

MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA DEL CLÁSPER DE
***Potamotrygon magdalenae* (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE)**

YENITH PAOLA ANAYA LÓPEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA

2016

MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA DEL CLÁSPER DE
***Potamotrygon magdalenae* (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE)**

YENITH PAOLA ANAYA LÓPEZ

TRABAJO DE GRADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

DIRECTORA:

MARTHA PATRICIA RAMÍREZ PINILLA

PhD.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2016

A Dios por la vida y las grandes bendiciones en mi camino.

A mis padres por guiarme, apoyarme en todos mis proyectos e ideas, por los valores que me inculcaron y por ser el mejor ejemplo de amor, cariño y perseverancia en mi vida.

A mis hermanos por su amor, locura y apoyo incondicional.

A toda mi familia, mis entrenadores, amigos y compañeros que han hecho de esta etapa inolvidable y me han brindado una mano y un consejo junto a su mejor sonrisa en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A María Fernanda Calvo y Heriberto Barbosa Moyano por su gran apoyo en la realización y edición de este proyecto. A Sergio Antonio Lizcano por las fotos brindadas y la ayuda en la colecta de los individuos. A todos y cada uno de los profesores que participaron en mi formación académica, especialmente a Martha Patricia Ramírez por permitirme aprender en su laboratorio y a Víctor Hugo Serrano por su amable colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción.....	11
1. Marco Teórico.....	13
2. Materiales y métodos.....	16
2.1. Colecta de ejemplares y área de muestreo.....	16
2.2. Análisis microscópico y macroscópico.....	16
2.3. Análisis de datos morfométricos.....	17
3. Resultados.....	19
3.1. Anatomía microscópica y macroscópica.....	19
3.2. Desarrollo morfológico de la glándula de cláser y caracterización histoquímica de su secreción.....	27
3.3. Análisis morfométricos.....	34
4. Discusión.....	36
5. Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1. Esquema de la región pélvica de un macho adulto de *Potamotrygon magdalenae*. En el cláster derecho, se muestra la estructura interna de la glándula del cláster en su relación con el cláster y la disposición de cada una de las partes que lo conforman..... 20
- Figura 2. *Potamotrygon magdalenae*, vista ventral de un individuo macho reproductivamente activo..... 21
- Figura 3. Corte histológico trasversal de la glándula del cláster de un individuo maduro y sexualmente activo de *Potamotrygon magdalenae*, coloración con H-E..... 22
- Figura 4. Corte longitudinal de la glándula del cláster de un individuo maduro de *P. magdalenae*..... 23
- Figura 5. Cortes trasversales de la región apical de las glándulas del cláster de un individuo macho maduro en reposo de *P. magdalenae*..... 24
- Figura 6. Esquema de la glándula del cláster de un individuo maduro de *P. magdalenae* con sus respectivas partes..... 25
- Figura 7. Unidades glandulares de la glándula del cláster en machos adultos de *Potamotrygon magdalenae*..... 27
- Figura 8. Cortes trasversales de la base del cláster de un embrión de *P. magdalenae*, las imágenes pertenecen al estadio más tardío de los embriones capturados..... 29
- Figura 9. Cortes trasversales de glándulas de cláster en individuos inmaduros (a, c y e) y en maduración (b, d y f) de *P. magdalenae*..... 32
- Figura 10. Cortes trasversales de la glándula del cláster de un macho maduro activo de *P. magdalenae*. Tinción PAS (a, b y c) y azul de Alcian (d).. 34
- Figura 11. Gráfico representativo del análisis de covarianza..... 36

RESUMEN

TÍTULO: Morfología de las glándulas del cláspere en *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae).

AUTOR: Yenith Paola Anaya López**

PALABRAS CLAVES: Actividad secretora, cláspere, glándula del cláspere, histología, Potamotrygonidae.

DESCRIPCIÓN:

Se determinó la morfología externa e interna de las glándulas de cláspere y su relación con la adquisición de madurez reproductiva en una serie de individuos machos de diferentes estadios (embriones, neonatos, juveniles y adultos activos y en reposo reproductivo) (n=35) de *Potamotrygon magdalenae*. Las glándulas se encuentran como masas glandulares subdérmicas en la base proximal de cada cláspere. Son órganos semi-bilobulados con una ranura ventral que posee una fila de papilas. Las glándulas tienden a ser asimétricas; las izquierdas presentan un mayor tamaño y desarrollo, tendencia observada en otros órganos de elasmobranchios. Histológicamente están conformadas de unidades glandulares tubulares con epitelio cilíndrico simple, con núcleos basales y citoplasma eosinófilo granular; la lámina basal está conformada por tejido conjuntivo laxo con fibras y fibroblastos, la glándula se encuentra cubierta por dos capas de tejido muscular estriado de disposición circular y longitudinal. La secreción de estas glándulas es asincrónica y de tipo holocrina, la reacción PAS+/AB+ sugiere la secreción de glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos sulfatados. Las glándulas se empiezan a desarrollar en los neonatos y en estadios juveniles empieza la actividad secretora, siendo máxima en los adultos reproductivos y en reposo. El tamaño de las glándulas presenta una relación positiva y directa con el tamaño del disco, medida del tamaño corporal de los individuos. Se encontraron diferencias significativas entre los tamaños de las glándulas de los individuos adultos y los tres estados restantes, indicando que la adquisición de la madurez sexual implica un aumento en el tamaño de las glándulas por su gran actividad secretora. Por lo tanto, estas glándulas deben tener un control endocrino y una función claramente asociados con la actividad reproductiva de los machos.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora: Martha P. Ramírez Pinilla, PhD.

ABSTRACT

TITLE: Clasper gland morphology of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)

AUTHOR: Yenith Paola Anaya López**

KEY WORDS: Clasper, clasper gland, histology, Potamotrygonidae, secretory activity.

DESCRIPTION:

The external and internal clasper gland morphology of *Potamotrygon magdalenae* was determined and its relation with the acquisition of reproductive maturity in a number of male individuals of different stages (embryonic, neonates, juveniles and reproductively active and idle adults) (n=35). The glands are subdermal glandular masses in the proximal base of each clasper. They are semi-bilobate organs with a ventral groove which has a row of papillae. The glands tend to be asymmetric; left ones have larger sizes and development, trend observed in other organs of elasmobranchs. Histologically, they are formed of tubular glandular units with simple columnar epithelium, basal nuclei and granular eosinophilic cytoplasm; the basal lamina is made up of loose connective tissue fibers and fibroblasts, the gland is covered by two layers of striated muscle tissue in circular and longitudinal arrangement. The secretion of these glands is asynchronous and of holocrine type, PAS+/AB+ secretion reaction suggests the presence of glycoproteins and sulfated acid mucopolysaccharides. The glands begin to develop in neonates and in juveniles their secretory activity. The size of the glands has a positive and direct relationship with the disk size, measurement of the animal's body size. Significant differences in the sizes of the glands between mature males and the remaining three reproductive states were found, suggesting that the acquisition of the sexual maturity implies the increase in the size of the gland due to its high secretory activity. Therefore, these glands should have an endocrine control and function clearly associated with the reproductive activity of males.

* Degree Work.

** Science Faculty. Department of Biology. Director: Martha P. Ramírez Pinilla, PhD.

INTRODUCCIÓN

Potamotrygon magdalenae es una raya endémica del río Magdalena, sus afluentes, el río Atrato y San Jorge (Charvet et al., 2005, Ramos & Grijalba 2011, Lasso et al., 2014). Se encuentra en la categoría de “casi amenazada” a nivel global y nacional (Araujo et al., 2009; Mojica et al., 2012). Esta categoría está relacionada con la pesca accidental, la gran contaminación de sus hábitats y el comercio ilegal (Ramos & Grijalba 2011), ya que esta especie de raya es la de mayor demanda como pez ornamental (Perdomo-Núñez, 2005).

Como todos los elasmobranquios, los machos de *P. magdalenae* presentan cláspers, que son aletas pélvicas modificadas (Friedman, 1935), y hacia la base de cada cláster se encuentra la glándula del cláster. La glándula es una estructura implicada en la reproducción, los fluidos allí secretados se transportan hacia los cláspers y por medio de su ranura, se expulsan durante la cópula (Friedman, 1935; Piercy et al., 2006). No hay descripciones detalladas del desarrollo, la morfología y morfometría para las glándulas de cláster en las rayas de esta familia, además, la función específica de la secreción aún no se conoce (Hamlett, 2005).

Pocos estudios se han llevado a cabo en las glándulas del cláster de batoideos, algunos han sido realizados en rayas como *Dasyatis sabina*, *Urobatis jamaicensis* y *Raja circularis* (Leigh-Sharpe, 1926; LaMarca, 1964; Piercy et al., 2006). Los estudios bioquímicos han revelado ciertos componentes proteicos y aminocídicos que dan una idea de la función de la secreción formada en la glándula del cláster de estos elasmobranquios (Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006).

En esta investigación, por medio de técnicas histológicas, histoquímicas y morfométricas, se responden preguntas como, ¿Cómo es la morfología e histología de la glándula de cláster en esta especie?, ¿Cuál es la naturaleza química de los fluidos secretados?, ¿El tamaño de la glándula y la producción de fluidos se relaciona con el estado reproductivo de los organismos al momento de

la captura? y ¿Cómo es su desarrollo desde estadios embrionarios hasta adultos maduros sexualmente? Por lo tanto, se brinda información sobre la variación morfológica de la glándula del cláster y su relación con la adquisición de madurez sexual en una serie de individuos desde embriones hasta adultos maduros de *Potamotrygon magdalenae*.

1. MARCO TEÓRICO

El estudio de la biología reproductiva en los elasmobranquios se constituye como uno de los temas más interesantes para el análisis de este grupo de peces cartilagosos, pues estos poseen gran variedad de estrategias reproductivas que van desde dos formas de paridad: la oviparidad (considerada como la condición ancestral de este grupo) (Dulvy & Reynolds, 1997) y la viviparidad, hasta diferentes formas de nutrición embrionaria para los grupos vivíparos. Se pueden observar la lecitotrofia, la oofagia, la histotrofia, la adelfofagia y la placentotrofia (Wourms, 1977; Dulvy & Reynolds; 1997; Hamlett, 2005; Galíndez et al., 2010).

