

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL



Dentro de los crustáceos, el orden Decapoda es el más diversificado, incluyendo cerca de 10.000 especies vivientes. Los cangrejos pertenecientes a este orden son predominantemente marinos, aunque algunos han invadido el agua dulce y otros han colonizado la tierra (Mellon, 1992).

En los crustáceos decápodos el músculo y el hepatopáncreas son los principales órganos de reserva y movilización de sustratos. En el músculo se almacena fundamentalmente glucógeno, aunque también existen reservas de lípidos. El hepatopáncreas participa en la síntesis y secreción de enzimas digestivas y absorción de sustancias digeridas; actúa también como almacén de minerales y sustancias orgánicas, tales como glucógeno, calcio, lípidos y proteínas (Sarasquete y col., 1985; Icelly y Nott, 1992; Luvizotto-santos y col., 2003; Oliveira y col., 2004). Estos compuestos son almacenados en la intermuda y movilizados durante la muda y reproducción (Stevenson, 1985; Zara y col., 2011).

### ***Músculo***

Al igual que en los vertebrados, en invertebrados se reconocen dos tipos principales de músculo de acuerdo con las características de sus células: músculo estriado y músculo liso. Bajo la denominación de músculo estriado se incluye un grupo heterogéneo de tejidos musculares, cuyas fibras pueden presentar una estriación transversal u oblicua (Royuela y col., 2000 a; Rosenbluth y col., 2010). Los crustáceos presentan músculos transversalmente estriados similares a los de vertebrados (Paniagua y col., 1996).

El tejido muscular esquelético de los decápodos representa una proporción importante de la masa total de los tejidos corporales. Comprende a los músculos flexores y extensores profundos y superficiales del abdomen, los músculos que abren y cierran las quelas o pinzas y los músculos extensores y flexores de las patas involucradas en el desplazamiento (El Haj y Whiteley, 1997). Al

igual que en los vertebrados, es evidente la presencia de tejido conectivo relacionado con el sistema muscular de crustáceos (Longo y col., 2011).

Se han identificado una amplia variedad de tipos de fibras musculares en crustáceos, según diferencias en su ultraestructura, histoquímica, propiedades contráctiles y composición de isoformas de proteínas miofibrilares. Existen tipos extremos - rápidas y lentas - con un continuo de tipos intermedios (Neil y col., 1993; Gruhn y Rathmayer, 2002; Koenders y col., 2004; Hooper y Thuma, 2005; Perry y col., 2009).

### ***Sistema digestivo***

El sistema digestivo de los decápodos es una estructura tubular que se extiende a lo largo del cuerpo desde la boca, en posición anteroventral hasta el ano, ubicado en el último somito abdominal. Sus componentes son: el intestino, que se divide en tres regiones (anterior, media y posterior), las glándulas acompañantes, los ciegos y los divertículos. Las regiones anterior y posterior del intestino derivan del ectodermo, por ello están tapizadas por cutícula, mientras que el intestino medio es de origen endodérmico y su epitelio está en contacto directo con la luz del órgano (Icely y Nott, 1992). El intestino anterior está compuesto por el esófago, el estómago cardíaco y el estómago pilórico. La región media del intestino comprende el intestino “propriadamente dicho”, el hepatopáncreas o glándula digestiva, ciegos anteriores y posteriores. Su longitud es variable aún en decápodos muy emparentados entre sí. La porción posterior del intestino abarca el recto y el ano (Sousa y Petriella, 2006).

El hepatopáncreas es una estructura bilateral, lobulada y muy ramificada que ocupa gran parte del cefalotórax anterior y lateral. Se conecta a la región ventroposterior del estómago pilórico a través de conductos primarios. Cada conducto se ramifica en los numerosos túbulos que forman la

glándula (Sousa y Petriella, 2000; Verri y col., 2001; Cuartas y col., 2002). Cada túbulo se divide en una zona distal ciega, una zona media y una proximal. El epitelio que reviste los túbulos está compuesto por, al menos, cuatro tipos celulares según sus características histológicas, ultraestructurales e histoquímicas (Sousa, 2003; Franceschini-Vicentini y col., 2009).

### ***Plasticidad fenotípica: respuesta frente a cambios en la salinidad ambiental***

La plasticidad fenotípica en individuos adultos involucra variaciones reversibles en respuesta a cambios espacio-temporales en las condiciones ambientales, tales como temperatura, salinidad, contenido de oxígeno, pH, fotoperiodo y flujo de agua (Johnston, 2006). Así, los crustáceos poseen una elevada capacidad de respuesta tisular tanto en condiciones normales como frente a los deterioros causados por modificaciones ambientales y/o fisiológicas (Masson, 2001; Cuartas y col, 2003; Sousa y Petriella, 2007; Díaz y col., 2010 a).

Los organismos que habitan zonas de mareas, aguas costeras y estuarios, como es el caso de los cangrejos eurihalinos, están expuestos a cambios frecuentes y abruptos en la salinidad ambiental. Estas fluctuaciones requieren ajustes a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico y comportamental para controlar el movimiento de agua e iones entre los individuos y el medio (Kirschner, 1991; 2004).

La osmorregulación involucra una serie de mecanismos energéticamente costosos que permiten mantener un gradiente osmótico entre el medio extracelular de un individuo y el medio externo. Todos los animales de agua dulce son osmorreguladores, mientras que las especies marinas pueden osmorregular u osmoconformar. Los animales que osmoconforman, si bien no son capaces de mantener un gradiente osmótico significativo entre el medio interno y el agua que los rodea (sus fluidos corporales son isosmóticos con el medio externo), regulan activamente la concentración

intracelular de osmolitos (Freire y col., 2008). Dentro de los invertebrados acuáticos, los crustáceos han invadido una gran diversidad de hábitats. De este modo, son capaces de llevar a cabo todos los tipos de estrategias osmorregulatorias y, más aún, pueden cambiar de estrategia (por ejemplo de osmorregulación a osmoconformación) dependiendo del cambio en la salinidad y del tiempo de exposición a dicho cambio (Freire y col., 2003). Así, los crustáceos estuariales, en general, son osmorreguladores en salinidad reducida (hiperreguladores) y osmoconformadores en condiciones de salinidad elevada (Kirschner, 2004).

En salinidad reducida, los crustáceos hiperregulan absorbiendo activamente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  desde el medio externo a través de las branquias para compensar la pérdida de sales (osmoionorregulación). Si bien las principales estructuras involucradas en este proceso son las branquias (Kirschner, 2004) en varias especies se ha sugerido el rol del músculo y del hepatopáncreas en mecanismos de ajuste secundarios a la osmoionorregulación. Por ejemplo, el músculo ha sido involucrado en la regulación del volumen celular (Freire y col., 2008), balance ácido base (Whiteley y col., 2001), en la movilización de lípidos bajo estrés hiposmótico (Luvizotto-Santos y col., 2003) y en la respuesta diferencial de diversas enzimas en condiciones de osmorregulación y osmoconformación (Pinoni, 2009). Por su parte, en el hepatopáncreas se ha demostrado un efecto de la salinidad ambiental sobre la gluconeogénesis y lipogénesis (Martins y col., 2011), así como también sobre la síntesis y liberación de enzimas digestivas (Li y col., 2008; Pinoni, 2009; Asaro y col., 2011). Sin embargo, faltan estudios a nivel morfológico e histoquímico sobre la respuesta de estos órganos frente al estrés salino.

### *Área y especies de estudio*

Las marismas costeras de estuarios y lagunas del Atlántico Sudoccidental, como es la laguna costera Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires, Argentina), son habitadas por poblaciones muy densas de cangrejos grápsidos (Spivak y col., 2001). Los mismos se hallan distribuidos en el área entre la línea de mareas baja y alta (intermareal), desde las planicies de inundación fangosas hasta las partes más altas vegetadas de la laguna (Bortolus, 2001). En esos ambientes existe una alta disponibilidad de alimentos y una gran diversidad de hábitats, así como intensos estreses fisiológicos. Estos animales deben enfrentar cambios diarios y estacionales de salinidad y temperatura (Spivak y col., 2001; Pinoni y López Mañanes, 2004).

*Cyrtograpsus angulatus* y *Neohelice granulata* (*Chasmagnathus granulatus*) (Grapsioidea, Varunidae) son cangrejos eurihalinos considerados como “especies clave” en los ecosistemas de marismas que se extienden a lo largo de las costas templado cálidas del Atlántico Sudoccidental (Boschi, 1964; Spivak y col., 1994; Spivak, 1997). Ambas especies coexisten en esos ambientes. Estudios previos sugieren que *N. granulata* desplaza a *C. angulatus* en áreas de sedimento blando, donde *N. granulata* construye extensas cuevas (Iribarne y col., 2003).

*N. granulata* es un cangrejo semiterrestre y excavador con una distribución discontinua, que abarca numerosos ambientes estuariales desde Río de Janeiro hasta el Golfo San Matías (Spivak y col., 2001). Habita en las planicies de marea y praderas de *Spartina densiflora* de la región externa o estuarial de la laguna Mar Chiquita (Pcia. de Bs. As.), donde la salinidad sufre cambios abruptos con un rango desde 4 a 35 ‰ (Anger y col., 1994; Spivak y col., 1994). Se comporta como hiperregulador en salinidades bajas y altas respectivamente, y como osmoconformador en 35 ‰ de salinidad (Pinoni y López Mañanes, 2011). Es una especie detritívora en las planicies de marea y herbívora en las áreas dominadas por *Spartina* (Bortolus e Iribarne, 1999; Alberti y col., 2008). Debido al rol esencial que cumple la alimentación detritívora sobre la composición del sedimento,

*N. granulata* es una especie clave en la producción e integridad de estos ambientes estuariales (Bortolus e Iribarne, 1999; Menone y col., 2004).

*C. angulatus* se distribuye desde Río de Janeiro (Brasil) hasta la Patagonia (Boschi, 1964) en el Atlántico, y desde Talcahuano (Chile) hasta Isla de San Lorenzo (Perú) en el Pacífico (Spivak, 1997). Es de hábitos más acuáticos. Los adultos se encuentran en el intermareal y submareal, en toda la extensión de Mar Chiquita, incluyendo hábitats de agua dulce, salobres y marinos. La especie es móvil y activa en el intermareal, principalmente cuando el área está cubierta por la marea, pero se refugia bajo las rocas o en el submareal somero durante la bajamar (Spivak y col., 1994). Al igual que *N. granulata*, en el intermareal está expuesto a cambios abruptos y frecuentes en la salinidad ambiental (Anger y col., 1994; Spivak y col., 1994). La especie es omnívora. En Mar Chiquita es anelidófaga y carroñera (Olivier y col., 1972).

### ***Hipótesis y objetivo general***

A pesar de la importancia ecológica de *N. granulata* y *C. angulatus*, y de la diversidad de trabajos sobre distintos aspectos de la biología de estos cangrejos, no existen estudios morfológicos e histoquímicos en músculo y hepatopáncreas de estas dos especies en relación a su estilo de vida y a las variables ambientales claves que afectan su distribución, tales como la salinidad.

De acuerdo con estos antecedentes, se propone la siguiente **hipótesis general**:

“La morfología funcional del músculo de cierre de las quelas y del hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* se relaciona con diferencias en el hábitat y modo de vida propio de cada especie, y se modifica por efecto de cambios en la salinidad ambiental”.

El **objetivo general** de esta tesis abarca el estudio morfológico del músculo de cierre de las quelas y del hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus*, y su respuesta al estrés salino.

## CAPÍTULO 2: ÁREA DE ESTUDIO Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



## 2.1. Área de estudio

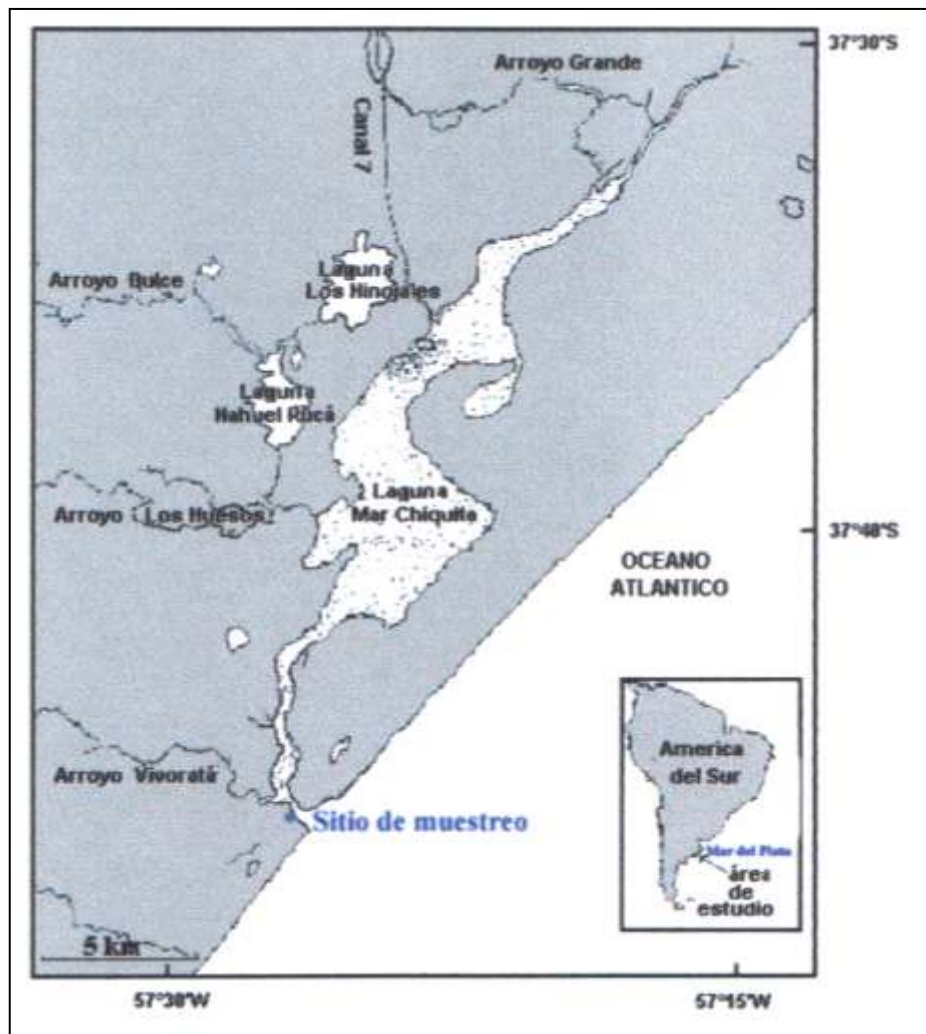
La laguna costera Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires) ( $37^{\circ}32'-37^{\circ}45'S$ ;  $57^{\circ}19'-57^{\circ}26'O$ ) es el único estuario de tipo restringido clásico existente en la Argentina, similar a los que existen en la costa atlántica de Uruguay y Brasil (Piccolo y Perillo, 1997). Posee una forma elongada, con una orientación general NNO-SSE. Su longitud es de 25 km, con un ancho variable entre 100 y 4500 m. Tiene un área total de  $46 \text{ km}^2$  con una cuenca tributaria de  $10.000 \text{ km}^2$  (Fasano, 1980). La conexión con el océano abierto se realiza por medio de un canal de 6 km de largo, 200 m de ancho y una profundidad que varía entre 3 y 0,5 m (Martos y Reta, 1997) (Fig. 1). La zona de la boca presenta un rasgo característico que es la existencia de deltas de marea (Reta y col., 2001).

La descarga de agua dulce en la laguna se realiza a través de una serie de arroyos y canales artificiales, además del importante influjo de aguas subterráneas (Fasano, 1980). Desde el punto de vista hidrográfico la laguna puede dividirse en dos ambientes netamente diferenciados: un cuerpo lagunar, donde la acción de la marea no es percibida, y un sector de características netamente estuariales, ubicado desde la boca hasta donde es percibida la acción de la marea. El límite entre ambos es sumamente variable, definiéndose por la conjunción de los siguientes parámetros: amplitud de mareas, las condiciones meteorológicas y el volumen de agua dulce presente en la laguna (Martos y Reta, 1997).

Por su latitud, la laguna Mar Chiquita, inscripta en la región pampeana, pertenece a una zona templada, estando afectada por la influencia de los vientos del sistema de altas presiones del Atlántico Sur y por los vientos cargados de humedad originados por la proximidad del mar. Asimismo, se halla expuesta eventualmente tanto a los efectos del viento "Pampero", de tipo seco y fresco en su condición de llanura abierta sin restricciones topográficas, como a los vientos fríos de latitudes meridionales (Reta y col., 2001). Las condiciones atmosféricas (precipitaciones,

dirección e intensidad de los vientos y ocurrencia de tormentas) tienen una gran influencia en la dinámica de las aguas de la laguna en periodos cortos (Reta y col., 1995).

El área única de muestreo comprende la playa localizada a 500 m de la boca sobre el margen sur de la laguna, que corresponde a la zona de planicie de marea (Fig. 1). Esta zona exhibe cambios abruptos, frecuentes y muy variables en la salinidad (entre 4 y 35 ‰) (Spivak y col., 1994; Beltrame y col., 2008).



**Figura 1.** Laguna costera Mar Chiquita. Mapa de la región y sitio de muestreo.

## 2.2. Animales de experimentación

Se capturaron ejemplares machos adultos de las especies *N. granulata* (Fig. 2) y *C. angulatus* (Fig. 3) durante la bajamar. Se utilizaron únicamente machos para evitar fuentes de variación debidas al dimorfismo sexual. La captura tuvo lugar entre los meses de octubre y diciembre de los años 2007, 2008, 2009 y 2010. Se seleccionaron cangrejos con quelas de tamaño similar (homoquelia) y se transportaron en recipientes con agua del lugar de la recolección. Una vez en el laboratorio, los animales fueron aclimatados 20 días en acuarios con aireación continua y condiciones controladas de alimentación (Cichlind T.E.N., Wardley, Secaucus, N.J., USA, tres veces por semana), salinidad (35 ‰ y 10 ‰), fotoperíodo (12:12 L:O) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) (Pinoni y col., 2005). Para tal fin, se utilizaron cuatro peceras, dos (una para cada especie) aclimatadas a 35 ‰, y otras dos (una para cada especie) a 10 ‰ de salinidad. Para determinar el estadio del ciclo de muda de cada individuo, se observaron bajo microscopio óptico las setas de las maxilas (Moriyasu y Mallet, 1986) de cangrejos previamente crioanestesiados. Se seleccionaron los ejemplares en intermuda.

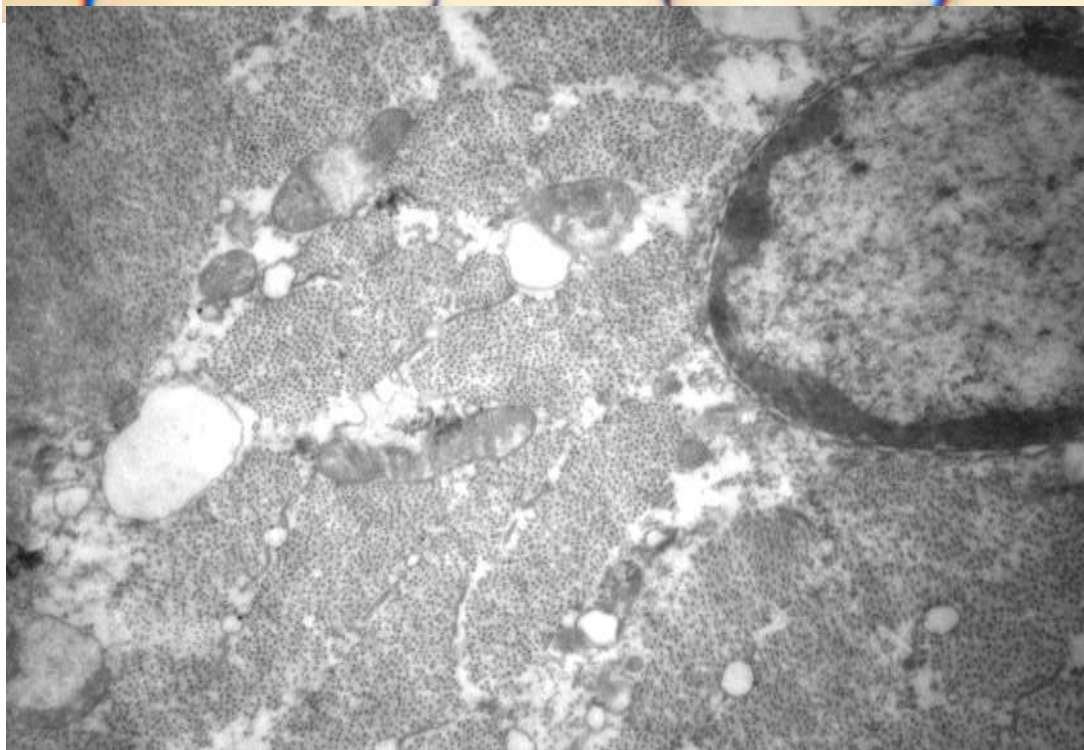
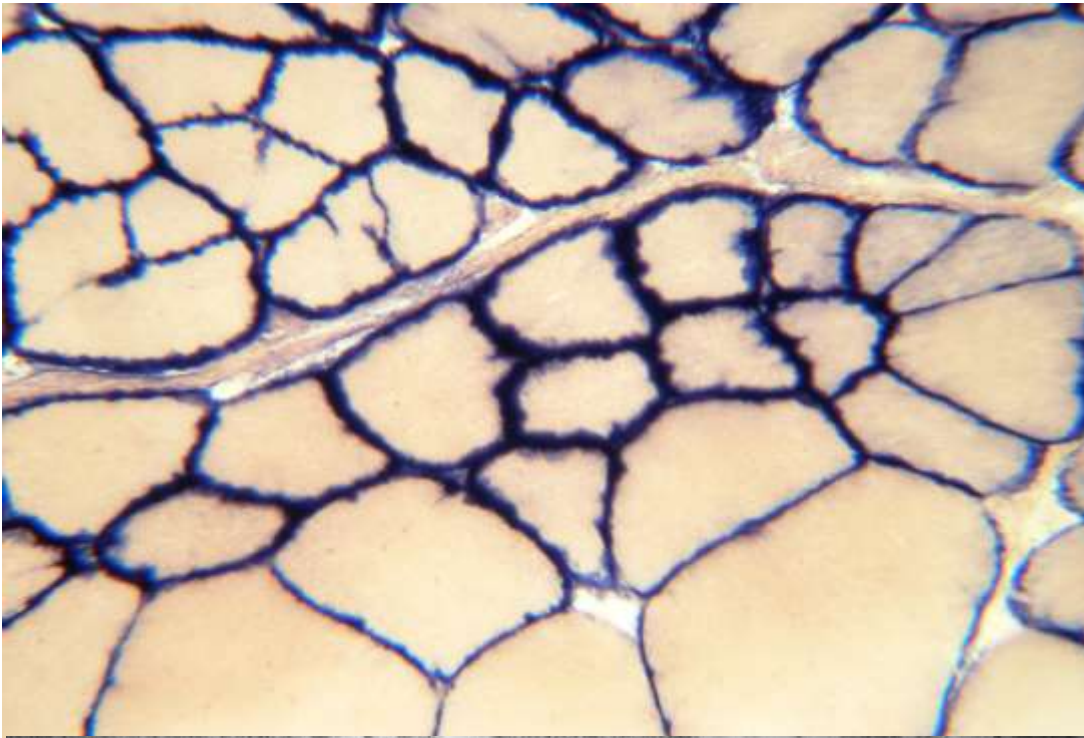


**Figura 2.** *N. granulata*. Vista dorsal de un macho adulto. Escala: 2 cm.



**Figura 3.** *C. angulatus*. Vista dorsal de un macho adulto. Escala: 2 cm.

## CAPÍTULO 3: MÚSCULO



### 3.1. Introducción

En vertebrados e invertebrados se reconocen dos tipos principales de tejido muscular: estriado y liso. Bajo la denominación de tejido muscular estriado se incluye un grupo heterogéneo de tejidos musculares. Así, de acuerdo con las características de sus células encontramos: el músculo esquelético que conforma la musculatura somática de los vertebrados, el músculo cardíaco de vertebrados y el músculo estriado de los invertebrados (transversal y oblicuo) (Royuela y col., 2000 a).

Dentro de los invertebrados, los artrópodos presentan el tipo muscular más similar al músculo esquelético de los vertebrados, que corresponde al músculo transversalmente estriado con discos Z continuos (Paniagua y col., 1996). Al igual que los vertebrados, las fibras contienen unidades paralelas menores denominadas miofibrillas que están compuestas por miofilamentos visibles con el microscopio electrónico. El sarcómero es la unidad estructural y funcional que se repite a lo largo de la miofibrilla, y es el segmento comprendido entre dos discos Z. Los filamentos gruesos están compuestos principalmente por moléculas de miosina; los filamentos finos contienen actina, tropomiosina y el complejo troponina (Hooper y Thuma, 2005). La disposición de los filamentos finos y gruesos origina el patrón de bandas de las miofibrillas. Los filamentos gruesos están ubicados en la porción central del sarcómero, denominada banda A (oscura). Los filamentos finos se fijan al disco Z y se extienden dentro de la banda A hasta el borde de la banda H (zona central de la banda A, menos refringente). La línea M marca el centro de la banda H. Las porciones de dos sarcómeros ubicadas a cada lado del disco Z constituyen la banda I (clara) y sólo contienen filamentos finos (Fig. 4). La miosina, actina, troponina y tropomiosina son las proteínas primarias del aparato contráctil (Ross y Pawlina, 2007). El sistema sarcotubular está compuesto por el retículo endoplásmico liso (retículo sarcoplásmico) y el sistema de túbulos transversos (túbulos T). El

retículo sarcoplásmico (RS) forma una red anastomosada de cisternas y túbulos que rodea cada miofibrilla. Los túbulos T son invaginaciones de la membrana plasmática (sarcolema) que corren perpendicularmente a las miofibrillas al nivel del límite entre la banda A e I, por lo que se encuentran dos túbulos T por sarcómero. En los artrópodos, a ese nivel, cada túbulo T se contacta con una cisterna del RS formando una díada, y en algunos casos, con dos cisternas, formando tríadas. En el músculo esquelético de los vertebrados solo se observan tríadas (Paniagua y col., 1996).

Al igual que en los vertebrados, es evidente la presencia de tejido conectivo relacionado con el sistema muscular de crustáceos. Componentes fibrosos de dicho tejido están asociados con la inserción de los músculos en la cutícula y tendones, siendo, de esta manera, elementos en la transmisión de fuerzas desde las contracciones musculares a los miembros del exoesqueleto (Mellon, 1992). Los componentes celulares del tejido conectivo de crustáceos corresponden a células propias de este tejido, fibroblastos y fibrocitos, y a células del sistema inmune, los hemocitos (Longo y col., 2011). Los hemocitos constituyen la fracción celular de la hemolinfa e intervienen en reacciones inmunitarias. Se clasifican, principalmente, en base a la proporción núcleo/citoplasma y a la presencia y tamaño de gránulos citoplasmáticos electrodensos cuando se los observa con el microscopio electrónico de transmisión (MET). Los hemocitos hialinos presentan una mayor proporción núcleo/citoplasma y algunos gránulos electrodensos de pequeño tamaño o ausencia de ellos. Participan en el inicio de la coagulación hemolinfática. Los granulocitos tienen abundantes gránulos electrodensos de pequeño o gran tamaño y su función abarca mecanismos de defensa contra agentes extraños, tales como fagocitosis y encapsulación (Hose y col., 1990; Martin y Hose, 1992; Kondo y col., 1998).

Las fibras esqueléticas de los crustáceos presentan diámetros mucho más variables que las de los vertebrados, en un rango que va desde menos de 10  $\mu\text{m}$  hasta más de 500  $\mu\text{m}$  en adultos grandes, como *Callinectes sapidus* (Boyle y col., 2003). Las fibras musculares de gran tamaño están asociadas con arreglos esqueléticos tales que les permitan desarrollar grandes fuerzas, gran velocidad de contracción, o ambas (Mellon, 1992).

Una característica ultraestructural única en las fibras musculares de crustáceos, vinculada con su diámetro extremo, es la presencia de “clefts” o invaginaciones profundas del sarcolema, que permiten que todos los grupos de miofibrillas de una fibra se contraigan a la vez. Estos “clefts” se ramifican hacia el interior de la fibra muscular, originando el sistema de túbulos T (Selverston, 1967; Boyle y col., 2003).

Peachey y Huxley (1964) describieron por primera vez un segundo tipo de sistema tubular en crustáceos, los túbulos Z. Este sistema tubular, se origina como invaginaciones del sarcolema a nivel de los discos Z. Existe cierta controversia con respecto a su relación con el sistema de túbulos T: algunos autores afirman que ambos sistemas tubulares están en continuidad, mientras que otros creen que son sistemas aislados (Mellon, 1992).

En los crustáceos, todos los tipos de fibras musculares, ya sean viscerales, cardíacas o esqueléticas, son transversalmente estriadas y exhiben una gran diversidad ultraestructural, histoquímica, bioquímica y fisiológica. Se reconocen dos tipos funcionales extremos: fibras rápidas y lentas, junto a un amplio espectro de tipos intermedios (Neil y col., 1993; Medler y col., 2004; Perry y col., 2009).

Una de las fuentes más evidentes de la variación ultraestructural corresponde a la longitud de los sarcómeros (Atwood, 1973). A diferencia del músculo de vertebrados, las fibras musculares de los crustáceos presentan un amplio rango de longitudes de sarcómero de 2 a 20  $\mu\text{m}$  (Biewener, 2003).

Existen fibras con sarcómeros cortos ( $< 4 \mu\text{m}$ ) y largos ( $> 6 \mu\text{m}$ ), con poblaciones de fibras intermedias entre ambos extremos ( $4\text{-}6 \mu\text{m}$ ) (Lang y col., 1977). La longitud de los sarcómeros, junto con el grado de desarrollo del sistema sarcotubular (túbulos T y RS) se correlacionan con la velocidad de contracción muscular: fibras con sarcómeros cortos (SC) y un gran desarrollo del sistema sarcotubular generan contracciones rápidas, mientras que en las fibras con sarcómeros largos (SL) y escaso desarrollo del sistema sarcotubular las contracciones son lentas (Kier y Curtin, 2002; Perry y col., 2009). La fuerza de la contracción se relaciona con el número de puentes cruzados entre los filamentos finos y gruesos, siendo mayor en las fibras con sarcómeros largos, las cuales presentan una elevada proporción de filamentos finos a gruesos (7:1) en corte transversal (Royuela y col., 2000 a).

Además del análisis ultraestructural de las fibras musculares, existen métodos bioquímicos e histoquímicos usados para la distinción de los distintos tipos de fibras. El análisis bioquímico está centrado en el estudio de la composición de isoformas de las proteínas miofibrilares (Medler y col., 2004; Perry y col., 2009). Las técnicas histoquímicas involucran tests que miden la actividad de la enzima miosín-Adenosín Trifosfatasa (m-ATPasa) y la capacidad oxidativa de las fibras (Neil y col., 1993; Gruhn y Rathmayer, 2002). Músculos que se contraen rápidamente muestran una tinción más intensa con la técnica de m-ATPasa que los de contracción lenta. Esto se debe a que la actividad específica de m-ATPasa para el músculo rápido de crustáceos es de dos a tres veces mayor que para el músculo lento (Govind, 1984). Las preincubaciones a distintos pHs, así como también los cambios en la temperatura de incubación permiten detectar una variedad mayor de tipos de fibras musculares (Maier y col., 1984; Mykles, 1988; Neil y col., 1993; Gruhn y Rathmayer, 2002; Longo y col., 2011). La velocidad de contracción y la capacidad oxidativa de las fibras tienden a variar inversamente. Adicionalmente, variaciones en la actividad de m-ATPasa han sido

relacionadas con diferencias en el contenido de polisacáridos (Tse y col., 1983; McDermott y Stephens, 1988).

El sistema muscular de los crustáceos, que desempeña un rol muy importante en la interacción de estos organismos con el ambiente, presenta en cada especie una disposición neuromuscular característica relacionada con su estructura anatómica y el hábitat que ocupa (Bond-Buckup y col., 1991).

La quela es un órgano multifuncional, siendo utilizada durante la alimentación, ataque-defensa y reproducción, principalmente, así como también en otras actividades tales como la excavación (Lee, 1995). Se compone de dos músculos antagónicos: el de “apertura”, pequeño y ubicado dorsalmente, y el de “cierre”, localizado en posición ventral (Fig. 5). El músculo de cierre ocupa una proporción importante del volumen de la quela, generando una de las fuerzas mecánicas más fuertes de las reportadas para cualquier grupo de animales (Taylor, 2000).

