



UNNE

Universidad Nacional del Nordeste

TEMA: Caracterización morfológica del tegumento y glándula del veneno en rayas del río Paraná *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Myliobatiformes).

RESIDENTE: Pérez Dante David

TUTOR EXTERNO: Olea Gabriela

TUTOR INTERNO: Flores Quintana Carolina

e-mail: dantedavi.dperez@gmail.com

AREA: Clínica de Pequeños Animales

Índice

Resumen	3
Introducción	4, 5
Objetivos	6
Materiales y Métodos	7, 8
Resultados	9-18
Discusión	19
Conclusiones	20
Bibliografía	21

Resumen:

La producción de toxinas a partir de animales acuáticos es una estrategia importante que garantiza su supervivencia en un ecosistema altamente competitivo. Estos animales producen una enorme cantidad de metabolitos, cuyas combinaciones dan como resultado una gran variedad de estructuras químicas. Las rayas de la familia *Potamotrygonidae* están muy extendidas por los sistemas fluviales de América del Sur que desembocan en el Océano Atlántico. Las mantarrayas tienen de uno a cuatro aguijones venenosos en el dorso de un apéndice caudal alargado en forma de látigo. Las espinas cónicas de vasodentina están retroserradas bilateralmente (con bordes de sierra, con el cartílago cortante apuntando en dirección opuesta al vértice de la columna). El objetivo del presente trabajo fue analizar las características del tegumento de *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Myliobatiformes) a nivel anatómico, histológico e histoquímico, a fin de caracterizar la estructura del mismo y sus glándulas asociadas. El muestreo se realizó en cercanías a la localidad de Corrientes Capital, a orillas del Río Paraná, provincia de Corrientes, República Argentina. Se colectaron un total de 7 ejemplares. Se registró la longitud hocico-cloaca de cada ejemplar, y se realizó la toma de muestra en la zona dorsal del lomo y cola. Con los fragmentos de tegumento de la región dorsal previamente fijados en Solución de Bouin y conservados en formol bufferado al 10% se procedió a la elaboración de preparados histológicos para análisis histológico e Inmunohistoquímico. Histológicamente se observó que el tegumento se encuentra constituido por una epidermis, dermis e hipodermis. Las células secretoras del veneno localizadas también en el epitelio de la epidermis tienen una forma alargada y presentan vesículas fusiformes en el interior de su citoplasma. Además podemos encontrar células epiteliales no especializadas en la producción de veneno, estas tienen una forma redondeada y se caracterizan por ser células mucosas. Estos resultados demuestran que en las rayas del género *Potamotrygon* las células y glándulas secretoras de veneno se distribuyen por todo el epitelio de la dermis lo que demuestra que no está formada por una sola glándula en sí. Esta distribución celular supone una estrategia de defensa además de estar relacionado con los ambientes donde habitan estos animales.

La producción de toxinas a partir de animales acuáticos es una estrategia importante que garantiza su supervivencia en un ecosistema altamente competitivo. Estos animales producen una enorme cantidad de metabolitos, cuyas combinaciones dan como resultado una gran variedad de estructuras químicas (Russell, 1971). A pesar de que se han avanzado los estudios sobre venenos de animales terrestres, existen pocos informes relacionados con el de los peces. En América del Sur, se ha prestado especial atención al veneno del pez *Thalassophryne nattereri*, el cual presenta varias actividades biológicas, bioquímicas y farmacológicas caracterizadas (Lopes-Ferreira *et al.*, 2004).

Las rayas de la familia *Potamotrygonidae* están muy extendidas por los sistemas fluviales de América del Sur que desembocan en el Océano Atlántico. Si bien algunos miembros de la otra familia de rayas pueden completar todo su ciclo de vida en agua dulce (Compagno y Roberts, 1982, Johnson y Snelson, 1996), se considera que las mantarrayas potamotrigónidas son el único grupo de elasmobranquios que se ha desarrollado exclusivamente en aguas dulces (Lovejoy, 1996). Algunas especies de *Potamotrygonidae* son endémicas del medio acuático dulce más extremo del Brasil, del río Paraná, del río Tocantins y de sus afluentes, y provocan frecuentes accidentes humanos. Las mantarrayas tienen de uno a cuatro aguijones venenosos en el dorso de un apéndice caudal alargado en forma de látigo. Las espinas cónicas de vasodentina están retroserradas bilateralmente (con bordes de sierra, con el cartílago cortante apuntando en dirección opuesta al vértice de la columna). La misma está envuelta por una vaina tegumentaria con un surco glandular ventrolateral que contiene glándulas venenosas a lo largo de cada borde (Halstead, 1970). La columna vertebral suele estar cubierta por una película de veneno y moco.

El tegumento en la región caudal presenta células especializadas que forman capas intermedias características en la epidermis que rodea la cola y todo el aguijón. Las capas epidérmicas más externas, así como las capas internas basales están formadas por células redondeadas similares a las células que componen la mayor parte de la epidermis de las especies marinas, presentando un citoplasma lleno de gránulos de secreción (Pedrozo, et al., 2007). Las capas especializadas son más prominentes en la región de los surcos ventrolaterales y, al igual que en las especies marinas, sus células se caracterizan por el

mismo tipo de vesículas citoplásmicas fusiformes. Además de estas capas de células especializadas, en la región epidérmica apical, existen grandes células secretoras en forma de matraz que están conectadas al exterior. Estas células secretoras también están presentes en la epidermis de otras partes del cuerpo de los animales, especialmente en la piel dorsal, donde aparecen en gran número (Pedrozo, et al., 2007).

Los venenos de animales se han vuelto invaluable como herramientas farmacológicas y para el desarrollo de fármacos basados en venenos (King, 2005). Sin embargo, un desafío importante de la línea de desarrollo de fármacos es la alta variabilidad inter e intraespecífica de la composición y toxicidad del veneno. La variabilidad intraespecífica suele ser consecuencia de rasgos individuales, patrones de distribución geográfica y etapa de madurez (Charvet et al., 2002). Los cambios en el veneno de los animales impulsados por la madurez son inducidos principalmente por variaciones en la elección de la presa o la presión de la depredación, según el papel del veneno en la alimentación y la defensa, respectivamente. Los ejemplos incluyen cambios relacionados con el cambio de dieta en la composición del veneno de víboras y serpientes de cascabel (Andrade y Abe, 1999, Gibbs et al., 2011) y la pérdida de glándulas venenosas en peces cirujanos adultos (Randall, 1961, Smith y Wheeler, 2006).