Los elasmobranquios tienen fertilización interna y sus tractos reproductivos tanto femeninos como masculinos poseen órganos sexuales secundarios desarrollados y complejos, que son únicos de este grupo. Dentro de estos se destacan los cláspers, glándulas de los cláspers, sifones (exclusivos en tiburones) y glándulas oviducuales (Friedman, 1935; LaMarca, 1964; Galíndez et al., 2010). En ese sentido, una de las sinapomorfias de este grupo es la presencia de un par de órganos sexuales copuladores masculinos (cláspers) (Friedman, 1935; Hamlett, 2005) que se encargan del traspaso de espermatozoides por medio de su inserción en la cloaca de la hembra (Gilbert & Heath, 1972). Los cláspers se encuentran a cada lado de las aletas pélvicas y se observan como estructuras cilíndricas y alargadas. Son en parte aletas enrolladas que forman un tubo y sus bordes no se fusionan, dando lugar a una ranura ventral terminal que comunica anteriormente a las glándulas del cláspers, esta ranura se conoce como hipópilo (Friedman, 1935).

A estos órganos sexuales se encuentran asociadas unas glándulas llamadas glándulas del cláspers que secretan un líquido viscoso y blanquecino que se adhiere al semen y están implicadas directamente en la actividad copuladora de los machos (LaMarca, 1964; Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006). Estas glándulas se ubican en la parte más distal en un saco muscular entre el cláspers y la cloaca,

que se comunica con el apópilo (canal interior del cláspere) y la respectiva ranura del cláspere por donde se transportan los fluidos que más tarde serán excretados (hipópilo) (Hamlett, 2005). El fluido excretado de estas glándulas se compone de lipo, muco y glicoproteínas, y entre estas sobresalen los aminoácidos triptófano y tirosina de acuerdo con estudios realizados en *Urobatis jamaicensis* (LaMarca, 1964) y *Raja eglanteria* (Luer et al., 2007).

Se han propuesto hipótesis para explicar la función del fluido de estas glándulas, como producto que permite la lubricación y un medio de transporte para los espermatozoides, control de la erección, activación y suministro de nutrientes para los espermatozoides, tapón de cópula y dilatación y preparación de la cloaca de la hembra para asegurar el éxito reproductivo (Leigh-Sharpe, 1926; LaMarca, 1964; Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido evaluada ni tienen evidencia que las sustente.

La familia Potamotrygonidae es un grupo de rayas de agua dulce conformada por 4 géneros (*Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* y *Potamotrygon*) y al menos 25 especies (Araujo et al., 2004; Lasso et al., 2014). Estas rayas se encuentran en las cuencas de algunos ríos de Colombia y otros ríos de Sudamérica. Brasil es el país que cuenta con la mayor riqueza de especies de esta familia, con 17 potamotrigónidos, Colombia se encuentra en el segundo lugar con 11 especies (Lasso et al., 2014). Estos elasmobranchios son vivíparos aplacentarios y nutren sus embriones por medio de leche uterina secretada por trofonemas (Thorson & James, 1983). Pocos estudios de los tractos reproductivos de los machos se han realizado en especies de esta familia, pero se conoce que el tracto masculino de *P. magdalenae* se compone de testículos, epidídimos, ductos eferentes y deferentes, vesículas seminales, glándulas de Leydig, alcalinas y del cláspere, los cuales son pareados y funcionales, aunque el desarrollo de los órganos es asincrónico. Se encontraron dos tipos de espermatogonias primarias, una regionalización interna del epidídimo y espermatozeugmata, todas estas características que no habían sido descritas en rayas dulceacuícolas (Pedreros-

Sierra & Ramírez-Pinilla, 2015). Los machos son reproductivamente activos durante todo el año, aunque se encontraron algunos en reposo durante los meses de temporada seca. La calcificación de los cláspes es un indicio confiable de que el individuo ha llegado a la madurez sexual (Friedman, 1935; Hamlett, 2005; Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla, 2015). En *P. magdalенаe* se identificaron por medio de histología cuatro estados reproductivos: inmaduros, en maduración, maduros activos y en reposo (Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla, 2015).

La glándula del cláspes en elasmobranquios es una estructura bilobular con una ranura ventral que posee papilas que secretan una sustancia transportada hacia los cláspes (Friedman, 1935; Piercy et al., 2006). Según Thorsonl & James (1983) ésta glándula no presenta mayores variaciones morfológicas entre especies de la familia Potamotrygonidae, sin embargo, no hay descripciones detalladas para rayas de la familia que puedan sustentar esta afirmación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colecta de ejemplares y área de muestreo

Se capturaron 32 machos cada dos meses durante un año, desde el mes de Agosto de 2010 a Septiembre de 2011, utilizando métodos de pesca artesanales como la atarraya y el trasmallo; estos fueron colectados en la Ciénaga de Paredes, Municipio de Puerto Wilches, Santander (Latitud: 7.44472, Longitud: -73.7714); posteriormente fueron sumergidos en una dosis letal de roxicaina al 1% y fijados en formaldehído al 10% (ver detalles en Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla, 2015). El estado reproductivo en que se encontraba cada macho y su respectiva medida del ancho del disco se obtuvieron a partir de los datos del trabajo de Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla (2015). Actualmente estos ejemplares hacen parte de la Colección Ictiológica del Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

Tres embriones fueron colectados a partir de sus madres gestantes a través de abortos espontáneos en la Ciénaga de Paredes y la Ciénaga de María, ésta última ubicada en el municipio de Aguachica en el departamento del Cesar (Latitud: 8.06667, Longitud: -73.7167) durante los meses de Junio y Octubre del 2015. Los embriones se procesaron como se especificó anteriormente, dos de ellos pertenecían al último estado embrionario definido por la presencia de pequeñas manchas de pigmentación característica en la zona dorsal, una medida del ancho del disco (AD) de 5.5 cm y órganos externos e internos bien formados. El macho restante probablemente pertenecía al estado inmediatamente anterior, con un AD de 4.0 cm y sin coloración alguna.

2.2. Análisis microscópico y macroscópico

Para la extracción de las glándulas del cláspere se realizó una disección en la base proximal de los cláspere (izquierdo y derecho) de 32 individuos; posteriormente, se registró la longitud y el ancho de cada una con un calibrador Dial de precisión 0,02 mm.

Se obtuvieron muestras representativas de las glándulas de machos inmaduros, en maduración, reproductivamente activos y machos adultos no reproductivamente activos o en reposo; por otro lado, para procesar las glándulas de los embriones (n=3), se retiró el cláster completo de cada embrión, debido a su pequeño tamaño. Las muestras de tejido fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en Paraplast (Mc Cormick®), según Luna (1968). Se realizaron cortes trasversales de 5 a 7 µm de espesor con micrótopo rotatorio Lipshaw; estos fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (AB) para una caracterización histoquímica de glicoproteínas a pH 2.5 y 1.0. Los micropreparados fueron analizados con un microscopio Nikon H-550S® con cámara incorporada Canon EOS®. Para la descripción y nomenclatura de la glándula del cláster de *P. magdalenae* se tomó como referencia a Lacy (2005).

2.3. Análisis de datos morfométricos

Con el fin de conocer si existe simetría entre las glándulas del cláster con referencia a la longitud y el ancho de cada glándula, se realizó un análisis de modelos lineales por medio de una regresión lineal simple, entre estas variables con los datos morfométricos tomados de los 35 individuos. Por otra parte para analizar si el tamaño de las glándulas tiene alguna relación con el tamaño corporal se realizaron correlaciones lineales, teniendo en cuenta el ancho y largo de las glándulas izquierdas y derechas como la variable dependiente y el ancho del disco como variable independiente. Estos análisis fueron realizados en el Software STATISTICA 7.

Para determinar si existían diferencias significativas en el tamaño de las glándulas del cláster respecto al tamaño corporal (ancho del disco) entre los distintos estados de desarrollo y reproductivos estudiados, se llevó a cabo un análisis de covarianza (ANCOVA) entre el estado reproductivo (variable categórica) y el tamaño de las glándulas (variable dependiente), utilizando el ancho del disco como covariable. Para dicho análisis se definieron cualitativamente los estados de

la siguiente manera: I (embriones), II (inmaduros o neonatos), III (en maduración o juveniles), IV (maduros en reposo) y V (maduros activos).

Como análisis adicional, para conocer si existe una relación entre el número de papilas de la glándula del cláster y el ancho del disco, se realizó una correlación lineal simple. Además se llevó a cabo una ANCOVA, para saber si existe una variación en el número de papilas de las glándulas en los diferentes estados reproductivos. La covariable usada fue el tamaño corporal (diámetro del disco).

Para la realización de estos análisis se inspeccionaron los datos morfométricos y fueron transformados por medio de la función logaritmo.

3. RESULTADOS

3.1. Anatomía microscópica y macroscópica

Los cláspers de *Potamotrygon magdalenae* se encuentran en la superficie ventral de la región pélvica, próximos a las aletas pélvicas y la cloaca. Se observan como dos estructuras enrolladas con una ranura lateral (Figura 1). En la base de cada cláster se observa una protuberancia subdérmica de masa glandular, donde se hallan las glándulas del cláster cubiertas por un saco de tejido muscular (Figura 1 y 2). La glándula del cláster es un órgano parcialmente bilobulado de textura rugosa que posee una ranura ventral longitudinal no tan profunda provista de papilas de diferentes tamaños dispuestas en hilera (Figura 1 y 2). Esta glándula es de forma alargada en el eje longitudinal, paralela a la cloaca y al cláster. Se hace más estrecha en su región más distal y en su extremo proximal al cláster se conecta directamente con el apópilo, posteriormente con el hipópilo y la ranura del cláster, por donde son transportados los productos de su secreción (Figura 1).

Figura 1. Esquema de la región pélvica de un macho adulto de *Potamotrygon magdalenae*. En el cláster derecho, se muestra la estructura interna de la glándula del cláster en su relación con el cláster y la disposición de cada una de las partes que lo conforman.