Estudios previos de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* de la laguna Mar Chiquita reportaron que el músculo de cierre está compuesto principalmente por fibras SL, que son indicativas del tipo lento (Fernández Giménez y col., 2007; Longo y col., 2011). Adicionalmente, en *N. granulata* este hecho concuerda con la intensidad de tinción moderada de las fibras con la técnica de m-ATPasa (Longo y col., 2011).

A través de estudios bioquímicos, se ha demostrado la presencia de reservas de triglicéridos, glucógeno y proteínas en el músculo de la quela de *N. granulata* de distintas zonas de la laguna Mar Chiquita (Pinoni y col., 2011). Trabajos previos de ajustes a nivel bioquímico frente a cambios de salinidad en ambas especies de cangrejos demostraron que *C. angulatus* y *N. granulata* exhiben mecanismos osmorregulatorios complejos que involucran la actividad de enzimas claves en el músculo de la quela (Pinoni y col., 2005; Pinoni y López Mañanes, 2008; Pinoni y López Mañanes,

2009). En *N. granulata* se analizó bioquímicamente el contenido de lípidos y glucógeno en músculo a diferentes salinidades (Nery y Santos, 1993; Luvizotto-Santos y col., 2003; Artillo y col., 2008; Pinoni y López Mañanes, 2011).

Sin embargo, en estas especies no existen estudios que analicen las actividades de la m-ATPasa y de enzimas oxidativas, ni caractericen histoquímicamente las reservas del músculo en diferentes condiciones de salinidad. Tampoco existen trabajos que caractericen ultraestructuralmente el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*.

Por lo tanto, el estudio histoquímico y ultraestructural del músculo de cierre de las quelas en diferentes especies de cangrejos estuariales contribuirá a la comprensión de hechos fundamentales en el campo, tales como son el apareamiento, alimentación y competencia intra e interespecífica en los ecosistemas de marismas salobres del este de Sudamérica.

Por otro lado, el análisis histoquímico del citado músculo en distintas condiciones de salinidad será de gran aporte al conocimiento de los complejos mecanismos de ajuste frente al estrés salino en *C. angulatus* y *N. granulata*.

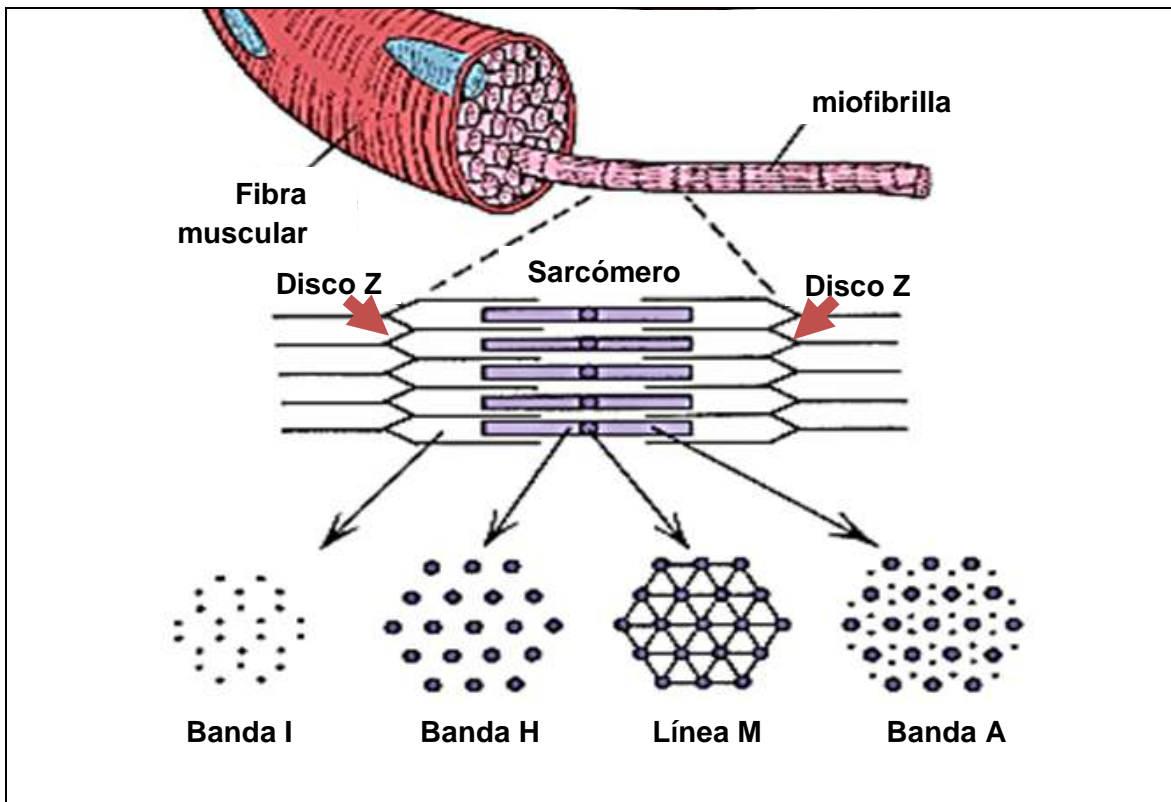
Las **hipótesis** de este capítulo son las siguientes:

- “El músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* y *C. angulatus* presenta una composición de tipos de tipos de fibras relacionada con el hábitat y modo de vida de estas especies.
- “La composición de tipos de fibras propia de cada especie varía con los cambios en la salinidad ambiental”.

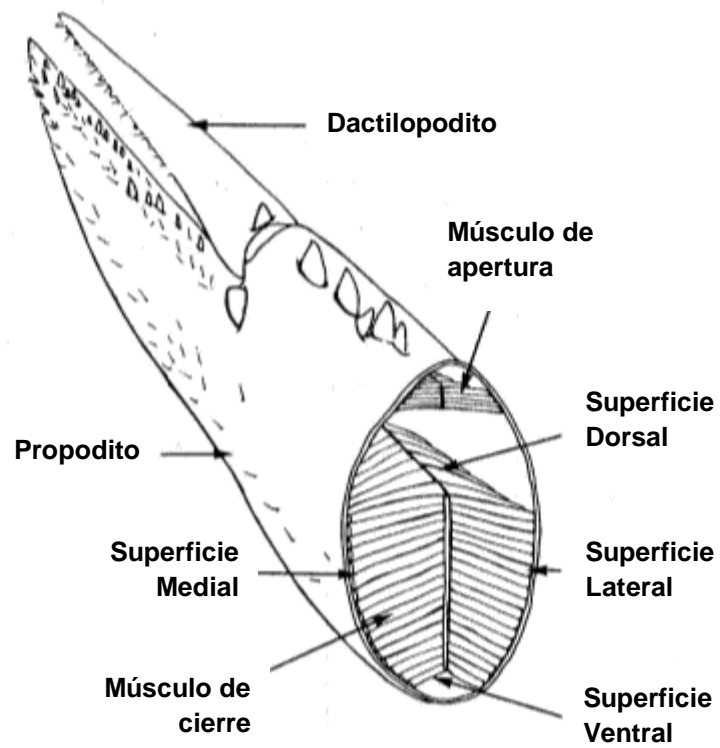
- “Las reservas de lípidos y glucógeno del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* se modifican con los cambios en la salinidad del ambiente, de un modo diferencial según la especie”.

Los **objetivos** comprenden:

- Caracterizar ultraestructuralmente el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*.
- Caracterizar histoquímicamente el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*.
- Encontrar posibles relaciones entre la composición de fibras musculares y las funciones de la quela en estas dos especies de cangrejos.
- Analizar histoquímicamente el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* en distintas condiciones de salinidad.
- Encontrar posibles relaciones entre la histoquímica del músculo de cierre de las quelas de ambas especies de cangrejos y las variaciones de salinidad.



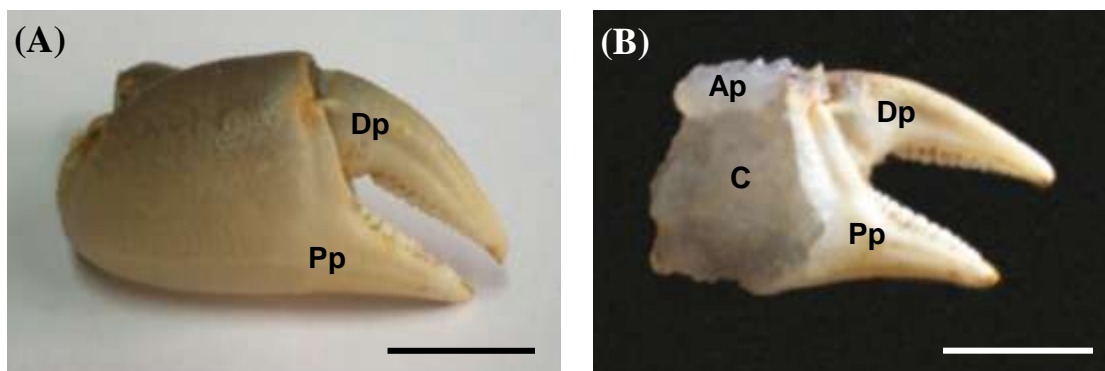
**Figura 4. Diagrama del sarcómero del músculo esquelético (modificado de Ross y Pawlina, 2007).**



**Figura 5. Músculos que componen la quela de los crustáceos decápodos (modificado de Govind, 1984).**

### 3.2. Materiales y Métodos

Los animales fueron mantenidos en ayuno durante las 24 hs. previas a la toma de muestras. Se anestesiaron en hielo durante 20-30 min., se registró el largo de ambas quelas y el ancho del cefalotórax. A continuación se seccionaron las quelas, se separó la cutícula de las mismas y se extrajo el músculo de cierre. No se utilizó el músculo de apertura, ya que por su pequeño tamaño es de difícil manipulación (generalmente se lisa durante la extracción de la cutícula) (Fig. 6).



**Figura 6. Quela de *C. angulatus*.** (A): cara externa. (B): cara interna, donde se extrajo la cutícula y se observan los músculos de apertura (Ap) y cierre (C). Dp: dactilopodito; Pp: propodito. Escala: 1 cm.

### ➤ **3.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Se utilizaron 3 ejemplares de cada especie aclimatados a una salinidad de 35 ‰. Se obtuvieron cortes de 0.5-1 mm de lado de diferentes zonas del músculo (dorsal, media y ventral). Se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer fosfato, a una temperatura de 4° C durante 2 horas. Posteriormente, se lavó el tejido con buffer fosfato 30 min. (2 o 3 cambios). Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata para su postfijación en tetróxido de osmio y tratamientos posteriores.

Las muestras fueron examinadas con un microscopio JEM 1200EX II, JEOL y fotografiadas con una cámara digital (ES 500W Erlangshen CCD Gatan).

### ➤ **3.2.2. Histoquímica**

Para la caracterización histoquímica se utilizaron 12 ejemplares de cada especie, 6 aclimatados a la salinidad de 35 ‰ y otros 6 aclimatados a la salinidad de 10 ‰ (con un largo de la quela entre 2,2 y 2,9 cm, y un ancho del cefalotórax entre 3,4 y 3,9 cm para *C. angulatus*; un largo de la quela entre 2,65 y 3,2 cm, y un ancho del cefalotórax entre 3,1 y 3,5 cm para *N. granulata*). Los animales anestesiados en hielo fueron transportados a la cámara fría (4° C) para realizar la fijación. El músculo de cierre fue fijado en nitrógeno líquido (-170° C) y almacenado en freezer (-20° C). Se llevaron a cabo cortes por congelación (10-15 µm) en crióstato a -20° C. Se trabajó con las secciones correspondientes a la región central del músculo. El material utilizado para detectar enzimas se empleó dentro de las dos a tres semanas luego de ser muestreado. Previo a la tinción, las secciones fueron secadas al aire durante 15 a 50 min. Se realizaron las siguientes técnicas histoquímicas:

- a) m-ATPasa. Permite diferenciar distintos tipos de fibras. Se utilizó el método de Guth y Samaha (1970) con algunas modificaciones: 1) incubación a temperatura ambiente (Günzel y col., 1993); 2) preincubaciones a pHs: 4,6 y 10,05 (Maier y col., 1984; Günzel y col., 1993; Devinenti y col., 2009; Longo y col., 2011). Las muestras fueron incubadas durante 30 min. Los controles se llevaron a cabo reemplazando el ATP por glicerofosfato de sodio.
- b) Succinato Deshidrogenasa (SDH). Es una enzima del ciclo de Krebs que permite detectar mitocondrias. Se prosiguió según el protocolo de Deffendi y Pearson (1955) con las siguientes modificaciones: las secciones se incubaron en cámara húmeda en estufa a 40° C durante 1 a 2 hs. (Neil y col., 1993). En los controles se suprimió el sustrato, succinato de sodio (Tse y col., 1983).
- c) Ácido Periódico Schiff (PAS) (Mc Manus, 1948; Hotchkiss, 1948): para evidenciar glucógeno y/o glicoproteínas (GPs) con dioles vecinos oxidables. Las muestras fueron tratadas con ácido periódico durante 15 min. Se lavaron en agua corriente y tiñeron con reactivo de Schiff (parafucsina en ácido sulfuroso) de 2 a 5 min. Como control se efectuó la digestión con amilasa salival (ptialina): las muestras se incubaron en cámara húmeda en estufa a 36° C durante 45 min., se prosiguió con la técnica de PAS (Pearse, 1985).
- d) Negro Sudan B (Johnson, 1980): para identificar lípidos neutros. Los cortes fueron tratados con solución de dicromato de potasio durante 75 min. Se lavaron en agua corriente, se colocaron en alcohol 70 % y se tiñeron con Negro Sudan B durante 16 hs. Como control, se realizó la técnica luego de extraer los lípidos con acetona durante 8 hs.

Los resultados fueron evaluados en forma semicuantitativa: se consideró la presencia (+) o ausencia (-) de reactividad, y la intensidad en la presencia de actividad fue indicada como un incremento en número.

### ➤ 3.2.3. Morfometría

Se analizaron las secciones musculares de tres individuos de cada especie, para cada salinidad, ya que fueron las únicas que presentaron fibras enteras y en sección transversal. Se utilizaron fotomicrografías de cortes teñidos con m-ATPasa para contar el número total de fibras de cada tipo en la sección muscular completa. Se midieron los diámetros de los diferentes tipos de fibras utilizando un ocular graduado en un microscopio óptico (Zeiss NU 2). El diámetro irregular de las fibras fue estimado como el promedio de los ejes ortogonales de cada fibra (Alnaqeeb y Goldspink, 1986; Wernig y col., 1990). Se calcularon las proporciones relativas (%) de los tipos de fibras. Estos valores y los diámetros promedio se utilizaron para calcular el área relativa porcentual (%  $A_i$ ) de cada tipo de fibra de acuerdo a la siguiente ecuación (Andrews y Spurgeon, 1986):

$$\% A_i = (\%i \times A_i) / \sum [\%i \times A_i],$$

donde %i = proporción relativa del tipo de fibra i, y  $A_i$  = área media en sección transversal del tipo de fibra i. El área media en sección transversal se calculó como:

$$A_i = (X_i / 2)^2 \times (\pi),$$

donde  $X_i$  = diámetro promedio del tipo de fibra i.

### ➤ 3.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Sigma Stat 3.5. Se utilizó el test de  $\chi^2$  para comparar las proporciones de los distintos tipos de fibras entre las dos especies y dentro de la misma especie, entre las dos salinidades. Las medias de los diámetros fueron comparadas mediante un análisis de varianza (test de Kruskal-Wallis), seguido del test de Dunn para comparaciones simultáneas de pares de datos. Se compararon, por un lado, los diámetros de los distintos tipos de

fibras en cada especie a distintas salinidades y, por otro lado, los diámetros de los distintos tipos de fibras entre ambas especies para una misma salinidad (Zar, 2010).

En todos los casos se agruparon los datos de los tres individuos muestreados para cada especie y salinidad.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. **MET**

En general, la ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de ambas especies de cangrejos es similar.

En cortes semifinos, se observa la inserción de fibras musculares individuales en el tegumento. El tejido tegumentario consta de una cutícula proteico quitinosa y el epitelio que la secreta. El epitelio está constituido por células epidérmicas modificadas (células tendinosas) que emiten proyecciones hacia la cutícula y la célula muscular. La unión con la célula muscular ocurre al nivel del disco Z, y es evidenciada por la presencia de numerosas interdigitaciones de forma cónica. La superficie externa de las células epidérmicas se conecta con la cutícula a través de pequeñas proyecciones similares a microvellosidades. Asociado a la unión músculo-tendinosa, se observa tejido conectivo con depósitos de melanina (Figs. 7A, B).

Ultraestructuralmente, se observan fibras musculares muy próximas entre sí, separadas por una delgada capa de tejido conectivo laxo, donde pueden distinguirse fibroblastos y células del sistema inmune, hemocitos hialinos y granulares (granulocitos). Los hemocitos hialinos exhiben un núcleo central y de cromatina laxa, que ocupa gran parte de la célula. Su citoplasma presenta escasos gránulos electrodensos o carece de los mismos (Fig. 8A). Los granulocitos, como su nombre lo indica, se caracterizan por presentar gránulos citoplasmáticos electrodensos (Fig. 8A). Son células redondeadas de mayor tamaño y menor proporción núcleo/citoplasma que los hemocitos hialinos. Sus núcleos pueden ubicarse centralmente o estar desplazados hacia la periferia de la célula.

Rodeando a las fibras musculares suelen observarse elementos del sistema nervioso (Fig. 8B). Cada célula muscular se halla limitada por una membrana plasmática -sarcolema- y presenta

numerosos núcleos. Es notable la presencia de “clefts” (Fig. 9A). Los núcleos, de cromatina laxa con un anillo externo heterocromático y nucléolo evidente, se ubican tanto en la periferia celular, como entre las miofibrillas (Figs. 9B, 10, 11A y 14A).

Se observan numerosas mitocondrias, localizadas principalmente debajo de la membrana plasmática (mitocondrias subsarcolémicas); también se las encuentra entre las miofibrillas (mitocondrias intermiofibrilares). Las mitocondrias subsarcolémicas son esferoidales y presentan crestas tubulares poco desarrolladas con una matriz clara abundante (Figs. 9A; 12C), mientras que las mitocondrias intermiofibrilares exhiben una forma más alargada (de bastón) y numerosas crestas transversales (Fig. 11).

Internamente se localizan las miofibrillas, cuyo patrón ultraestructural corresponde al del músculo transversalmente estriado. Los miofilamentos forman sarcómeros bien definidos, delimitados por los discos Z (Figs. 9A-C; 10A, B; 12A-C; 14A, B). Las bandas A, I, H y la línea M no se diferencian claramente.

Rodeando a las miofibrillas se observa un sistema sarcotubular bien desarrollado. El componente tubular comprende los “clefts” y sus ramificaciones, los sistemas tubulares Z (Fig. 9B) y T (Figs. 10C, 11, 13B, D). El otro componente de este sistema corresponde al RS, que presenta cisternas de aspecto globular muy dilatadas (Figs. 9-14). Los túbulos T y el RS se asocian formando díadas y tríadas usualmente a nivel del límite entre las bandas A e I (Figs. 10C y 13C).

Los depósitos de lípidos son escasos o nulos. El glucógeno se observa como partículas difusas y pequeñas entre los miofilamentos (Fig. 14).

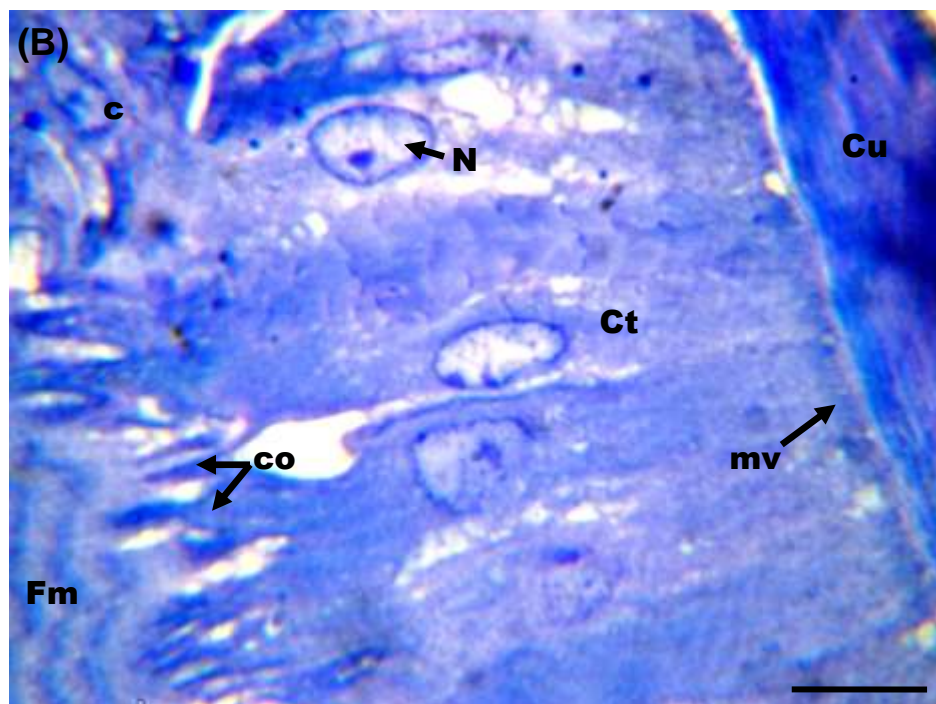
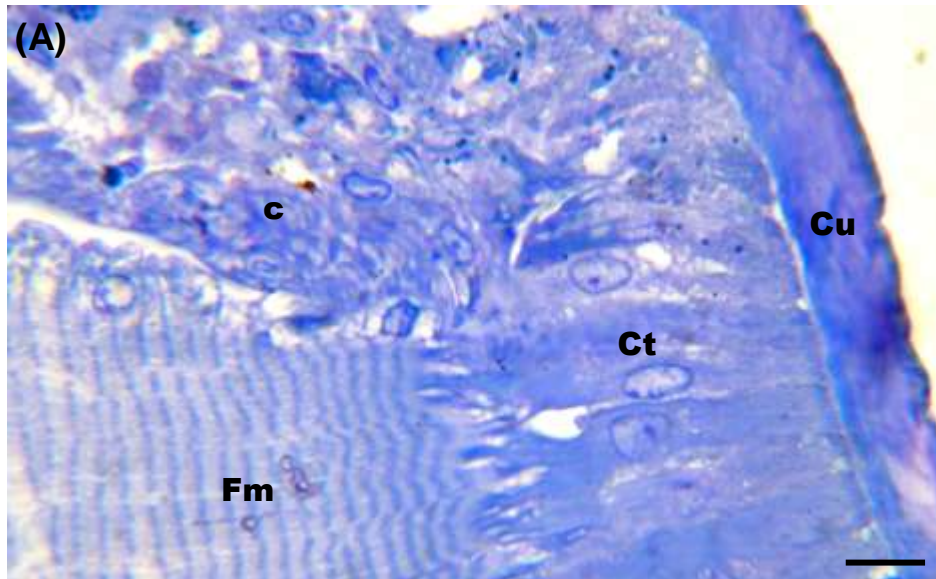
En *C. angulatus* pudieron distinguirse dos tipos de fibras. Uno corresponde a fibras con sarcómeros de longitud intermedia ( $6 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) y con un arreglo de miofilamentos más ordenado, de disposición poligonal en corte transversal. Los discos Z siguen un patrón bastante lineal. Las

cisternas del RS están muy desarrolladas, principalmente en la periferia celular, y las mitocondrias son abundantes y de gran tamaño. Este tipo de fibra fue hallado en la zona dorsal del músculo (Fig. 9). El segundo tipo celular, perteneciente a las zonas media y ventral del músculo de cierre, presenta sarcómeros largos ( $8 \pm 1,35 \mu\text{m}$ ) y con un arreglo de miofilamentos más desordenado, con discos Z en zigzag. Las mitocondrias son pequeñas y las cisternas del RS están menos desarrolladas (Figs. 10 y 11). El glucógeno es escaso en ambos tipos celulares.

En *N. granulata* las fibras son de mayor tamaño que en *C. angulatus*, los miofilamentos están más densamente empaquetados, y en corte transversal presentan una disposición poligonal. Los discos Z muestran un arreglo en zigzag. Los sarcómeros son largos ( $8 \pm 1,49 \mu\text{m}$ ) y las mitocondrias pequeñas. No se observan cisternas del RS tan desarrolladas en la periferia celular, aunque son abundantes entre las miofibrillas (Figs. 12-14). Los depósitos de glucógeno son evidentes (Fig. 14).

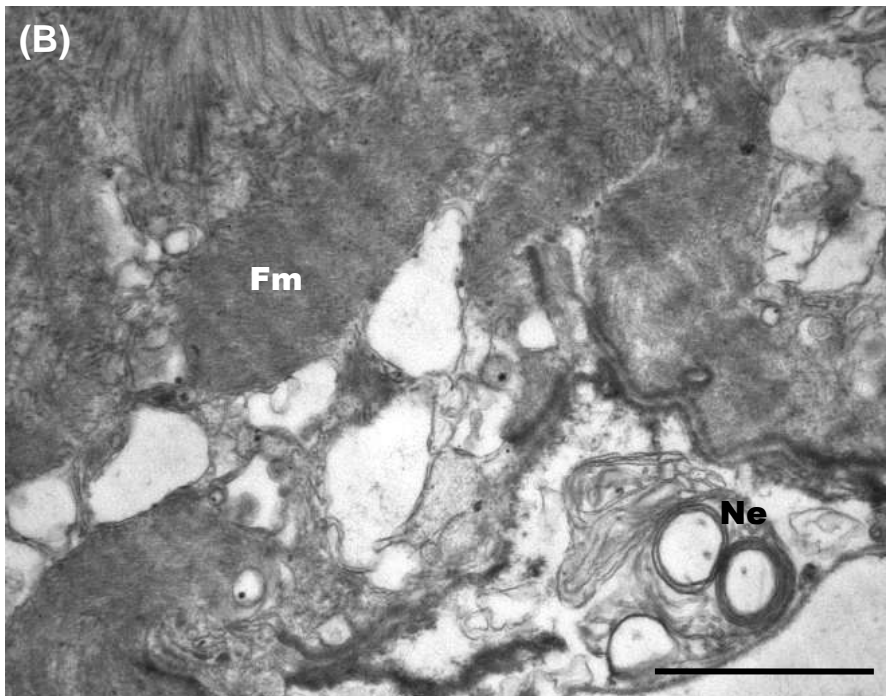
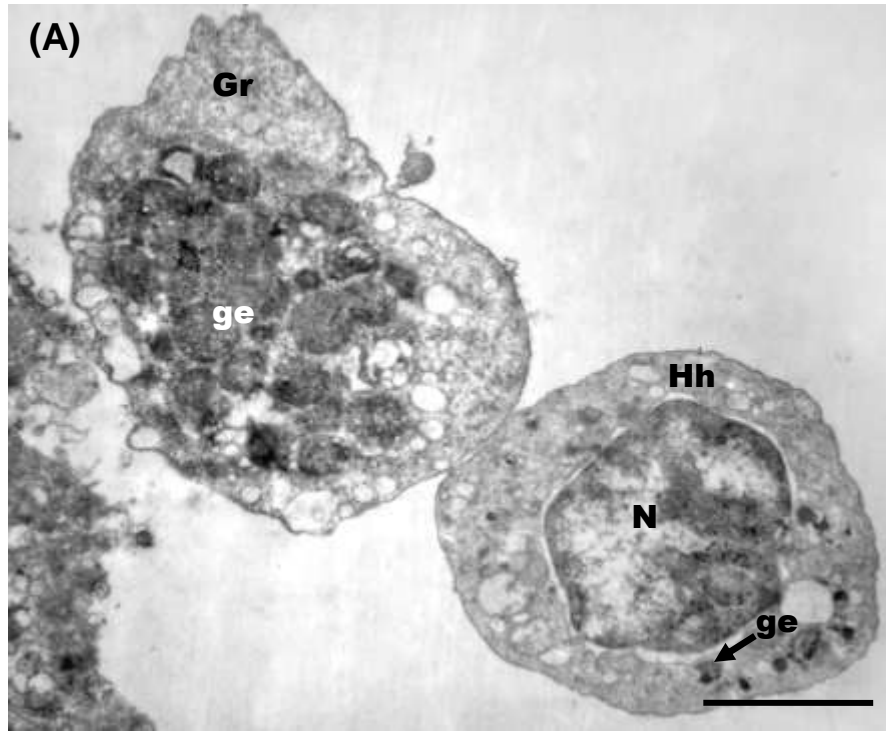
**Figura 7. Músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad: Inserción de la fibra muscular en el tegumento. Secciones semifinas teñidas con Azul de Toluidina. (A):** se observa la unión de la fibra muscular (Fm) a la cutícula (Cu) por medio de células tendinosas (Ct). **(B):** detalle de la figura A. Nótese las interdigitaciones cónicas (co) en la unión músculo-tendinosa y las proyecciones similares a microvellosidades (mv) en la unión de las células tendinosas con la cutícula.

c: conectivo; N: núcleo de célula tendinosa. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .



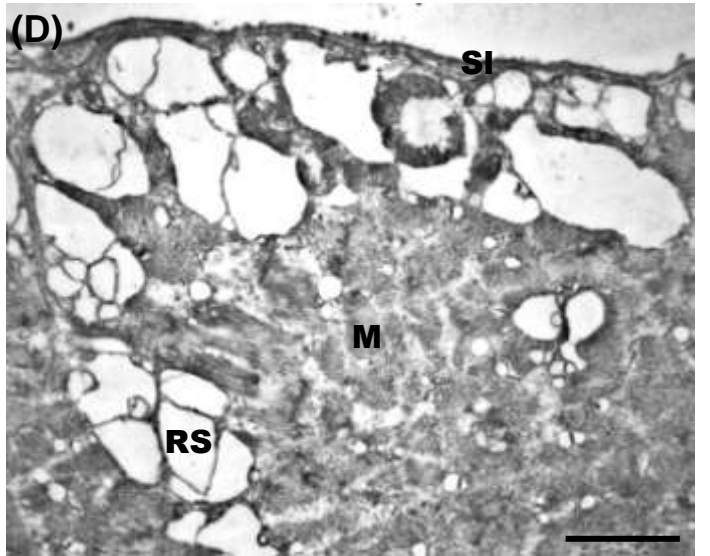
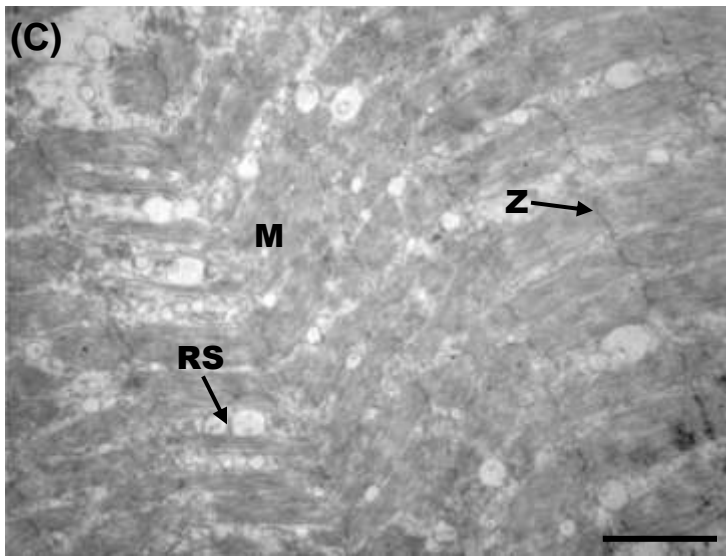
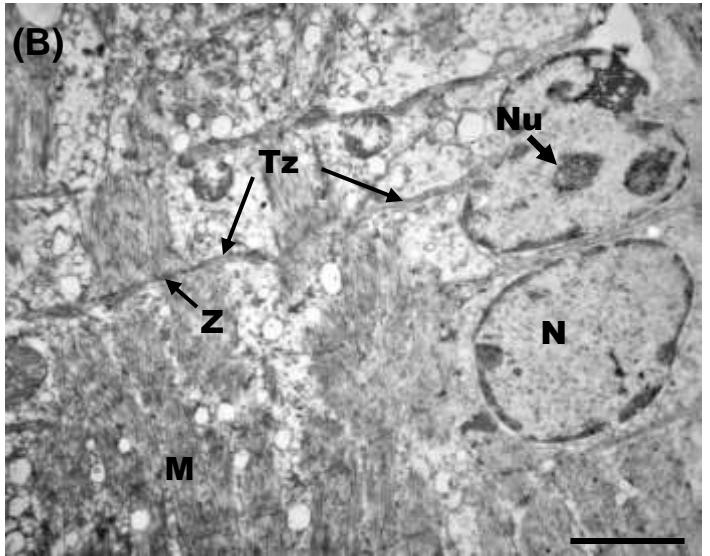
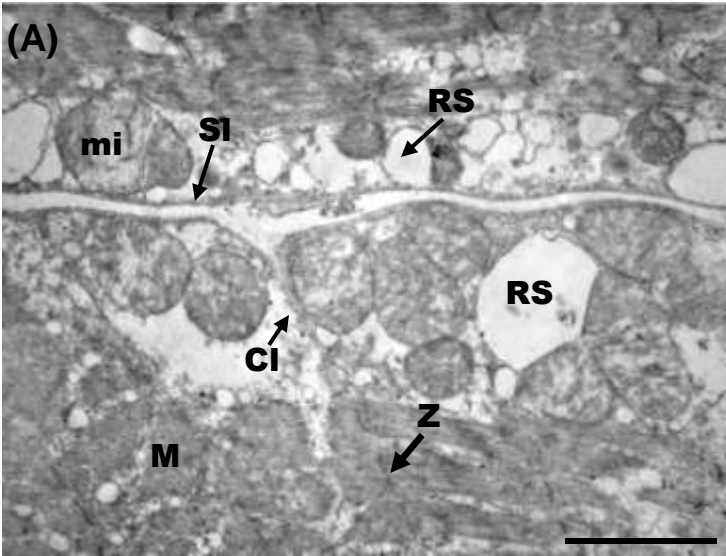
**Figura 8. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad: hemocitos y elementos del Sistema Nervioso. (A): *C. angulatus*. Nótese la abundancia de gránulos electrodensos (ge) en el citoplasma del granulocito (Gr). En el hemocito hialino (Hh), el núcleo (N) ocupa gran parte del volúmen celular y el citoplasma presenta escasos gránulos. (B): *N. granulata*. Zona periférica de la célula muscular donde se observa un nervio (Ne).**

Fm: fibra muscular. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .



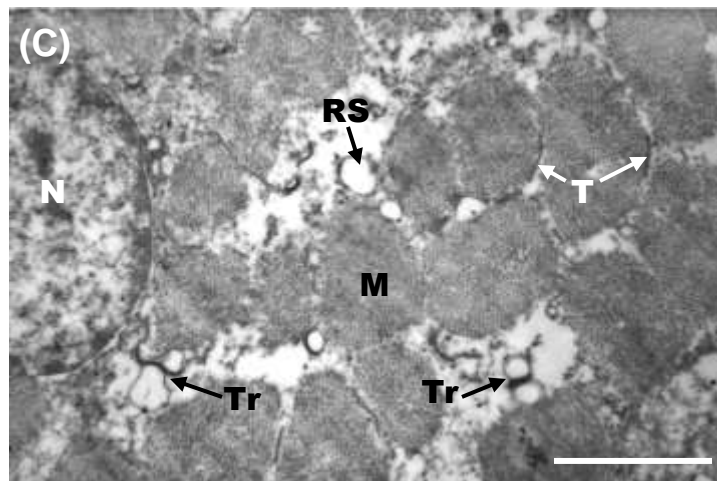
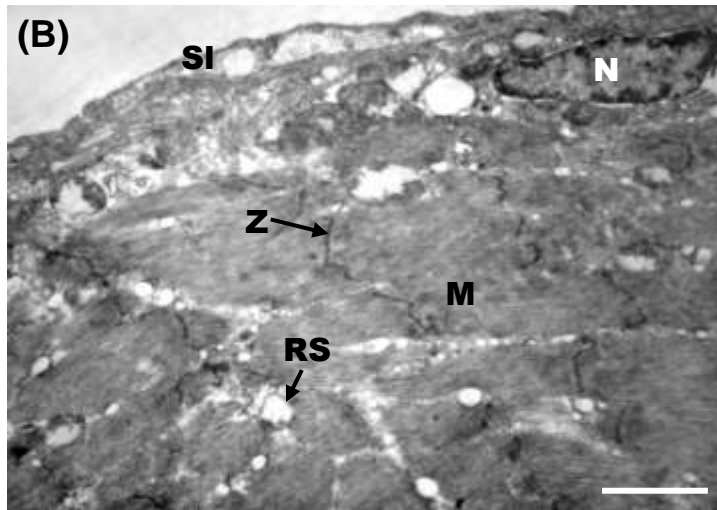
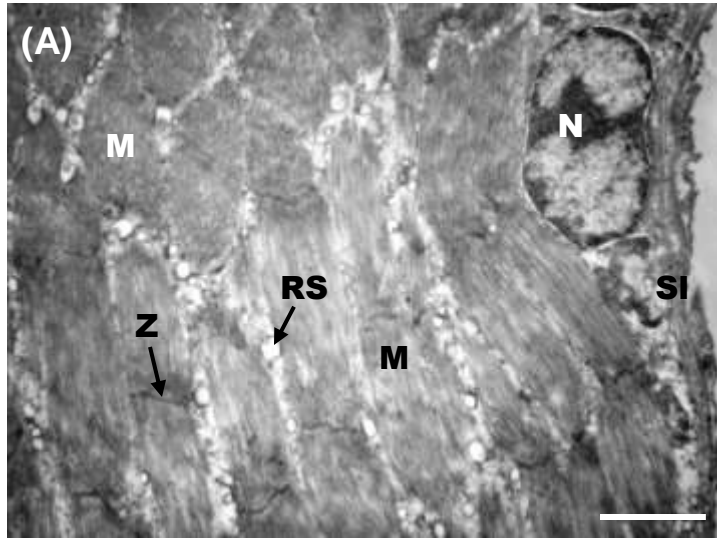
**Figura 9. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A), (B), (C): se observan las miofibrillas (M) en corte longitudinal, donde son notorios los discos Z (Z). Nótese la disposición ordenada de los miofilamentos y la presencia de retículo sarcoplásmico (RS) globular entre las miofibrillas; (D): Es notable el gran desarrollo del RS subsarcolémico.**

Cl: “cleft”; mi: mitocondrias; N: núcleo; Nu: nucléolo; Sl: sarcolema; Tz: túbulos Z. Escala: 6 µm.

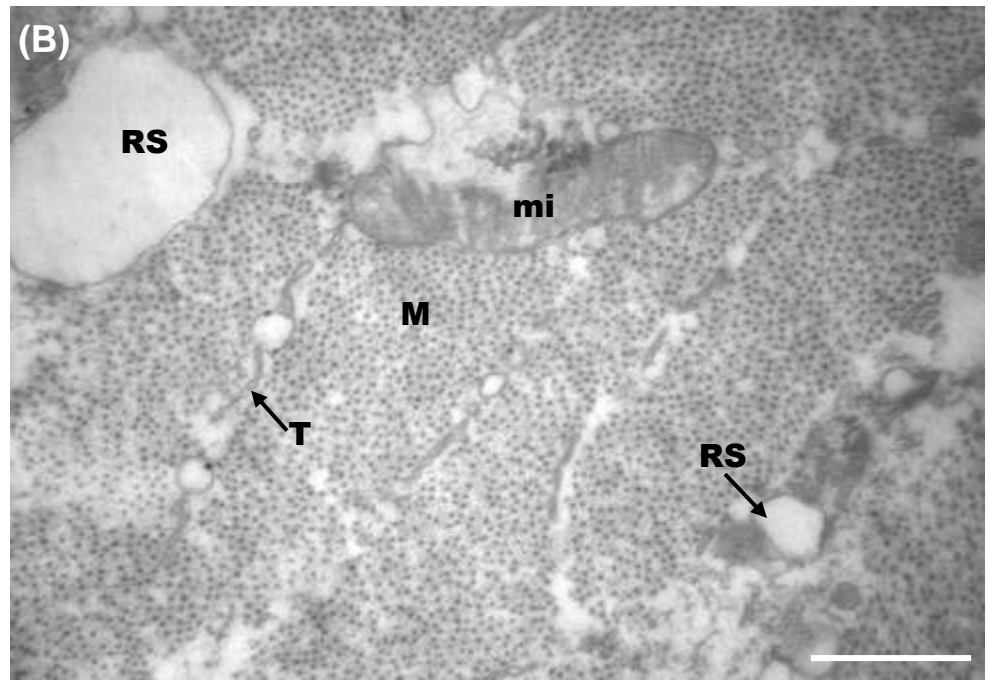
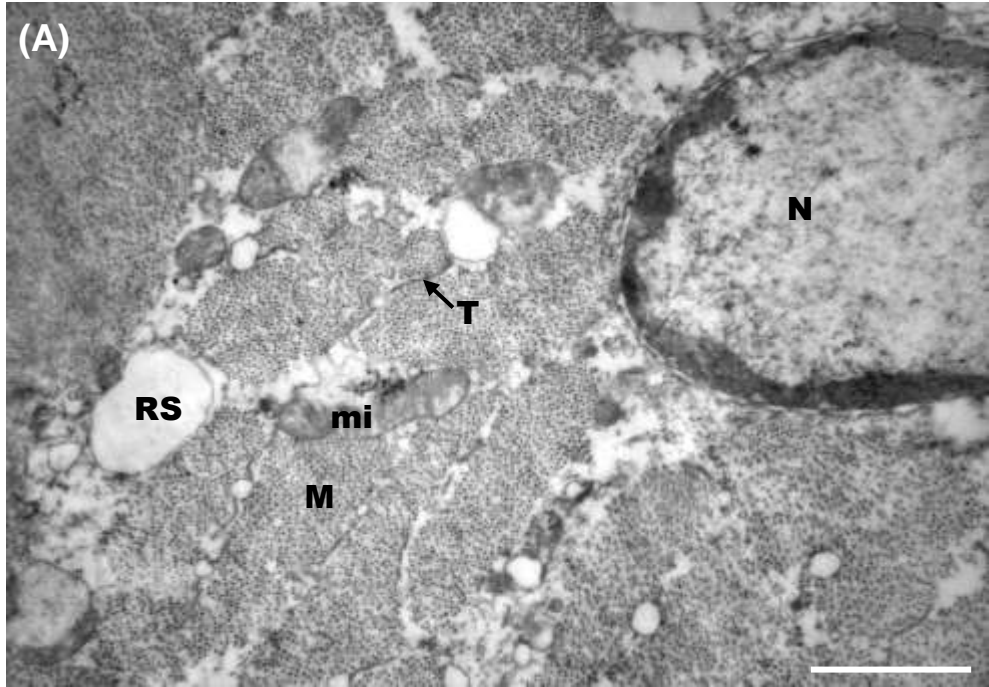


**Figura 10. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A):** se observan las miofibrillas (M) en corte longitudinal y algunas en corte transversal (ángulo superior izquierdo). **(B):** M en corte longitudinal. Se observa un arreglo de miofilamentos bastante desordenado, con discos Z (Z) en zigzag. Las cisternas del retículo sarcoplásmico (RS) están poco desarrolladas. **(C):** M en corte transversal. Se observa un sistema de túbulos T (T) y RS asociados en tríadas (Tr).

N: núcleo; Sl: sarcolema. Escala: 4 µm.

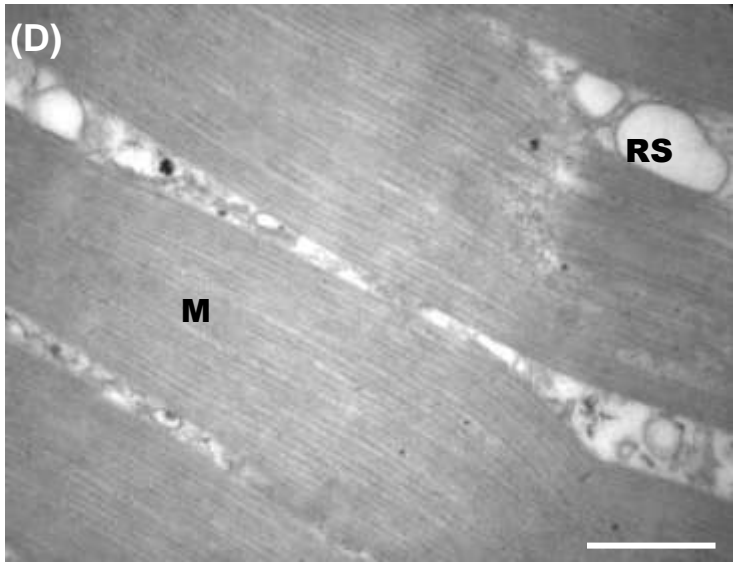
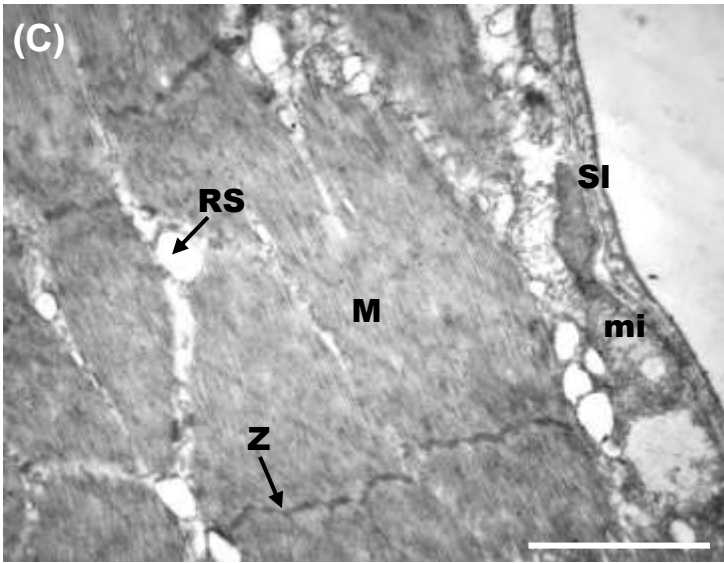
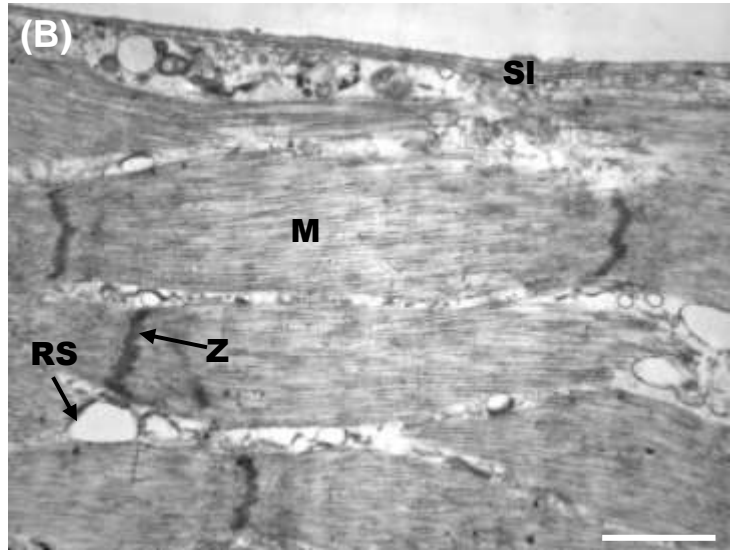
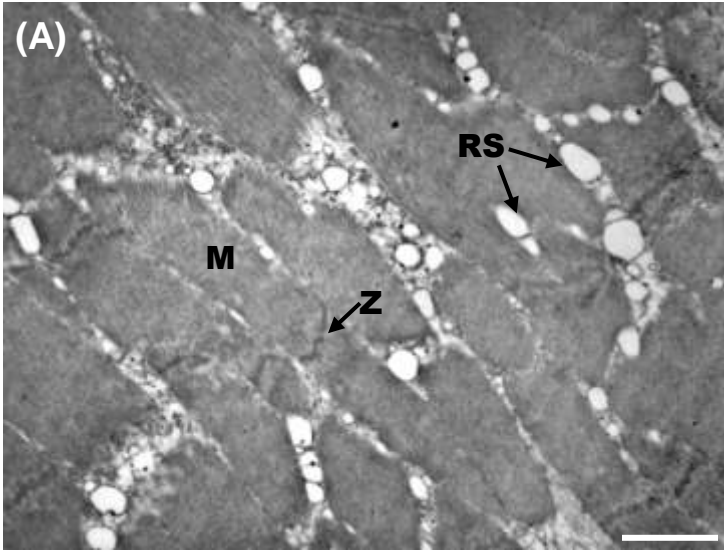


**Figura 11. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 35 % de salinidad: corte transversal. (A):** nótese la disposición desordenada de los miofilamentos y la localización intermiofibrilar del núcleo (N) y las mitocondrias (mi). **(B):** detalle de la figura A. La mitocondria presenta forma de bastón y exhibe crestas transversales. Se observa una íntima asociación entre el retículo sarcoplásmico (RS) y los túbulos T (T). M: miofibrillas. Escala: **(A):** 4  $\mu\text{m}$ ; **(B):** 2  $\mu\text{m}$ .



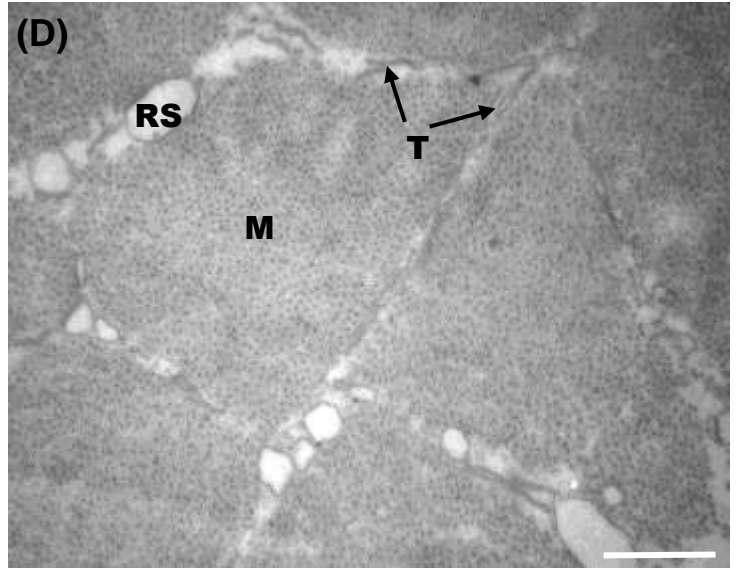
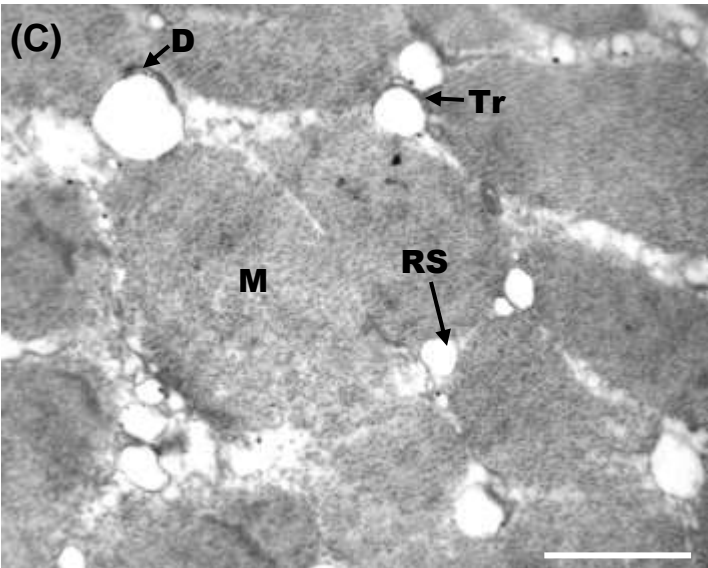
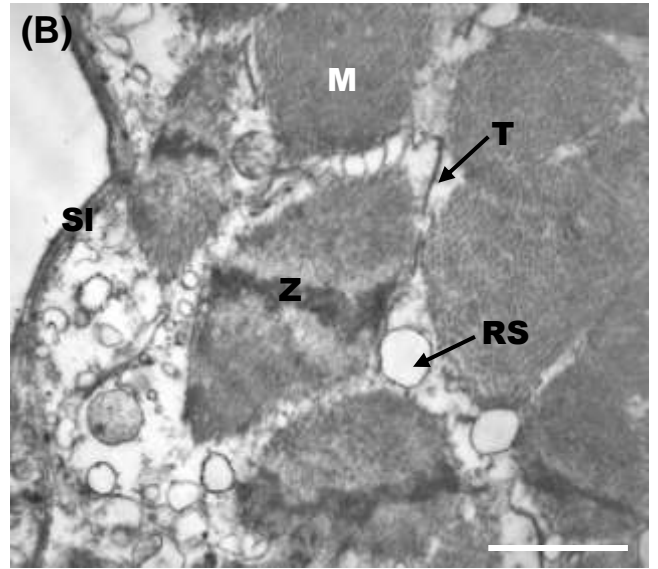
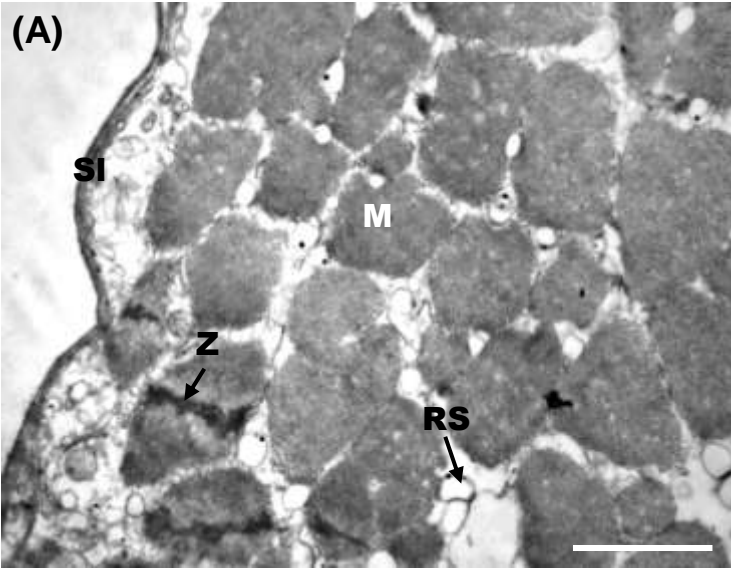
**Figura 12. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad: corte longitudinal. (A)-(D):** nótese el arreglo densamente empaquetado de los miofilamentos y la abundancia de cisternas del retículo sarcoplásmico (RS) de aspecto globular entre las miofibrillas (M). (A)-(C): se observan claramente los discos Z (Z), que presentan una disposición en zigzag.

mi: mitocondrias; SI: sarcolema. Escala: (A) y (C): 4  $\mu\text{m}$ ; (B) y (D): 2  $\mu\text{m}$ .



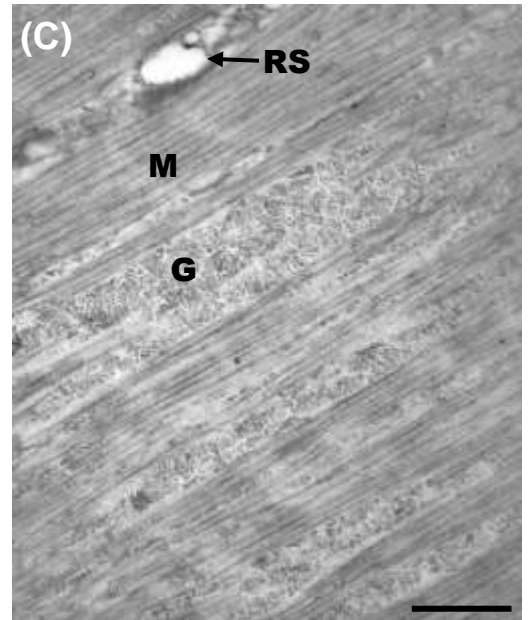
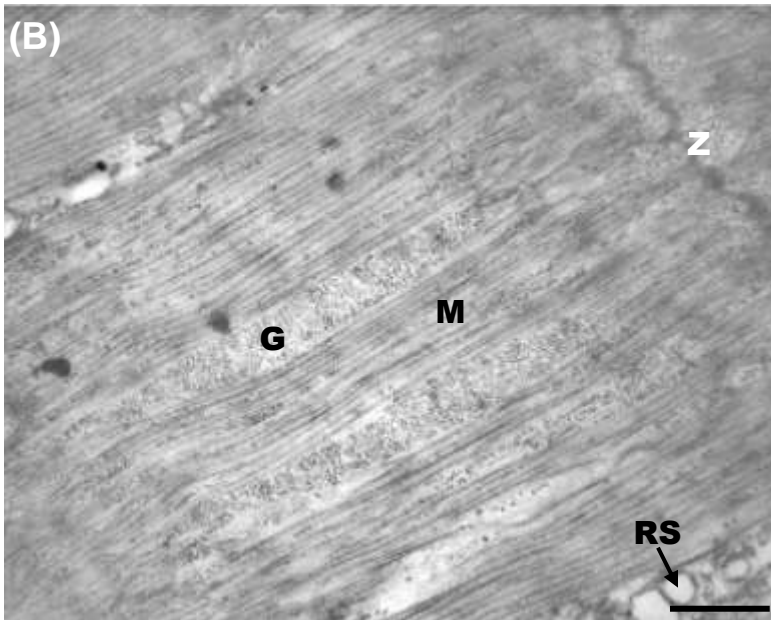
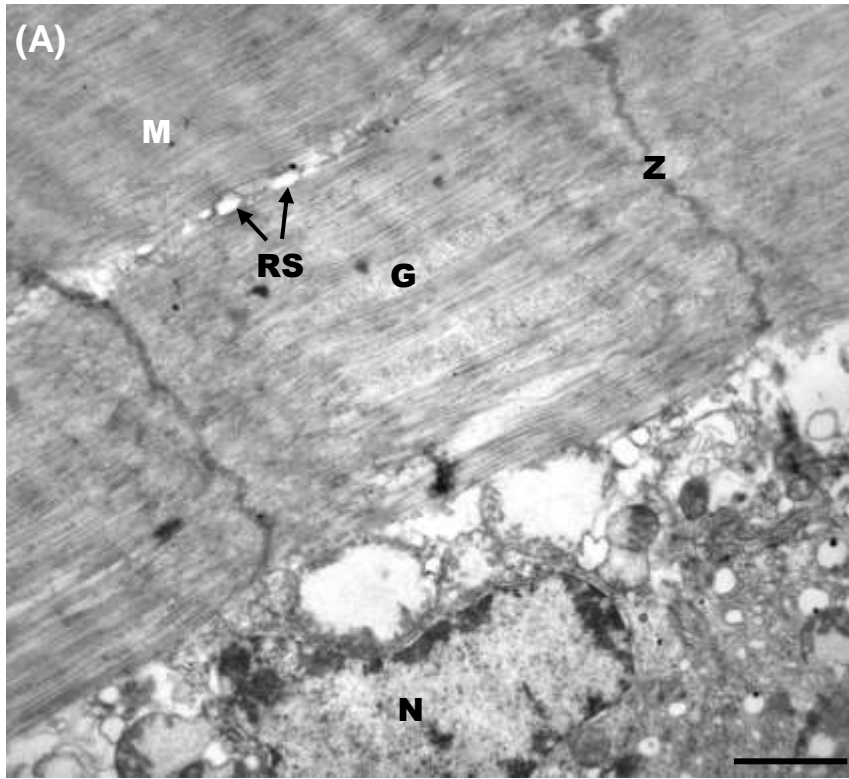
**Figura 13. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad: corte transversal. (A)-(D):** nótese la abundancia de cisternas del retículo sarcoplásmico (RS) y túbulos T (T) rodeando las miofibrillas (M). **(A)-(B):** Los discos Z (Z) están dispuestos en zigzag. **(C):** se observa claramente la íntima asociación entre el RS y los T, ya sea formando díadas (D), o tríadas (Tr).

Sl: sarcolema. Escala: **(A):** 6  $\mu\text{m}$ ; **(B)** y **(C):** 3  $\mu\text{m}$ ; **(D):** 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 14. Ultraestructura del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A)-(C): se observan reservas de glucógeno (G) entre los miofilamentos. (B)-(C): A mayor aumento es notorio el pequeño tamaño y el aspecto difuso de los gránulos de G.**

M: miofibrillas; N: núcleo; RS: retículo sarcoplásmico; Z: disco Z. Escala: (A): 2  $\mu\text{m}$ ; (B) y (C): 1  $\mu\text{m}$ .



### 3.3.2. Histoquímica

Se caracterizaron cuatro tipos de fibras en el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. La técnica de m-ATPasa permitió diferenciar fibras de contracción lenta (I) y rápida (IV), junto con dos tipos intermedios (II, III) (Figs. 15A, 16A). La actividad de SDH fue subsarcolémica en todos los tipos de fibras (Figs. 15D, 16D). Las fibras del tipo I dieron reacción negativa en los tratamientos con preincubación ácida y alcalina, y reaccionaron débilmente con las técnicas de SDH (Fig. 16D), Sudan (Fig. 16F) y PAS, mientras que las fibras de tipo IV exhibieron una reacción fuerte/muy fuerte con todas las técnicas (Figs. 15B-F, 16B-F).

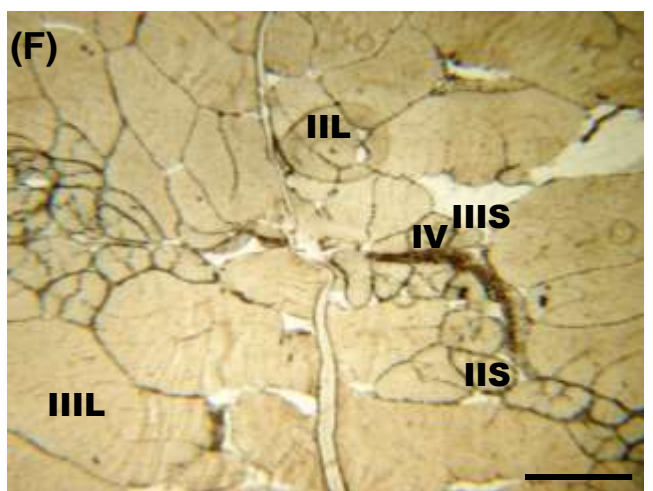
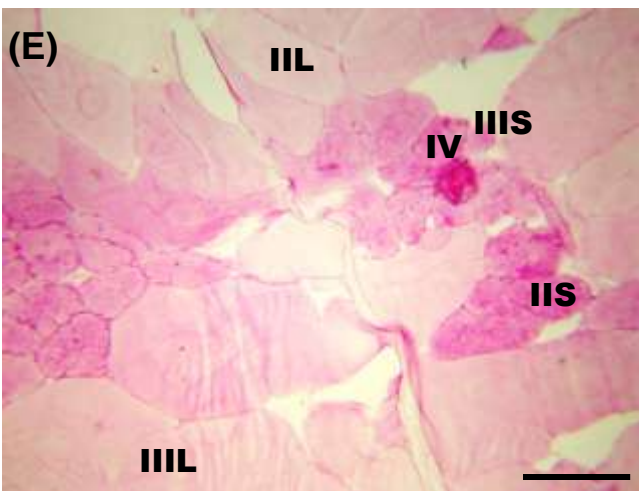
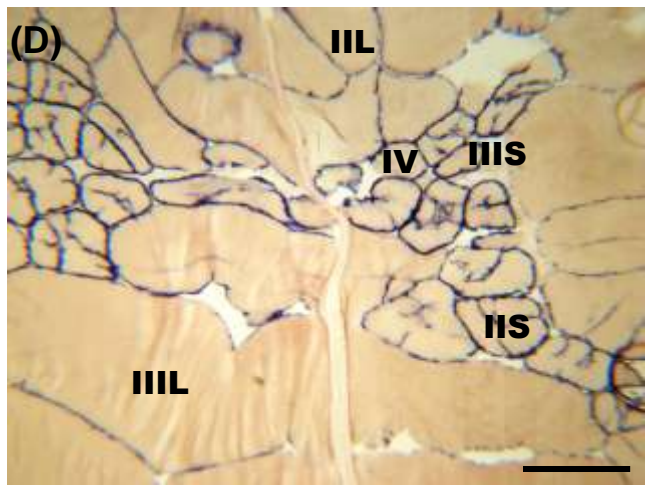
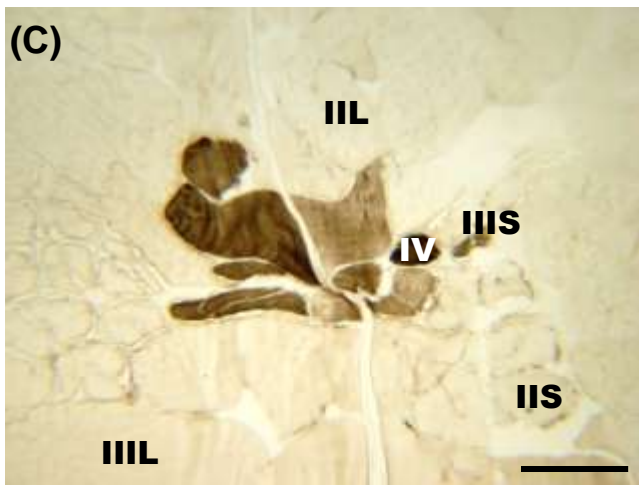
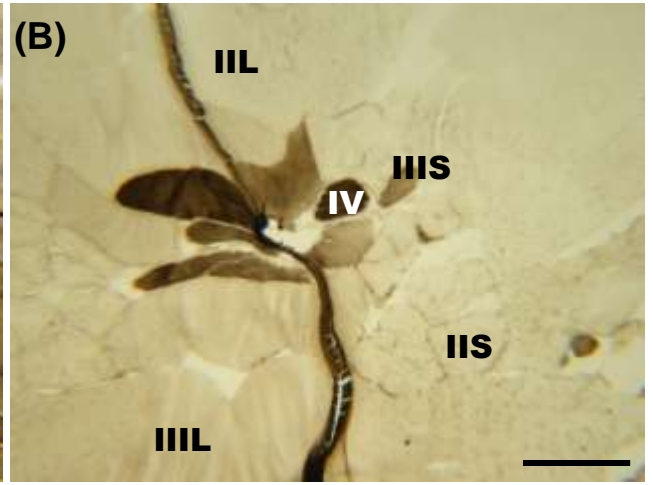
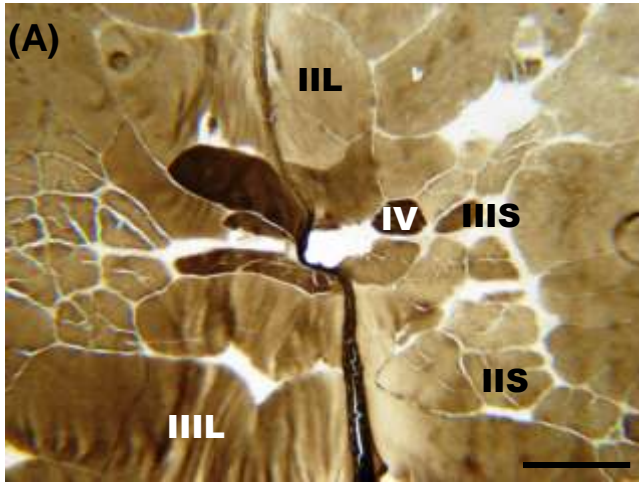
Dentro de los tipos intermedios pudieron identificarse dos subtipos: “Large” (L) y “Small” (S) en ambas especies de cangrejos. Ambos subtipos se diferencian en base a su tamaño y a su reacción diferencial con las técnicas de SDH, PAS y Sudan. El subtipo L mostró una reacción débil-moderada con estas técnicas, mientras que el subtipo S exhibió una actividad moderada/fuerte (Figs. 15D-F, 16D-F). Los subtipos III L y III S reaccionaron diferencialmente en los tratamientos con preincubación ácida y alcalina de la técnica de m-ATPasa: las fibras III L dieron reacción negativa o débil, y las III S moderada/fuerte (Figs. 15B, C; 16B, C).