Estudios respecto a la composición y efecto del veneno se han realizado en *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi* y *Potamotrygon schroederi* (Lameiras, et al., 2019). Inclusive en la especie en estudio se han realizados análisis comparados del grado de toxicidad en comparación con las especies marinas (Pedrozo, et al., 2007). Sin embargo estudios que detallen la estructura del tegumento y de las glándulas asociadas, como así también de la glándula del veneno son escasos.

Potamotrygon motoro es una especie de pez miliobatiforme de la familia Potamotrygonidae. Se distribuye en las costas del río Uruguay, río Paraná, río Orinoco, Venezuela, y el río Amazonas. Poseen una forma casi circular y varían en tamaño desde un diámetro de unos pocos decímetros, hasta la raya de río de cola corta, de la que algunos de sus ejemplares pueden llegar a medir 2 metros de diámetro. La superficie superior está cubierta de dentículos (escamas con puntas como dientes). Son de color marrón o grisáceo, y con frecuencia tienen patrones distintivos manchados o moteados.

Por lo antes expuesto el presente estudio tuvo como objetivo analizar las características anatómicas tegumentarias de *Potamotrygon motoro*, aspectos histológicos y disposición estructural de los tipos celulares tanto en el tegumento como en la glándula del veneno asociado al aguijón. A fin de aportar información sobre las características tegumentarias de dicha especie y permitir de este modo establecer los patrones de los distintos tipos celulares del tegumento.

Objetivo general;

- Analizar las características del tegumento de *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Myliobatiformes) a nivel anatómico, histológico e histoquímico, a fin de caracterizar la estructura del mismo y sus glándulas asociadas.

Objetivos particulares;

- Caracterizar el tegumento a partir del análisis histológico y la marcación de las células por técnicas histoquímicas, a fin de estudiar su distribución y composición de la secreción para el caso de las células glandulares.

- Caracterizar las glándulas asociadas al aguijón desde un punto de vista histoquímico a fin de establecer la composición y funcionalidad de la misma.

- Analizar el perfil microbiológico asociado a las secreciones mucosas del tegumento de *Potamotrygon motoro*.

- Caracterizar el contenido químico de la glándula del veneno de *Potamotrygon motoro*.

Obtención del material: El muestreo se realizó en cercanías a la localidad de Corrientes Capital, a orillas del Río Paraná, provincia de Corrientes, República Argentina. Se colectaron un total de 7 ejemplares. Se siguió las normas bioéticas nacionales-Disposición ANMAT 5330/97- e internacionales GLP (Good Laboratory Practices), para el uso de animales de experimentación, contando con los protocolos y con la aprobación del CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE.

Los muestreos se realizaron 2 veces por estación para poder contar con el número de ejemplares propuestos. Los mismos fueron muestreados a partir de pesca directa o redes de malla.

Análisis de los individuos: Se registró la longitud hocico-cloaca de cada ejemplar con calibre de 0.01 mm. Para el análisis macroscópico del sistema tegumentario, se realizó la biopsia de cada ejemplar bajo lupa estereoscópica; y se aislaron fragmentos del tegumento del dorso y cola del animal.

Los fragmentos de tegumento de la zona dorsal fueron fijados en Solución de Bouin y conservados en formol bufferado al 10%. Los fragmentos fueron observados bajo lupa estereoscópica y microscopio electrónico de barrido (MEB). La preparación de los ejemplares para MEB se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de deshidratación en soluciones de concentración creciente de Acetona (12.5, 25, 50, 75, 100%), secado a punto crítico y metalizado con oro. Las observaciones fueron realizadas en un Microscopio JEOL JSM-5800 LV perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

Análisis histológico:

Las muestras fueron tomadas en la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Se utilizó un saca bocado, para colectar 4 fragmentos de la región dorsal del tegumento, previa anestesia con Lidocaína al 2%, las mismas fueron colocadas en casetes individuales, fijados en Solución de Bouin y conservados en formol bufferado al 10%. De esta manera se procedió a la elaboración de preparados histológicos siguiendo las técnicas convencionales de deshidratación, inclusión en parafina y coloración. La

deshidratación se realizó en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70, 80 y 96%) y alcohol butílico 100% durante 45 minutos. Se realizó la inclusión en butilo parafina (50% y 50%) durante 12 hs. y 3 baños de parafina de 2 hs. cada uno. Finalmente se confeccionaron tacos y se orientaron las muestras para la obtención de secciones transversales o longitudinales de 5 a 7 micras. Estas fueron obtenidas con Micrótopo Rotatorio tipo Spencer manual. Las muestras fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina y de esta manera se analizaron las estructuras celulares y glandulares presentes en el tegumento de *Potamotrygon motoro*, con Tricrómica de Mallory a fin de poner de manifiesto la presencia de las fibras de colágeno y su distribución en el tegumento de la especie en estudio y reacción histoquímica de PAS y Alcian Blue-PAS para detectar positividad de dichas glándulas y analizar la naturaleza química de sus componentes. Las imágenes fueron capturadas mediante el uso de microscopio, modelo DC-180 de Leica y un sistema de captura de imágenes soportado por el programa IM50 de Leica. La cámara se encuentra acoplada a un microscopio trinocular modelo DMLS de Leica Inc. 86.

Análisis Inmunohistoquímico:

Se reveló la expresión del antígeno de proliferación celular PCNA con la finalidad de detectar eventos de proliferación celular en el tegumento. Para ello se utilizó como anticuerpo primario PCNA origen conejo anti ratón. Se realizó la permeabilización de las membranas celulares por incubación con Tritón X-100 al 1% en PBS (Phosphate Buffered Saline) durante 5 minutos y bloqueo de peroxidasas internas con H₂O₂ al 3% en PBS durante 10 minutos. Previo a la incubación de las muestras con el anticuerpo, se efectuó un bloqueo con 5% de leche descremada en PBS. Luego de lavar el anticuerpo con PBS, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado universal de DAKO (K0679) listo para usar. Se lavó el anticuerpo secundario y se incubó con la estreptavidina conjugada a peroxidasa de Rábano picante (HRP), lista para usar (DAKO K0690) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se reveló la peroxidasa con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) de DAKO (K3468) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Se utilizó hematoxilina como tinción de contraste.

