) o ovário direito é 55 menor que o esquerdo em termos volumétricos. O órgão epigonal ocupa proporcionalmente uma fração significativa maior (>90%) da massa tecidual do lado direito. No entanto, apesar de volumetricamente pequeno, o ovário direito é composto basicamente de epitélio germinativo (90%). Comparativamente, o ovário direito possui cerca de 6 vezes mais epitélio germinativo que o lado esquerdo. Como discutido anteriormente, as oogônias originam-se no epitélio germinativo. Isso sugere um imenso potencial para formação de folículos no ovário direito. No entanto, estes achados não têm suporte nos dados de fecundidade ovariana.

A fecundidade ovariana é uma estimativa do potencial reprodutivo quando se contabiliza o número de folículos maduros visíveis. Em geral, nos potamotrigonídeos a fecundidade ovariana é ligeiramente menor que a fecundidade uterina. Charvet-Almeida et al. (2005) relatam que a fecundidade ovariana varia de 1-11, enquanto que a uterina de 1-16 em 7 espécies de potamotrigonídeos. Mas esse aspecto considera apenas a fecundidade no ovário esquerdo. Enquanto os folículos maduros visíveis no ovário esquerdo são usados como critério para quantificar o potencial reprodutivo, tais folículos aparentemente não podem justificar a fecundidade uterina observada no lado direito do animal, o qual surpreendentemente igual à do lado esquerdo. Na arraia cururu, a despeito da assimetria na fecundidade ovariana de 0:4 (direito:esquerdo), a fecundidade

uterina foi de 0,9:1,1 (direito:esquerdo). Ainda que o ovário direito seja volumetricamente menor que o esquerdo e não apresente folículos visíveis, a presença de embriões no útero direito com a mesma frequência do esquerdo sugere que os dois ovários são igualmente funcionais, pois o potencial reprodutivo não pode ser mensurado apenas por meio de critérios quantitativos, tais como número de folículos maduros visíveis. Isso sugere que um grande número de folículos maduros pode ser reabsorvido. Outra explicação para essa curiosa observação pode estar no fato que a fecundação realmente ocorre no lado esquerdo do animal, porém a implantação acontece no útero direito.

Assim, esses aspectos parecem um padrão reprodutivo bem definido dentro da família Potamotrygonidae e que, certamente, esses aspectos têm provocado discussões contraditórias sobre a biologia reprodutiva das arraias de água doce. Contudo, enfatizamos a necessidade de mais dados para assegurarmos tais observações.

7. PERSPECTIVAS

- (i)** Considerando que os ovários são órgãos volumetricamente assimétricos em *Potamotrygon* sp. C (arraia cururu), conforme dados estereológicos, faz-se necessário utilizar a mesma metodologia em diferentes espécies de potamotrigonídeos para estabelecer se esses achados representam um padrão comum dentro da família;
- (ii)** Utilizar marcadores de apoptose (técnica do TUNEL) e de proliferação celular (Imunohistoquímica pelo PCNA) como ferramenta para entender os meios pelos quais os ovários tornaram-se assimétricos;
- (iii)** Comparar a morfologia reprodutiva de fêmeas em diferentes períodos reprodutivos;

8. BIBLIOGRAFIA

- ACERO, A.; GRIJALBA-BENDECK, M.; MORENO, F; ACEVEDO, K. & GONZÁLEZ, E. 2008. Histología comparada del sistema reproductivo de cuatro especies de rayas caribeñas (Chondrichthyes: Batoidea). *Revista Academica Colombiana de Ciencias*, 32 (125): 571-586.
- ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA M. P. & PEREIRA, H.. 2004. Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20 info 08:1-6 <http://www.cites.org/common/cttee/animals/20/E20-inf-08.pdf>.
- BABEL, J. S. 1967. Reproduction, Life History, and Ecology of the Round Stingray, *Urolophus Halleri* Cooper. Fish Bulletin 197, Online Archive of California, http://www.oac.cdlib.org/view?docId=kt6t1nb1vn&brand=oac4&doc.view=entire_text.
- BACCARI, G. C.; MINUCCI, S. D.; MATTEO, L. & CHIEFFIT, G. 1992. Ultrastructural Investigation of the Corpora Atrética of the Electric Ray, *Torpedo marmorata*. *General and Comparative Endocrinology*, 86: 72-80.
- BOWEN-SHAUVER, J. M. & TELLERIA, C. M. 2003. Luteal regression: a redefinition of the terms. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 (28): 1-3.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. 2003. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Checklist of freshwater fishes of South and Central America. Reis, R. E.; Ferraris, C. J.; Kullander, S. O. (eds) Editora da Pontificia Universidade Católica, Porto Alegre, 22-29 p.
- CARVALHO, M. R. & LOVEJOY, N. R. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, 2776: 13-48.
- CASTEX, M. N. & MACIEL, I. 1965. Hallazgo del *Potamotrygon brumi* (Devicenzi y Teague 1942) en aguas de Santa Fé (Argentina). In: M.N. Castex and I. Maciel (eds), *Notas sobre la familia Potamotrygonidae Garman, 1913*, Publicación Técnica No. 14. Dirección General de Recursos Naturales, Provincia de Santa Fé.
- CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G. & ALMEIDA, M. P. 2005. Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Patamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35: 165-171.
- CHATCHAVALVANICH, K.. & VISUFFIPAT, R. 1997. Gross and Microscopic Structures of the Female Reproductive System in the Whip-tail Stingray (*Dasystis bleekeri*). *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 2 (1): 47-55.