A menor salinidad se encontraron los mismos tipos de fibras en ambas especies (Figs. 17 y 18). Sin embargo, en *N. granulata* el contenido de glucógeno fue mayor que en condiciones de osmoconformación (Fig. 17C, D). En *C. angulatus* la concentración de glucógeno fue similar en ambas salinidades y con respecto a *N. granulata* aclimatados a la salinidad de 35 ‰ (Figs. 15E, 16E, 18C). Por otro lado, no hubo diferencias en el contenido lipídico entre ambas especies (Figs. 15F, 16F) y entre salinidades dentro de cada especie.

En la tabla 1 se muestra un resumen del perfil histoquímico del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* y *C. angulatus*.

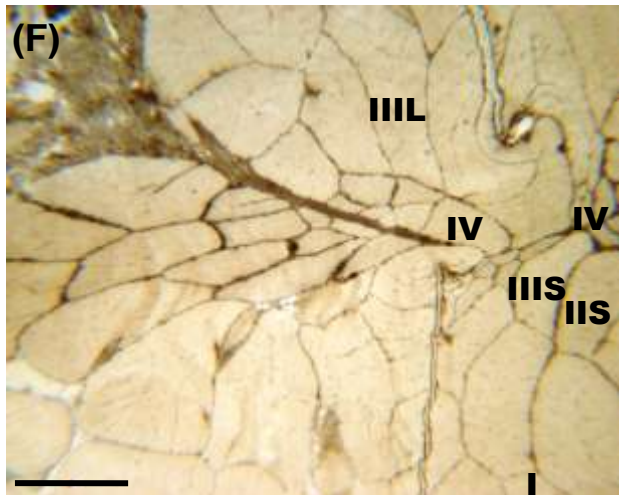
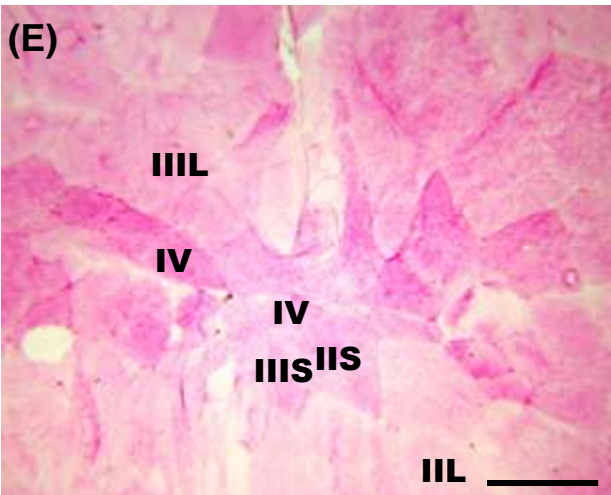
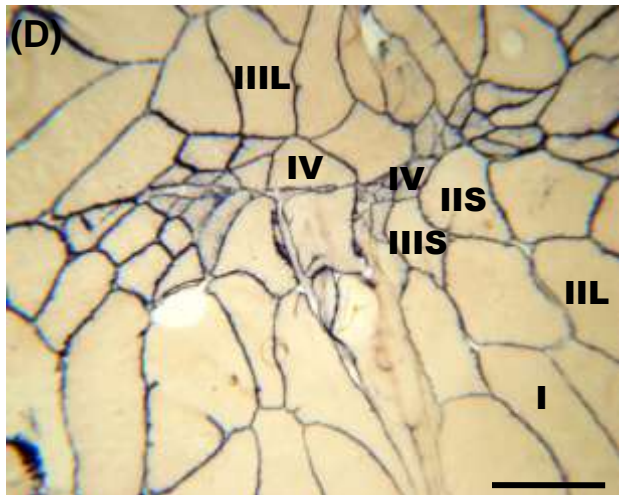
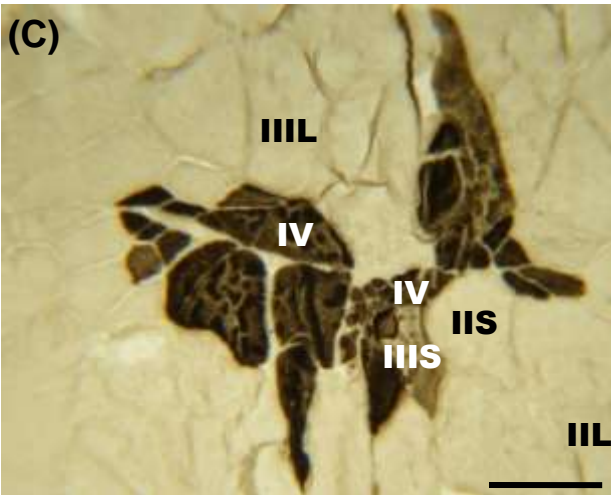
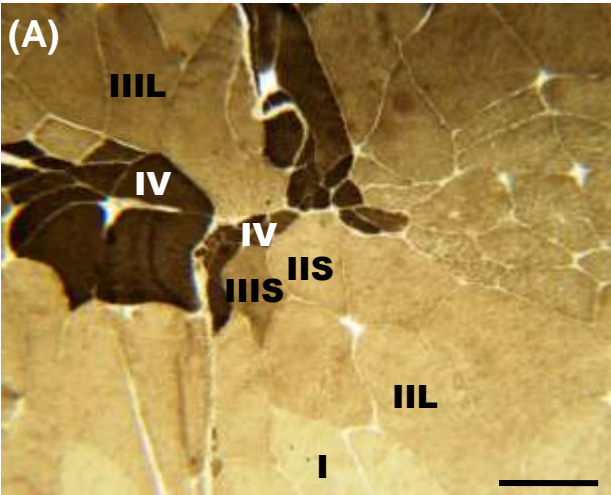
**Figura 15. Histoquímica del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A)-(F): cortes seriados donde se diferencian tres tipos de fibras (II, III y IV). (A): actividad de m-ATPasa sin preincubación. (B): actividad de m-ATPasa con preincubación a pH 10.05. (C): actividad de m-ATPasa con preincubación a pH 4.6. (D): SDH. Se observa actividad subsarcolémica en todos los tipos de fibras. (E): PAS. (F): Negro Sudan B.**

L: Subtipo “Large”; S: Subtipo “Small”. Escala: 500 µm.



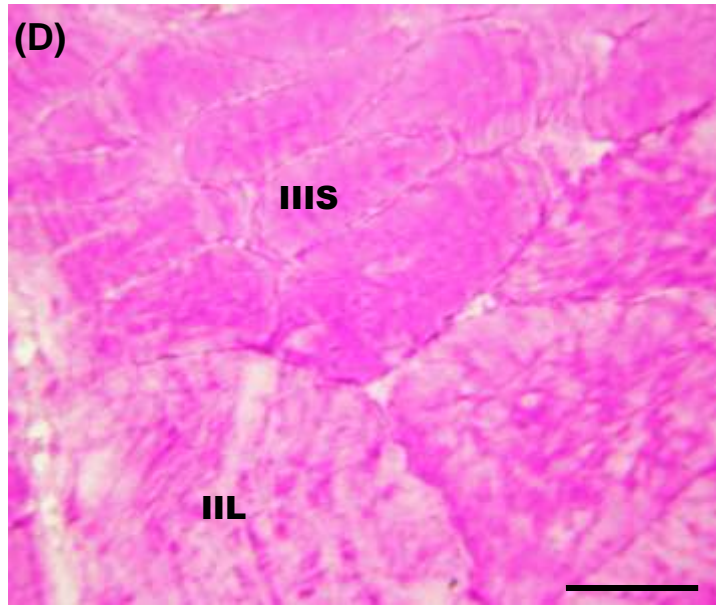
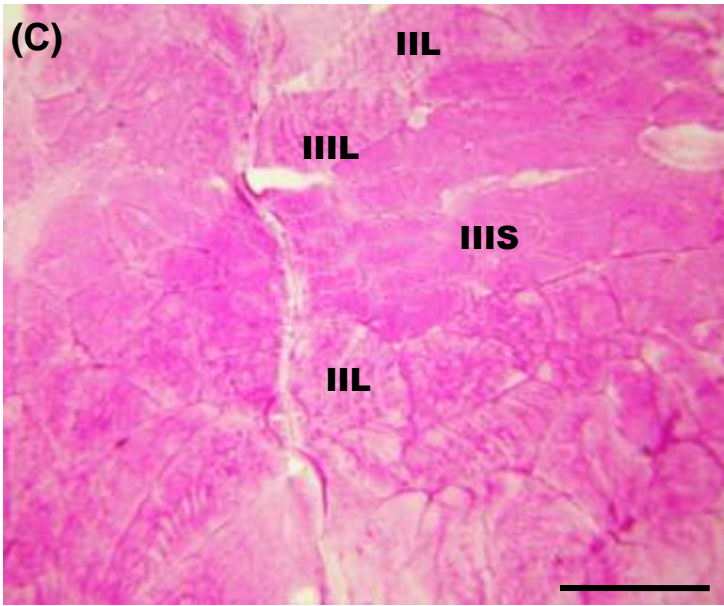
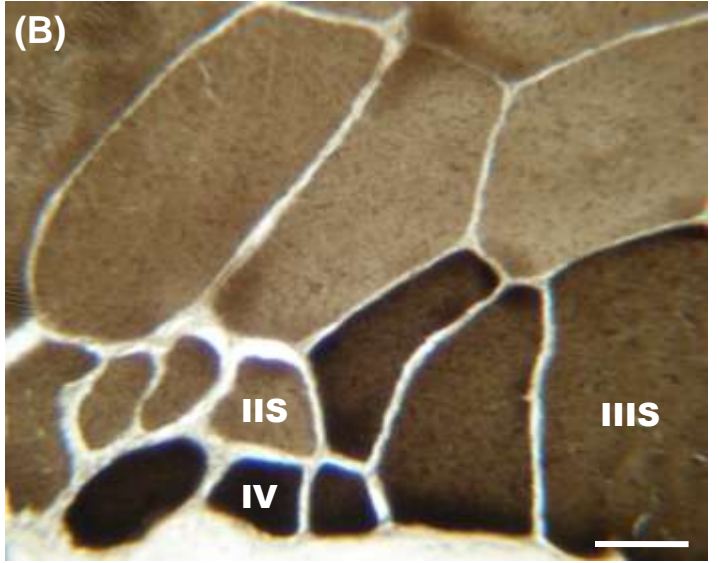
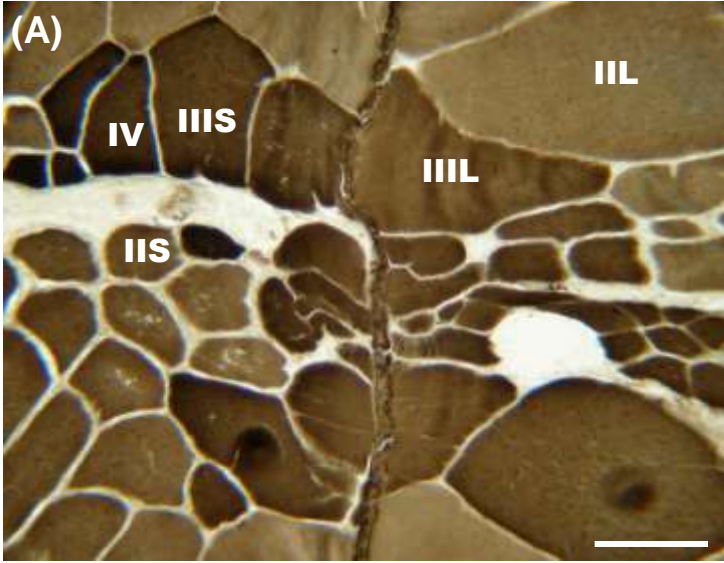
**Figura. 16. Histoquímica del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad.** Cortes seriados donde se diferencian los tipos de fibras I, II, III y IV (**A, D, F**), y los tipos II, III y IV (**B, C, E**). (**A**): actividad de m-ATPasa sin preincubación. (**B**): actividad de m-ATPasa con preincubación a pH 10.05. (**C**): actividad de m-ATPasa con preincubación a pH 4.6. (**D**): SDH. Se observa actividad subsarcolémica en todos los tipos de fibras. (**E**): PAS. (**F**): Negro Sudan B.

L: Subtipo “Large”; S: Subtipo “Small”. Escala: 400 µm.



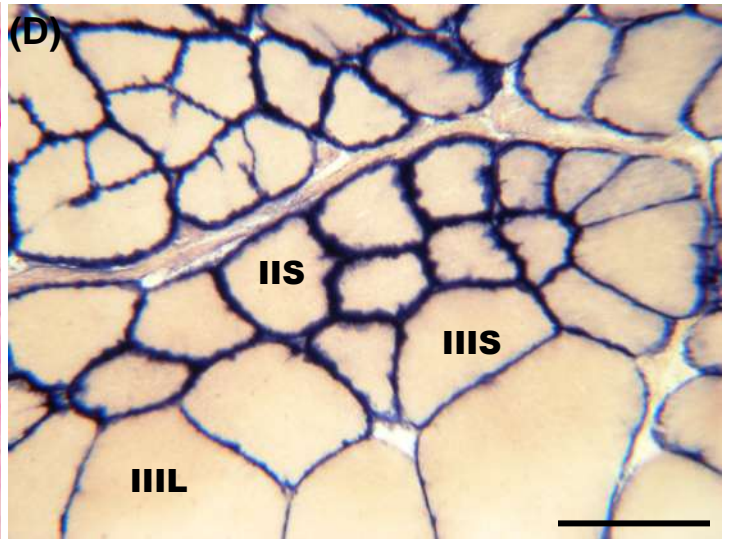
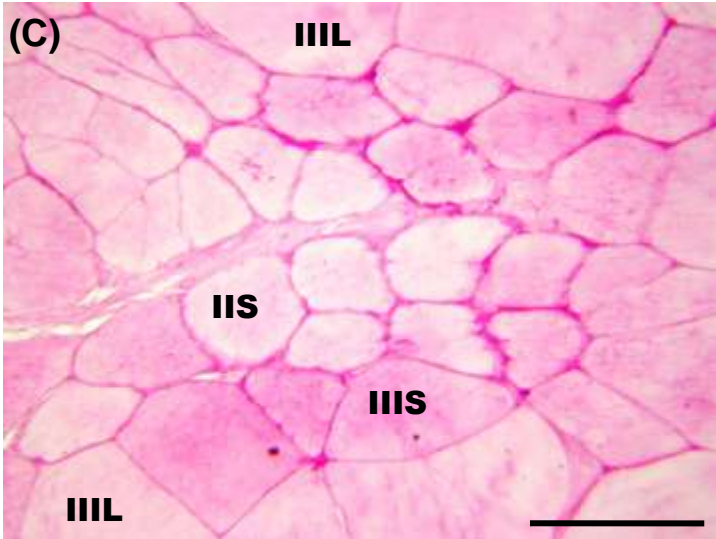
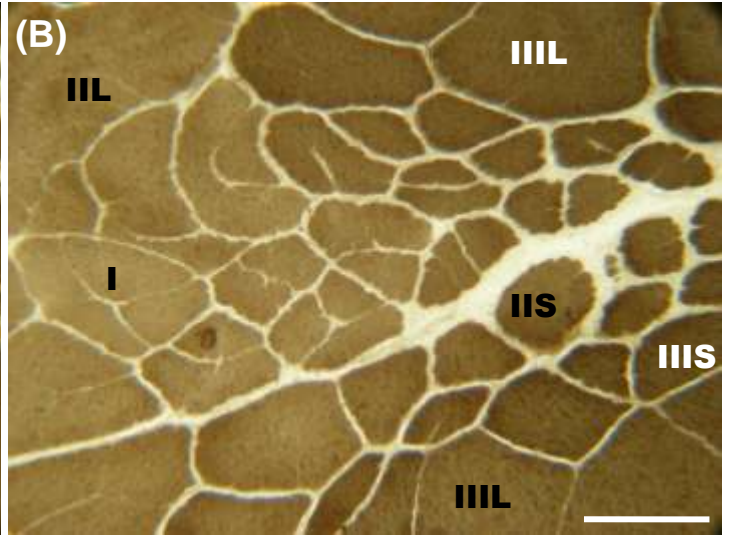
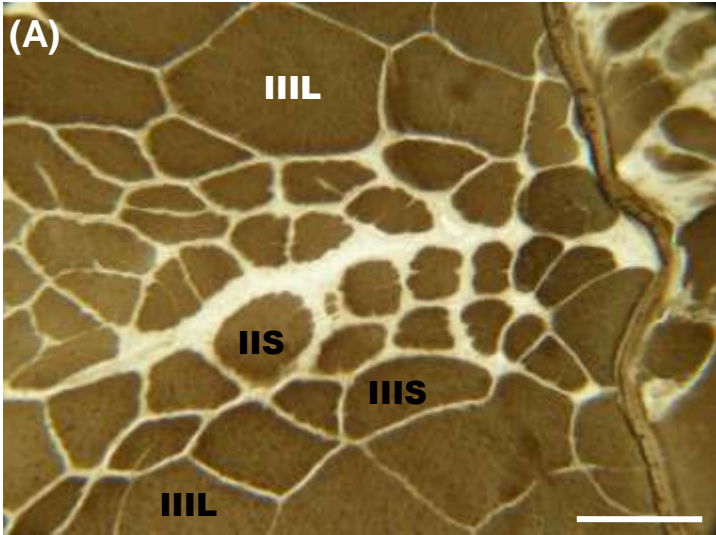
**Figura 17. Histoquímica del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* aclimatados a 10 ‰ de salinidad. (A)-(B): actividad de m-ATPasa sin preincubación. Se diferencian tres tipos de fibras (II, III y IV). (C)-(D): PAS. Nótese el contenido elevado de glucógeno de las fibras, particularmente en las de tipo III, evidenciado por la tinción magenta fuerte.**

L: Subtipo “Large”; S: Subtipo “Small”. Escala: (A) y (D): 200 µm; (B): 100 µm; (C): 500 µm.



**Figura 18. Histoquímica del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* aclimatados a 10 ‰ de salinidad. (A)-(B):** actividad de m-ATPasa sin preincubación. Se diferencian los tipos de fibras II y III (A), y los tipos I, II y III (B). **(C):** PAS. **(D):** SDH. En general, las fibras más pequeñas se tiñen más intensamente con ambas técnicas, indicando una mayor capacidad oxidativa y un contenido de glucógeno más elevado.

L: Subtipo “Large”; S: Subtipo “Small”. Escala: 300 µm.



**Tabla 1. Caracterización histoquímica de los tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*.**

	Tipos de Fibras					
	I	II		III		IV
		L	S	L	S	
<b>m-ATPasa (sin pre-incubación)</b>	+1	+2	+2	+3	+3	+4
<b>m-ATPasa (pre-incubación a pH 10,05)</b>	-	-	-	-	+2/+3	+4
<b>m-ATPasa (pre-incubación a pH 4,6)</b>	-	-	-	-/+1	+2/+3	+4
<b>SDH</b>	+1	+1/+2	+2/+3	+2	+3	+3
<b>PAS</b>	+1	+1/+2	+2/+3	+2	+2/+3	+3
<b>Negro Sudan B</b>	+1	+1	+1/+2	+1	+2	+2

Reactividad: (-), negativa; (+1), positiva débil; (+2), positiva moderada; (+3), positiva fuerte; (+4), positiva muy fuerte. L, Subtipo “Large”; S, Subtipo “Small”.

### **3.3.3. Proporción de tipos de fibras**

El músculo de cierre de las quelas de las dos especies de cangrejos exhibió una composición heterogénea de los tipos de fibras I, II, III y IV. Las proporciones de los tipos de fibras difirieron significativamente entre las dos especies en las salinidades de 35 ‰ ( $\chi^2=69,367$ ; gl= 3; P= <0,001) y de 10 ‰ ( $\chi^2=18,081$ ; gl= 3; P= <0,001).

A la salinidad de 35 ‰ en *C. angulatus* predominaron los tipos intermedios (II y III), representando el 80 % del total de la población de fibras, mientras que el tipo IV fue escaso. Al igual que en *C. angulatus*, el tipo II predominó en el músculo de cierre de las quelas de *N. granulata*. Sin embargo, el tipo IV representó el 25 % del total de la población de fibras y el tipo III fue menos abundante que en *C. angulatus* (Tabla 2, Fig. 19A).

A 10 ‰ de salinidad en *C. angulatus* se observó un patrón de proporciones similar que a mayor salinidad ( $\chi^2=6,698$ ; gl= 3; P=0,082), salvo por la ausencia de fibras de tipo IV. En *N. granulata* las proporciones de tipos de fibras fueron significativamente diferentes con respecto a la salinidad de 35 ‰ ( $\chi^2=51,814$ ; gl= 3; P= <0,001). Predominó el tipo II pero en una proporción superior a la observada a 35 ‰ de salinidad. La proporción del tipo I fue mayor que a la salinidad de 35 ‰ y las fibras del tipo IV fueron escasas (Tabla 3, Fig. 19B).

### **3.3.4. Tamaño de los tipos de fibras**

El test de Kruskal-Wallis reveló un efecto de los tipos de fibras sobre los diámetros estadísticamente significativo a las salinidades de 35 ‰ (H= 297,893; gl = 7; P = <0,001) y 10 ‰ (H= 119,308; gl= 6; P = <0,001).

A 35 ‰ de salinidad se demostró con el test de Dunn que el diámetro promedio del tipo I para ambas especies fue significativamente mayor que el de los tipos III (Q=4,881 y Q=4,738, para *C.*

*angulatus* y *N. granulata*, respectivamente;  $P < 0,05$ ) y IV ( $Q=5,603$  y  $Q=12,999$ , para *C. angulatus* y *N. granulata*, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Los diámetros de los tipos intermedios y del tipo IV también fueron significativamente diferentes ( $Q=4,044$ ,  $Q=3,298$  y  $Q=14,041$ ,  $Q=9,849$ , para *C. angulatus* and *N. granulata*, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Sin embargo, los diámetros no difirieron significativamente entre los tipos intermedios ( $Q=1,77$  y  $Q=3,065$ , para *C. angulatus* y *N. granulata*, respectivamente;  $P < 0,05$ ) y entre los tipos I y II en *N. granulata* ( $Q=2,587$ ;  $P < 0,05$ ). En *C. angulatus*, el área relativa ocupada por el tipo I fue mayor que su proporción relativa, lo cual fue similar para los tipos I y II en *N. granulata*. Los restantes tipos de fibras exhibieron el patrón inverso (II, III y IV en *C. angulatus*, y III, IV en *N. granulata*) (Tabla 2, Fig. 19A).

A 10 ‰ de salinidad en *N. granulata* el diámetro promedio del tipo I fue significativamente mayor que el de los tipos II ( $Q=3,147$ ;  $P < 0,05$ ), III ( $Q=6,092$ ;  $P < 0,05$ ) y IV ( $Q=3,803$ ;  $P < 0,05$ ). No hubo diferencias significativas entre los diámetros de los tipos II y III ( $Q=4,142$ ;  $P < 0,05$ ), II y IV ( $Q=2,58$ ;  $P < 0,05$ ), y III y IV ( $Q=0,695$ ;  $P < 0,05$ ). En *C. angulatus* los diámetros promedio de los tipos I y II no difirieron significativamente ( $Q=2,111$ ;  $P < 0,05$ ). Los diámetros promedio de los tipos I y II fueron significativamente mayores que el del tipo III ( $Q=5,156$  y  $Q=3,951$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ). En *N. granulata*, el área relativa ocupada por el tipo I fue mayor que su proporción relativa, lo cual fue similar para los tipos I y II en *C. angulatus*. Los restantes tipos de fibras exhibieron el patrón inverso (II, III y IV en *N. granulata* y III en *C. angulatus*) (Tabla 3, Fig. 19B).

De la comparación de los diámetros promedio para cada tipo de fibra por separado se observa que en general, no existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies, tanto para la salinidad de 35 ‰, como para la de 10 ‰. Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre salinidades,

se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en el diámetro promedio de los tipos de fibra I, II y III en *N. granulata*, y del tipo III en *C. angulatus* aclimatados a menor salinidad (Figs. 20-23).

**Tabla 2. Proporción, diámetro y área relativa de los tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad.**

	<b>Tipo de fibra</b>	<b>Proporción (%)</b>	<b>Diámetro promedio±SD (µm)</b>	<b>Area Relativa (%)</b>
<i>C. angulatus</i>	<b>I</b>	17,27	<sup>a</sup> 653,18 ± 288,83	31,42
	<b>II</b>	41,81	<sup>b</sup> 468,37 ± 212,87	39,12
	<b>III</b>	37,27	<sup>b</sup> 426,28 ± 254,44	28,88
	<b>IV</b>	3,63	<sup>c</sup> 192,66 ± 102,13	0,57
<i>N. granulata</i>	<b>I</b>	12,95	<sup>a</sup> 654,63 ± 167,07	22,95
	<b>II</b>	37,65	<sup>ae</sup> 575,60 ± 274,72	51,59
	<b>III</b>	23,98	<sup>be</sup> 480,86 ± 296,65	22,93
	<b>IV</b>	25,42	<sup>c</sup> 154,93 ± 134,83	2,52

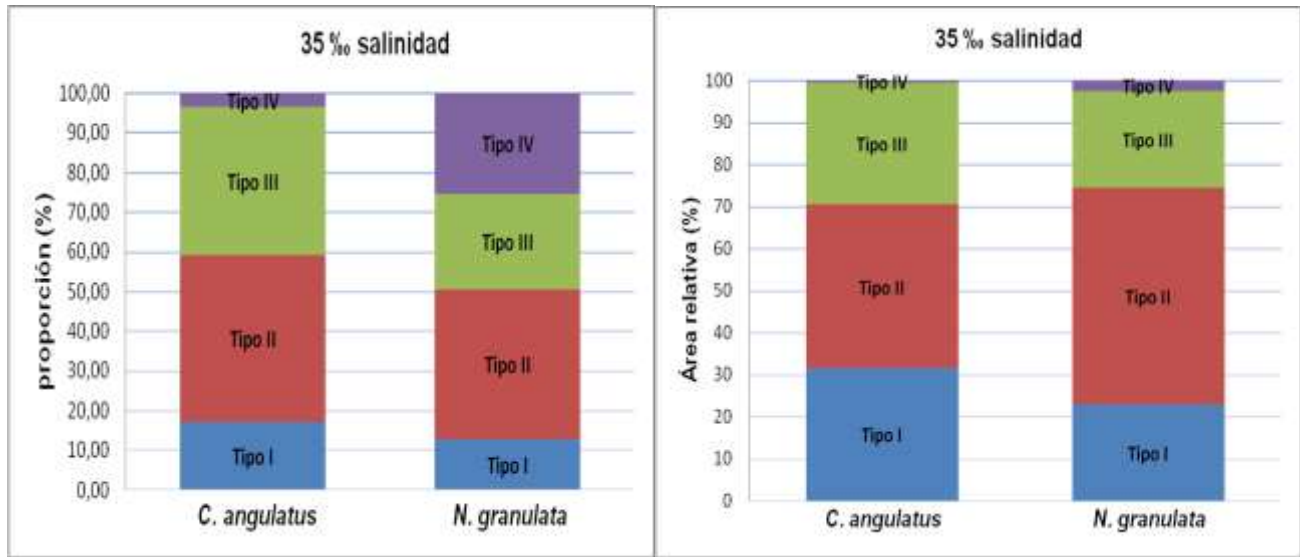
Los valores con igual letra como superíndice expresan diferencias no significativas (P<0,05). Letras diferentes como superíndices indican diferencias significativas (P<0,05).

**Tabla 3. Proporción, diámetro y área relativa de los tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 10 ‰ de salinidad.**

	<b>Tipo de fibra</b>	<b>Proporción (%)</b>	<b>Diámetro promedio±SD (µm)</b>	<b>Area Relativa (%)</b>
<i>C. angulatus</i>	<b>I</b>	18,43	<sup>a</sup> 458,99 ± 109,12	29,52
	<b>II</b>	43,57	<sup>a</sup> 385,07 ± 137,43	49,12
	<b>III</b>	38	<sup>b</sup> 271,89 ± 153,92	21,36
	<b>IV</b>	0		
<i>N. granulata</i>	<b>I</b>	22,1	<sup>a</sup> 455,76 ± 199,02	43,65
	<b>II</b>	54,23	<sup>bc</sup> 314,67 ± 169,44	51
	<b>III</b>	20,53	<sup>bc</sup> 159,14 ± 100,18	4,94
	<b>IV</b>	3,16	<sup>c</sup> 107,81 ± 28,43	0,35

Los valores con igual letra como superíndice expresan diferencias no significativas (P<0,05). Letras diferentes como superíndices indican diferencias significativas (P<0,05).