Análisis del perfil microbiológico:

A fin de conocer su microbiota natural y/o patógena, se remitió al Laboratorio de Química Aplicada de FACENA muestras de la secreción de las glándulas de veneno de *Potamotrygon motor* o provenientes de 3 individuos adultos para identificación de microorganismos. Las mismas fueron tomadas mediante punción aspiración y por hisopado. Para el momento del, transporte y preservación de las muestras se utilizó un medio de transporte Stuart. Luego se procedió a la siembra en los medios Agar-Sangre, para permitir el crecimiento de todos los microorganismos con importancia y Agar Levine, medio diferencial y selectivo para aislar y detectar enterobacterias en muestras mixtas. Se las llevo a estufa a 37 °C. A las 24 h se visualizó el crecimiento de los microorganismos. Se realizó una coloración de Gram para observar la morfología. Se utilizaron diferentes pruebas para la posterior tipificación de los microorganismos: la prueba de la catalasa, de hemólisis, de hidrólisis de pyr, coagulasa, TSI, SIM, citrato, urea, lisina hierro agar y también se probó la resistencia a bacitracina. Se realizó la observación cualitativa de los medios de cultivo.

Luego de realizar la toma de muestra el ejemplar fue liberado en el mismo lugar donde fue capturado. A continuación se muestra en el figura 1 los sitios donde fueron tomadas las muestras.

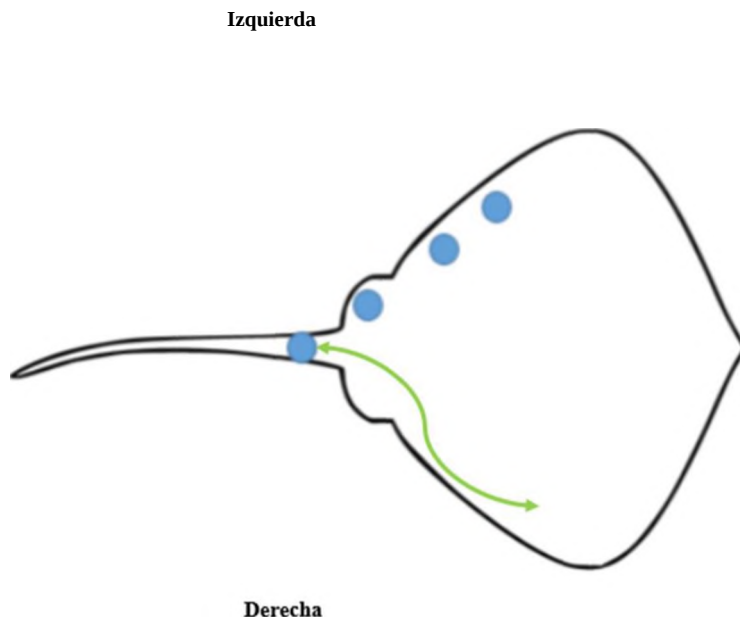


Figura 1.
Regiones donde fue realizada la toma de muestra.
(círculos) Análisis histológico
(flecha) Análisis microbiológico

Análisis Macroscópico:

Los ejemplares de la familia Potamotrigonidae poseen una forma casi circular y varía en tamaño desde centímetros hasta 2 metros. Su coloración en general en el dorso y aletas pélvicas pueden ser gris, marrón o beige, con ocelos de tamaños variables, distribuidos por todo el disco, generalmente tricolores con una mancha central de color amarillo, un anillo intermedio anaranjado y otro anillo negro periférico; cola generalmente con pequeñas manchas circulares, desde su base hasta el aguijón o espina caudal. Una sola hilera dorsal de espinas puntiagudas en la cola, y de una a dos hileras de espinas laterales, desde la base de la cola hasta el aguijón.



Lugar de procedencia	.Tnvpnil n	Nnmhcp _{Hp}	Spvn	Longitud
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	Imagen de la especie Potamotrygon motoro, "vista dorsal)			cm
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	juvenil	IVIZ,	maeiuu	14 cm

Rio Paraná, ciudad de Corrientes	juvenil	M3	hembra	12 cm
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	adulto	M3	hembra	48 cm
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	adulto	M5	macho	35cm
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	Juvenil	M6	macho	20 cm
Rio Paraná, ciudad de Corrientes	adulto	M7	hembra	30cm

Tabla 1: Análisis Biométricos

Análisis Microscopio Electrónico de Barrido

Se observa que el tegumento está conformado por un tipo de escamas de forma poligonal denominas placoides, estas solo se pueden observar en rayas y tiburones, estructuralmente formada por dentina como los dientes de los vertebrados, las mismas son todas del mismo tamaño, y generalmente no crecen en sí, sino que solo se superponen unas con otras (*Fig.2 A*). Este tipo de escama le da una textura rugosa a la piel y ayuda a su deslizamiento normal sobre lugares duros como ser la arena o piedras. Microscópicamente se observan numerosos orificios o también denominadas poros, los cuales son los espacios por donde se secreta el contenido de las células productoras del veneno y otras glándulas asociadas (*Fig.2 B, C, D*). En las muestras tomadas de la región de la cola se pueden observar unas hileras de espinas de distintos tamaños (*Fig.2 E*), y más hacia la región caudal de la cola podemos encontrar el aguijón (vulgarmente conocido con el nombre de chuza), el mismo tienen una longitud de hasta 8 cm por un diámetro menos a 4mm, su punta es afilada y en

sus bordes laterales se pueden observar la presencia de serraciones, la misma actuaría como instrumento de lesión al momento en el que animal reaccione por temor o defensa (*Fig.2 F*).