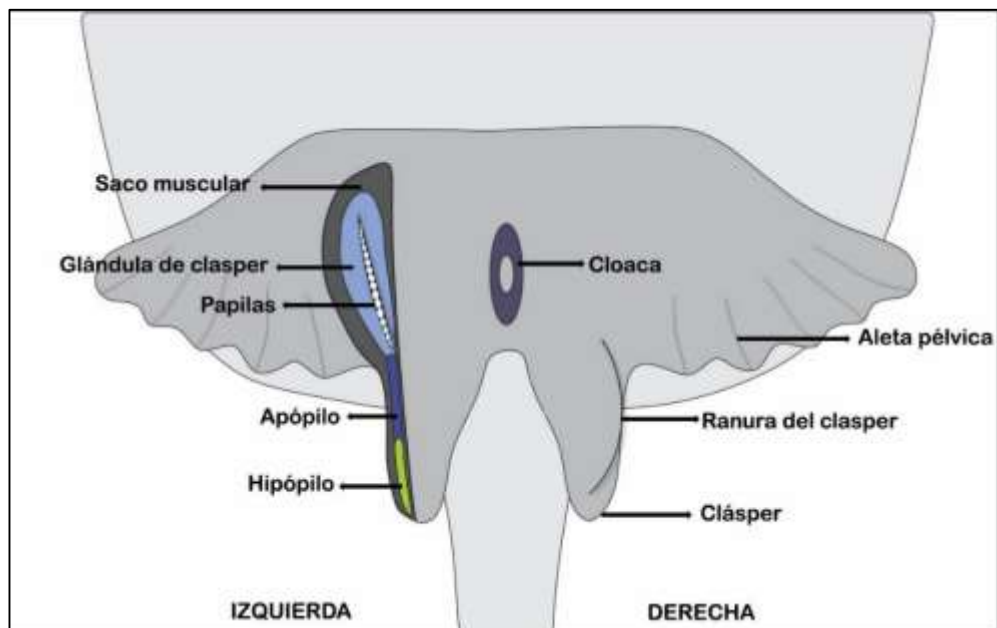
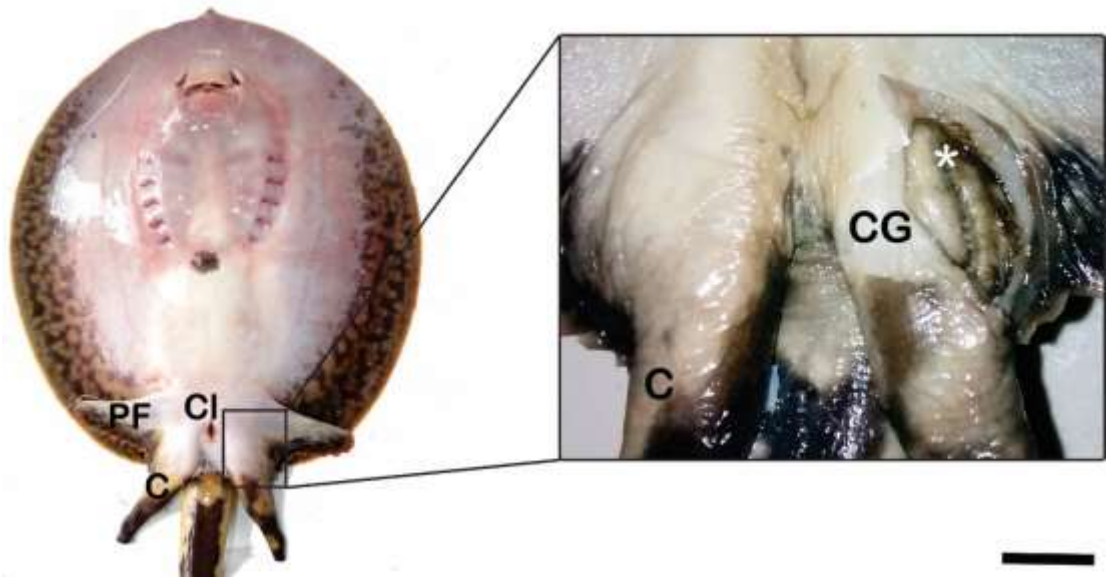


Figura 2. *Potamotrygon magdalenae*, vista ventral de un individuo macho reproductivamente activo. En detalle se observa la glándula de cláster de un individuo adulto dentro de un saco muscular subdérmico después de realizarse un corte longitudinal superficial de la piel en la zona proximal al cláster. C: cláster, CG: glándula del cláster, PF: aleta pélvica. El asterisco (*) muestra la fila de papilas de la glándula. Escala de tamaño: 4cm



La glándula del cláster se compone de unidades glandulares simples de tipo tubular recta, dispuestas de manera radial con respecto a la ranura ventral donde se encuentran las papilas (Figura 3). Cada unidad glandular o túbulo presenta un epitelio cilíndrico simple alto compuesto de células secretoras de núcleo basal, aunque en algunos túbulos se encuentran núcleos en la porción media y apical de las células, el citoplasma granular es de tipo eosinófilo (Figura 4a y b); el epitelio tiene una lámina basal subyacente debajo de la cual se encuentra tejido conjuntivo laxo con fibras y fibroblastos (Figura 5a). El conjunto de unidades glandulares están rodeadas de una capa muscular estriada interna circular y una capa longitudinal externa organizada en fascículos (Figura 4b).

Figura 3. Corte histológico trasversal de la glándula del cláster de un individuo maduro y sexualmente activo de *Potamotrygon magdalenae*, coloración con H-E. P: papila; T:

túbulos o unidades glandulares; M: músculo estriado en disposición longitudinal; M*: músculo estriado en disposición circular; SR: borde secretor, RC: rayo de cartílago de tipo hialino. Escala de tamaño: 1mm.

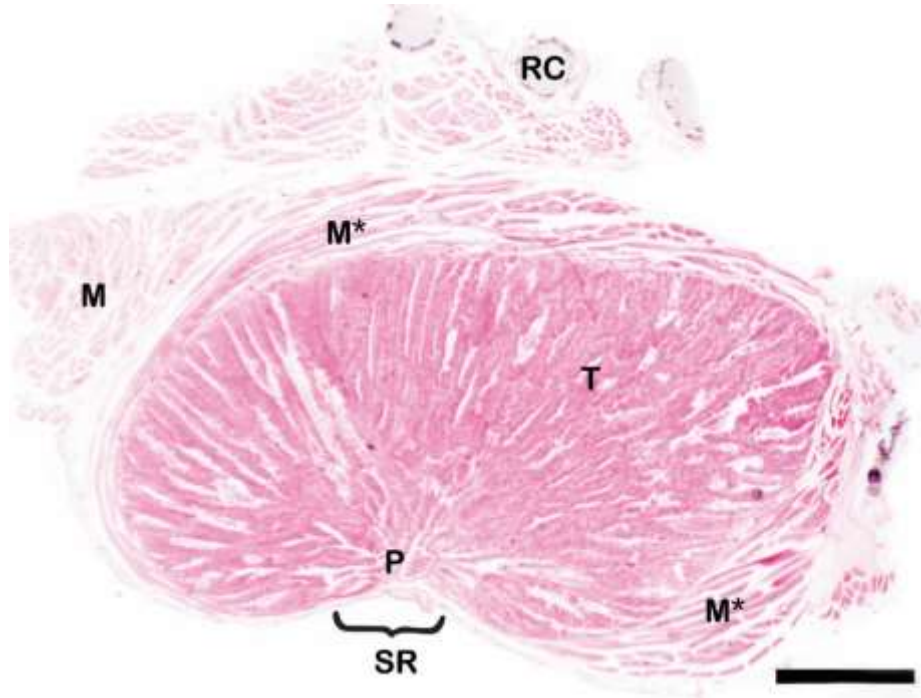
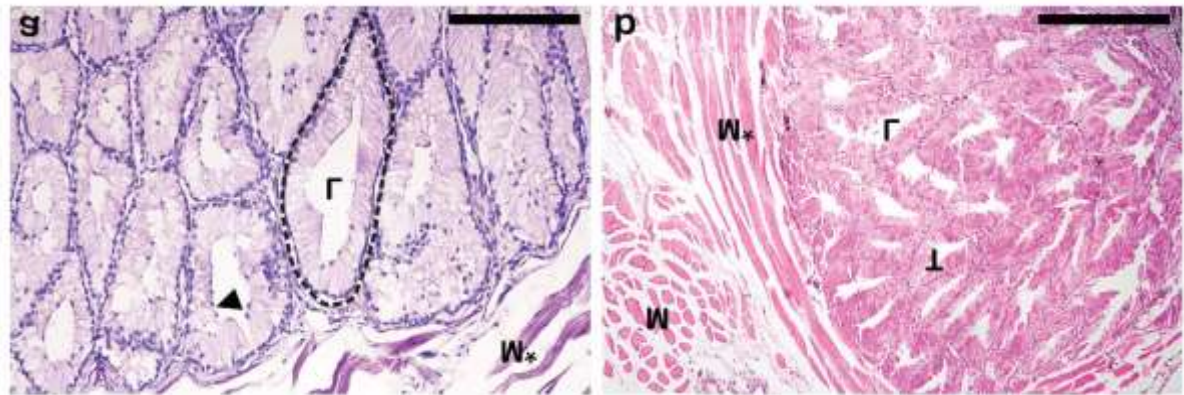
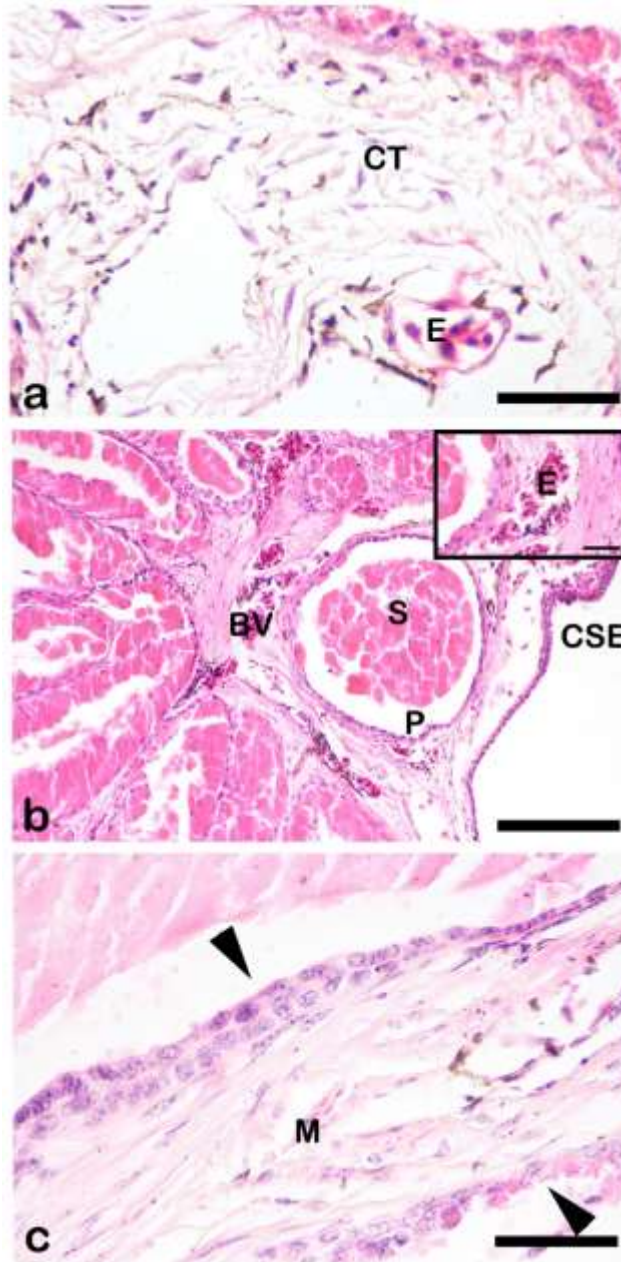


Figura 4. Corte longitudinal de la glándula del cláster de un individuo maduro de *P. magdalenae*. Con una línea punteada se observa un túbulo o unidad glandular conformada por células columnares simples y núcleos basales y apicales (punta de flecha). (b) Corte transversal de la glándula de cláster en la región basal. Las unidades glandulares se encuentran rodeadas por dos capas de tejido muscular estriado. L: lumen del túbulo; M*: capa muscular interna de disposición circular; M: capa muscular externa de disposición longitudinal que forma fascículos; T: túbulos o unidades glandulares. Escalas de tamaño: (a) 420 μ m, (b) 420 μ m.