A



B

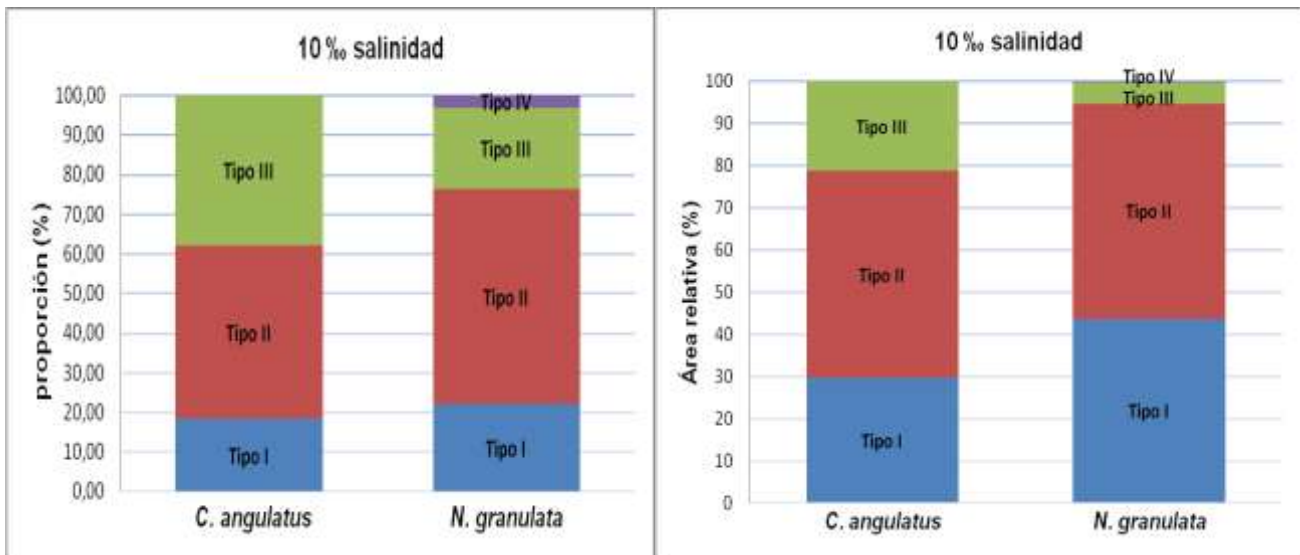
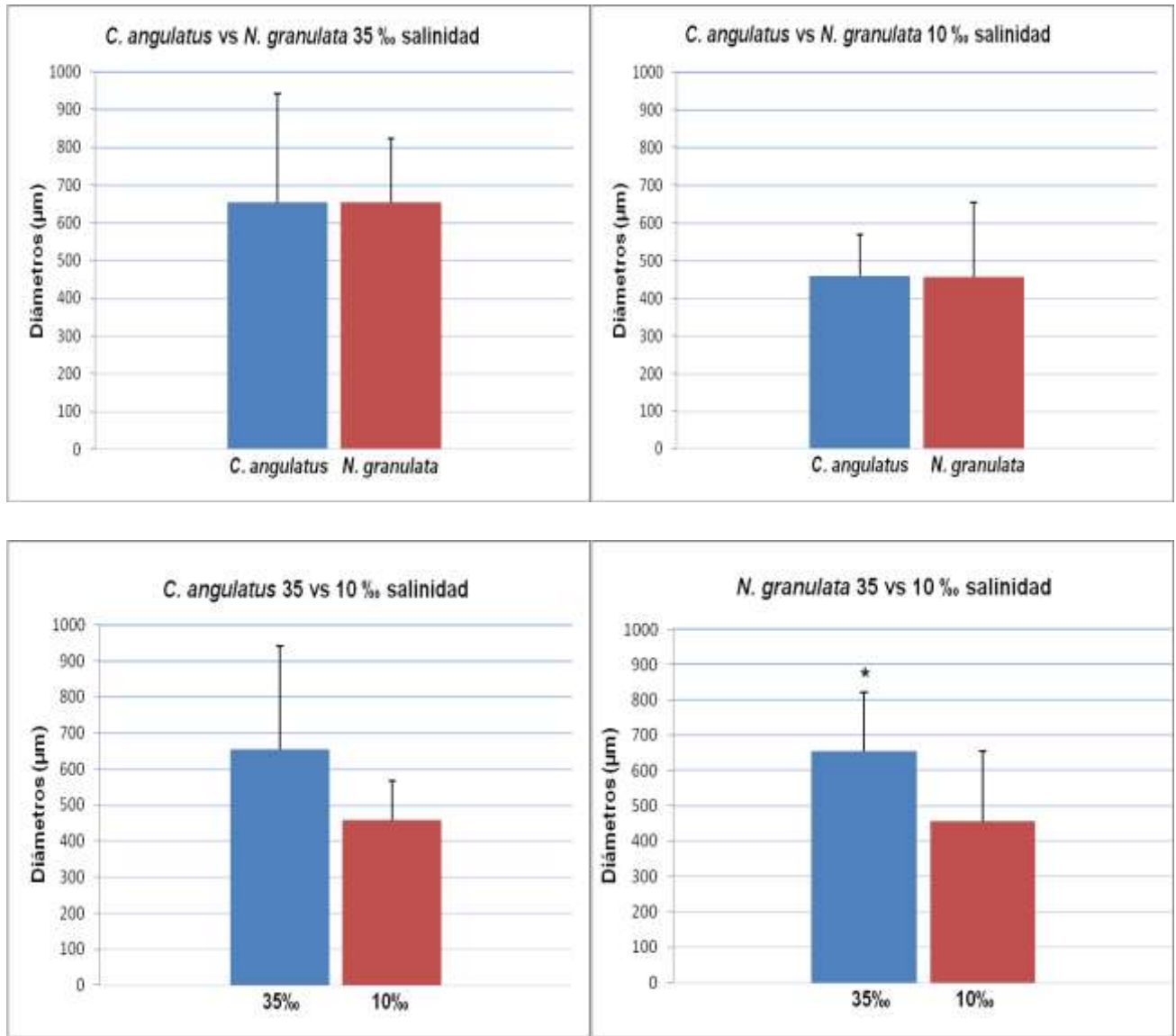
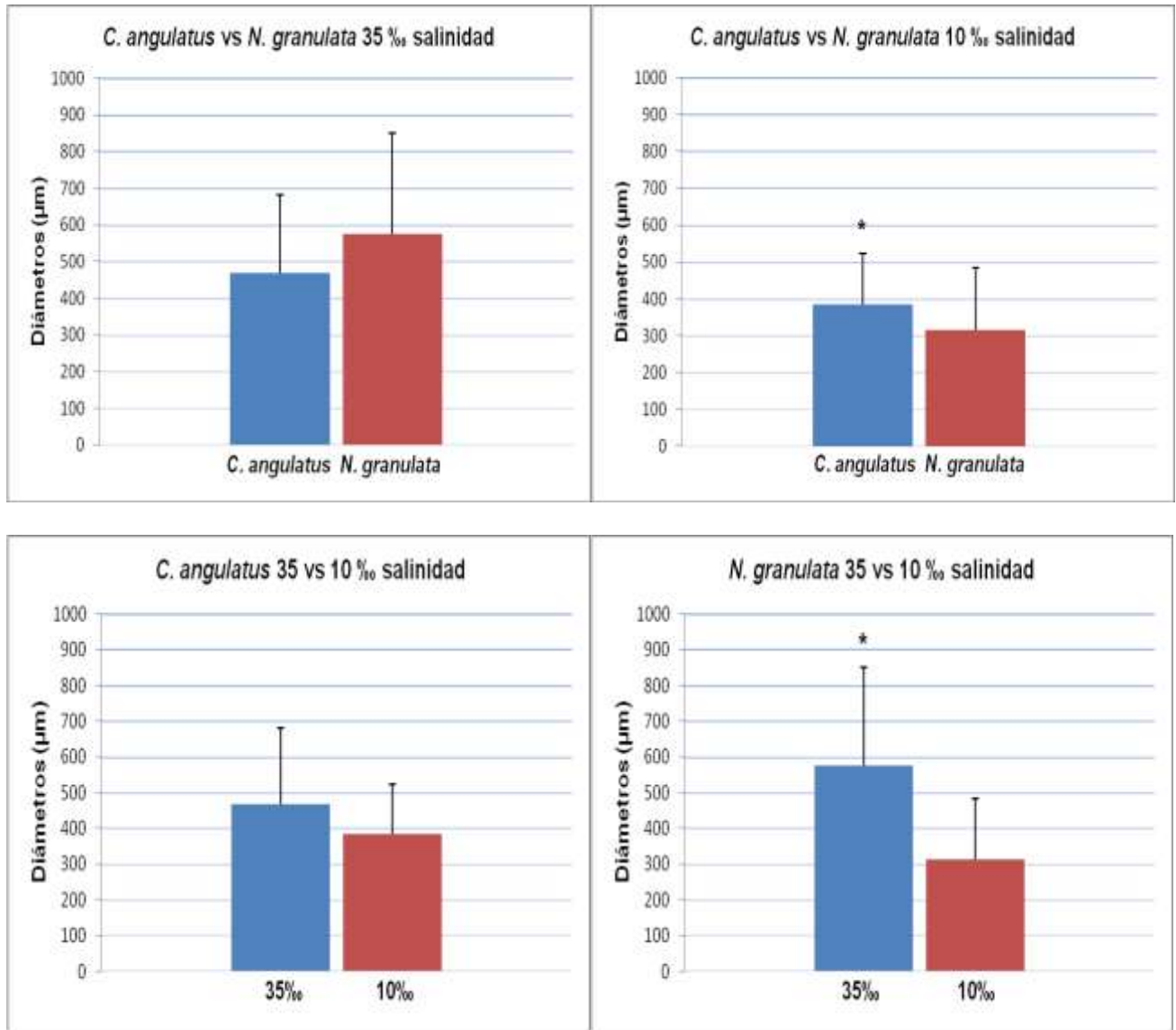


Figura 19. Proporción y área relativa de los tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 (A) y a 10 ‰ de salinidad (B).



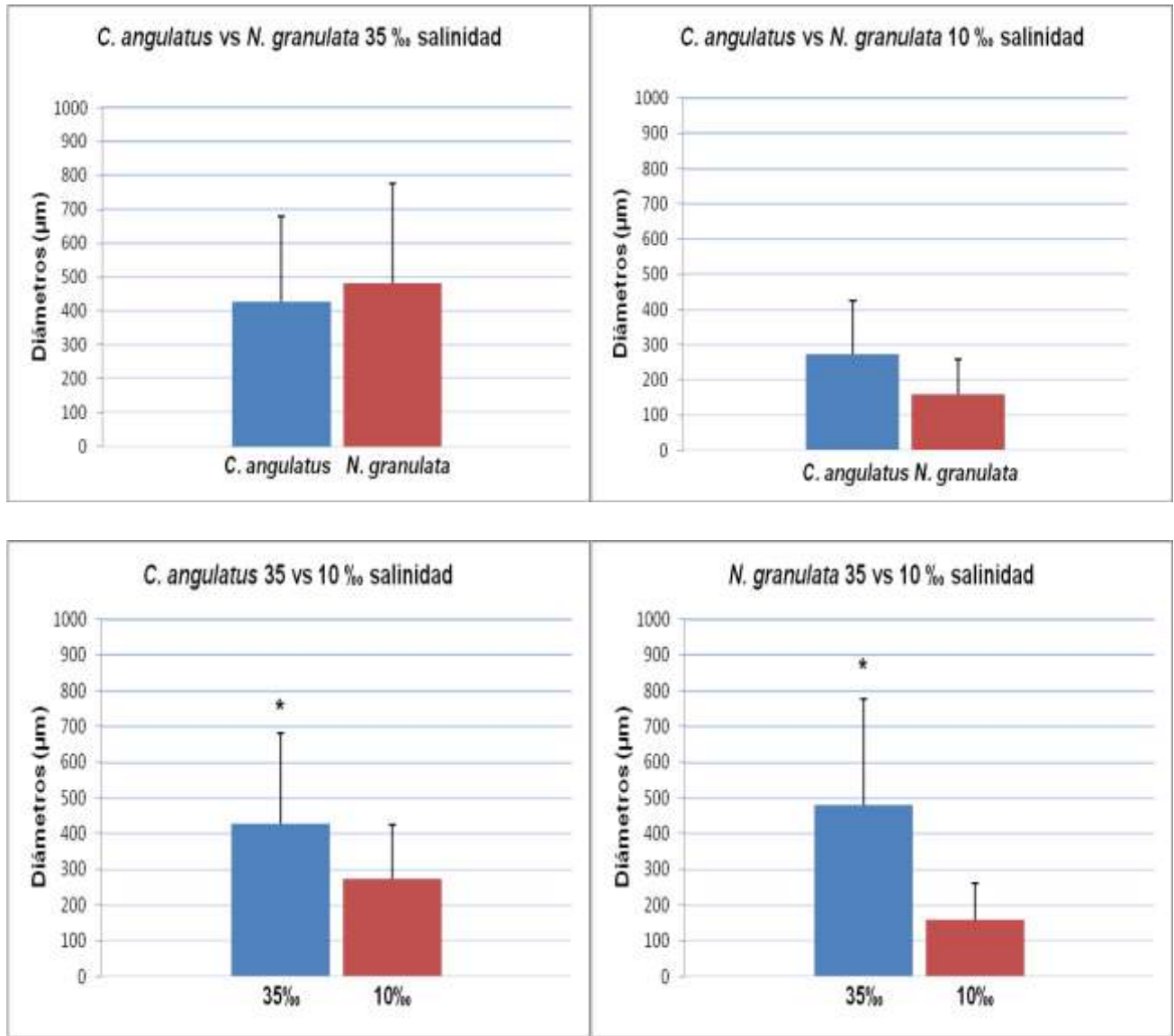
**Figura 20. Diámetros promedio de las fibras de tipo I del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.**

\* diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor indicado en rojo.



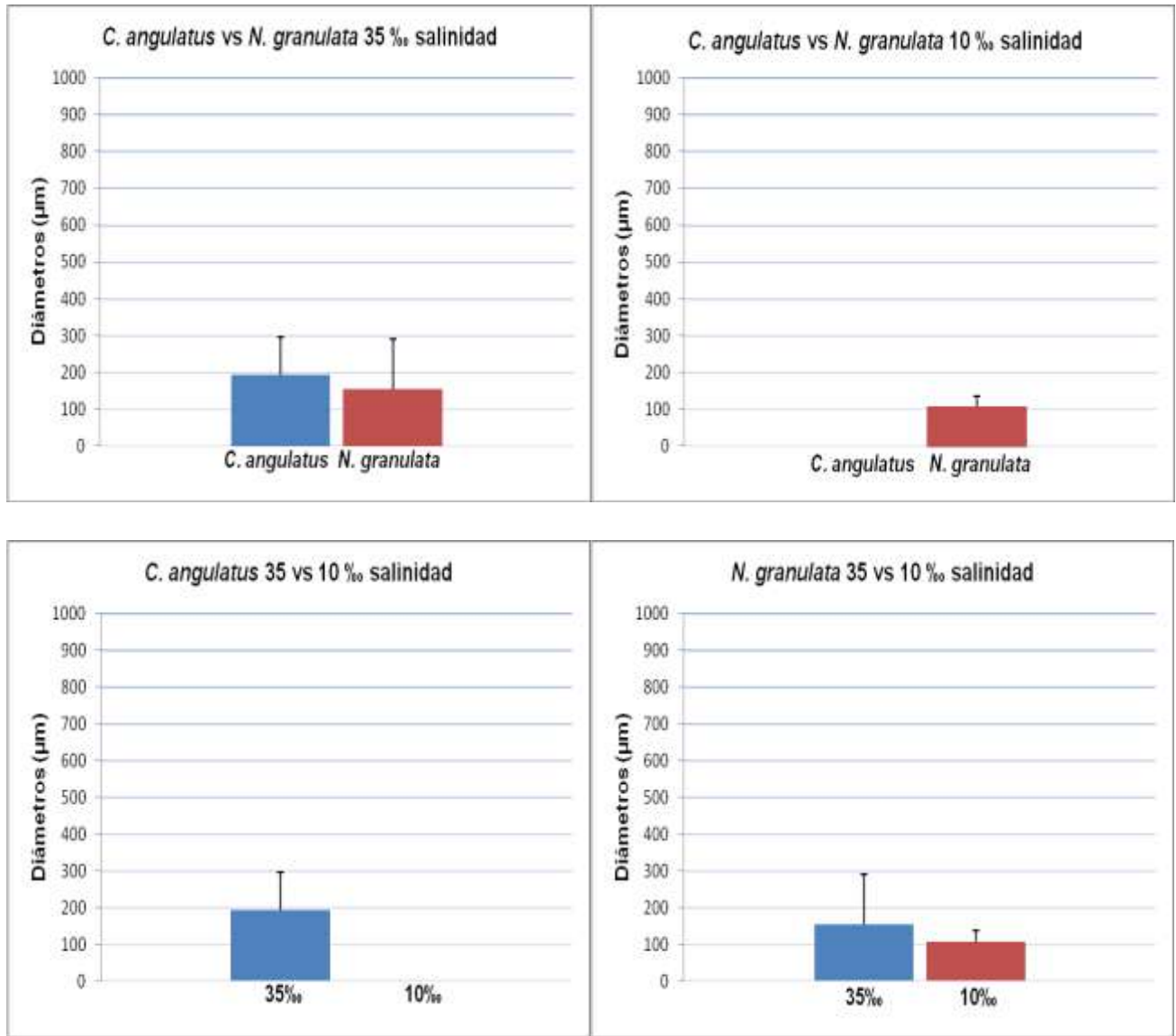
**Figura 21. Diámetros promedio de las fibras de tipo II del músculo de cierre de las velas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.**

\* diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor indicado en rojo.



**Figura 22. Diámetros promedio de las fibras de tipo III del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.**

\* diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor indicado en rojo.



**Figura 23.** Diámetros promedio de las fibras de tipo IV del músculo de cierre de las quejas de *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.

### 3.4. Discusión

Las células musculares de los invertebrados pueden ser clasificadas dentro de tres amplias categorías en base al patrón de estriación de las miofibrillas: transversalmente estriadas, oblicuamente estriadas o músculo liso. Los músculos transversalmente estriados, a su vez, se subdividen en dos clases, los que presentan discos Z continuos o discontinuos. Dentro de esta clasificación, el tipo muscular más similar al músculo esquelético de los vertebrados es el transversalmente estriado con discos Z continuos, el cual se halla presente en los artrópodos (Paniagua y col., 1996).

La ultraestructura de las fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* se corresponde con la descrita para el músculo transversalmente estriado con discos Z continuos, donde los miofilamentos forman sarcómeros bien definidos (Royuela y col., 2000 a).

Al igual que en los crustáceos en general, las fibras musculares de *C. angulatus* y *N. granulata* son multinucleadas, presentan “clefts”, que están en continuidad con los sistemas tubulares T y Z, túbulos T y RS asociados formando díadas y tríadas ubicadas usualmente entre las bandas A e I, y mitocondrias subsarcolémicas (Mellon, 1992; Ushio y Watabe, 1993; Read y col., 1994; Royuela y col., 2000b).

Las características ultraestructurales de las mitocondrias subsarcolémicas descritas en el presente estudio - crestas tubulares escasas y matriz clara abundante – han sido reportadas en el músculo rojo de la musculatura miotomal de ciertos peces teleósteos, como *Micropogonias furnieri*, *Engraulis anchoita* y *Cynoscion striatus* (Devincenti y col., 1998; 2000 a; b). Por otro lado, músculos de otros artrópodos, como el ostrácodo *Acetabulostoma* sp. y el ácaro *Halacarellus thomasi* presentan mitocondrias con numerosas crestas transversales (Royuela y col., 1998; 2000 b),

similares a las mitocondrias intermiofibrilares del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*.

El glucógeno es un polímero hiperramificado de moléculas de glucosa, que constituye una reserva energética fundamental para los animales. Según el grado de complejidad ultraestructural, las partículas de glucógeno se clasifican en  $\beta$  y  $\alpha$ . Las partículas  $\beta$  presentan diámetros entre 10 y 30 nm y su aspecto es más difuso al MET, mientras que las partículas  $\alpha$  se originan a partir de la unión compleja de partículas  $\beta$  en una estructura supramolecular de hasta 300 nm de diámetro, siendo más condensadas y con forma de roseta observadas con el MET (Sullivan y col., 2010). La ultraestructura de las partículas de glucógeno es variable según la especie y órgano de reserva. Así, el hígado de los vertebrados por lo general presenta  $\alpha$  rosetas, mientras que en el músculo esquelético de vertebrados e invertebrados se han descrito partículas  $\beta$  y/o  $\alpha$  (Childress y col., 1970; Hoyle y col., 1973; Devinenti y col., 2000 a; Ryu y col., 2009). En el músculo de cierre de las quelas de las especies estudiadas en la presente Tesis la ultraestructura de las partículas de glucógeno se correspondería con la de las partículas  $\beta$ , más difusas y de pequeño tamaño.

En músculos de la base del quinto par de pereiópodos de diferentes especies de cangrejos adultos portunidos (*C. sapidus*, *Portunus sayi*, *Portunus gibbesii*, *Portunus spinimanus*, *Carcinus maenas*, *Ovalipes ocellatus*) y no portunidos (*Menippe mercenaria*, *Cancer magister*) las fibras adquieren un gran tamaño, exhibiendo modificaciones estructurales, tales como el desarrollo de “clefs”, y la redistribución de los núcleos, que se localizan no sólo periféricamente, sino también entre las miofibrillas (Hardy y col., 2009; 2010). Ambos caracteres morfológicos fueron reportados en el presente estudio, lo cual es esperable debido al diámetro considerable que exhiben las fibras del músculo de cierre de las quelas, tanto en *C. angulatus* como en *N. granulata*. La distribución más

homogénea de los núcleos permitiría una difusión eficiente de macromoléculas en la totalidad de la célula (Hardy y col., 2010).

En ambas especies de cangrejos, la inserción del músculo en la cutícula mostró el patrón ultraestructural típico de crustáceos (Mellon, 1992; Royuela y col., 1998), así como también de otros artrópodos, como el ácaro *H. thomasi* (Royuela y col., 2000 b).

En el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* se identificaron dos tipos de fibras en base a diferencias en la longitud de los sarcómeros, alineación de los discos Z, ordenamiento de los miofilamentos y desarrollo del sistema sarcotubular (Govind y col., 1986; Ushio y Watabe, 1993; Kier y Curtin, 2002). Un grupo se correspondería con fibras de contracción relativamente rápida (sarcómeros más cortos, miofilamentos con un arreglo más ordenado, discos Z lineales, sistema sarcotubular desarrollado), mientras que el otro sería indicativo de fibras de contracción más lenta (sarcómeros más largos, miofilamentos con menor grado de ordenamiento, discos Z en zigzag, menor desarrollo del sistema sarcotubular). La abundancia de mitocondrias es indicativa de la capacidad de resistencia a la fatiga de una fibra (Johnson y col., 2004). En *C. angulatus*, las fibras rápidas presentaron mitocondrias de gran tamaño y más numerosas, por lo que serían más resistentes a la fatiga que las fibras lentas.

En *N. granulata* pudo observarse un solo tipo de fibra de acuerdo a las características ultraestructurales: fibras lentas y poco resistentes a la fatiga.

En base a diferencias en el perfil de reacción frente a las técnicas de m-ATPasa, SDH, PAS y Negro Sudán, las fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* se clasificaron en cuatro grupos. El tipo I se correspondería con fibras de contracción moderada y con baja capacidad glicolítica y oxidativa. El tipo IV sería indicativo de fibras rápidas oxidativas y

glicolíticas. Los tipos II y III serían fibras de contracción moderada con un amplio espectro de propiedades glicolíticas y oxidativas.

La actividad subsarcolémica de enzimas oxidativas ha sido demostrada en distintas especies de crustáceos decápodos y concuerda con la localización ultraestructural de las mitocondrias (Neil y col., 1993; Hardy y col., 2009; Perry y col., 2009). Esta correlación ha sido demostrada en el presente estudio.

En uno de los músculos implicados en la natación del cangrejo azul *C. sapidus* y en músculos flexores abdominales de la langosta *Nephrops norvegicus* las fibras más oxidativas mostraron un elevado contenido de glucógeno y exhibieron una actividad de m-ATPasa resistente a pHs ácidos y alcalinos (Tse y col., 1983; Neil y col., 1993). Además, variaciones en la capacidad oxidativa se relacionan con diferencias en los diámetros de las fibras, de manera que las fibras más pequeñas son más oxidativas (Perry y col., 2009; Longo y col., 2011). En músculos miotomales y de la aleta pectoral de peces teleósteos se ha demostrado un patrón equivalente de tamaño de fibras, capacidad oxidativa y contenido de glucógeno (Fernández y col., 2000; Devinenti y col., 2000 a; b; 2009). Estas observaciones fueron corroboradas en el músculo de cierre de las quelas de las dos especies bajo estudio. Sin embargo, la comparación entre los resultados de la técnica de m-ATPasa sin y con pre-incubación a diferentes pHs, no permitió clasificar a las fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* dentro de las categorías de tipos de fibras establecidas en otros crustáceos (Tse y col., 1983; Maier y col., 1984; Günzel y col., 1993).

Diversos autores han demostrado una relación inversa entre la longitud de sarcómeros de las fibras musculares y la actividad de m-ATPasa. Así, fibras con sarcómeros cortos reaccionan intensamente con la técnica de m-ATPasa, mientras que las fibras con sarcómeros largos reaccionan de una forma más tenue con dicha técnica (Silverman y Charlton, 1980; Günzel y col., 1993; Longo

y col., 2011). Por otro lado, la abundancia de mitocondrias muestra una correlación positiva con la capacidad oxidativa de las fibras (Neil y col., 1993; Royuela y col. 2000 a; Hardy y col., 2010). En el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus*, la caracterización ultraestructural e histoquímica permitió distinguir claramente los distintos tipos de fibras: las fibras con sarcómeros más largos y con menor cantidad y número de mitocondrias, se corresponderían con las fibras de contracción más lenta y menor capacidad oxidativa (tipos I, IIL y IIIL); las fibras con sarcómeros más cortos y mayor número y tamaño de mitocondrias, serían las fibras de contracción más rápida y mayor capacidad oxidativa (tipos IIS, IIIS, y IV). En *N. granulata* no pudo establecerse una correlación tan estrecha entre la ultraestructura y la histoquímica de las fibras, ya que ultraestructuralmente no se detectaron fibras con sarcómeros más cortos y mayor abundancia mitocondrial. Este último hecho no es sorprendente dado que, habitualmente, no existe un criterio común para integrar los diferentes esquemas de clasificación del músculo de crustáceos en tipos definidos de fibras (Perry y col., 2009). Más aún, en ciertos casos, las caracterizaciones morfológica, histoquímica y fisiológica no permiten distinguir claramente los distintos tipos de fibras (Tse y col., 1983; Mykles, 1988).

Por otro lado, la clasificación en categorías discretas puede no reflejar el continuo de tipos de fibras presentes en el músculo de crustáceos (Medler y col., 2004; Perry y col., 2009). De este modo, en el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata*, los tipos I y IV serían grupos “extremos”, mientras que los tipos II y III se corresponderían con grupos “intermedios”.

En un primer trabajo del músculo de cierre de las quelas de *N. granulata* se caracterizaron dos tipos de fibras de contracción moderada: A y B. Las fibras A fueron predominantes, de gran tamaño y exhibieron una reacción más débil que las fibras B cuando fueron tratadas con las técnicas de SDH, PAS y m-ATPasa luego de preincubaciones en un pH ácido (Longo y col., 2011). En

consecuencia, estos dos tipos de fibras se corresponderían con los grupos intermedios de este trabajo: el tipo A sería el subtipo L y el tipo B, el subtipo S.

La morfometría de los tipos de fibras contribuye a la comprensión de la relación entre la estructura y función de un músculo dado. Se sabe, por ejemplo, que la máxima fuerza contráctil que un músculo puede ejercer es casi proporcional a su área de sección transversal (Sustaita, 2008), de este modo, el área relativa que ocupa cada tipo de fibra nos permite calcular cual es su contribución a esa fuerza. El área relativa aportada por cada tipo de fibra mostró el siguiente patrón: II > I > III > IV en ambas especies, lo cual concuerda con la prevalencia de fibras LS reportada en estudios previos (Fernández Giménez y col., 2007; Longo y col., 2011). Sin embargo, en *N. granulata* la contribución relativa del tipo II a la contracción muscular total sería mayor que la observada en *C. angulatus*, mientras que los tipos I y III seguirían un patrón inverso. En un sentido amplio, el músculo de cierre de las quelas de las dos especies estudiadas sería un músculo de contracción moderada.

La heterogeneidad de fibras en músculos de los apéndices de crustáceos es la base para la heterogeneidad funcional de dichos apéndices, lo cual ha sido reportado en músculos de los pereiópodos de especies de cangrejos, langostas y camarones (Neil y col., 1993; Govind y Pearce, 1994; Gruhn y Rathmayer, 2002; Longo y col., 2011).

La quela es un órgano involucrado en diferentes funciones, tales como el combate, cortejo, apareamiento y alimentación (Lee, 1995). *C. angulatus* y *N. granulata* viven en distintos microhabitats en las planicies de marea y tienen hábitos alimenticios diferentes, por lo cual no es sorprendente encontrar variaciones en la composición de tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas de ambas especies. Por ejemplo, *N. granulata* remueve grandes cantidades de sedimento al alimentarse y excavar para mantener su cueva (Botto e Iribarne, 2000), abriendo y cerrando el

dactilopodito casi continuamente para inspeccionar el sustrato (observación personal). Este movimiento continuo de apertura y cierre de la quela se relacionaría con una mayor proporción, con respecto a *C. angulatus*, de fibras del tipo IV (rápidas oxidativas y glicolíticas). Por otro lado, las fibras más lentas y menos resistentes a la fatiga (tipos II y III) serían utilizadas por ambas especies de cangrejos durante la exhibición, encuentros agonísticos y el cortejo.

Las fibras musculares esqueléticas son estructuras dinámicas capaces de cambiar su fenotipo bajo diversas condiciones tales como la alteración de la actividad neuromuscular, entrenamiento, perfiles hormonales modificados y edad (Pette y Staron, 2001). La musculatura de los crustáceos muestra un alto grado de plasticidad, por ejemplo, en el desarrollo del dimorfismo de las quelas experimentado por ciertos decápodos durante su ontogenia (Govind y col., 1987). Esta plasticidad no está limitada a los animales en desarrollo, ya que puede darse en cualquier momento de la vida del individuo y está fuertemente ligada a cambios en el patrón de inervación (Gruhn y Rathmayer, 2002). Factores extrínsecos, como la temperatura, también son responsables de modificaciones en el fenotipo de las fibras musculares. Por ejemplo, en peces y crustáceos, se han reportado variaciones en la expresión de isoformas de proteínas miofibrilares dependientes de la temperatura (Hirayama y col., 2000; Hooper y Thuma, 2005). En especies de anfípodos gamáridos se ha demostrado que las variaciones en temperatura asociadas al intermareal alto serían más selectivas para la diversidad de isoformas de miosina de cadena pesada que las variaciones asociadas a diferentes latitudes (Rock y col., 2009). Por otro lado, no se han detectado variantes de las isoformas de miosina de cadena pesada en el músculo abdominal de larvas en desarrollo de *Homarus gammarus* frente a cambios de temperatura. Esto indicaría que en vez de presentar isoformas específicas de temperatura, dichas larvas sufrirían modificaciones en los tipos de fibras para sobrellevar las alteraciones térmicas (Magnay y col., 2003). En peces se ha observado un reclutamiento diferencial de fibras rápidas y lentas dependiente

de la temperatura de desarrollo (Johnston y col., 2003; Johnston, 2006). En el pez *Dicentrarchus labrax* L. leves variaciones en la temperatura de desarrollo en embriones incrementó el crecimiento y longitud corporal en estadíos larvales y postlarvales, y aceleró la maduración del músculo blanco, lo cual fue visualizado por un aumento del diámetro promedio de las fibras y del patrón histoquímico para la m-ATPasa y la nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolio reductasa (NADH-TR) (López-Albors y col., 2003).

Los cangrejos eurihalinos que habitan zonas de mareas, aguas costeras y estuarios están expuestos a cambios en factores ambientales, siendo la salinidad uno de los factores claves. Estos organismos presentan mecanismos de ajuste a distintos niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o de comportamiento) que les permiten soportar un amplio rango de variación en la salinidad ambiental (Kirschner 1991; 2004). Dichos mecanismos parecen ser dependientes de la especie, hábitat y tipo de estrés y no siempre se producen en forma conjunta (Pinoni, 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que variaciones en la salinidad de aclimatación modifican la expresión de enzimas, tanto metabólicas como aquellas involucradas en procesos osmorregulatorios, en branquias de *C. maenas* (Serrano y Henry, 2008; Towle y col., 2011). *N. granulata* y *C. angulatus* exhiben respuestas diferenciales a nivel bioquímico en las branquias, el músculo de las quelas y el hepatopáncreas frente a distintas condiciones de salinidad ambiental, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos de ajuste en relación al estado osmoionorregulatorio en estos cangrejos (Schleich y col., 2001; López Mañanes y col., 2002; Pinoni, 2009). Se ha demostrado un aumento en el grosor del epitelio de las branquias posteriores de *N. granulata* expuestos a un medio hiposmótico (12 ‰ de salinidad) o hiperosmótico (44 ‰ de salinidad), como consecuencia de un aumento del tamaño celular. Esta característica es típica de los epitelios que se especializan en el

transporte de iones, lo cual sugiere el rol de las branquias posteriores de este cangrejo en la hipo e hiperregulación (Bianchini y col., 2008).