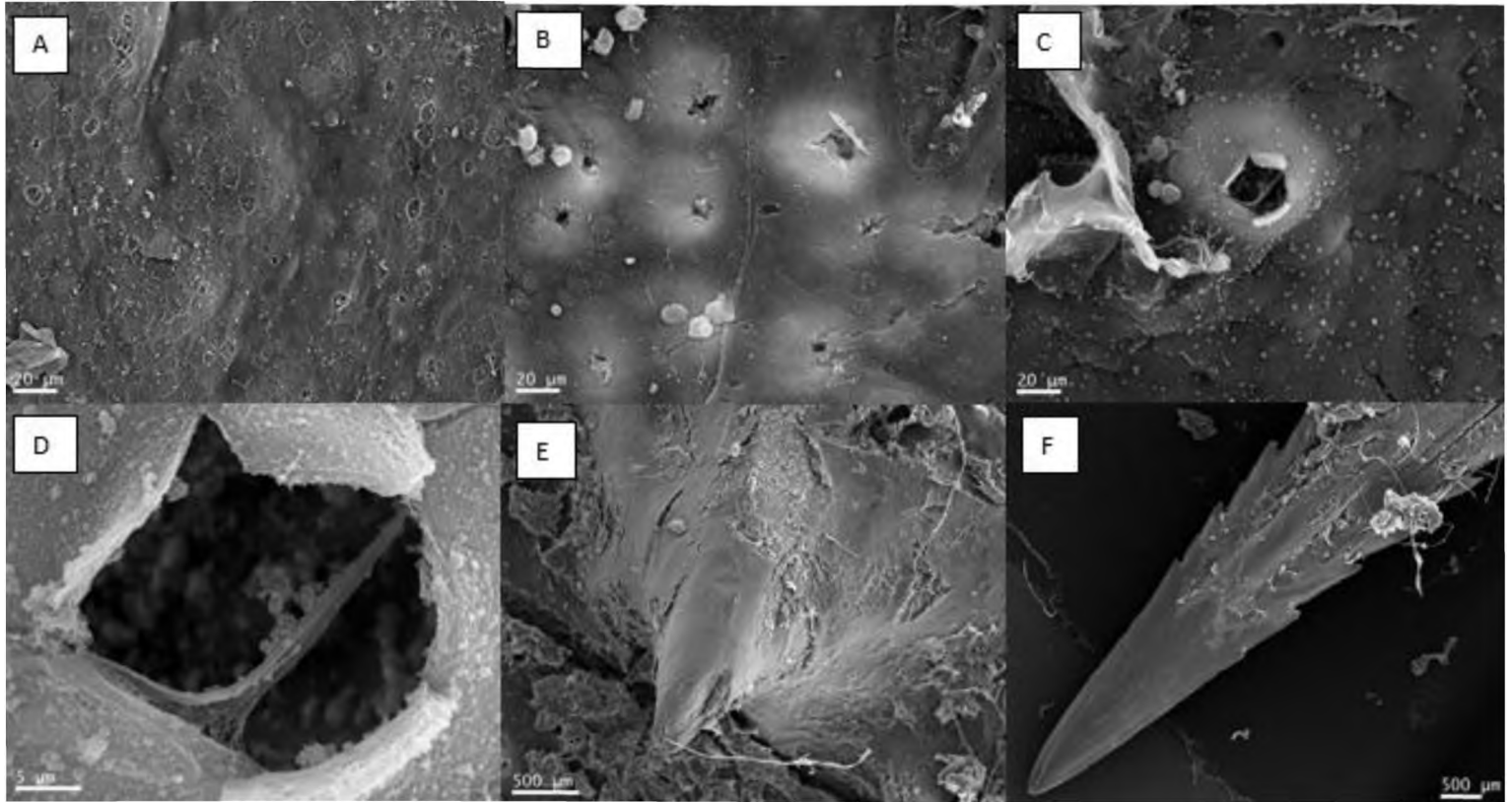


Fig.2 Imágenes Tomadas con Microscopio Electrónico de Barrido

Fig 2.A: Imagen tomada con MEB. en la cual se puede observar las escamas de tipo placoidea.

Fig 2.B: Imagen tomada con MEB. se observa la presencia de poros en el tegumento de *Potamotrygon motora*.

Fig 2.Cy D: Imagen tomada con MEB. se observa un poro con mayor aumento.

Fig 2.E: Imagen tomada con MEB. en la cual se puede observar la presencia de una espina en la cola de *Potamotrygon motora*.

Fig 2.F: Imagen tomada con MEB. en la cual se puede observar una porción del agujón, presente en la cola de *Potamotrygon motora*.

Análisis histológico:

Histológicamente se observó que el tegumento se encuentra constituido por una epidermis, dermis e hipodermis (*Fig 3. A, B, C*). La epidermis constituida de epitelio plano

estratificado no queratinizado podemos encontrar mayoritariamente células epiteliales las cuales poseen una forma redonda y se localizan en la zona basal y apical del tegumento, en la zona intermedia encontramos otros tipos celulares. La misma está separada de la dermis por una fina membrana la cual no contiene células, denominada membrana basal. La dermis constituida principalmente por fibroblastos y fibras de tejido conectivo, la cual provee un medio de sostén, además de estar muy vascularizado lo cual se determinó por la presencia de vasos sanguíneos y eritrocitos nucleados. Cumple con la función de soporte de la piel, además de aportar la nutrición necesaria a la epidermis (*Fig.3 D, F*). También se pudieron observar algunas escamas, las mismas se originan en la dermis, y están cubiertas por la epidermis (*Fig.3 E*). Se continua por debajo una gran capa de músculo, la cual se evidencia que es tejido muscular esquelético dispuesto en varias direcciones. Las células secretoras del veneno localizadas también en el epitelio de la epidermis tienen una forma alargada y presentan vesículas fusiformes en el interior de su citoplasma (*Fig.3 A,B,C*). Estas células se pueden encontrar a lo largo de todo el tegumento de dicha especie, pero mayoritariamente se distribuyen en mayor cantidad cerca de la región dorsal de la cola, en proximidades al agujón. Además podemos encontrar células epiteliales no especializadas en la producción de veneno (*Fig.3 E,F*), estas tienen una forma redondeada y se caracterizan por ser células mucosas de un diámetro promedio de 60 μm , contienen muchos gránulos secretores en su citoplasma que se encargan de secretar mucus compuesto principalmente por mucopolisacaridos el cual fue evidenciado mediante la técnica de coloración PAS (*Fig.3 D*). Otro tipo de estructura encontradas en el epitelio de estos animales son las glándulas secretoras o también conocidas como células en botella porque tienen una forma alargada y una conexión con el exterior del epitelio, pero en general son glándulas grandes que contienen hialinas, con un diámetro promedio de 100 μm (*Fig.3 G, H, I*). Este tipo celular con las demás células presentes en el tegumento forman un tipo de secreción que envuelve a todo el animal, protegiéndolo no solo de factores externos sino de otros tipos de amenaza.