Cada papila es una estructura circular similar a un saco que se encuentra formada por tejido epitelial cúbico estratificado (Figura 5b y c). La región más apical de la papila y la glándula, hacia el exterior, está rodeada por otra capa tejido epitelial estratificado cúbico, que entra en contacto con el saco muscular, esta región se denomina borde secretor (Figura 5c). Al interior de cada papila llegan los gránulos de secreción que se producen en las unidades glandulares a través de la región más apical de los túbulos secretores que se conectan directamente con el saco de la papila, formando una región colectora.

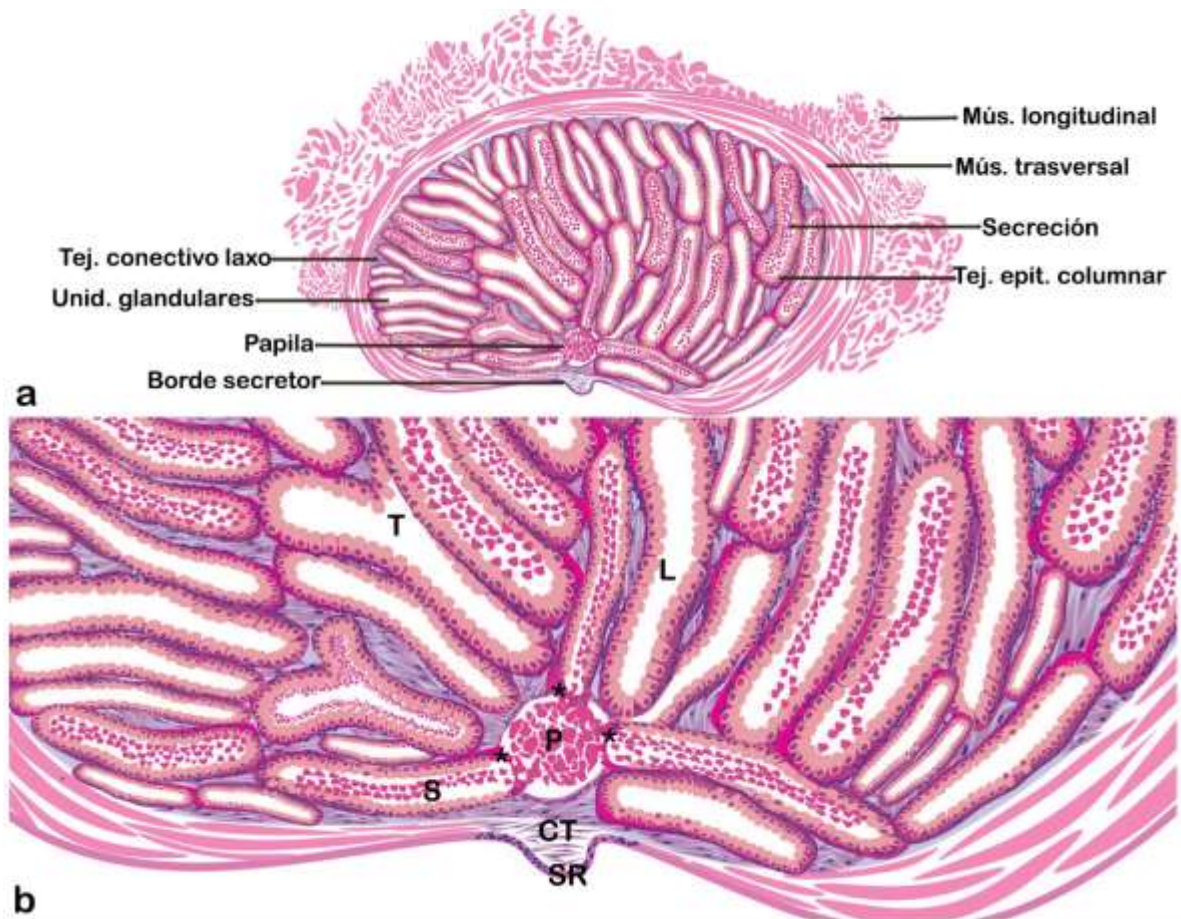
Figura 5. Cortes transversales de la región apical de las glándulas del cláspere de un individuo macho maduro en reposo de *P. magdalenae*. (a) Detalle del tejido conjuntivo subyacente al borde secretor en la papila, con fibras y fibroblastos. (b) La papila se observa como un saco conformado por tejido epitelial cúbico estratificado y tejido conjuntivo. En el lumen de la papila se observa el acúmulo del producto de secreción. En el conjuntivo subyacente se aprecia la vascularización de la zona. (c) Detalle de una papila y el borde secretor (puntas de flechas). Entre ambas estructuras se observa tejido conjuntivo y fibras de tejido muscular estriado. Tinción hematoxilina-eosina. P: papila; BV: vasos sanguíneos; CSE: tejido epitelial cúbico; M: tejido muscular estriado; S: gránulos de secreción; CT: tejido conectivo; E; eritrocitos. Escalas de tamaño: (a) 180µm y 45µm, (b) 45µm, (c) 180µm, (d) 45µm.



En esta zona se observa un cambio en el tipo de epitelio luminal que va desde un epitelio secretor cilíndrico propio de la glándula a un epitelio escamoso simple en la región más apical colectora (Figura 6).

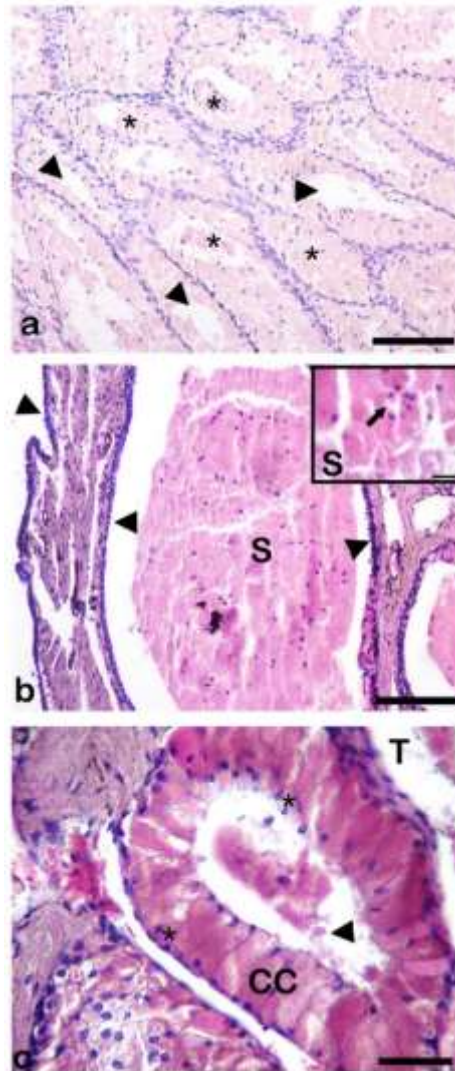
Figura 6. (a) Esquema de la glándula del cláspes de un individuo maduro de *P. magdalenae* con sus respectivas partes. (b) Detalle de la zona de la papila, se muestran unidades glandulares activas que están permitiendo el paso del producto de su secreción

(*) al saco de la papila. T: túbulo; L: lumen del túbulo; S: secreción; P: papila; CT: tejido conectivo; SR: borde secretor



La glándula del cláspes es de tipo exocrina, asincrónica y mucosa; esto último ya que las secreciones son viscosas y contienen mucopolisacáridos y proteínas. Se observó que la secreción en cada una de las unidades glandulares no es simultánea sino que se realiza en diferentes momentos, algunas unidades se encontraban llenas de gránulos de secreción mientras que otras no (Figura 7a). También, se observó que la región colectora de algunas papilas de individuos maduros se encontraban llenas de gránulos de secreción y con restos de núcleos y citoplasma, lo cual sugiere la pérdida completa de la célula en el momento de la secreción (Figura 7b), por lo tanto la glándula del cláspes es de tipo holocrino (Figura 7c).

Figura 7. Unidades glandulares de la glándula del cláspier en machos adultos de *Potamotrygon magdalenae* (a) Se muestran diferentes túbulos secretores con abundante secreción luminal (*) y algunos túbulos secretores sin secreción luminal acumulada (punta de flecha) en la misma glándula de un macho maduro, evidenciando la asincronía en el proceso de secreción del órgano. (b) Ampliación de la zona de la papila, las puntas de flecha muestran el tejido epitelial cúbico estratificado que bordea el lumen de la papila, dentro del cual se observa abundante material secretor, además de algunos núcleos que se desprenden (flechas). (c) Detalle de un túbulo secretor, en el lumen de este se observa la secreción producida con expulsión de citoplasma y núcleos proveniente de las células columnares que lo conforman. T: túbulos; S: secreción; CC: células columnares. Escalas de tamaño: (a) 150 μ m, (b) 150 μ m y 12 μ m, (c) 25 μ m.