A pesar de la diversidad de estudios sobre los mecanismos de ajuste a nivel bioquímico en crustáceos, así como también en peces (Evans, 2008), frente a cambios en la salinidad ambiental, no existen estudios del efecto de la salinidad sobre la composición y el diámetro promedio de las fibras musculares. En la presente tesis se determinó que la proporción de tipos de fibras fue variable con la salinidad de aclimatación en *N. granulata*, no así en *C. angulatus*. Esto podría deberse a una plasticidad fenotípica diferencial entre especies frente a cambios en las condiciones de salinidad del ambiente. Por otro lado, en ambas especies los diámetros de los distintos tipos de fibras fueron menores a menor salinidad. Esto podría deberse a un menor volumen celular en condiciones de salinidad reducida por eflujo de agua y solutos (Freire y col., 2008). A su vez, la mayor relación superficie/volumen de la célula a menor salinidad permitiría un intercambio efectivo de agua y solutos con el medio extracelular, disminuyendo las limitaciones asociadas al gran tamaño de las fibras de estas especies de crustáceos (Hardy y col., 2009).

La hiperregulación es un proceso fisiológico con alto costo energético. Requiere de una reorganización metabólica tal que permita afrontar las demandas de energía asociadas con la activación de la maquinaria osmoionorregulatoria (Freire y col., 2008). En *N. granulata* se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las modificaciones que sufre el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas en distintas condiciones de salinidad (Bianchini y col., 2008). Incrementos en los niveles de glucosa en hemolinfa han sido reportados luego de estrés hipo o hiperosmótico (Santos y Nery, 1987). En verano el shock hipo o hiperosmótico induce gluconeogenesis en branquias, músculo y hepatopáncreas (Nery y Santos, 1993; Schein y col., 2005; Martins y col., 2011). Esto se correspondería con el mayor contenido de glucógeno del

músculo de cierre de las quelas de los ejemplares de *N. granulata* aclimatados a menor salinidad utilizados en el presente trabajo. Así, la glucosa producida por gluconeogenesis se almacenaría como glucógeno, para ser posteriormente utilizada como fuente energética durante la hiperregulación. Se ha demostrado que *N. granulata* expuestos a dietas de distinta calidad y privados de alimento durante distintos períodos de tiempo no sufren variaciones en el contenido y/o distribución de biomoléculas de reserva a tiempos cortos de privación de alimento (menores a una semana) (Vinagre y Da Silva, 2002; Oliveira y col., 2004) lo cual refuerza la idea del efecto de la baja salinidad sobre las variaciones en la concentración de glucógeno encontrados en la presente Tesis. Contrariamente, en *C. angulatus* no se observaron variaciones en el contenido de glucógeno con la salinidad.

A partir del estudio de las variaciones estacionales en el metabolismo energético del cangrejo *Ocypode quadrata* de la playa Siriú de Brasil, Vinagre y col. (2007) sugieren que los lípidos serían una fuente importante de energía durante la reproducción. Luvizotto-Santos y col. (2003) observaron, utilizando métodos bioquímicos, una movilización de lípidos en branquias y músculo de *N. granulata* juveniles y adultos aclimatados a bajas salinidades. Por otro lado, Martins y col. (2011) no encontraron variaciones significativas en la actividad lipogénica en músculo de la mandíbula de esta especie luego de estrés hiposmótico. En el presente estudio no se observó un efecto de la salinidad de aclimatación sobre la concentración de lípidos del músculo de cierre de las quelas, tanto en *N. granulata* como en *C. angulatus*.

### 3.5. Conclusiones

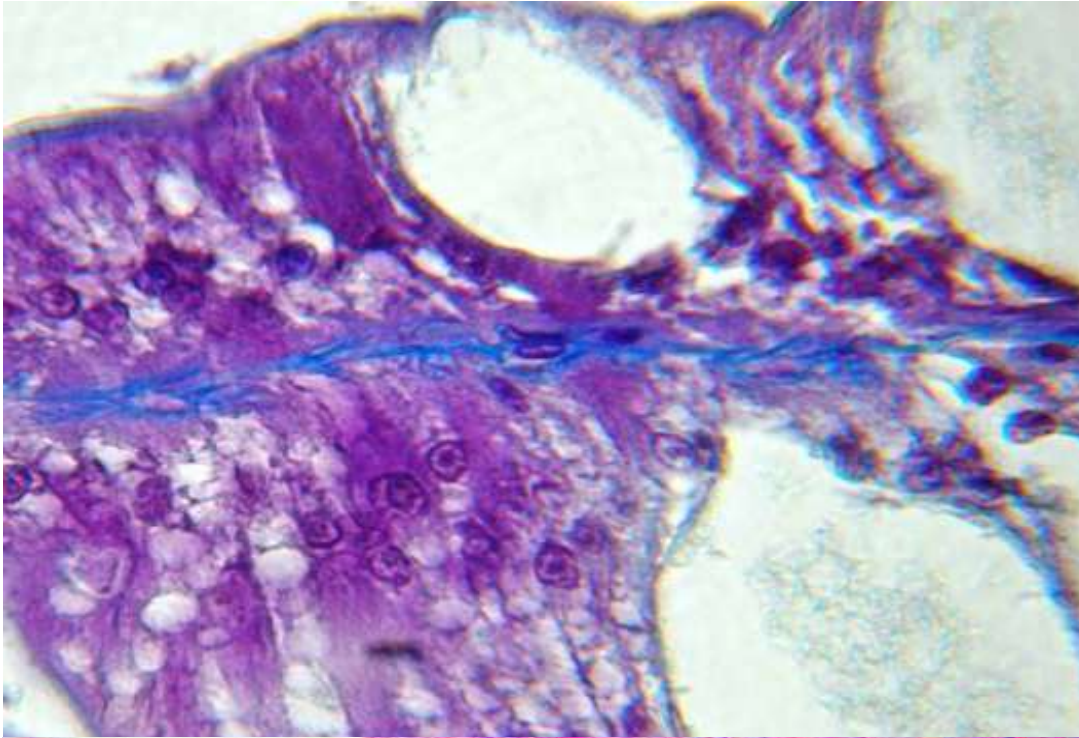
- En base al patrón de estriación de las miofibrillas, el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* es un músculo transversalmente estriado con discos Z continuos.
- Las características ultraestructurales de las fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* son similares a las descritas para los crustáceos en general.
- Los “clefts”, y la localización de los núcleos entre las miofibrillas estarían asociados con el gran diámetro que exhiben las fibras del músculo de cierre de las quelas, tanto en *C. angulatus* como en *N. granulata*.
- En el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* se caracterizaron ultraestructuralmente dos tipos de fibras: fibras de contracción más rápida resistentes a la fatiga y fibras de contracción más lenta con menor resistencia a la fatiga.
- En *N. granulata*, pudo observarse un solo tipo de fibra de acuerdo con las características ultraestructurales, que se correspondería con el tipo lento y de menor resistencia a la fatiga caracterizado en *C. angulatus*.
- En base a diferencias en el perfil de reacción frente a las técnicas de m-ATPasa, SDH, PAS y Sudan Black, las fibras del músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* se clasificaron en cuatro grupos: I, II, III y IV.
- Los tipos I y IV serían grupos “extremos”, mientras que los tipos II y III, grupos “intermedios”. El tipo I se correspondería con fibras de contracción moderada y con baja capacidad glicolítica y oxidativa. El tipo IV sería indicativo de fibras rápidas oxidativas y glicolíticas. Los tipos II y III

serían fibras de contracción moderada con un amplio espectro de propiedades glicolíticas y oxidativas.

- En el músculo de cierre de las quelas de *C. angulatus* pudo establecerse una correlación estrecha entre la ultraestructura y la histoquímica de las fibras: fibras con sarcómeros más largos y, con menor cantidad y número de mitocondrias, se corresponderían con las fibras de contracción más lenta y menor capacidad oxidativa (tipos I, IIL y IIIL); las fibras con sarcómeros más cortos y, mayor número y tamaño de mitocondrias, serían las fibras de contracción más rápida y mayor capacidad oxidativa (tipos IIS, IIIS, y IV).
- Según los valores del área relativa aportada por cada tipo de fibra, el músculo de cierre de las quelas de las dos especies estudiadas sería un músculo de contracción moderada.
- La heterogeneidad histoquímica de fibras en los músculos de cierre de las quelas de *C. angulatus* y *N. granulata* estaría relacionada con la función que cumple cada tipo celular.
- Hubo variaciones en la proporción de tipos de fibras entre especies, lo cual se relacionaría con hábitats y modos alimenticios diferentes.
- *N. granulata* y *C. angulatus* exhiben una plasticidad fenotípica diferencial en la composición de tipos de fibras musculares en respuesta a condiciones de salinidad reducida.
- La mayor relación superficie/volumen de la célula a menor salinidad en ambas especies de cangrejos permitiría un intercambio efectivo de agua y solutos con el medio extracelular.

- *N. granulata* y *C.angulatus* exhiben respuestas diferenciales en el uso de reservas de glucógeno frente a distintas condiciones de salinidad ambiental, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos de ajuste en relación al estado osmoionorregulatorio en estos cangrejos.
- Los lípidos no serían utilizados como fuente energética durante la hiperregulación en el músculo de cierre de las quelas de ambas especies de cangrejos.

## CAPÍTULO 4: HEPATOPÁNCREAS



#### 4.1. Introducción

Los crustáceos decápodos presentan una glándula digestiva asociada al intestino medio, la cual ha recibido diferentes denominaciones, siendo la de hepatopáncreas la más aceptada (Van Weel, 1974). Es el órgano principal involucrado en la digestión, absorción y reserva de nutrientes, secreción de enzimas digestivas y excreción de desechos (Sousa y Petriella, 2000; Oliveira y col., 2004). También cumple un rol importante en el balance iónico del organismo (Zhuang y Ahearn, 1996) y en la detoxificación de sustancias (Sousa y Petriella, 2007; Collins, 2010).

Se compone de numerosos túbulos ciegos revestidos por un epitelio simple y rodeados por una capa de células mioepiteliales, y más externamente, por tejido conectivo laxo con hemocitos, capilares y senos hemales (Verri y col., 2001; Franceschini-Vicentini y col., 2009). En el epitelio se diferencian al menos cuatro tipos celulares: células E (embrionarias), F (fibrilares), R (absorbentes), y B (con forma de ampolla) (Jacobs, 1928; Cuartas y col., 2002; Côrrea Jr. y col., 2002). En varias especies de camarones peneidos, en decápodos superiores como *Homarus gammarus*, *Astacus leptodactylus* y *C. maenas*, y en el camarón carideo *Macrobrachium amazonicum* se ha descrito un quinto tipo celular: la célula M (basal) (Icely y Nott, 1992; Verri y col., 2001; Franceschini-Vicentini y col., 2009).

El proceso digestivo es cíclico y el rol específico de cada tipo celular del hepatopáncreas en cada una de las etapas ha sido determinado mediante estudios morfológicos, ultraestructurales, histoquímicos e inmunohistoquímicos (Madhyastha y Rangneker, 1974; Vogt y col., 1989; Vogt, 1994; Sousa y Petriella, 2001; Marcolin y col., 2008).

Las células E son escasas y se ubican en el extremo distal de los túbulos. Presentan las características histológicas típicas de células indiferenciadas, y son el único tipo celular que sufre mitosis. Las células F son cilíndricas o piramidales y están localizadas en las zonas media y distal.

Presentan un citoplasma basófilo y un gran núcleo basal con nucléolo evidente. Su función comprende la síntesis de enzimas digestivas. Las células R son las más abundantes y se distribuyen a lo largo de toda la longitud tubular, siendo más evidentes en la zona proximal. Este tipo celular es el sitio principal de almacenamiento de lípidos y glucógeno, así como también de metales pesados. Su aspecto es columnar, con un núcleo basal pequeño y una pequeña vacuola apical, en su estadio inmaduro (Ri), o con el citoplasma ocupado por numerosas vacuolas en estadios maduros (Rm). Las células B se encuentran en la zona media y proximal de los túbulos y presentan una gran vacuola central y pequeñas vacuolas apicales en su estadio inmaduro (Bi). En su etapa madura (Bm), la célula está totalmente ocupada por una gran vacuola y el núcleo desplazado hacia la base. Se encarga de la síntesis de enzimas digestivas y de la absorción de nutrientes desde la luz tubular. Los materiales absorbidos se digieren intracelularmente, se concentran en la gran vacuola y el material de desecho es eliminado al final del ciclo digestivo (Icely y Nott, 1992; Verri y col, 2001; Côrrea Jr. y col., 2002; Sousa y col., 2005). El mecanismo secretor puede ser apócrino, merócrino u holócrino dependiendo de la especie (Sousa, 2003; Marcolin y col., 2008; Franceschini-Vicentini y col., 2009). Las células M son las menos numerosas y están dispersas entre los demás tipos celulares a lo largo de toda la longitud tubular, sin estar en contacto directo con el lumen. Exhiben una forma piramidal, citoplasma basófilo, y un núcleo redondo central (Icely y Nott, 1992; Franceschini-Vicentini y col., 2009) (Fig. 24).

Los tipos celulares F, R y B presentan microvellosidades en la membrana apical, relacionadas con el transporte de sustancias (Côrrea Jr. y col., 2002; Sousa y col, 2005). En los vertebrados, los epitelios del intestino y túbulos contorneados renales exhiben con el microscopio óptico (MO) un borde refringente a lo largo de la superficie libre de las células que se correspondería con las microvellosidades observadas con el MET. Dicha estructura se designa con el nombre “brush

border”, en inglés, mientras que en español se utilizan habitualmente las denominaciones: borde en cepillo, para las células que forman los túbulos contorneados renales, y chapa estriada, para los enterocitos del intestino (Paniagua y col., 2003; Ross y Pawlina, 2007). En base a lo expuesto, en el presente estudio el borde apical de las células epiteliales del hepatopáncreas se designará como chapa estriada.

La membrana peritrófica es una estructura acelular existente en la luz intestinal de una amplia variedad de invertebrados, muy estudiada en insectos. Está compuesta por una malla de fibrillas quitinosas embebidas en una matriz de proteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Georgi, 1969; Bolognesi y col., 2008). Algunas de sus funciones son análogas a las de las secreciones mucosas del tracto digestivo de vertebrados: protege al epitelio de la abrasión mecánica, de las enzimas digestivas y de los patógenos. Es una barrera bioquímica, que secuestra y, en algunos casos, inactiva toxinas ingeridas. Por otro lado, compartimentaliza los procesos digestivos, permitiendo una eficiente asimilación de nutrientes y reutilización de enzimas hidrolíticas (Brunet y col., 1994; Martin y col., 2006; Hegedus y col., 2009). Es común su existencia en el sistema digestivo de crustáceos, tanto en el intestino como en el hepatopáncreas (Hopkin y Nott, 1980; De Jong-Moreau y col., 2000; Côrrea Jr. y col., 2002). En el hepatopáncreas dicha membrana engloba material particulado no digerido en el lumen y lo transfiere al intestino medio para formar la columna fecal en el intestino posterior (Wilde y col., 2004). La membrana peritrófica puede presentar un aspecto laminar o multilaminar (Cuartas y Petriella, 2001).

Cuartas y Petriella (2000) caracterizaron histológicamente el hepatopáncreas de *N. granulata*, *C. angulatus* y *Uca uruguayensis*. En general, la citoarquitectura del órgano es similar en las tres especies y se corresponde con la observada para otros decápodos. Sin embargo, el aspecto de la luz

tubular y de la membrana peritrófica es variable entre especies, así como también la composición celular de la zona media de los túbulos.

A nivel histoquímico, son pocos los estudios que se han desarrollado en el hepatopáncreas de crustáceos. Madhyastha y Rangneker (1974) analizaron los cambios en el contenido de glucógeno y lípidos durante las diferentes etapas del ciclo de muda en el hepatopáncreas del camarón *Metapenaeus monoceros*. Por otro lado, Sarasquete y col. (1985) estudiaron los caracteres citohistoquímicos de carbohidratos y proteínas del hepatopáncreas del langostino *Penaeus kerathurus*. Asimismo, se analizó la composición química de las sustancias almacenadas en el citoplasma de las células hepatopancreáticas del cangrejo *Ocypoda platytarsis* (Ramadevi y col., 1990) y de la langosta *Tenus orientalis* (Johnston y col., 1998).

Debido a la importancia del hepatopáncreas en la economía general del organismo, las variaciones fisiológicas causadas por cambios ambientales, ya sean naturales u antropogénicos, son usualmente visualizadas en la histología y ultraestructura de este órgano (Icely y Nott, 1992; Sousa y Petriella, 2007; Collins, 2010). Se han descrito las modificaciones histológicas causadas por variaciones de salinidad en el hepatopáncreas de los camarones *Artemesia longinaris* (Masson, 2001), *Litopenaeus vannamei* (Li y col., 2008) y *Palaemonetes argentinus* (Díaz y col., 2010 a), y del langostino *Pleoticus muelleri* (Cuartas y col., 2003).

La hiperregulación es un proceso fisiológico con alto costo energético. Requiere de una reorganización metabólica tal que permita afrontar las demandas de energía asociadas con la activación de la maquinaria osmoionorregulatoria (Freire y col., 2008). Debido a esto y al rol fundamental del hepatopáncreas en el metabolismo, no es sorprendente la existencia de mecanismos de ajuste en el hepatopáncreas de crustáceos frente a cambios de salinidad ambiental. Así, se ha demostrado una actividad de enzimas digestivas sensible a cambios de salinidad en el camarón

blanco *L. vannamei* (Li y col., 2008). A nivel bioquímico, el hepatopáncreas de *N. granulata* almacena glucógeno, proteínas y lípidos (Pinoni y col., 2011) y la concentración de dichas reservas, así como también la actividad de fosfatasa alcalina (AP), amilasas, sacarosas, maltasas, lipasas y proteasas varían en distintas condiciones de salinidad (Nery y Santos, 1993; Pinoni, 2009; Michiels, 2010; Asaro y col., 2011; Martins y col., 2011). En *C. angulatus* se ha demostrado una actividad de AP y proteolítica, así como también un contenido proteico dependientes de la salinidad de aclimatación (Pinoni, 2009).

Sin embargo, aún no se ha descrito la caracterización histoquímica del hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata*, ni las modificaciones histológicas e histoquímicas que sufre tal órgano en ambas especies de cangrejos frente a variaciones en la salinidad ambiental.

La caracterización histoquímica del hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* contribuirá a la comprensión del rol de cada tipo celular en el proceso digestivo. Por otro lado, el análisis histológico e histoquímico del hepatopáncreas en distintas condiciones de salinidad servirá para comprender los complejos mecanismos de ajuste frente al estrés salino en *C. angulatus* y *N. granulata*.

Las **hipótesis** de este capítulo son las siguientes:

- “La histología del hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* se modifica por efecto de cambios en la salinidad ambiental”.
- “Las características histoquímicas del hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus* varían en distintas condiciones de salinidad”.
- “Las modificaciones histológicas e histoquímicas del hepatopáncreas por efecto de cambios en la salinidad ambiental varían según la especie”.

Los **objetivos** de este capítulo abarcan:

- Caracterizar histoquímicamente el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata*.
- Analizar la histología e histoquímica del hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* en distintas condiciones de salinidad.
- Encontrar posibles relaciones entre la histología e histoquímica del hepatopáncreas de ambas especies de cangrejos y las variaciones de salinidad.

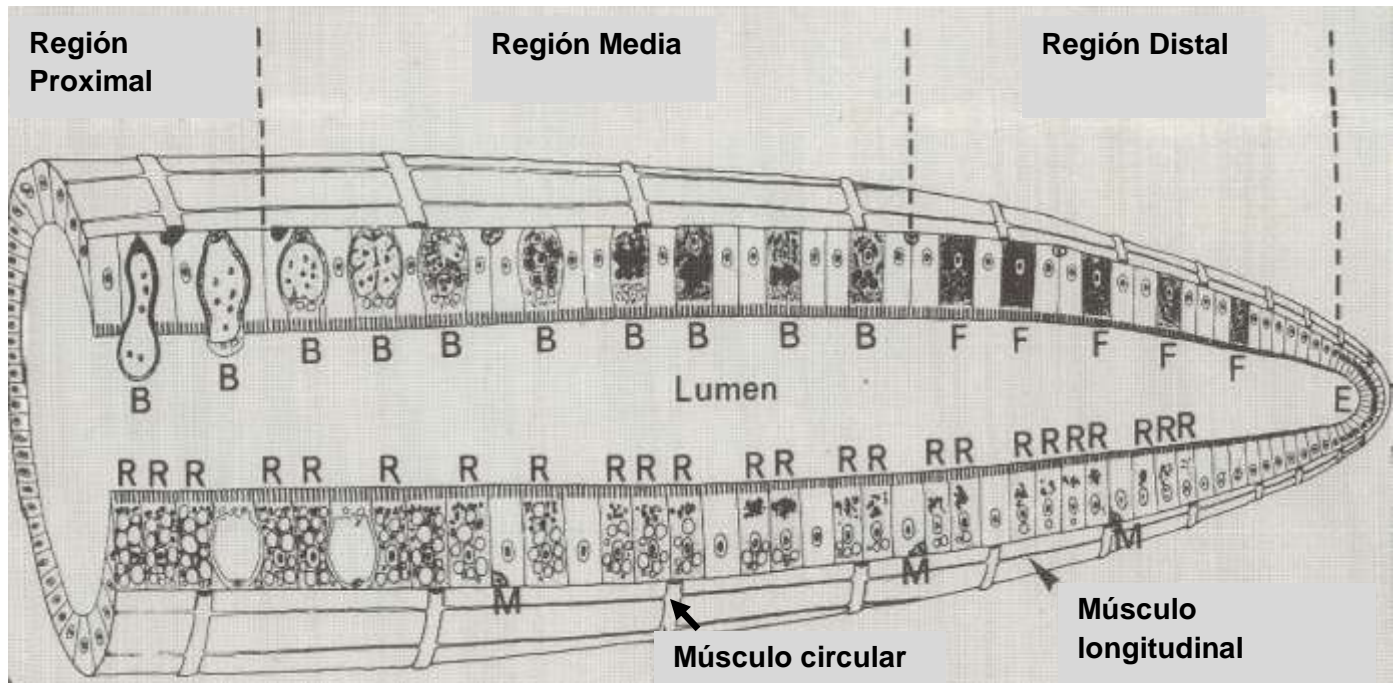
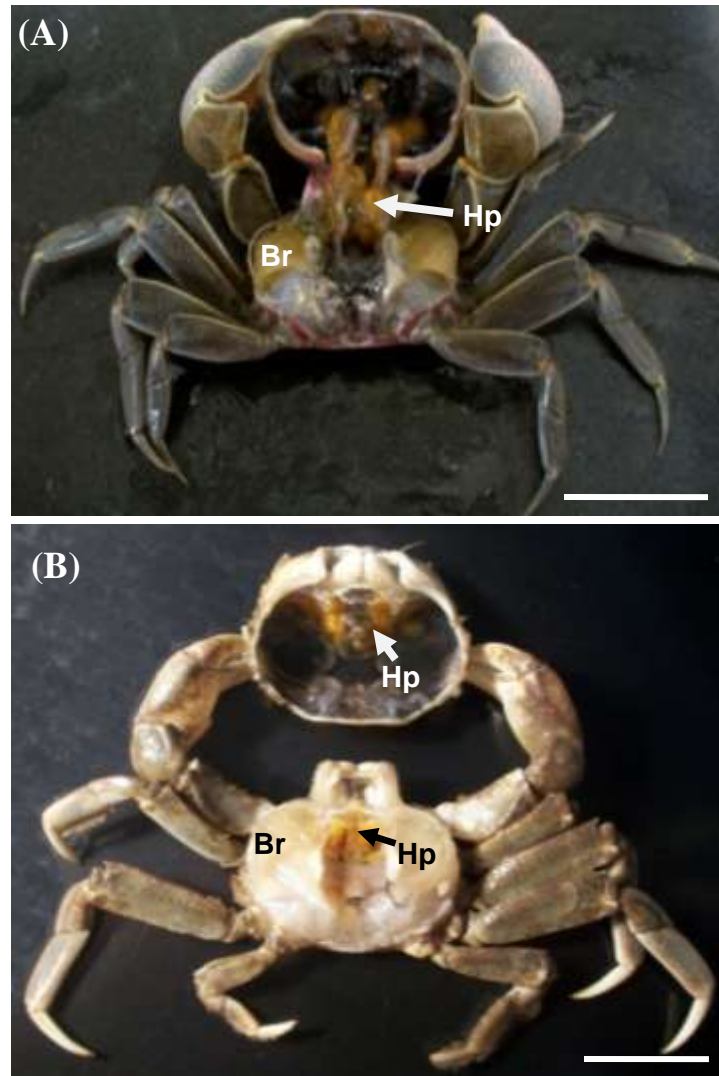


Figura 24. Esquema de un túbulo hepatopancreático, donde se muestra la distribución de los diferentes tipos celulares a lo largo de la longitud tubular (modificado de Al-Mohanna y Nott, 1989).

#### 4.2. Material es y Métodos

Los animales fueron crioadestesiados durante 20-30 min. Se removió la cutícula y, posteriormente, se prefijó y extrajo el hepatopáncreas (Fig. 25).



**Figura 25.** Vista macroscópica dorsal del hepatopáncreas en la cavidad cefalotorácica. (A): *N. granulata*. (B): *C. angulatus*. Br: branquias; Hp: hepatopáncreas. Escala: 2 cm.

#### ➤ **4.2.1. Histología**

Los animales fueron mantenidos en ayuno durante las 24 hs. previas a la toma de muestras. Se utilizaron 10 individuos de cada especie, 5 aclimatados a la salinidad de 35 ‰ y otros 5 aclimatados a 10 ‰ de salinidad. El hepatopáncreas se prefijó inyectando fijador de Davidson antes de su extracción. Luego, fue removido, seccionado, e inmerso en el mismo fijador por un período de 24 hs. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de alcoholes de graduación creciente. Luego de ser sumergidas en alcohol 100 % fueron tratadas con alcohol butílico (2 cambios de 1 día c/u), butilparafina (50:50 v/v) y parafina pura. Con micrótopo se realizaron cortes de 5 µm de espesor. Las muestras fueron teñidas con:

- a) Hematoxilina-Eosina (H/E) (Martoja y Martoja-Pierson, 1970): método general de tinción utilizado en estudios topográficos.
- b) Tricrómico de Masson (Martoja y Martoja-Pierson, 1970): para la identificación de distintos tipos de tejido.

#### ➤ **4.2.2. Histoquímica de glicoproteínas (GPs):**

Se utilizaron 10 ejemplares de cada especie, 5 aclimatados a 35 ‰ y 5 aclimatados a 10 ‰ de salinidad. Las muestras de hepatopáncreas fueron obtenidas y procesadas según el mismo protocolo para histología. Los cortes se tiñeron con las siguientes técnicas:

- a) PAS (Mc Manus, 1948; Hotchkiss, 1948): para evidenciar GPs neutras, específicamente GPs con dióles vecinos oxidables y/o glucógeno. Como control de glucógeno se incubó la muestra con  $\alpha$ -amilasa y se prosiguió con la técnica de PAS (Pearse, 1985). Ambos procedimientos siguieron el protocolo utilizado para las muestras de músculo.

b) Azul Alcian (AA) (Lev y Spicer, 1964): este método evidencia GPs ácidas. Con una solución a pH 2,8 se colorean GPs con grupos carboxílicos y/o sulfatados; a pH 1 lo hacen las GPs con ésteres O-sulfatados, y a pH 0,5, sólo las GPs muy sulfatadas.

c) Azul de Toluidina (AT) (Lison, 1953): permite detectar GPs ácidas. A diferencia del AA, este colorante básico presenta la propiedad de metacromasia al teñir polímeros polianiónicos de alto peso molecular de un color que difiere del tinte de origen del colorante (el AT en estado diluido es de color azul; como polímero es de color rojo-púrpura). La solución a pH 5,6 tiñe GPs con grupos carboxílicos y/o sulfatados; a pH 4,2: GPs con ésteres O-sulfatados. En ambos casos si las GPs ácidas detectadas corresponden a polímeros polianiónicos de alto peso molecular, se teñirán de color rojo-púrpura (metacromasia); en cambio, si las GPs ácidas no forman dichas agregaciones, se teñirán de color azul (ortocromasia).

Los resultados fueron evaluados en forma semicuantitativa: se consideró la presencia (+) o ausencia (-) de reactividad, y la intensidad en la presencia de actividad fue indicada como un incremento en el número de +.

#### ➤ **4.2.3. Histoquímica de lípidos:**

Los animales fueron mantenidos en ayuno durante las 48 hs. previas a la toma de muestras. Se utilizaron 10 ejemplares de cada especie, 5 aclimatados a 35 ‰ y 5 aclimatados a 10 ‰ de salinidad. Se prefijó el hepatopáncreas de individuos crioadestesiados embebiéndolo con gel de congelación (Cryoplast, Biopack, Buenos Aires, Argentina). Se extrajo el órgano, se seccionó y fijó con el mismo gel sobre un soporte (chuck). Tanto la prefijación como la fijación se realizaron dentro del criostato. Las muestras fijadas fueron almacenadas en freezer (-20° C) hasta su posterior

utilización. Se llevaron a cabo cortes por congelación (10-15  $\mu\text{m}$ ) en crióstato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las secciones se trataron con las siguientes técnicas:

Negro y Rojo Sudán (Martoja y Martoja Pearson, 1970; Chayen y col., 1973): para detectar lípidos neutros. Las secciones se tiñeron en solución saturada de los colorantes en etanol al 70 % durante 15 a 30 min. Los controles se efectuaron tratando los cortes con acetona durante 30 min. previa coloración.

### 4.3. Resultados

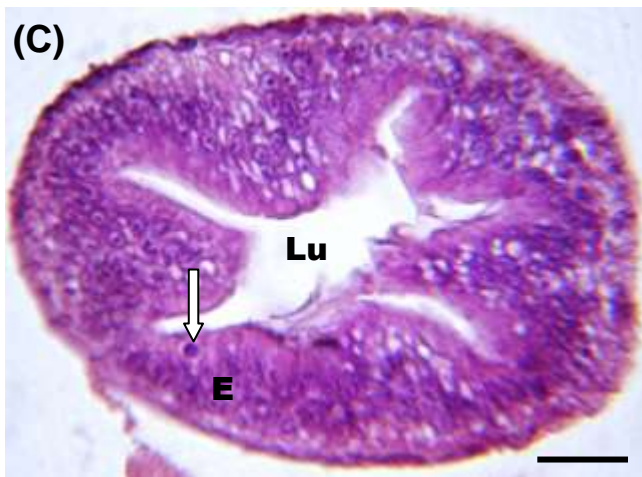
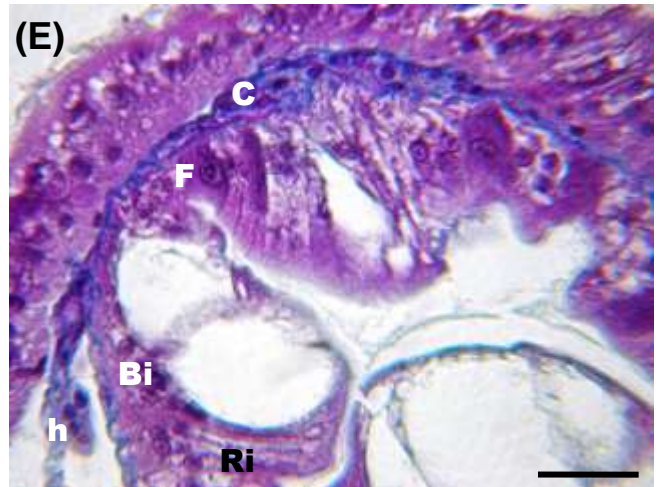
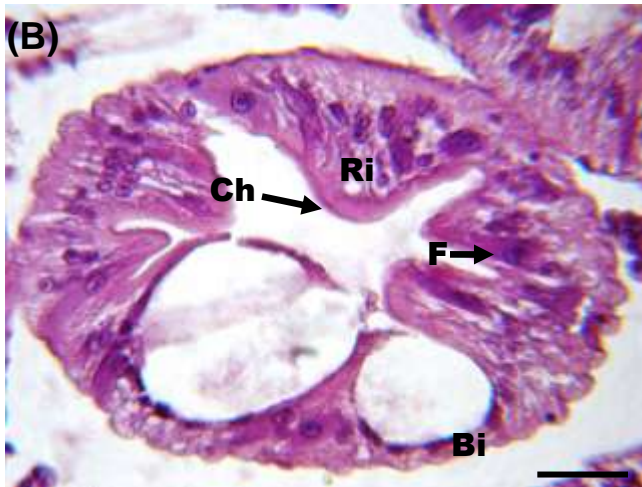
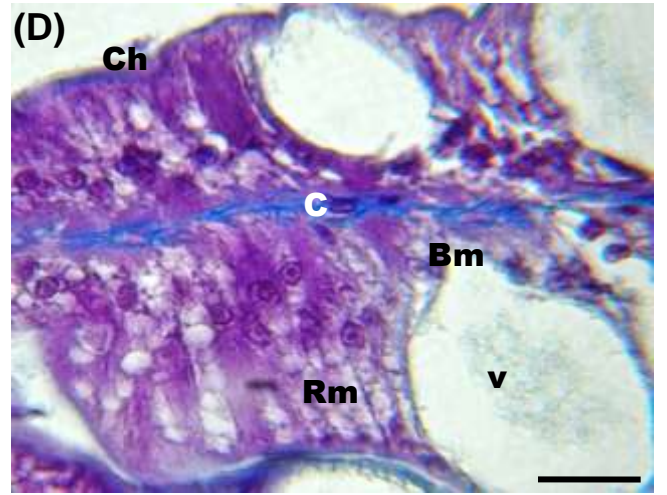
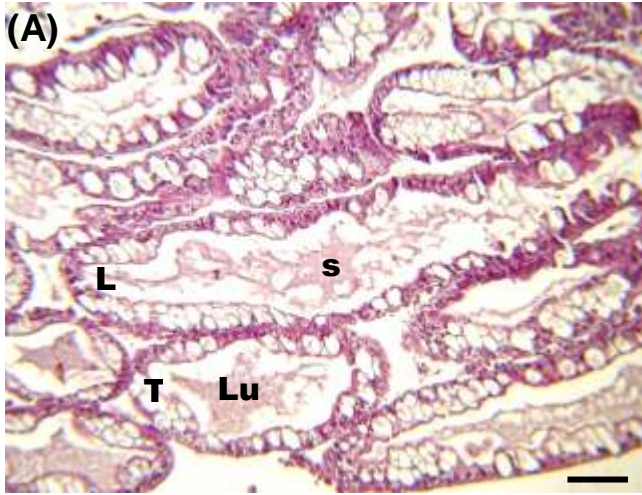
#### 4.3.1. Histología

En la salinidad de 35 ‰, el hepatopáncreas de ambas especies de cangrejos exhibió características histológicas típicas (Figs. 26 y 28). La zona distal, media y proximal fueron observadas en cortes longitudinales y transversales de los túbulos. En *C. angulatus*, la zona media exhibió una mayor proporción de células B que lo observado para *N. granulata* (Figs. 26A y 28A).