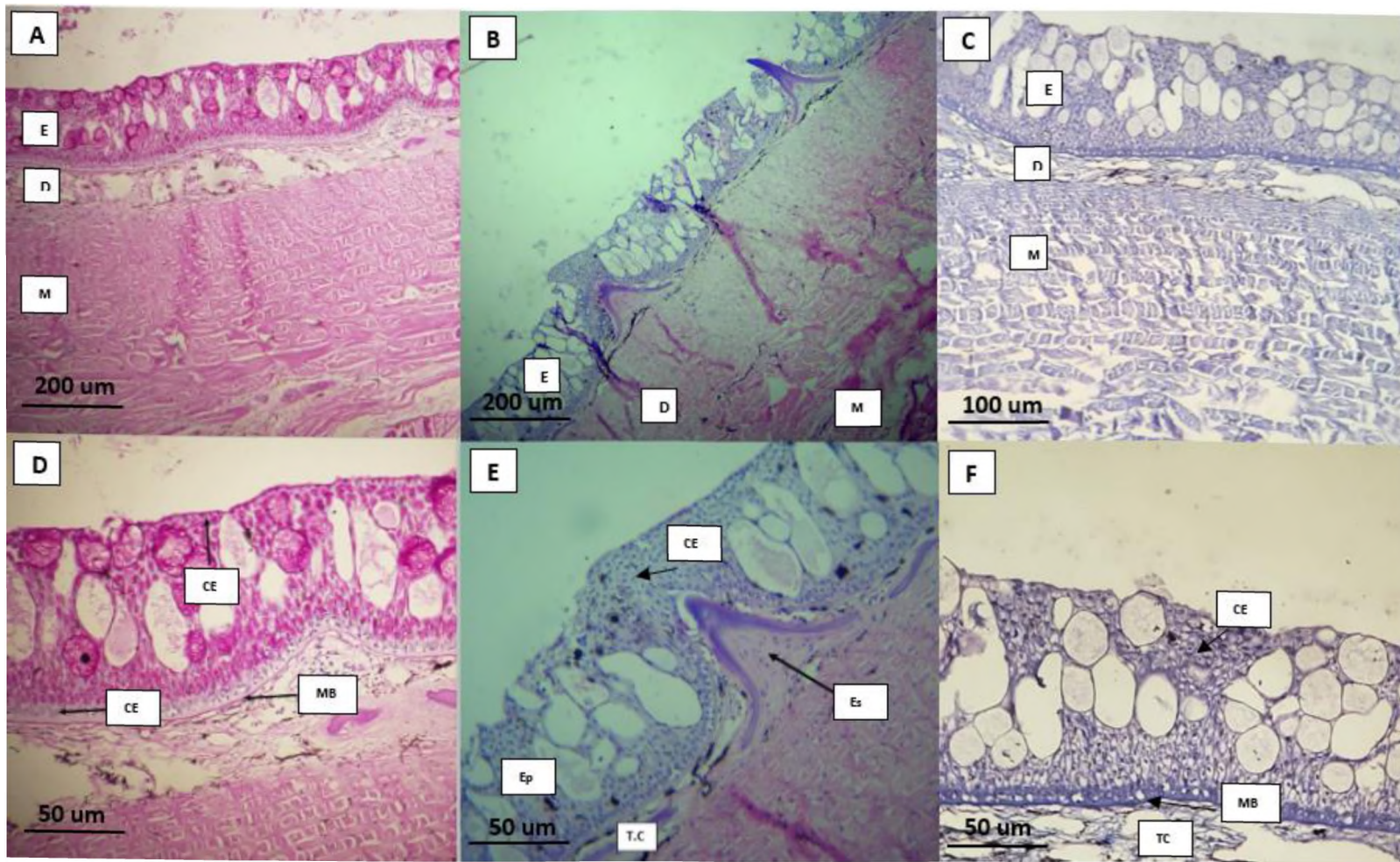


Figura 3: Imágenes tomadas con cámara acoplada a un microscopio trinocular modelo DMLS de Leica Inc. 86.

Fig.3 A: Sección transversal de tegumento donde se puede observar la epidermis (E), la dermis (D) y el tejido muscular (T.M). Coloración: PAS. 10X.

Fig.3 B: Sección transversal de tegumento donde se puede observar la epidermis (E), la dermis (D) y el tejido muscular (T.M). Coloración Hematoxilina/Eosina:. 10X.

Fig.3 C: Sección transversal de tegumento donde se puede observar la epidermis (E), la dermis (D) y el tejido muscular (T.M). Coloración: Mallory. 10X.

Fig.3 D: Se observa en la epidermis las células epiteliales (C.E), tanto en la región apical como en la basal, las cuales asientan sobre una membrana basal (M.B). Coloración: PAS. 40X

Fig.3 E: Se observa en la epidermis las células epiteliales (C.E), tanto en la región apical como en la basal. También se observa una escama (Es), la cual se origina del tejido conectivo, y está recubierta por el epitelio (Ep). Coloración: Hematoxilina/Eosina. 40X.