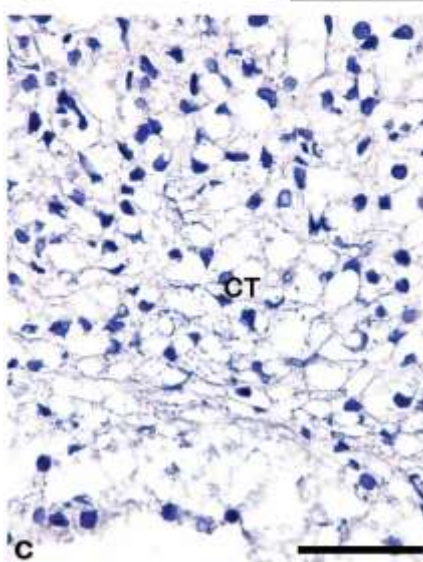
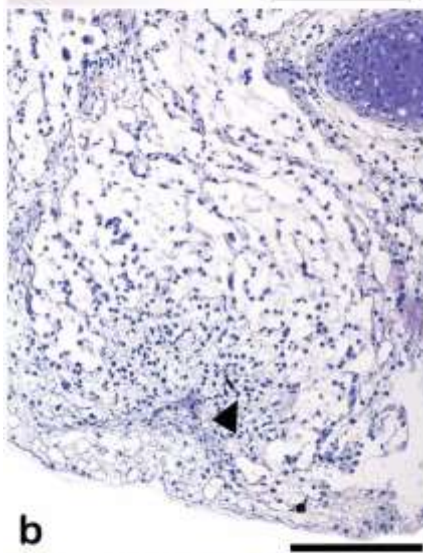
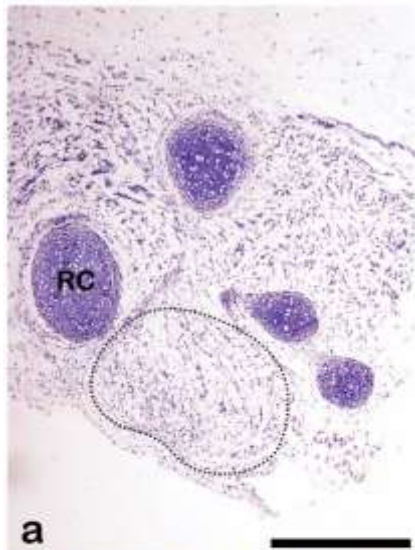
3.2. Desarrollo morfológico de la glándula del cláster y caracterización histoquímica de su secreción.

La morfología externa de la glándula del cláster en cada estado de desarrollo y reproductivo varió en cuanto al tamaño de las glándulas, la pigmentación externa, y el tamaño de las papilas.

Los clásters de los embriones en los dos estados se observan de color blanco, no se observa un plegamiento completo de esta aleta modificada, por lo cual no es posible hallar la ranura del cláster. Al realizar la disección en la base del cláster no se pudo diferenciar el saco muscular que cubre la glándula del cláster, ni esta misma, por lo tanto, a nivel macroscópico no se observó una glándula definida.

A nivel microscópico, se corroboró que en estos estadios la glándula no se ha desarrollado; sin embargo, por la posición de los rayos de espinas de cartílagos que confieren consistencia al cláster, se puede inferir que la glándula se formará en estados posteriores en la zona posterior a los rayos donde se observa una gran cantidad de tejido conectivo de tipo mesenquimatoso con núcleos de gran tamaño y citoplasma claro (Figura 8a). Una pequeña congregación de núcleos se encontró hacia la parte más distal de los rayos de cartílagos (Figura 8b, punta de flecha), que podría llegar a formarse como la papila en etapas posteriores. No se halló algún tipo de tejido epitelial que conforme la glándula (Figura 8c), por lo tanto, en los dos estadios embrionarios estudiados de *Potamotrygon magdalenae* no se ha formado la glándula del cláster.

Figura 8. Cortes transversales de la base del cláster de un embrión de *P. magdalenae*, las imágenes pertenecen al estadio más tardío de los embriones capturados. (a) con una línea punteada se delimita lo que en estadios posteriores puede formarse como glándula del cláster. (b) la flecha muestra un conglomerado celular de células mesenquimatosas; en esta posición se encontrarían las papilas de la glándula del cláster. (c) detalle del tejido conectivo mesenquimal que conforma la región del cláster durante los estadios embrionarios. Tinción Hematoxilina-eosina. RC: rayos de cartílago; CT: tejido conectivo. Escalas de tamaño: (a) 420µm, (b) 180µm, (c) 45µm.



En los neonatos se identificaron fácilmente las glándulas del cláster a nivel macroscópico después de un corte en la base del cláster. Las glándulas se encuentran en un saco muscular de consistencia suave al tacto y color blanco traslúcido, además son alargadas en el eje longitudinal cloaca-cláster. El color de las glándulas es blanquecino claro, aunque en la parte ventral, cerca de las papilas, se empiezan a observar manchas de coloración marrón claro. El surco ventral de la glándula no está bien pronunciado, por lo tanto, ésta no se observa como un órgano bilobulado, sino como una estructura oblonga con una fila de pequeñas protuberancias blancas o papilas de igual tamaño. Se estimó un promedio de 13 papilas en el eje longitudinal de las glándulas. Las papilas y la glándula son pequeñas en relación al tamaño correspondiente en machos adultos.

A nivel microscópico las glándulas de estos individuos no presentan las zonas de túbulos o unidades glandulares y capas musculares bien delimitadas como se encuentran en estados más avanzados (Figura 9a). Las unidades glandulares se conforman de tejido epitelial cúbico estratificado, con núcleos grandes en la porción media de las células (Figura 9c). No se observan gránulos de secreción en el citoplasma epitelial, el citoplasma es de tipo granular basófilo, ni en el lumen de las unidades glandulares.

Las papilas no son una región bien definida y circular pero se observa la capa de tejido epitelial cúbico estratificado que las caracteriza en forma irregular, dejando un espacio que posteriormente constituirá el lumen donde se almacenarán las secreciones producidas en los túbulos (Figura 9e). Además abundante tejido conectivo se encuentra en la parte apical y más externa de la papila, donde posteriormente se formará el borde secretor. La caracterización histoquímica demuestra que en este estadio la glándula no produce secreciones como glicoproteínas o mucopolisacáridos ácidos.

En los juveniles la glándula del cláster es de color marrón más uniforme, es más oblonga y la ranura ventral aún no es un surco pronunciado, por lo tanto aún se observa como un órgano unilobulado. Las papilas son más sobresalientes y

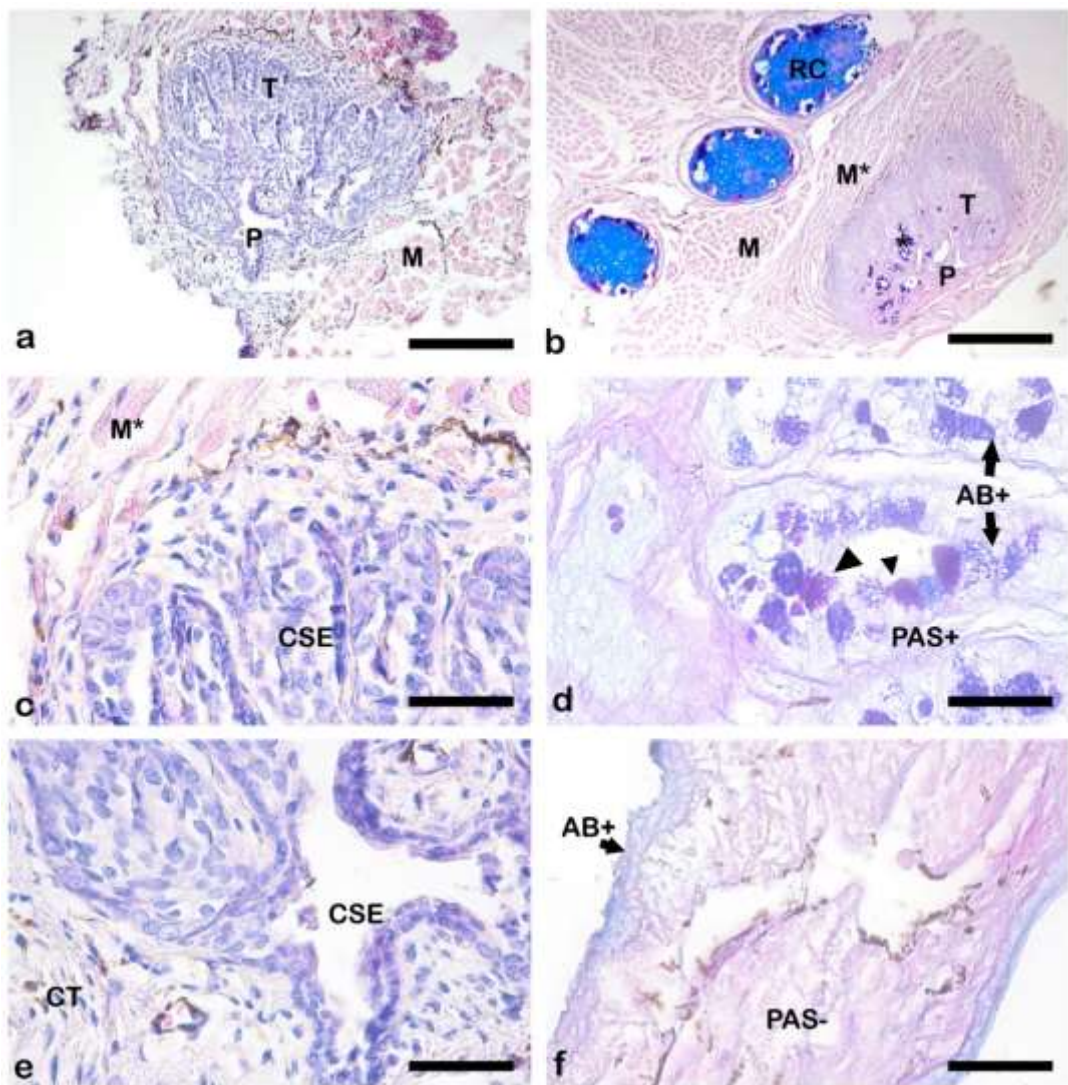
redondeadas respecto a las papilas de las glándulas de los neonatos, su coloración es blanquecina y se encuentran aproximadamente de 15 a 16 de estas a lo largo de la glándula, de igual tamaño o poco variable entre ellas.

A nivel microscópico las glándulas de estos individuos son muy similares a las de los neonatos. La región de las unidades tubulares que entran en contacto con la capa de tejido muscular en disposición circular no presenta una clara delimitación y hacia la parte más externa de la glándula se pueden observar fascículos de músculo estriado en disposición longitudinal (Figura 9b). Las unidades glandulares se componen de tejido epitelial de tipo cúbico estratificado con células con núcleos basales, medios y apicales y citoplasma levemente eosinófilo con una pequeña cantidad de gránulos de secreción. Subyacente a este tejido se observa una lámina de tejido conjuntivo laxo. La papila de forma más circular que la del neonato, presenta una capa de tejido epitelial cúbico estratificado que va dando lugar al lumen.