En condiciones de hiperregulación se observaron modificaciones de la estructura tubular, con desprendimiento de la lámina basal, descamación celular, interrupciones de la chapa estriada, pérdida de la cohesión intercelular e hipertrofia de la luz tubular. En esos sitios se observó infiltración de hemocitos en el tejido conectivo (Figs. 27 y 29). En *C. angulatus*, hubo hipertrofia celular y vacuolización de las células R (Figs. 27A, B). En *N. granulata*, se observaron áreas de licuefacción tisular (Fig. 29A).

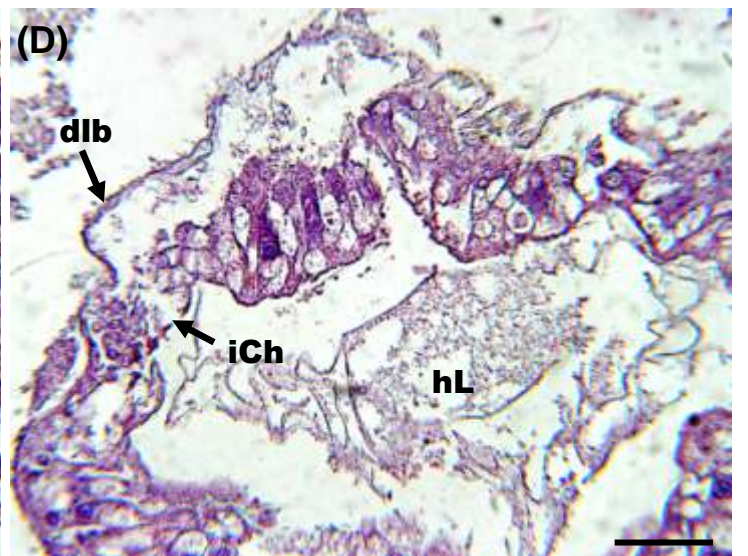
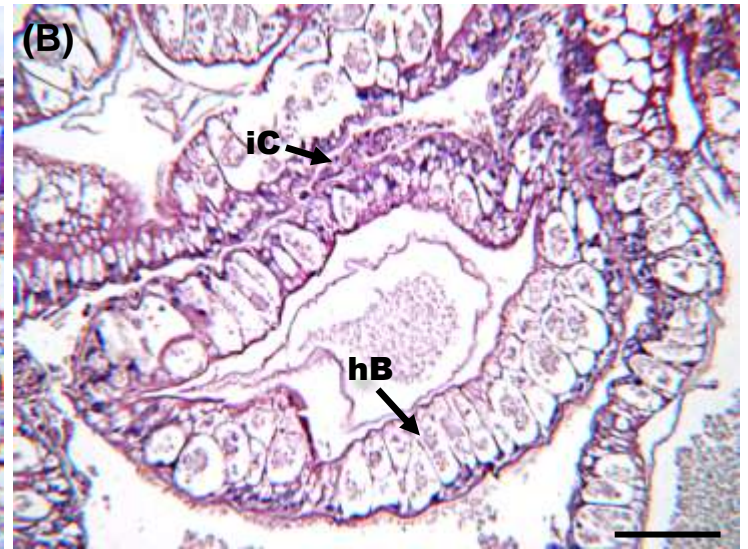
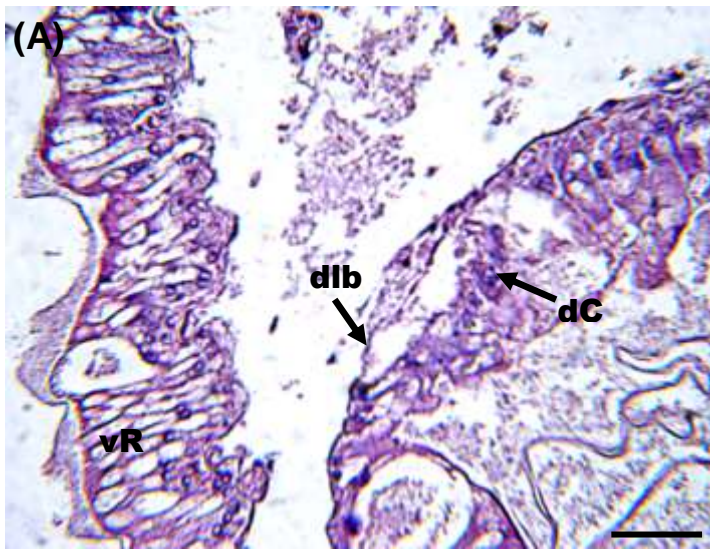
**Figura 26. Hepatopáncreas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A)-(C): H/E. (D) y (E): Tricrómico de Masson. (C): las células E (E) son el único tipo celular que sufre mitosis (flecha blanca).**

Bi: célula B inmadura; Bm: célula B madura; C: conectivo; Ch: chapa estriada; F: célula F; h: hemocitos; L: corte longitudinal; Lu: lumen; Ri: célula R inmadura; Rm: célula R madura; s: secreción; T: corte transversal; v: vacuola. Escala: (A): 120  $\mu\text{m}$ ; (B)-(E): 30  $\mu\text{m}$ .



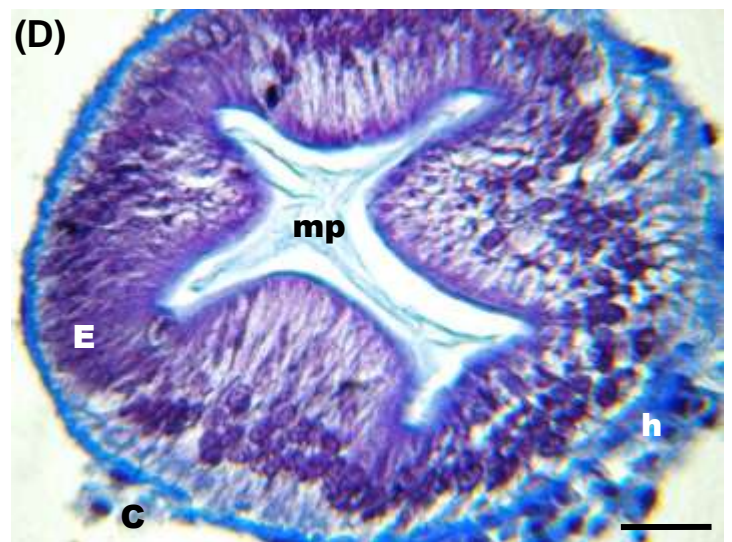
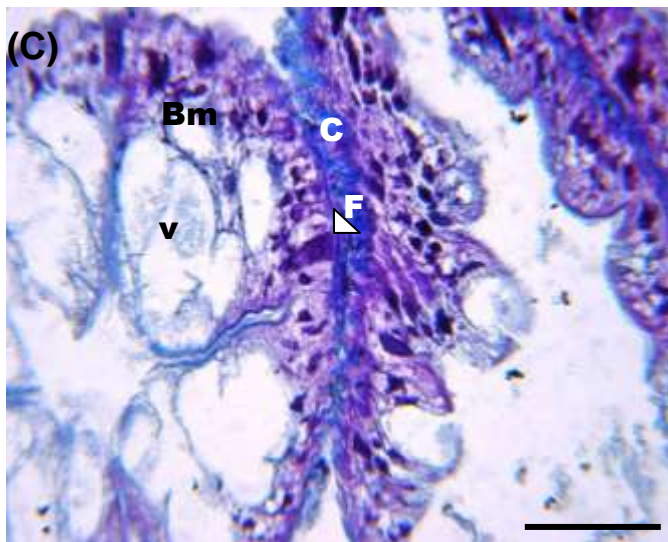
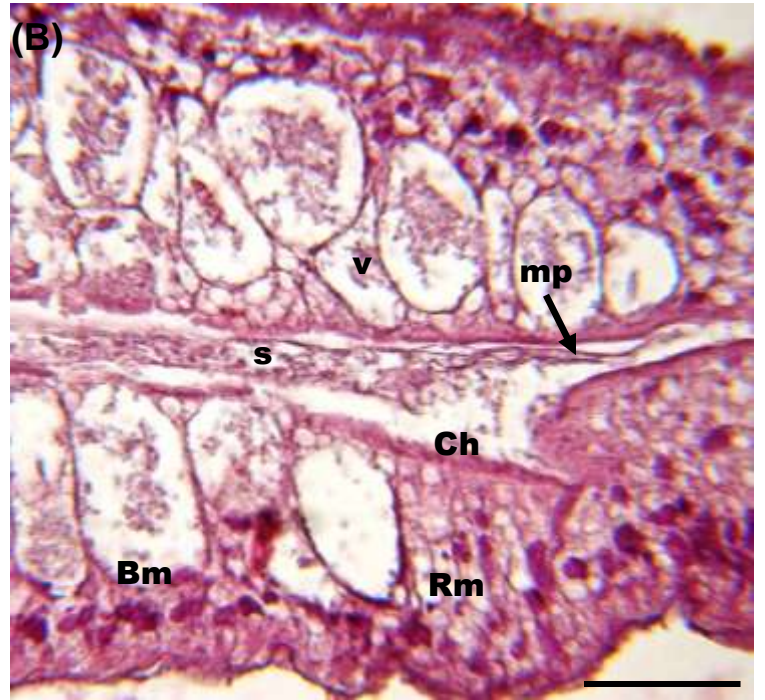
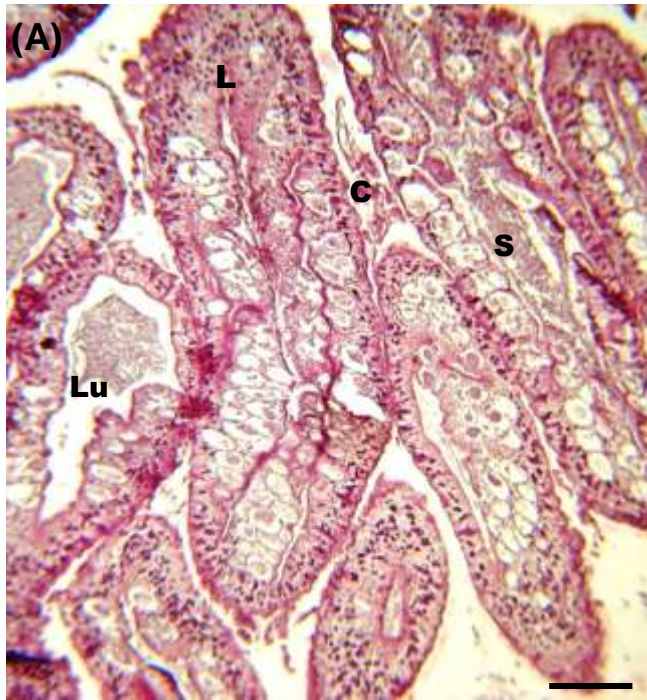
**Figura 27. Hepatopáncreas de *C. angulatus* aclimatados a 10 ‰ de salinidad coloreados con H/E. (A)-(D): se observan modificaciones de la estructura tubular.**

dC: descamación celular; dlb: desprendimiento de la lámina basal; h: hemocitos; hB: hipertrofia de células B; hL: hipertrofia de la luz tubular; iC: infiltración de conectivo; iCh: interrupciones de la chapa estriada; vR: vacuolización de células R. Escala: (A), (C), (D): 60  $\mu\text{m}$ ; (B): 120  $\mu\text{m}$ .



**Figura 28. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad. (A) y (B): H/E. (C) y (D): Tricrómico de Masson.**

Bm: célula B madura; C: conectivo; Ch: chapa estriada; E: célula E; F: célula F; h: hemocitos; L: corte longitudinal; Lu: lumen; mp: membrana peritrófica; Rm: célula R madura; s: secreción; v: vacuola. Escala: (A): 120  $\mu\text{m}$ ; (B), (C): 60  $\mu\text{m}$ ; (D): 30  $\mu\text{m}$ .

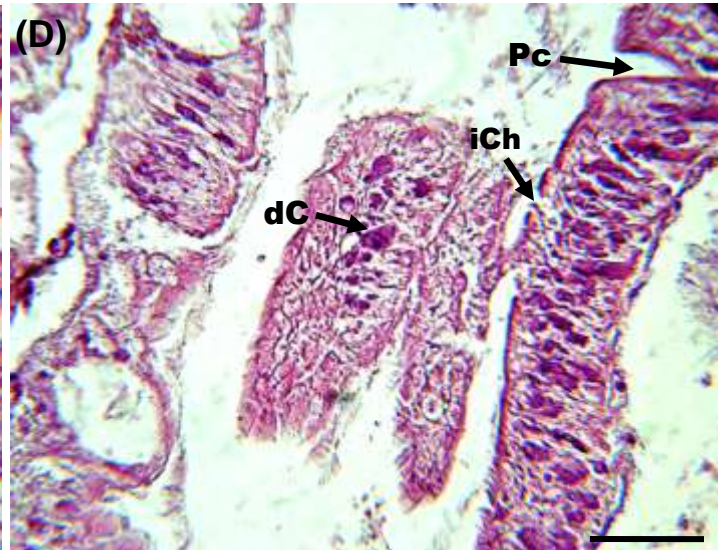
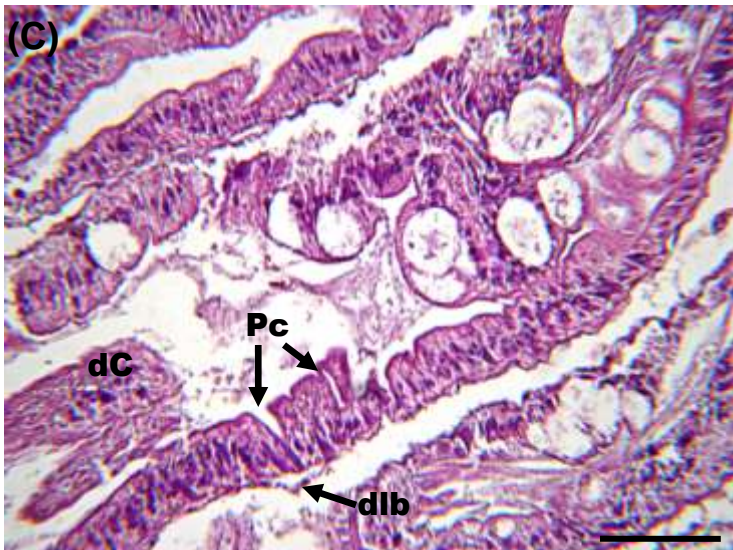
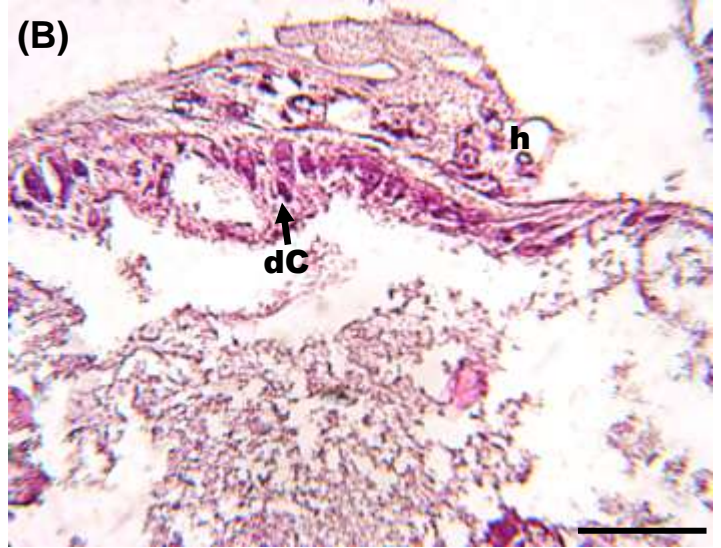


**Figura 29. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados a 10 ‰ de salinidad coloreados con**

**H/E. (A)-(D): se observan modificaciones de la estructura tubular.**

dC: descamación celular; dlb: desprendimiento de la lámina basal; h: hemocitos; iCh: interrupciones de la chapa estriada; Lt: áreas de licuefacción tisular; Pc: pérdida de la cohesión intercelular. Escala:

(A), (C): 120  $\mu\text{m}$ ; (B), (D): 60  $\mu\text{m}$ .



### **4.3.2. Histoquímica**

#### ***C. angulatus***

En ambas salinidades las células E, F, chapa estriada y lámina basal mostraron ausencia de reservas de glucógeno, mientras que exhibieron un contenido moderado-elevado de GPs con dioles vecinos oxidables (Fig. 30). En la membrana peritrófica, el glucógeno fue escaso y las GPs con dioles vecinos oxidables moderadas (Fig. 30E). Por otro lado, en base a la tinción de AA a diferentes pHs, la chapa estriada y la membrana peritrófica presentaron una mezcla de GPs carboxiladas, sulfatadas y muy sulfatadas (Figs. 31, 32), mientras que la lámina basal mostró GPs sulfatadas únicamente. Con la técnica de AT a pH 5,6 se observó metacromasia en algunas zonas de la chapa estriada y en la membrana peritrófica (Fig. 33). Las células B exhibieron escasos glucógeno y GPs con dioles vecinos oxidables en el citoplasma y zona apical. Del mismo modo, en sus vacuolas se observó una mezcla de ambos compuestos, aunque el contenido de glucógeno fue más elevado (Fig. 30B, E). El citoplasma de las células B mostró escasas GPs carboxiladas y sulfatadas en sus estadios maduros (Figs. 31A; 32A, B), y sólo escasas GPs sulfatadas en su fase inmadura (Fig. 32A). Las vacuolas de células Bm exhibieron una mezcla de GPs carboxiladas, sulfatadas y muy sulfatadas y reaccionaron metacromáticamente con la técnica de AT a pH 5,6 (Figs. 31A, 32, 33). La zona apical de las células R evidenció una mezcla de glucógeno y GPs con dioles vecinos oxidables (Figs. 30C, E). Ninguna estructura reaccionó metacromáticamente a pH 4,2. Se observó un contenido moderado-elevado de gotas lipídicas en las vacuolas de las células Rm y en el citoplasma de los diferentes tipos celulares, excepto las células E (Fig. 34).

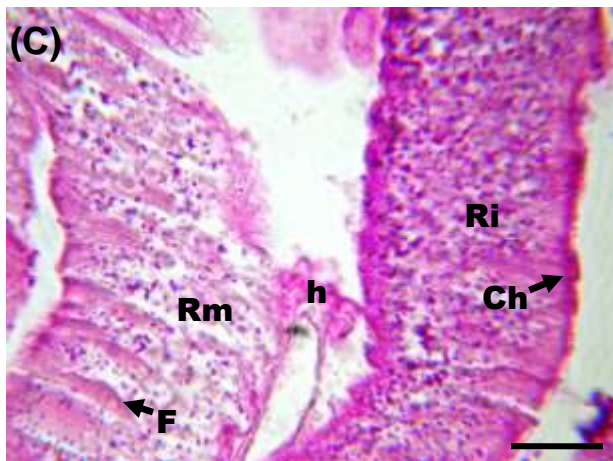
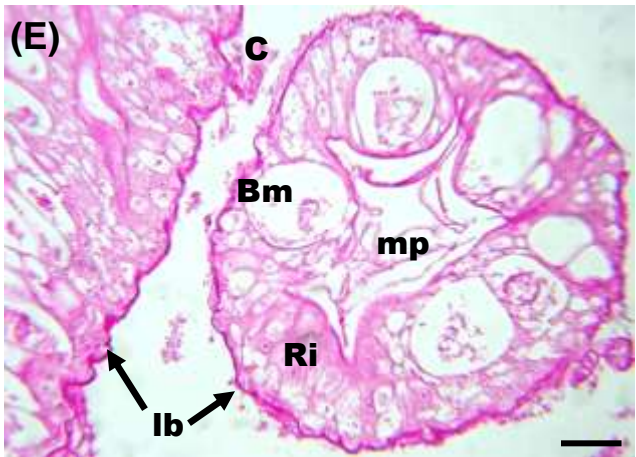
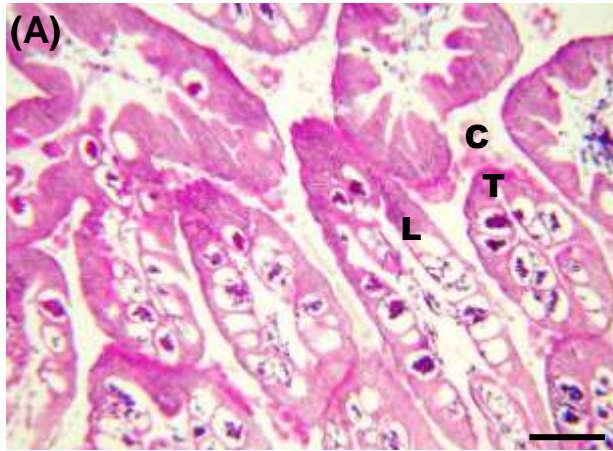
A 35 % de salinidad, las vacuolas de las células B y el citoplasma de las células R evidenciaron un contenido de glucógeno mayor que a 10 % (Figs. 30B, C, E). El citoplasma de todos los tipos celulares y la zona apical de las células B y R presentaron GPs carboxiladas y/o escasas sulfatadas a

mayor salinidad, y un contenido débilmente mayor de sulfatadas y/o muy sulfatadas a menor salinidad (Figs. 31, 32).

En la tabla 4 se muestra un resumen del perfil histoquímico de las GPs del epitelio hepatopancreático de *C. angulatus* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.

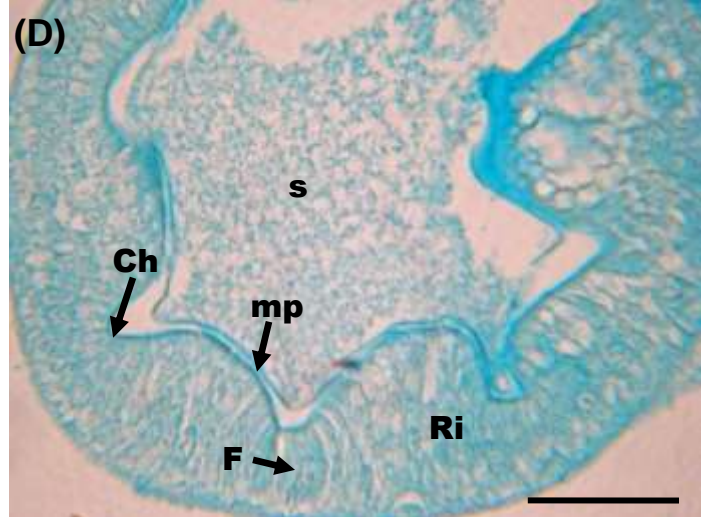
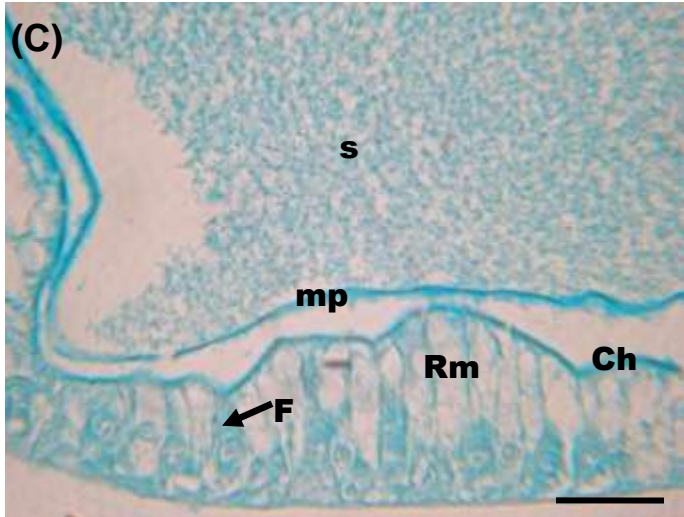
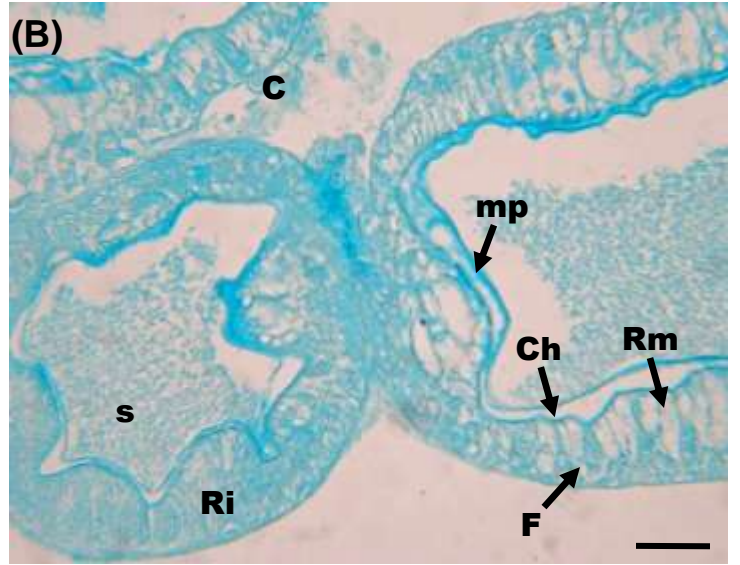
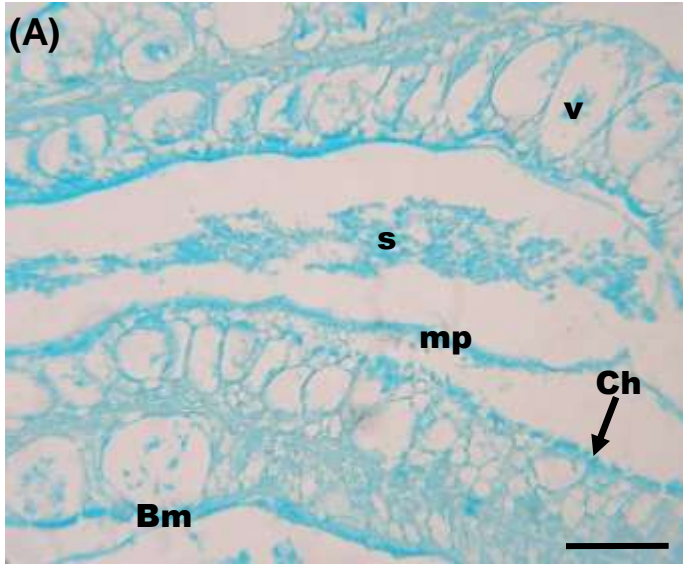
**Figura 30. Hepatopáncreas de *C. angulatus* en diferentes condiciones de salinidad coloreados con la técnica de PAS. (A)-(C): 35 ‰ de salinidad. Nótese la abundancia de glucógeno en el citoplasma de las células R y en las vacuolas (v) de las células B. (D)-(E): 10 ‰ de salinidad. Se observa una disminución en las reservas de glucógeno.**

Bm: célula B madura; C: conectivo; Ch: chapa estriada; F: célula F; h: hemocitos; L: corte longitudinal; lb: lámina basal; mp: membrana peritrófica; Ri: célula R inmadura; Rm: célula R madura; s: secreción; T: corte transversal. Escala: (A), (D): 120  $\mu\text{m}$ ; (B), (C), (E): 30  $\mu\text{m}$ .



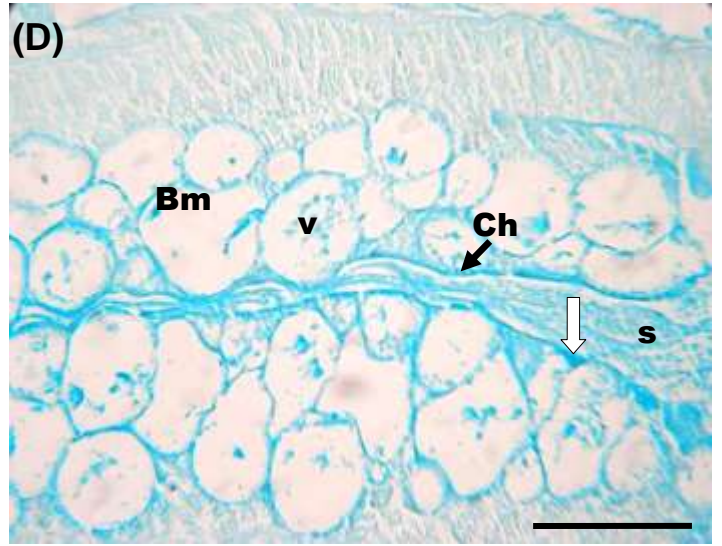
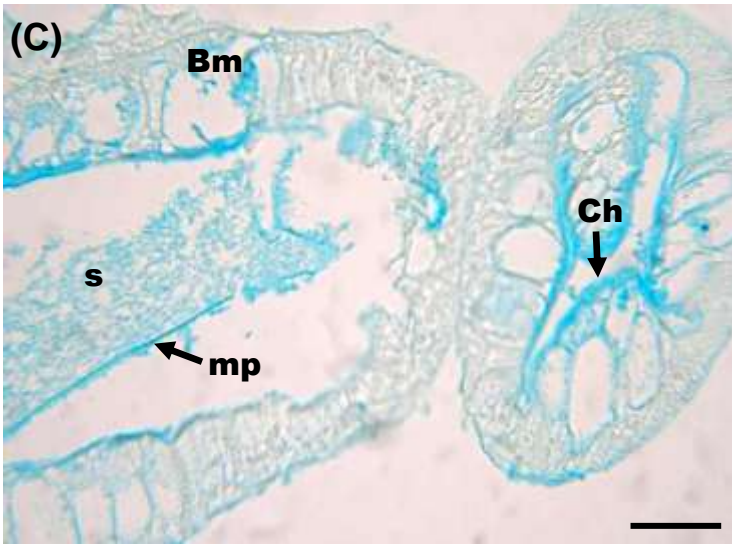
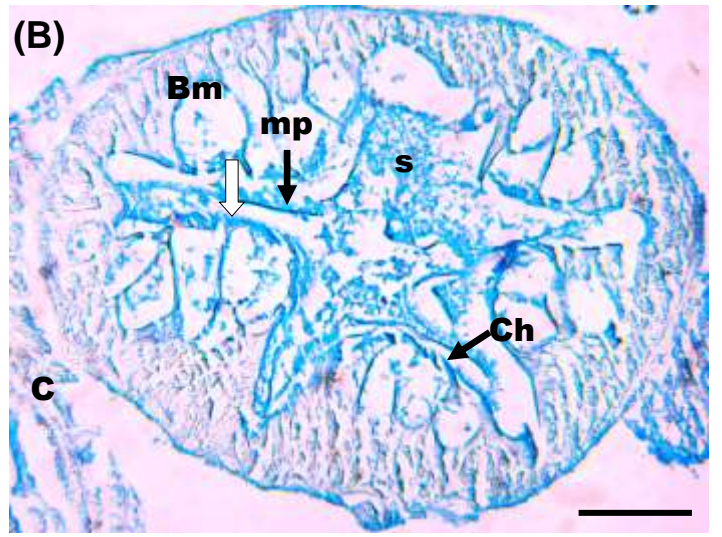
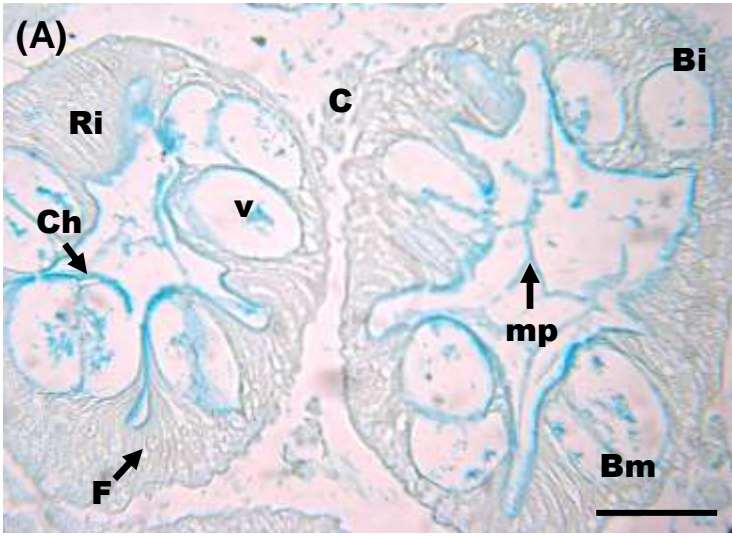
**Figura 31. Hepatopáncreas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad, coloreados con la técnica de AA a pH 2,8. (A)-(D):** nótese la tinción positiva de todas las estructuras del túbulo hepatopancreático, excepto las vacuolas de las células R maduras (Rm). La membrana peritrófica (mp), chapa estriada (Ch) y el contenido de las vacuolas (v) de las células B exhiben una tinción más fuerte que el resto de los componentes hepatopancreáticos.