Fig.3 F: Se observa en la epidermis las células epiteliales (C.E), tanto en la región apical como en la basal, las cuales asientan sobre una membrana basal (M.B). Coloración: Mallory. 40X

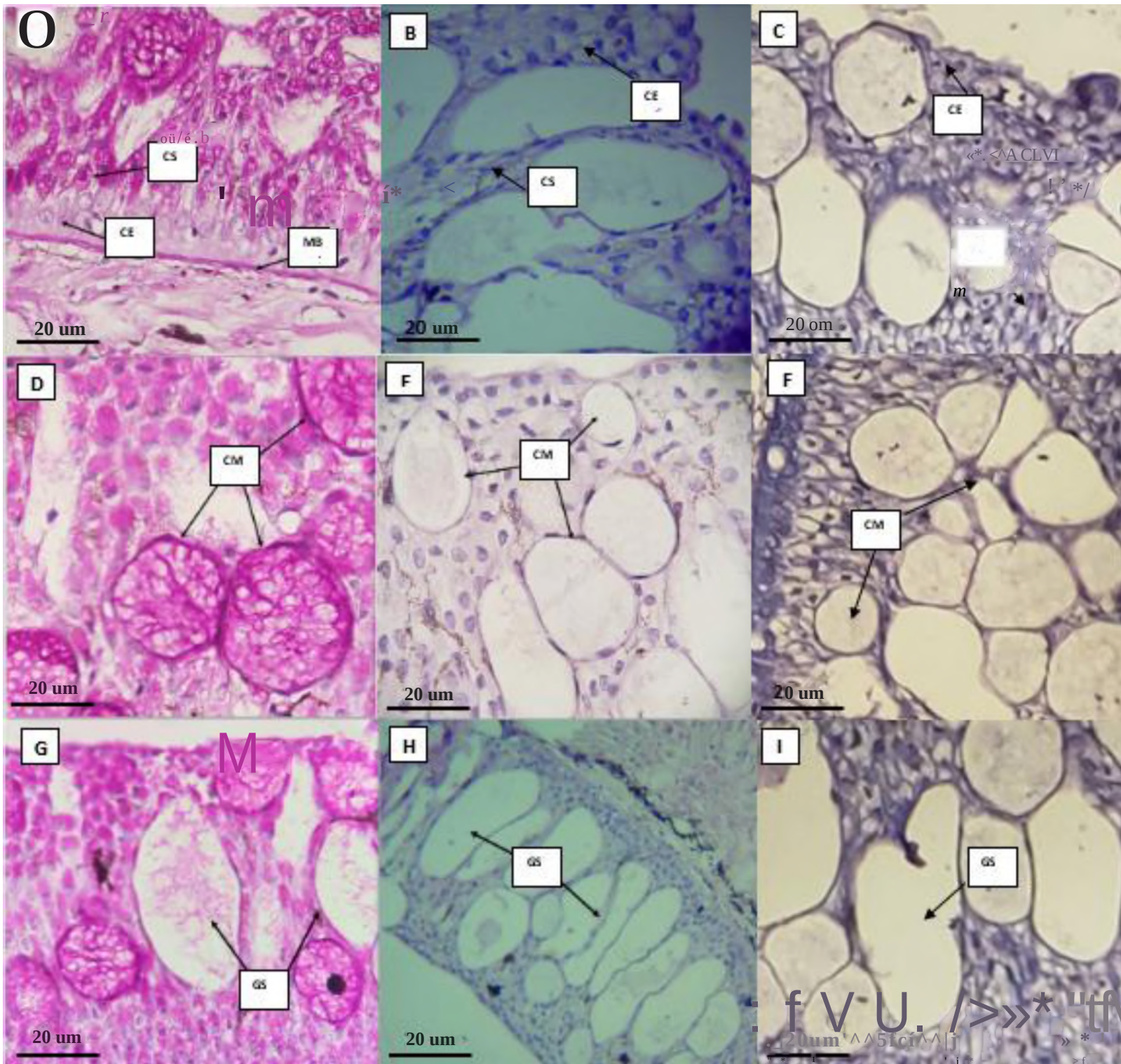


Figura 4: Imágenes tomadas con cámara acoplada a un microscopio trinocular modelo DMLS de Leica Inc. 86.

Fig.4 A: Se observan las células secretoras del veneno (C.S), en la parte media del epitelio. Células epiteliales (C.E) y una membrana basal (M.B). Coloración: PAS 40X.

Fig.4 B: Se observan las células secretoras del veneno (C.S), en la parte media del epitelio. Células epiteliales (C.E). Coloración: Hematoxilina/Eosina 40X.

Fig.4 C: Se observan las células secretoras del veneno (C.S), en la parte media del epitelio. Células epiteliales (C.E). Coloración: Mallory. 40X.

Fig.4 D: Se observan células mucosas (C.M), se puede ver su contenido mediante Coloración PAS. 40X.

Fig.4 E: Se observan células mucosas (C.M). Coloración Hematoxilina/Eosina. 40X.

Fig.4 F: Se observan células mucosas (C.M). Coloración: Mallory. 40X.

Fig.4 G: Sección transversal del tegumento, donde se visualizan glándulas secretoras del veneno (GS). Coloración: PAS. 40X.

Fig.4 H: Sección transversal del tegumento, donde se visualizan glándulas secretoras del veneno (GS). Coloración: Hematoxilina/Eosina.. 40X

Fig.4 I: Sección transversal del tegumento, donde se visualizan glándulas secretoras del veneno (GS). Coloración: Mallory. 40X

Análisis del Perfil Microbiológico:

Luego de haber realizado la toma de muestra, a las 24 horas se observó el crecimiento de microorganismos Beta-hemolíticos (*Fig.4 A*), el paso siguiente fue realizar una coloración de Grant.

Todas las cepas fueron visualizadas con esta tinción para determinar su morfología, características tintoriales y agrupación. Se observaron bacilos Gram negativos.(F/g.-/ *B*)