En la caracterización histoquímica en las glándulas de individuos en maduración o juveniles se observó que algunas unidades glandulares, cercanas a la región de la papila, poseían unos gránulos de secreción que fueron positivos para PAS y azul de Alcian a pH 2.5 (Figura 9d) lo que indica que estos individuos han comenzado la producción de secreciones glicoproteícas y de glicosaminoglicanos ácidos. El borde secretor y la papila de las glándulas de juveniles, que está conformado por tejido epitelial cúbico estratificado, fue débilmente positivo para azul de Alcian a pH 2.5 (Figura 9f).

Figura 9. Cortes trasversales de glándulas de clasper en individuos inmaduros (a, c y e) y en maduración (b, d y f) de *P. magdalenae*. (a) tinción hematoxilina-eosina de la glándula de un neonato. No se observa una disposición ordenada de las capas de este último tejido. La papila es una estructura hueca irregular y los túbulos aunque no muestran una clara disposición radial, está se insinúa. (b) tinción PAS/AB de la glándula de un juvenil. La reacción de PAS fue negativa en el tejido muscular, túbulos glandulares y papila. (c) detalle de la región basal de la glándula del cláspen, el tejido epitelial que conforma las unidades glandulares es de tipo cúbico estratificado. Tinción hematoxilina-

eosina. (d) ampliación de un túbulo glandular, algunos gránulos de secreción fueron positivos para PAS (puntas de flecha) y AB (flechas). (e) detalle de la zona de la papila, las unidades glandulares y el borde de la papila están formados por tejido epitelial cúbico estratificado, en el interior de la papila no se observa aún secreción. (f) detalle de la papila, la tinción con PAS fue negativa y AB a pH 2.5 fue débilmente positivo en los bordes. T: túbulos; M: tejido muscular de tipo longitudinal; M*: tejido muscular en disposición transversal; P: papilas; RC: rayos de cartílago; CSE: tejido epitelial cúbico estratificado; CT: tejido conectivo. Escalas de tamaño: (a) 180µm, (b) 420µm, (c) 45µm, (d) 45µm, (e) 45µm, (f) 45µm.



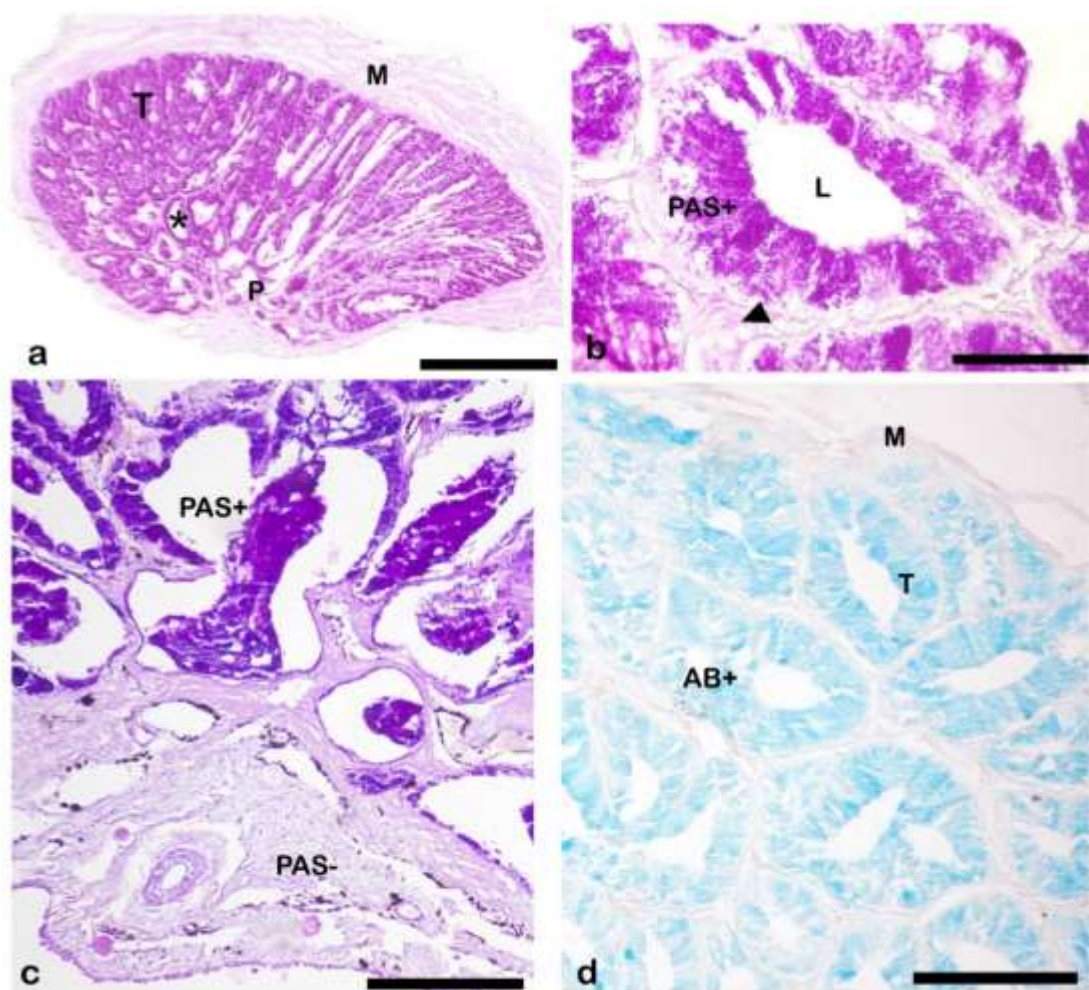
Finalmente, a nivel macroscópico las glándulas de los machos maduros tanto activos sexualmente como aquellos en reposo de *Potamotrygon magdalenae* son parcialmente bilobuladas, el surco de la ranura ventral es pronunciado pero no tanto para dar la apariencia de un órgano completamente bilobulado. Las glándulas presentan una coloración de marrón claro a verde oliva. Son alargadas en el eje longitudinal y en la ranura ventral se contaron entre 14 y 18 papilas. Estas papilas se encuentran alineadas y se hacen más prominentes hacia el centro de la glándula y un poco más pequeñas hacia los extremos distal y proximal, son de mayor tamaño con respecto a las papilas de las glándulas en los neonatos y juveniles, además presentan un color grisáceo.

A nivel histológico las glándulas están bien delimitadas, recubiertas de dos capas de músculo estriado, una interna de disposición circular y otra más externa de disposición longitudinal en fascículos (Figura 3 y 4b). Las unidades glandulares están bien definidas, conformadas por tejido epitelial de tipo columnar simple (Figura 4a). Las células epiteliales tienen predominantemente núcleos basales, pero también se encuentran en la región media y apical en algunas unidades glandulares. Bajo la lámina basal el tejido conectivo es laxo y tiene fibroblastos de núcleos grandes y alargados. Las papilas son estructuras redondeadas conformadas por tejido epitelial cúbico estratificado hacia el lumen y tejido conjuntivo laxo subyacente al epitelio. Se observaron en algunos túbulos hacia la parte más apical, una salida de los gránulos de secreción (Figura 6), que se conectan con el saco formado por la papila. Cercano a la papila se encontraron algunos vasos sanguíneos conteniendo eritrocitos nucleados (Figura 5b).

Las unidades glandulares fueron fuertemente positivos para PAS, mostrando la presencia de polisacáridos y carbohidratos en el epitelio y en algunos lúmenes de los túbulos glandulares (Figura 10a y b). A pH 2.5 las glándulas no mostraron ser positivas para azul de Alcian. Sin embargo, a pH 1.0 fueron débilmente positivas demostrando la presencia de mucopolisacáridos ácidos sulfatados (Figura 10d).

La porción de la papila y el borde secretor no presentaron actividad secretora para glicoproteínas (Figura 10c). Las capas musculares fueron PAS y AB negativas.

Figura 10. Cortes transversales de la glándula del cláster de un macho maduro activo de *P. magdalenae*. Tinción PAS (a, b y c) y azul de Alcian (d). (a) se observa el contraste entre los túbulos que reaccionaron positivo ante la tinción de PAS y la porción muscular, la papila y el borde secretor que fueron negativos. (b) detalle de una unidad glandular, el contenido de gránulos de secreción de las células columnares (punta de flecha) es positivo para PAS mientras el conjuntivo es negativo. (c) detalle de la papila y el borde secretor, este último es débilmente PAS positivo. (d) la reacción con azul de Alcian fue similar a PAS, la secreción es débilmente positivo para mucopolisacáridos ácidos sulfatados. T: túbulos; M: tejido muscular estriado; P: papila; L: lumen del túbulo. Escala de tamaños: (a) 800µm, (b) 50µm, (c) 180µm, (d) 180µm.