- COMPAGNO, L. J. V. & COOK, S. F. 1995. The exploration and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: Oettinger, M.I.; Zorzi, G.D. (eds.). The Biology of Freshwater Elasmobranch. *Journal of Aquaculture & Aquatic Science*, 7: 62-90.
- CRAIK, J. C. A. 1987. Plasma levels of Vitellogenin in the Elasmobranch *Scyliorhinus anicula* L. (lesser spotted dogfish). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 60: 9-18.
- DÍAZ ANDRADE, M.; GALÍNDEZ, E. & ESTECONDO, S. 2009. The ovary of the bignose fanskate *Sympterygia acuta* Garman, 1877 (Chondrichthyes, Rajidae) in the Bahía Blanca estuary, Argentina: morphology and reproductive features. *Brazilian Journal of Biology*, 69: 405-13.
- DÍAZ-ANDRADE, M. C.; GALÍNDEZ, E. J.; LÓPEZ-CAZORLA, A. & ESTECONDO, S. 2011. Ovarian Folliculogenesis in the Smallnose Fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes, Rajidae) *International Journal of Morphology*, 29 (1): 174-181.
- GARRONE NETO, D. 2010. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de raias (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5 (1): 101-111.
- GEMMELL, R. T. A. 1995. Comparative Study of the Corpus Luteum. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 303-12.
- GUNDERSEN, H. J. G. & JENSEN, E. B. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147: 229-263.
- HAMLETT & T. J. KOOB. 1999. Female reproductive system, em: Sharks, Skates, and Rays: the Biology of Elasmobranch Fishes. W.C. Hamlett (ed.). *The Johns Hopkins University Press*, Baltimore, 398-433.
- HISAW FL Jr, HISAW FL. 1959. Corpora lutea of elasmobranch fishes. *Anatomical Records*, 135: 269-77.
- HOWARD, C. V. & REED, M. G. 2005. Unbiased stereology. Advanced Methods. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- LASSO, C. A.; RIAL, A. B. & LASSO-ALCALÁ, O. 1996. Notes on the biology of the freshwater stingrays *Paratrygon aiareba* (Müller and Henle, 1841) and *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua, Journal of Ichthyology: Aquatic Biology*, 2 (3): 39-52.
- LUTTON, B. V., & CALLARD, I. P. 2008. Morphological relationships and leukocyte influence on steroid production in the epigonal organ-ovary complex of the skate, *Leucoraja erinacea*. *Journal of Morphology*, 269, 620-629.
- PRATT, H. L. Elasmobranch gonad structure: a description and survey. *Copeia* 1988: 719-729, 1988.

- PRISCO, M., LOREDANA, R. and PIERO, A., 2007. Ultrastructural studies on developing follicles of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 61, no. 1, p. 78-86.
- ROSA, R.S. 1985. *A systematic revision of the South American Freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)*. A dissertation presented to the Faculty of the school of Marine Science the college of William and Mary in Virginia. 523pp.
- ROSA, R. S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C. C. D. 2010. Biology of the South American Potamotrygonid stingrays. In: *Shark and their relatives II: Biodiversity, adaptive physiology and conservation*. Carrier, J. C.; Musick, J. A.; Heithaus, M. R (eds). Editora Taylor & Francis Group, New York. 241-286 p.
- RINCON, G., 2006. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da Raia de Água Doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no Rio Paraná, Tocantins. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista [Tese de Doutorado].
- SERRA-PEREIRA, B.; FIGUEIREDO, I.; GORDO, L.S. 2011. Maturation of the Gonads and Reproductive Tracts of the Thornback Ray *Raja clavata*, with Comments on the Development of a Standardized Reproductive Terminology for Oviparous Elasmobranchs. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 3(1):160-175.
- STORRIE, M.; WALKER, T.; LAURENSEN, L. & HAMLETT, W. 2009. Gestational morphogenesis of the uterine epithelium of the gummy shark (*Mustelus antarcticus*). *Journal of Morphology*, 270(3):319-36.
- TESHIMA, K., AND K. TAKESHITA. 1992. Reproduction of the freshwater stingray, *Potamotrygon magdalenae* taken from the Magdalena River System in Colombia, South America. *Bulletin of Seikai National Fisheries Research Institute*, 70: 11–27.
- THORSON, T. B., J. K. LANGHAMMER, AND M. I. OETINGER. 1983. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*, 9(1): 3–24.
- WOURMS, J.P. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoologist*, 17:379-410.

9. CRONOGRAMA

Nº	Atividade	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
1	Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Coleta de Campo			X	X	X	X	X						
3	Biometria e Morfometria			X	X	X	X	X	X	X				
4	Elaboração do Relatório Parcial				X									
5	Apresentação Parcial						X							
6	Processamento das amostras para microscopia de luz				X	X	X	X	X	X	X	X		
7														
8	Apresentação em Eventos Científicos							X						
9														
10	Integração dos Resultados							X	X	X	X	X	X	
11	Elaboração do Relatório Final												X	X
12	Apresentação Final													X

10. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

- (i) ECOMORFOMETRIA DE EMBRIÕES A TERMO DE POTAMOTRYGONIDAE (ELASMOBRANCHII) DA BACIA AMAZÔNICA, de autoria de Silva-Maria, I., Cunha, S. L. R., Areosa, V. B. M., Mendes, S. A. B. A., Santos, Y. V. S., Hamdan, N. M. C. e Duncan, W. P. XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Maringá-PA, 2013.
- (ii) MORFOMETRIA BRANQUIAL DOS EMBRIÕES A TERMO DE POTAMOTRYGONIDAE (ELASMOBRANCHII) DA BACIA AMAZÔNICA, de autoria de Silva-Maria, I., Almeida-Correa, T., Maia, S. N., Fernandes, M. N. e Duncan, W. P. XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Maringá-PA, 2013.