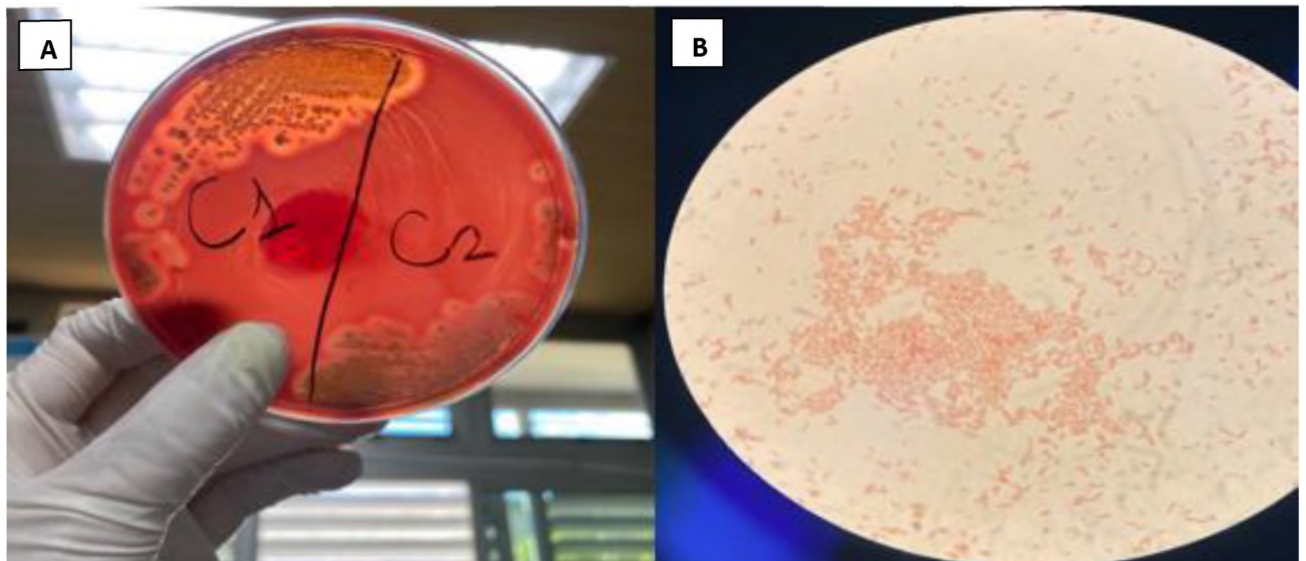


Fig.4 A : Crecimiento de colonias bacterianas

Fig.4 B: Bacilos Gram negativos observados con microscopio electrónico.

Los resultados de las pruebas de tipificación de presentan en la tabla 2. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y utilizando tanto controles positivos como negativos.



PRUEBAS	GRAM	CATALASA	OXIDASA	TSI	SIM	DNASA	CITRATO	LISINA HIERRO AGAR	COMPATIBLE CON
MUESTRAS DE TEGUMENTO	BACILOS GRAM NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVA	A/A	NEGATIVO POSITIVO POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	K/A	<i>Aeromona spp.</i>

Tabla 2: resultados de a prueba de tipificación

El género *Aeromonas* (aer, del griego: gas; monas, unidades; unidades productoras de gas), de acuerdo con la edición más reciente del Manual de Bergey (MartinCamahan y Josph, 2005), pertenece a la Clase de las Gammaproteobacterias, Orden Aeromonadales, Familia Aeromonadaceae, que en la actualidad incluye 3 géneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tulomonas* (Manual de Bergey, 2ªed.). Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa generalmente positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y mayoritariamente resistentes al factor vibriostático 0/129 (2,4-Diamino-6,7- diisopropilpteridina fosfato).

Análisis Inmunohistoquímico:

Se pudo inmunodetectar la proliferación de las células presentes en el epitelio, tanto células productoras del veneno, como células mucosas, dicho evento se evidenció a partir de la inmunodetección positiva de la proteína de proliferación celular PCNA en los núcleos de dichas células (*Fig. 5 B, C*)

El mayor número de células positivas se vio en el estrato basal de la epidermis; ya que la zona apical es donde se produce el continuo recambio celular (*Fig.5 A*).

El control negativo no dio inmunodetección positiva en ningún tipo celular.

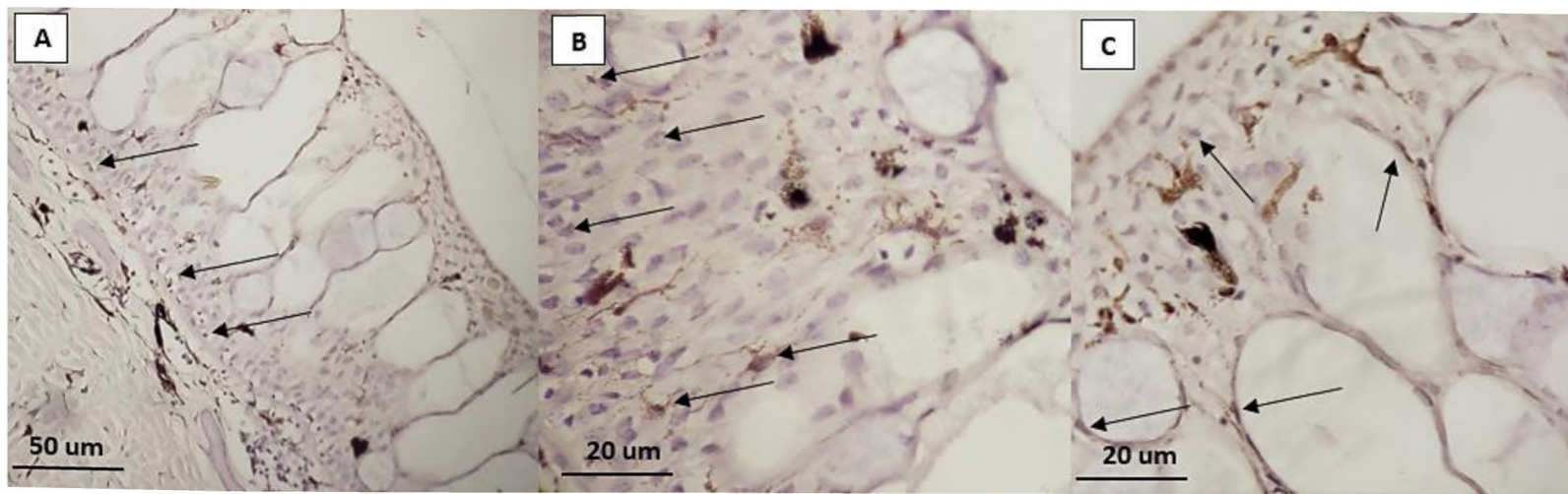


Fig. 5 Imágenes tomadas con cámara acoplada a un microscopio trinocular modelo DMLS de Leica Inc. 86

Fig.5 A: Sección transversal del tegumento, la flecha marca las células proliferativas en la zona basal.

Fig.5 B y C: Sección transversal del tegumento, la flecha marca la proliferación de células productoras del veneno y las células mucosas.