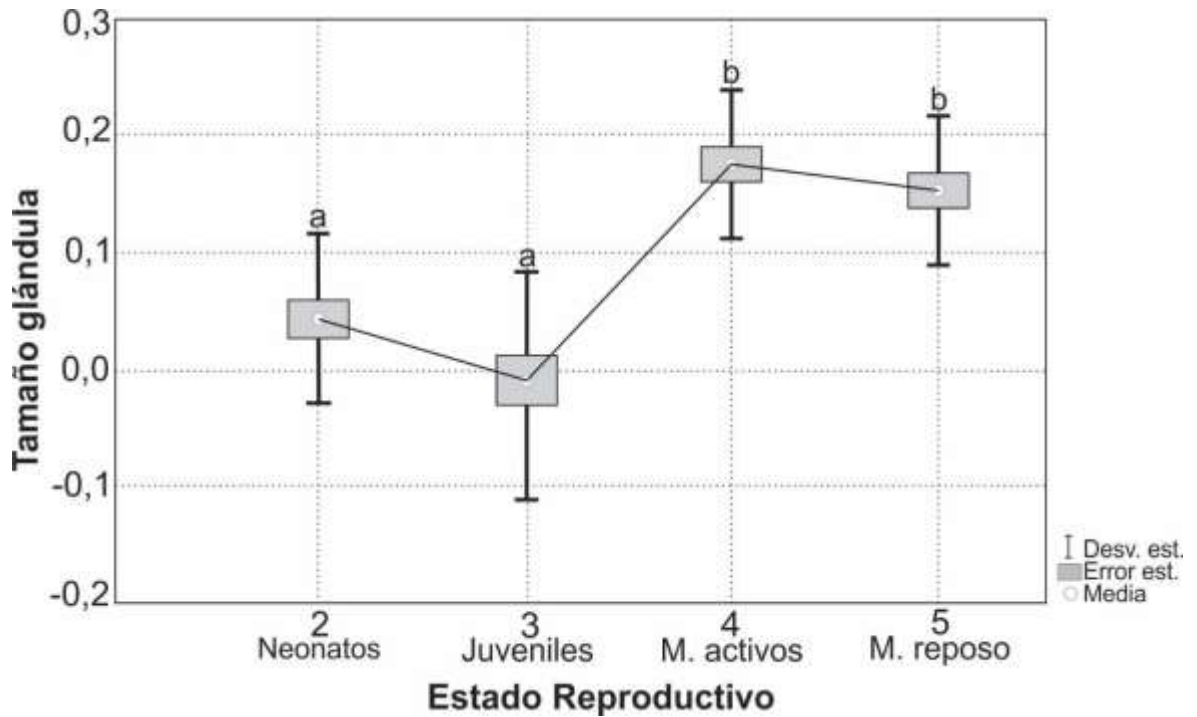


3.3. Análisis morfométricos

El análisis de simetría entre las glándulas izquierda y derecha mostró que las glándulas no son simétricas, las glándulas del cláster izquierdas poseen mayor tamaño que las derechas. El ajuste entre las medidas del ancho entre las glándulas izquierdas y derechas de los individuos evaluados da como resultado un R^2 ajustado de 0.5525 y una probabilidad altamente significativa (menor a 0.05). El análisis para el largo de las glándulas izquierdas y derechas resultó en datos similares, hay una leve asimetría y las glándulas izquierdas presentan un mayor tamaño, sin embargo, el coeficiente R^2 ajustado fue de 0.913, un valor de correlación positivo muy fuerte que tiende a la simetría para este parámetro.

Las correlaciones lineales entre el ancho y largo de las glándulas izquierdas y derechas y el ancho del disco demostraron una relación significativa entre estas variables (AD vs Longitud glándulas izquierdas: $p < 0.05$, R^2 ajustado= 0.8472; AD vs Longitud glándulas derechas: $p < 0.05$, R^2 ajustado= 0.8711; AD vs Ancho glándulas izquierdas: $p < 0.05$, R^2 ajustado= 0.5052; AD vs ancho glándulas derechas: $p < 0.05$, R^2 ajustado= 0.6176). Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de las glándulas (izquierdas y derechas) y los estados reproductivos, las glándulas de los individuos maduros activos y en reposo fueron significativamente más grandes que las encontradas en los neonatos y los juveniles (Figura 11).

Figura 11. Gráfico representativo del análisis de covarianza. Se presenta una variación significativa en el tamaño de las glándulas y los estados reproductivos (ANCOVA $F(4, 28) = 4.805$, $p = 0,00827$, R^2 ajustado= 0,875), las letras diferentes sobre las barras muestran los estados que presentaron tamaños de glándulas significativamente diferentes (a y b).



Por otra parte, se encontró una correlación positiva entre el tamaño corporal de los individuos y el número de papilas (R ajustado = 0,829, $p < 0.05$). El análisis de covarianza mostró una variación en el número de papilas de las glándulas de clásper entre los estados de desarrollo, siendo significativamente mayor el número de papilas en las glándulas de los adultos ($F(4, 28) = 18.169$, $p = 0,000$, R^2 ajustado = 0,955).

4. DISCUSIÓN

Los machos de *Potamotrygon magdalenae* poseen un par de cláspers en la región pélvica que son similares macroscópicamente a los descritos en otros elasmobranquios (Hamlett, 2005). La ubicación general de las glándulas del cláster, en la base proximal del cláster, es concordante con las descritas en rayas como *Dasyatis sabina*, *Urobatis jamaicensis*, *Raja stabuliforis*, *Raia circularis*, *Potamotrygon motoro* y *Potamotrygon circularis* (Friedman, 1935; Leigh-Sharpe, 1926; LaMarca, 1964; Thorson, 1983; Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006). Para las rayas estudiadas la posición relativa de la glándula dentro de los cláster varía; en *P. magdalenae* se observó que la glándula se une en la porción media del cláster, lo cual indica que las secreciones allí producidas no se expulsan directamente por la ranura del cláster en las cloacas de las hembras al momento de la cópula. Este mecanismo de traspaso de secreciones es similar al que se da en la glándula de *Dasyatis sabina* (Piercy et al., 2006), sin embargo, esto difiere de lo hallado en *Urobatis jamaicensis*, ya que la glándula en esta especie si se extiende a lo largo del cláster (LaMarca, 1964).

La glándula de cláster de *Potamotrygon magdalenae* es un órgano parcialmente bilobulado, ya que el surco ventral donde se encuentran las papilas no es una ranura profunda, contrario a lo descrito en *Raia circularis*, donde el surco da la errónea impresión de que la masa glandular está separada en dos lóbulos (Leigh-Sharpe, 1926).

Las glándulas izquierdas son más amplias que las derechas, mientras que la longitud de las glándulas tiende a ser similar. Así la asimetría entre las glándulas es relativa a su ancho, lo que estaría relacionado con la profundidad de las unidades glandulares. La asimetría entre órganos pares es un fenómeno común en otros órganos de elasmobranquios, como ovarios, úteros y cláspers izquierdos, los que muestran un mayor desarrollo y en algunos casos son los únicos funcionales, ya que su homólogo derecho se encuentra atrofiado o no desempeña su función de igual manera (Charvet et al., 2005; Fahy et al., 2007).

Hay un alto grado de correlación entre el tamaño del disco y el tamaño de las glándulas, lo que indica que los machos más grandes tienen glándulas del cláster más grandes y además, se encontró que el tamaño de las glándulas del cláster varía significativamente entre estados. Los estadios embrionarios y juveniles difieren de los estados de los adultos. La actividad reproductiva implica un aumento en el tamaño de las glándulas explicado por la producción y alta actividad secretora, lo que sugiere que este órgano se comporta como un órgano sexual secundario que responde al estímulo hormonal derivado de la actividad gonadal.

La glándula de cláster de *P. magdalenae* es una glándula de tipo exocrina, las glándulas así vierten sus secreciones a través de un conducto (Estrada & Uribe, 2002), en este caso a través del apópilo y el hipópilo hasta la ranura del cláster. El líquido viscoso que se produce en la glándula de *P. magdalenae* se expulsa por medio de la exocitosis de gotas o gránulos de secreción con pérdida de citoplasma y núcleos, contrario al mecanismo descrito para las glándulas del cláster en *D. sabina* y *U. jamaicensis*; estas glándulas son merócrinas, sus secreciones no presentan pérdida de citoplasma. El proceso de expulsión del material secretor en la glándula de *P. magdalenae* es propio de las glándulas holocrinas (Estrada & Uribe, 2002). La glándula posee actividad secretora en todos los machos adultos, incluyendo aquellos en reposo de la actividad reproductiva. Los machos de *P. magdalenae* tienen actividad reproductiva continua casi todo el año, sin embargo durante el mes de mínima precipitación y aguas bajas algunos machos entran en regresión gonadal (Pedreros-Sierra & Ramírez-Pinilla, 2015). Para estos últimos machos, la glándula del cláster no presentó disminución en su actividad secretora indicando que la glándula se mantiene activa todo el año en relación con la mínima estacionalidad reproductiva de esta especie. Este resultado es diferente al encontrado para la actividad de las glándulas del cláster de la raya Atlántica (*D. sabina*) que es altamente estacional. En esta especie la actividad de la glándula es sincrónica y ocurre únicamente en la estación reproductiva (Piercy et al., 2006).

La glándula del cláster de *Potamotrygon magdalenae* se compone de unidades glandulares que se irradian desde la papila. La parte más apical de las unidades glandulares que están activas (produciendo secreciones) se conectan con el saco de la papila, abriéndose directamente a éste por medio de una región colectora donde ocurre un cambio del epitelio luminal de cada unidad y pasando el producto de su secreción. Posteriormente el fluido es expulsado en la cloaca de la hembra durante la cópula. Este paso de material secretor es ligeramente diferente al encontrado en *D. sabina*, en el que es evidente la existencia de ductos colectores que se encuentran dentro de una extensa matriz de tejido conectivo: estos ductos colectores son los encargados del paso del material producido en las unidades glandulares a la papila (Hamlett, 2005).

La literatura reporta variaciones en las papilas de las glándulas en diferentes especies de rayas. En *P. magdalenae* éstas son prominentes sacos formados por tejido epitelial estratificado que se encuentran desde neonatos hasta adultos; su función es la recolección, el almacenamiento y la expulsión del fluido de secreción producido en las unidades glandulares. Al igual que en otras rayas como *U. jamaicensis*, el paso de la secreción al exterior se hace por medio de el surco de la glándula que está conformado por un borde de tejido epitelial cúbico estratificado secretor que se abre hacia la ranura del cláster pasando por el apópilo y el hipópilo (Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006). Este borde en las glándulas de *P. magdalenae* resultó positivo para azul de Alcian a pH 1.0 en individuos adultos, lo que confirma la presencia de mucopolisacáridos ácidos sulfatados.

Por otra parte, los machos adultos tienen más papilas que los otros estados evaluados; esto puede ser explicado por la relación directamente proporcional en el tamaño corporal y el tamaño de la glándula. En glándulas más grandes la producción de secreción en las unidades glandulares es más evidente y por lo tanto un mayor número de papilas pueden almacenar y transportar al exterior el líquido producido.

Los túbulos glandulares en la glándula de cláster de *P. magdaleneae* son simples y rectos, se encuentran formados por un epitelio columnar simple de núcleos basales aplanados. Este tipo de epitelio es particular en tejidos glandulares (Young et al., 2013). También el citoplasma granular eosinófilo encontrado en la glándula de *P. magdaleneae* es un indicador de la existencia de un pH predominantemente básico (Trull, 2008), debido al alto contenido proteico de las secreciones allí producidas. Histológicamente esta morfología es similar a la de *U. jamaicensis* (LaMarca, 1964) y *Raja eglanteria* (Luer et al., 2007). Sin embargo, para *D. sabina*, el epitelio de los túbulos glandulares es columnar pseudoestratificado con núcleos en la parte más ancha de las células (Hamlett, 2005).