El presente trabajo permitió evidenciar que *Potamotrygon motoro* presenta un sistema tegumentario semejante al descrito para otras especies de rayas, tanto las de agua dulce como las de agua salada. La ubicación y características externas de la piel coinciden con lo descrito por otros autores para las rayas de río. (DEHGHANIC/ *al.*, 2010; PEDROSO *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos constituido por una epidermis, dermis e hipodermis. En la epidermis podemos encontrar mayoritariamente células epiteliales y otros tipos celulares como las células mucosas y las células glandulares tal como se describen en el presente trabajo.

Estos resultados demuestran que en las rayas del género *Potamotrygon* las células y glándulas secretoras de veneno se distribuyen por todo el epitelio de la epidermis lo que demuestra que no existe una sola glándula como en serpientes. Esta distribución celular supone una estrategia de defensa además de estar relacionado con los ambientes donde habitan estos animales.

Con respecto al análisis del perfil microbiológico podemos decir que las bacterias del género *Aeromonas* son consideradas autóctonas del medio acuático y han sido aisladas de ríos, lagos, agua de mar, agua potable y aguas residuales tratadas y no tratadas. Además, *Aeromonas* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, pudiendo recuperarse en animales, principalmente peces (sanos o enfermos), siendo capaces de producir grandes epidemias en piscifactorías y en consecuencia son responsables de producir grandes pérdidas económicas en acuicultura.

Existen varios estudios que han detectado altas concentraciones de *Aeromonas*, tanto aguas residuales tratadas y no tratadas, y que consideran que esta es la posible vía de diseminación de estos microorganismos a diversos tipos de alimentos, como por ejemplo verduras, peces y mariscos, destinados al consumo humano (Ginestrea, M. *et al* 2005). Debido a que algunos de estos son consumidos principalmente crudos o escasamente cocidos, la presencia de estas bacterias, potencialmente patógenas, podría tener impacto en la salud pública, lo que hace necesario la rápida y correcta detección e identificación de esta bacteria.

Además este estudio permitirá realizar un análisis comparativo con ejemplares de diferentes edades y de otras especies, ya que según la bibliografía consultada este patrón tegumentario se repite en todas las especies de rayas y mantarrayas, a su vez se podrá determinar las características químicas del veneno, y como actúa a nivel muscular y sistémico.

Conclusiones:

En base a lo expuesto, se pudo cumplir mayoritariamente con todos los objetivos propuestos en el plan de trabajo.

De los objetivos antes mencionados se logró caracterizar a todas las células presentes en el tegumento de *Potamotrygon motoro*, también el tipo de secreción que producen mediante técnicas histoquímicas, y de esta manera determinar que su tegumento está formado por distintos tipos de células especiales y no por una única glándula en si con capacidad de producir el veneno.

Una de las dificultades encontradas fueron los retrasos en conseguir la muestra, y al momento de obtenerla no poder transportarla hasta el laboratorio, ya que algunos animales tenían un tamaño de mediano a grande, a la vez considerando el peso de los mismos. De esta manera la captura al azar dificultó la toma de muestra, ya que era mucho más fácil trabajar con animales de tamaño pequeño.

-
- Andrade, D. V., & Abe, A. S. (1999). Relationship of venom ontogeny and diet in Bothrops. *Herpetologica*, 200-204.
 - Antoniazzi, Marta M.; Benvenuti, LA; Lira, MS; Jared, SGS; Neto, DG; Jared, C. & Barbara, KC Cambios histopatológicos inducidos por extractos del tejido que cubre los agujones de las rayas de agua dulce *Potamotrygon falkneri*. *Toxicón*, v. 57, núm. 2, pág. 297-303, 2011.
 - Charvet-Almeida, P., Araújo, M. L. G., Rosa, R. S., & Rincón, G. (2002). Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News*, 14, 47-51.
 - Compagno, L. J., & Roberts, T. R. (1982). Freshwater stingrays (Dasyatidae) of Southeast Asia and New Guinea, with description of a new species of *Himantura* and reports of unidentified species. *Environmental Biology of Fishes*, 7(4), 321-339.
 - Ginestrea¹, M., Rincón, G., Romero¹, S., Harris, B., Castellano¹, M., & Colina¹, G. (2005). Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 96-99.
 - Halstead, B. W. (1970). Venomous catfish. In *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Vol. III. Vertebrates* (p. 149). US Government Printing Office Washington, DC.
 - Johnson, M. R., & Snelson Jr, F. F. (1996). Reproductive life history of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina* (Pisces, Dasyatidae), in the freshwater St. Johns River, Florida. *Bulletin of Marine Science*, 59(1), 74-88.
 - King, J. D., Rollins-Smith, L. A., Nielsen, P. F., John, A., & Conlon, J. M. (2005). Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. *Peptides*, 26(4), 597-601.
 - Lopes-Ferreira, M., da Silva Emim, J. A., Oliveira, V., Puzer, L., Cezari, M. H., da Silva Araújo, M., ... & Moura-da-Silva, A. M. (2004). Kininogenase activity of

Thalassophryne nattereri fish venom. *Biochemical pharmacology*, 65(11), 2151-2157.

- Lameiras, J. L. V., Moura, V. M. D., Dias, L. C., Santos, I. G. C. D., Costa, O. T. F. D., & Dos-Santos, M. C. (2019). Cross-reactivity between Potamotrygon motoro antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin. *Toxin reviews*, 35(1), 61-70.
- Lovejoy, N. R. (1996). Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 117(3), 207-257.
- Pedroso, C. M., Jared, C., Charvet-Almeida, P., Almeida, M. P., Neto, D. G., Lira, M. S.,... & Antoniazzi, M. M. (2007). Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, 50(5), 688-697.
- Randall, J. E. (1961). Contribution to the biology of the convict surgeonfish of the Hawaiian Islands, *Acanthurus triostegus sandvicensis*.
- Pedroso, Catia M; Jared, C.; Chavert-Almeida, P.; Almeida, MP; Garrone Neto, D.; Lira, MS; Haddad Jr., V.; Bárbaro, KC; Antoniazzi, MM. Caracterización morfológica de las células epidérmicas secretoras de veneno en el aguijón de rayas marinas y de agua dulce. *Toxicón*, v. 50, núm. 5, pág. 688-697, 2007.
- Russell, F. E. (1971). Snake venom poisoning. *Philadelphia*, 18, 139-234.