Las glándulas del cláster de *P. magdaleneae* al igual que en *D. sabina*, *Urobatris jamaicensis* y *Raia circularis* están rodeadas por dos capas de músculo estriado (Leigh-Sharpe, 1926; LaMarca, 1964; Hamlett, 2005; Piercy et al., 2006). La capa más interna de músculo estriado es de disposición circular y la capa más externa es longitudinal. Según LaMarca la contracción de estos músculos causa la expulsión de las secreciones de la glándula a través de la fila de papilas, pasando por la ranura del cláster donde se mezcla con los espermatozoides emitidos desde la cloaca del macho (LaMarca, 1964); este sistema de expulsión del producto glandular se activa al momento de la cópula cuando el macho gira su cláster y lo posiciona para ser insertado en la cloaca de las hembras (Friedman, 1935; Hamlett, 2005; Piercy et al, 2006).

La glándula del cláster de *Raia diafares* se encuentra rodeada por tres espinas o rayos de cartílagos inervados (47, 48 y 49) (Friedman, 1935) que le brindan consistencia al cláster; de acuerdo con esta información y por los cortes transversales realizados en las glándulas de embriones en *P. magdaleneae*, donde se observan de 3 a 4 rayos de cartílagos, se puede inferir que la glándula de cláster de *P. magdaleneae*, en posteriores estadios se formaría a partir del tejido mesenquimal que conforma el cláster y en la posición señalada por una línea

punteada en la figura 7. Esta posición de desarrollo glandular se confirmó en los cortes realizados a las glándulas de cláster en individuos machos neonatos, juveniles y machos maduros, en donde también se observaron estos rayos de cartílagos en las posiciones anteriormente nombradas, rodeando la glándula.

La tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (AB) fue variable en los diferentes estados de machos de *Potamotrygon magdalenae* analizados; aún no se han realizado trabajos similares con los que puedan ser comparados. Sólo se hallaron algunos gránulos de secreción PAS/AB a pH 2.5 positivos dentro de algunos túbulos cercanos a la papila en las glándulas del cláster de individuos en maduración, que sugieren que esta glándula ha empezado a presentar actividad secretora y los gránulos presentes están compuestos de mucopolisacáridos ácidos sulfatados y carboxílicos. Además, el borde secretor, fue débilmente positivo para AB, lo que indica también la presencia y el paso de mucopolisacáridos ácidos por este tejido.

En machos adultos de *D. sabina* según Piercy et al (2006) se hallaron mucosustancias en la glándula del cláster de tipo polisacáridos y glucosaminoglicanos siendo fuertemente positivo para PAS/AB, éste último a pH 2.5. Esto difiere un poco en *P. magdalenae*, la tinción resultó ser fuertemente positiva para PAS y azul de Alcian a pH 1.0, pero no a pH 2.5, en las células columnares simples de las unidades glandulares de la glándula en machos adultos. Lo cual evidencia la presencia de polisacáridos y mucopolisacáridos ácidos sulfatados únicamente. Ni la papila, ni el borde secretor fueron positivos para alguna de estas dos pruebas histoquímicas, lo que demuestra su función exclusiva de almacenamiento y paso del producto secretor.

En *U. jamaicensis* LaMarca (1964) encontró que la glándula del cláster de esta especie produce glicoproteínas y fosfolípidos, lo que sugiere que estas características químicas de la secreción pueden ser muy adecuadas para suspensión de espermatozoides y transporte. En las secreciones de la glándula del cláster de *Raja eglanteria* se hallaron carbohidratos, aminoácidos libres y ácidos grasos;

el aminoácido más abundante fue la taurina, por lo cual, Luer et al. (2007) llegaron a la conclusión de que la secreción de la glándula del cláster puede servir como sustancia nutritiva para potenciar el almacenamiento de esperma viable en la glándula oviducal de las hembras post cópula.

Friedman (1935) sugiere que la glándula de cláster es análoga a la próstata en mamíferos, ya que la principal función de esta es la formación de proteínas e iones que puedan constituir y enriquecer la masa del fluido seminal (Hayward & Cunha, 2000).

Por otro lado, la presencia de glicoproteínas en las glándulas del cláster de las rayas y en general de elasmobranchios puede ser comparada con las secreciones producidas en la glándula bulbouretral o glándula de Cowper de mamíferos, las cuales, según Hart & Greenstein (1968), facilitan la coagulación del semen que en elasmobranchios podría ayudar a crear una capa protectora en la ranura del cláster protegiendo así el semen de la dilución del agua de mar, como lo sugirió LaMarca (1964). A pesar de que *P. magdalenae* es una raya dulceacuícola, las variaciones de la caracterización de mucosustancias con respecto a otras especies marinas como *U. jamaicensis* o tolerantes al agua dulce como *D. sabina* fue muy poca y las funciones atribuidas para esta secreción siguen en el terreno de las hipótesis.

5. CONCLUSIONES

Del desarrollo ontogénico de la glándula del cláster se concluye que este órgano sólo aparece en etapas posteriores al nacimiento; su actividad secretora comienza incipientemente en individuos juveniles, y es activa completa y continuamente en individuos adultos.

Las glándulas del cláster se hacen más grandes con el aumento en el tamaño corporal y son significativamente más grandes en los machos adultos reproductivos. La glándula del cláster es de secreción holocrina y asincrónica; la secreción consiste de glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos sulfatados.

Se encontró un mayor tamaño en la profundidad de las glándulas izquierdas que en las derechas. Sin embargo, ambas son funcionales. La morfología de estas glándulas en los individuos adultos es similar a la ya descrita para otras rayas y elasmobranquios.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAÚJO, M. L. G., CHARVET-ALMEIDA, P., PINTO DE ALMEIDA, M. & PEREIRA, H. (2004). Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document presented to CITES Animals Committee, AC 20, 8: 1-6.
- ARAÚJO, M. L. G. (2009). *Potamotrygon schroederi*. In IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 August 2015.
- CHARVET-ALMEIDA, P., DE ARAÚJO, M. L. G., & DE ALMEIDA, M. P. (2005). Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 37 (1): 165-171.
- DULVY, N. K., & REYNOLDS, J. D. (1997). Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264 (1386), 1309-1315.
- ESTRADA E., & URIBE M. (2002). Atlas de histología de vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. Primera edición. Páginas 19-29.
- FAHY, D. P., SPIELER, R. E., & HAMLETT, W. C. (2007). Preliminary observations on the reproductive cycle and uterine fecundity of the yellow stingray, *Urobatis jamaicensis* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Urolophidae) in Southeast Florida, U.S.A. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 14: 131-139.
- FRIEDMAN, M. H. F. (1935). The function of the claspers and clasper-glands in the skate. *Journal of the Biological Board of Canada*, 1(4): 261-268.

- GALÍNDEZ, DÍAZ-ANDRADE, AVACA, & ESTECONDO (2010). Morphological study of the oviductal gland in the smallnose fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller and Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Brazil Journal Biology*, 70 (2): 325-333
- GILBERT, P. W., & HEATH, G. W. (1972). The clasper -siphon sac mechanism in *Squalls acanthias* and *Mustelus canis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Biochemical and Physiology*, 42 (1): 97-119.
- HAMLETT, W. C., KORMANIK, G., STORRIE, M., STEVENS, B. & WALKER, T. I. (2005). Chondrichthyan Parity, Lecithotrophy and Matrotrophy. *In Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.) 3: 395-434.
- HART, R. G., GREENSTEIN, J. S., (1968). A newly discovered role for Cowper's gland secretion in rodent semen coagulation. *Journal of Reproductive Fertility* 17: 87–94.
- HAYWARD, S. W., & CUNHA, G., (2000). The prostate: Development and Physiology. *Radiologic Clinics of North America*, 38: 1-14.
- HENDERSON A. C., REEVE A.J., AMBU-ALI A., (2014). Microanatomy of the male and female reproductive tracts in the long-tailed butterfly ray *Gymnura poecilura*, an elasmobranch with unusual characteristics. *Journal of Fish Biology*, 84: 297–313.
- LACY, 2005. Alkaline glands and Clasper glands of Batoids. En *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (Hamlett, W.C., ed.) 3: 350-358.

- LAMARCA, M. J. (1964). The functional anatomy of the cláspes and cláspes gland of the yellow stingray, *Urolophus jamaicensis* (Cuvier). *Journal of Morphology*, 114: 303-23.
- LASSO, C., ROSA, R., SANCHEZ-DUARTE, P., MORALES-BETANCOURT, M. & AGUDELO-CORDOBA, E., 2014. IX Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Sudamérica, Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia. 368 pp.
- LEIGH-SHARPE, W. H. 1926. The comparative morphology of the secondary sexual characters of elasmobranch fishes. *Journal of Morphology*, 42: 307-348
- LUER, C., WALSH, C., BODINE, B. & WYFFELS J., (2007). Normal embryonic development in the clearnose skate, *Raja eglanteria*, with experimental observations on artificial insemination. *Environmental Biology of Fishes*. 80: 239–255.
- LUNA, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. McGraw-Hill Book Company.
- MOJICA, J.I.C., CASTELLANOS, S. U., & ALVARÉZ, R., (2002). Libro Rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá –Colombia.
- PEDREROS-SIERRA, T. & RAMÍREZ-PINILLA, M., (2015). Morphology of the Reproductive Tract and Acquisition of Sexual Maturity in Males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Journal of Morphology*, 276: 273-289

- PERDOMO-NUÑEZ, J. M. 2005. Rayas de agua dulce del género *Potamotrygon* utilizadas como ornamentales en Colombia. ACOLPECES. Bogotá D. C. Informe técnico 15 pp.
- PIERCY, A., GELSLEICHTER, J., & SNELSON, F.F. (2006). Morphological changes in the clasper gland of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, associated with the seasonal reproductive cycle. *Journal of Morphology*, 267(1): 109-14.
- RAMOS-SOCHA, H.B. & GRIJALBA-BENDECK, M. (2011). Bioecología de la raya de agua dulce *Potamotrygon magdalenae* (Myliobatiformes) en la ciénaga de Sabayo, (Duméril, 1865). *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14 (2): 109 - 118.
- THORSONL, T. B., & JAMES, K. (1983). Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*, 9 (1): 59-61.
- TRULL, J. L. (2008). La apariencia óptica de las células y los tejidos patológicos desentrañada a través del microscopio electrónico: Bases ultra estructurales de la microscopía óptica. *Revista Española de Patología*, 41(1): 11-22.
- YOUNG, B., LOWE, J., STEVENS, A., HEATH, J., 2013. Wheater's Functional Histology: A text and color Atlas. *Elsevier, Churchill Livingstone*. Sexta Edición. Páginas: 82-100.
- WOURMS, J. P. (1977). Reproduction and Development in Chondrichthyan Fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 17 (2): 379-410.