Bm: célula B madura; C: conectivo; F: célula F; Ri: célula R inmadura; s: secreción. Escala: **(A)**: 60  $\mu\text{m}$ ; **(B)-(D)**: 30  $\mu\text{m}$ .



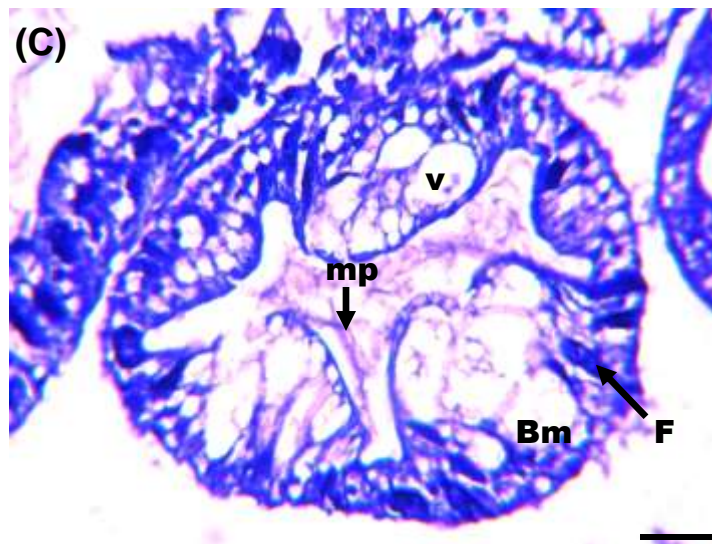
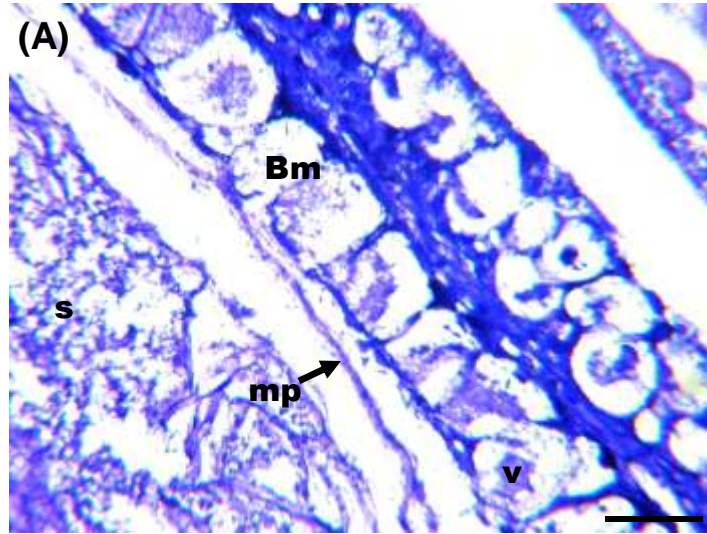
**Figura 32. Hepatopáncreas de *C. angulatus* en diferentes condiciones de salinidad coloreados con la técnica de AA a pH 1 (A, B) y 0,5 (C, D). (A) y (C): 35 ‰ de salinidad. El contenido de las vacuolas (v) de las células B, la membrana peritrófica (mp), la chapa estriada (Ch) y la secreción (s) en la luz tubular dan reacción positiva. (B) y (D): 10 ‰ de salinidad. Se observa una mayor tinción en la zona apical de las células B (flecha blanca).**

Bi: célula B inmadura; Bm: célula B madura; C: conectivo; F: célula F; Ri: célula R inmadura. Escala: (A)-(D): 60  $\mu\text{m}$ .



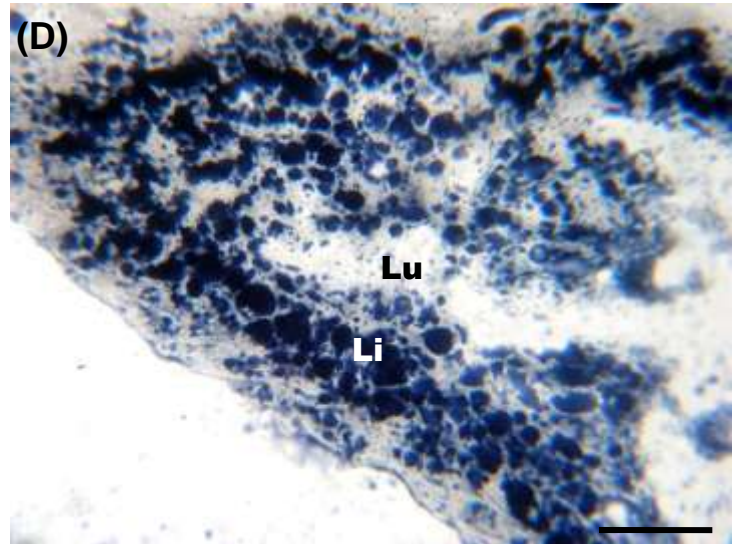
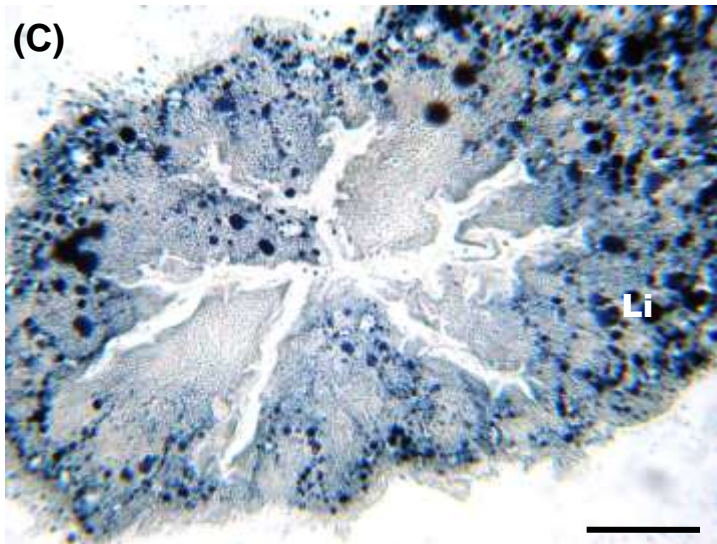
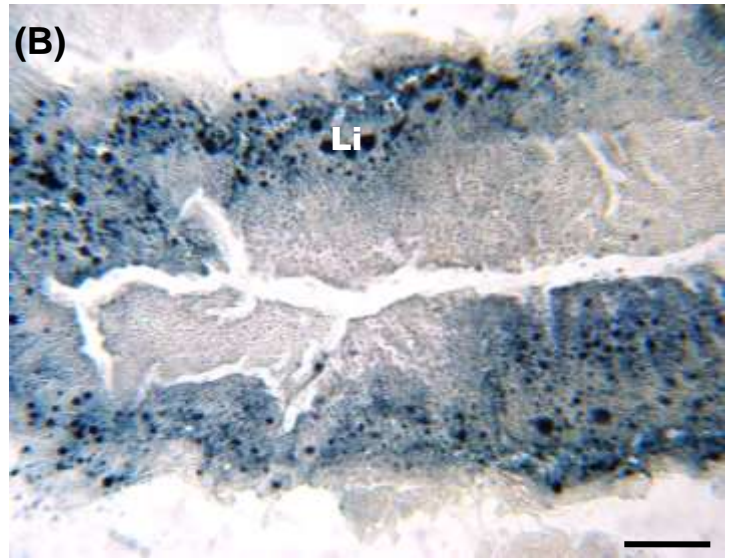
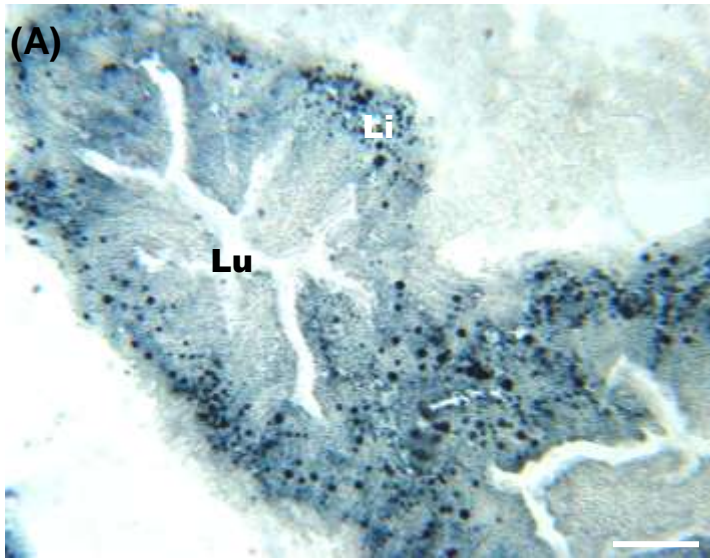
**Figura 33. Hepatopáncreas de *C. angulatus* en diferentes condiciones de salinidad coloreados con la técnica de AT a pH 5,6. (A)-(B): 10 ‰ de salinidad; (C): 35 ‰ de salinidad. (A)-(C): en ambas salinidades se observa metacromasia en las vacuolas (v) de las células B maduras (Bm) y en la membrana peritrófica (mp).**

F: célula F; s: secreción. Escala: (A), (B): 60  $\mu\text{m}$ ; (C): 30  $\mu\text{m}$ .



**Figura 34. Hepatopáncreas de *C. angulatus* aclimatados a 35 ‰ de salinidad coloreado con la técnica Negro Sudán. (A)-(D):** Nótese el contenido moderado-elevado de gotas lipídicas (Li) en el epitelio hepatopancreático, evidenciadas como un puntillado negro en el citoplasma de los diversos tipos celulares.

Lu: lumen tubular. Escala: (A)-(D): 60  $\mu\text{m}$ .



**Tabla 4.** Distribución histoquímica de GPs en el hepatopáncreas de *C. angulatus*.

Tinción	Chapa Estriada	Célula E	Célula F	Célula B						Célula R						Membrana Peritrófica	Lámina Basal
				Inmaduras			Maduras			Inmaduras			Maduras				
				ZA	C	V	ZA	C	V	ZA	C	V	ZA	C	V		
PAS	2/3	2	2	2	2	4 2/3	2	2	4 2/3	3	4 3	0	2	3/4 2	0	3	3
α-amilasa PAS	2/3	2	2	1	1	0/1	1	1	1/2	1	1	0	1	1/2	0	2	3
AA 2,8	3	2	2	2 1	1	2/3	2 1	1	3	2	2	0	2	1 2	0	3	2
AA 1	2	0 1	0 1	0 1	1	2	1	0/1	2	0 1	0 1	0	1	0 1	0	2	2
AA 0,5	1/2	0	0	0	0	1/2	0 1	0	1/2	0	0	0	0	0	0	1/2	0
AT 5,6	3 m/or	3 or	4 or	2 or	2 or	1/2 or	2 or	2 or	2 m	2 or	2 or	0	2 or	2 or	0	2 m	3 or
AT 4,2	2 or	2 or	3/4 or	2 or	1/2 or	1 or	1 or	1 or	1 or	2 or	1/2 or	0	1 or	1 or	0	1 or	2 or

Reactividad: (0), negativa; (1), positiva débil; (2), positiva moderada; (3), positiva fuerte; (4), positiva muy fuerte. C: citoplasma; m: metacromasia; or: ortocromasia; V: vacuolas; ZA: zona apical. Los valores en negro corresponden a ambas salinidades; los valores en rojo a la salinidad de 35 ‰; los valores en verde a la salinidad de 10 ‰.

### *N. granulata*

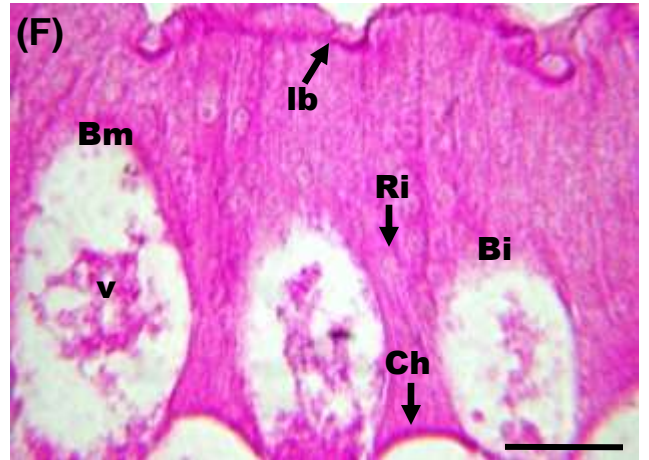
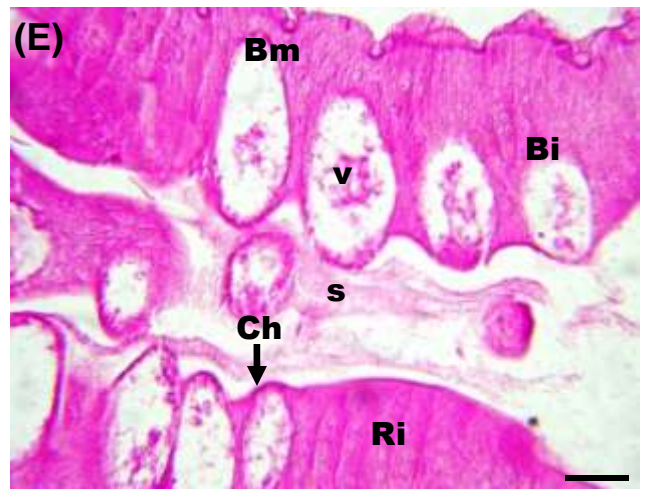
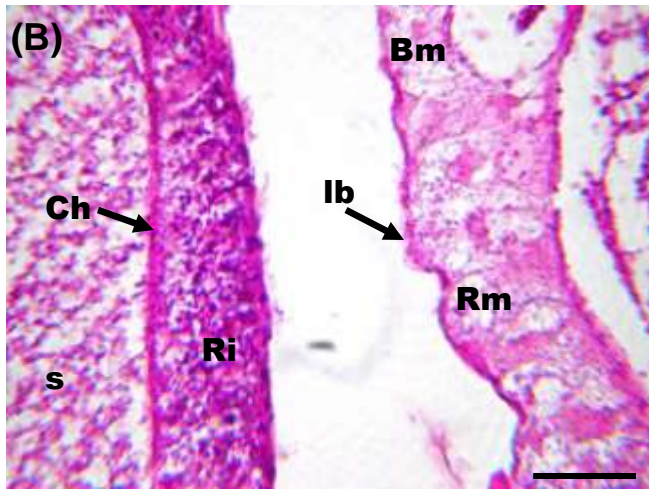
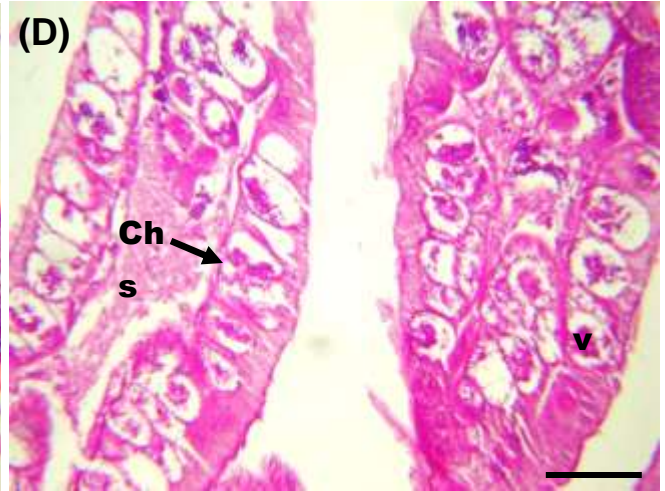
En ambas salinidades las células E, F, chapa estriada y lámina basal presentaron escaso o nulo contenido de glucógeno. Las células E exhibieron escaso-moderado contenido de GPs carboxiladas y, al igual que las células F, moderadas GPs con dioles vecinos oxidables. En la chapa estriada se evidenció un contenido moderado-elevado de GPs con dioles vecinos oxidables (Fig. 35), GPs sulfatadas (Fig. 37) y muy sulfatadas. Esta estructura reaccionó metacromáticamente en algunas zonas con la técnica de AT a pH 5,6 (Fig. 38B). La lámina basal presentó GPs con dioles vecinos oxidables, GPs carboxiladas, sulfatadas y muy sulfatadas (Figs. 35B, F; 36A, B; 37B). En la membrana peritrófica se observaron GPs sulfatadas (Fig. 37) y muy sulfatadas, y una reacción metacromática en algunas zonas con AT a ambos pHs (Fig. 38D). Las células Bi mostraron contenidos escasos-moderados de glucógeno y GPs con dioles vecinos oxidables (Figs. 35E, F). Las vacuolas de este tipo celular presentaron moderadas GPs sulfatadas, mientras que en el citoplasma y zona apical la concentración de dichas GPs fue menor. Las células Bm evidenciaron escasas GPs sulfatadas en el citoplasma (Fig. 37) y elevado contenido de GPs muy sulfatadas en sus vacuolas. Tanto las vacuolas de las células Bi como de los estadios maduros reaccionaron metacromáticamente con la técnica de AT a pH 5,6 y 4,2 (Fig. 38). Las células Ri exhibieron moderadas cantidades de GPs carboxiladas y algunas GPs sulfatadas, mientras que los estadios maduros mostraron pocas GPs carboxiladas y sulfatadas (Figs. 36A, B; 37A), y en su zona apical evidenciaron escasos glucógeno y GPs con dioles vecinos oxidables (Figs. 35B, C). Las vacuolas de las células R no exhibieron contenido glicoproteico, sin embargo, presentaron gotas lipídicas en cantidad elevada. Los lípidos también fueron abundantes en el citoplasma de los diferentes tipos celulares, excepto las células E (Fig. 39).

A 35 ‰ de salinidad, el citoplasma y zona apical de células Ri y las vacuolas de las células Bm mostraron un contenido de glucógeno mayor que a 10 ‰ (Figs. 35B, C, E, F). El mismo patrón fue observado para las GPs con dioles vecinos oxidables de la membrana peritrófica. El citoplasma de las células F y Rm, y la zona apical de las células Bm y Ri presentaron un contenido débilmente mayor de GPs carboxiladas a 10 ‰ de salinidad (Fig. 36).

En la tabla 5 se muestra un resumen del perfil histoquímico de las GPs del epitelio hepatopancreático de *N. granulata* aclimatados a 35 y 10 ‰ de salinidad.

**Figura 35. Hepatopáncreas de *N. granulata* en diferentes condiciones de salinidad coloreados con la técnica de PAS. (A)-(C): 35 ‰ de salinidad. Nótese la abundancia de glucógeno en el citoplasma de las células R y en las vacuolas (v) de las células B; (D)-(F): 10 ‰ de salinidad. Se observa una disminución en las reservas de glucógeno.**

Bi: célula B inmadura; Bm: célula B madura; C: conectivo; Ch: chapa estriada; lb: lámina basal; mp: membrana peritrófica; Ri: célula R inmadura; Rm: célula R madura; s: secreción. Escala: **(A):** 60  $\mu\text{m}$ ; **(B):** 20  $\mu\text{m}$ ; **(D):** 100  $\mu\text{m}$ ; **(C), (E), (F):** 30  $\mu\text{m}$ .

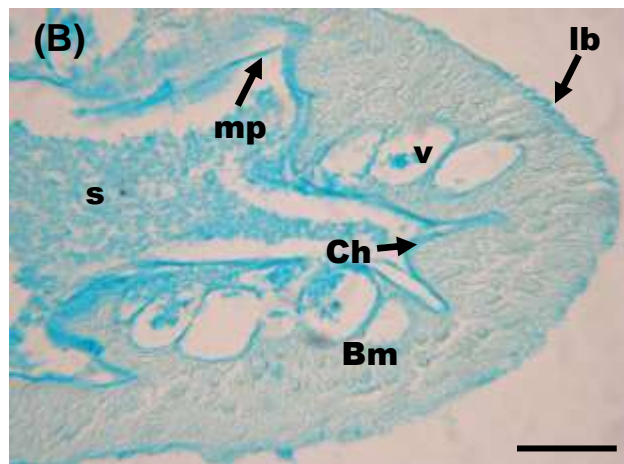
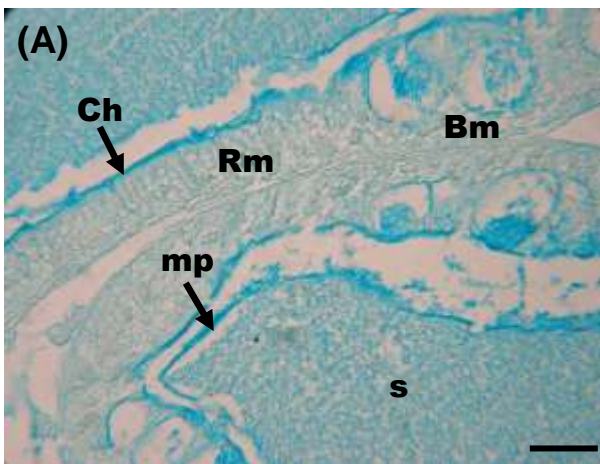
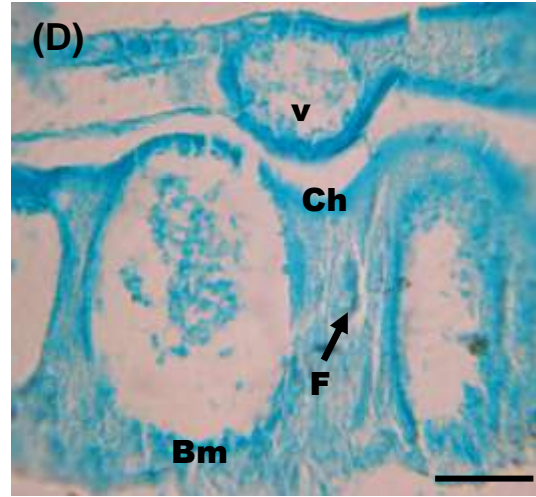
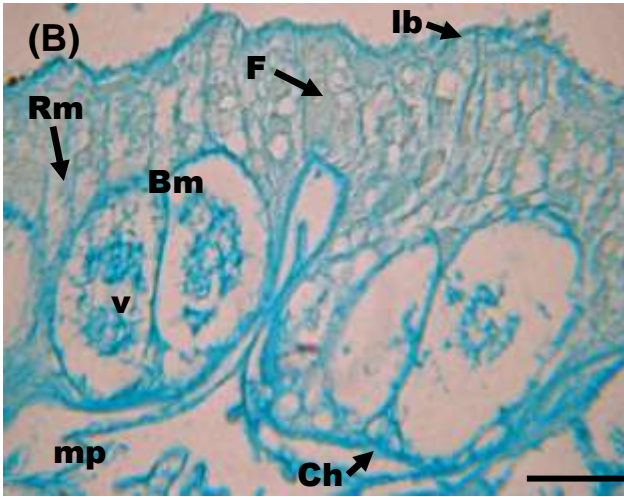
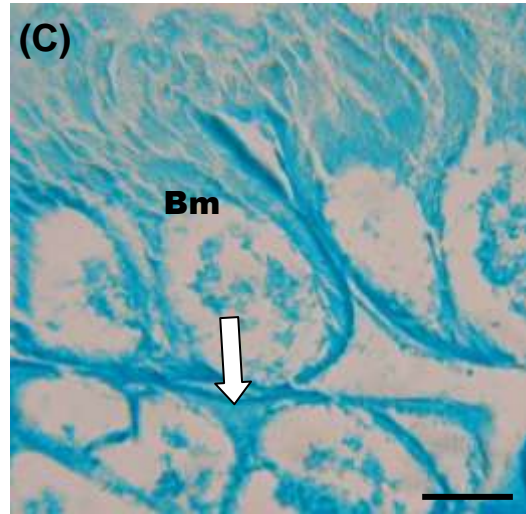
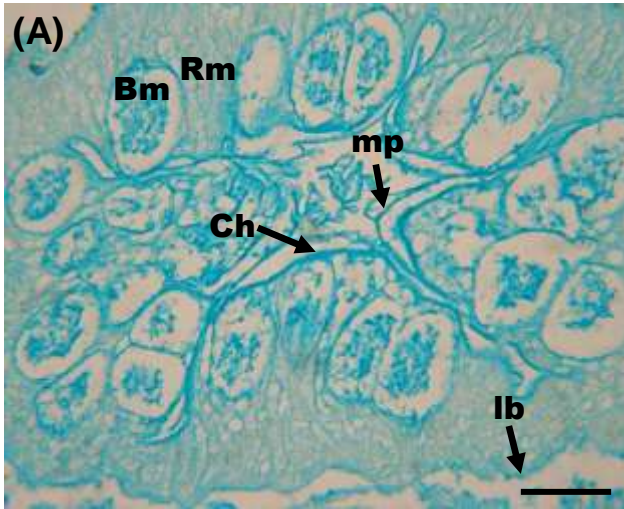


**Figura 36. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados en diferentes condiciones de salinidad, coloreados con la técnica de AA a pH 2,8. (A)-(B): 35 ‰ de salinidad. La membrana peritrófica (mp), chapa estriada (Ch) y el contenido de las vacuolas (v) de las células B maduras (Bm) exhiben una tinción más fuerte que el resto de los componentes hepatopancreáticos. (C)-(D): 10 ‰ de salinidad. Nótese el contenido débilmente mayor, con respecto a la salinidad de 35 ‰, de GPs carboxiladas en el citoplasma de las células F (F) y en la zona apical de las células Bm (flecha blanca).**

lb: lámina basal; Rm: célula R madura. Escala: (A): 60 µm; (B)-(D): 30 µm.

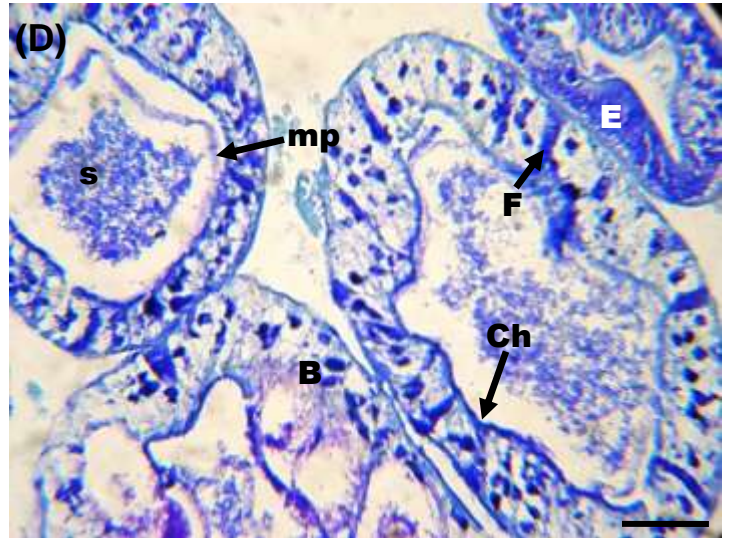
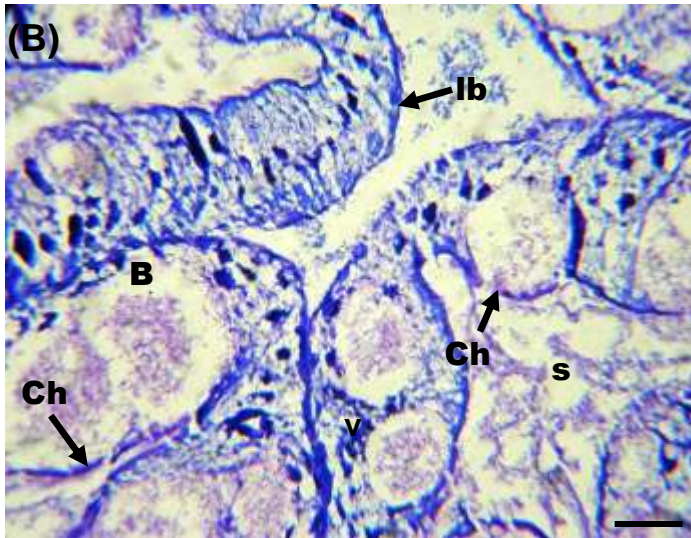
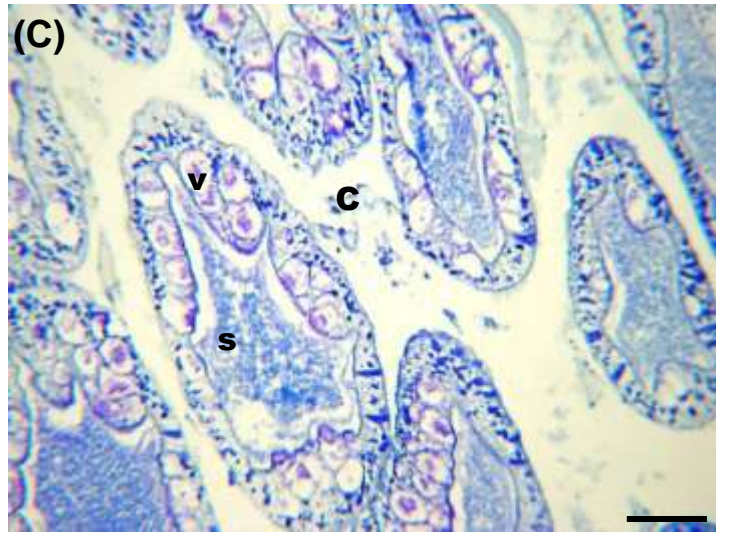
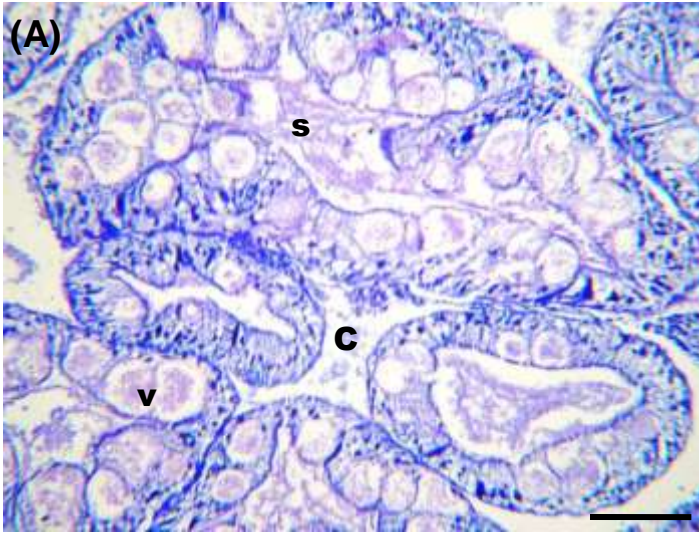
**Figura 37. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados en diferentes condiciones de salinidad, coloreados con la técnica de AA a pH 1. (A): 35 ‰ de salinidad. (B): 10 ‰ de salinidad. (A)-(B): en ambas salinidades, la intensidad de tinción de los distintos componentes del epitelio hepatopancreático es similar.**

Bm: célula B madura; Ch: chapa estriada; lb: lámina basal; mp: membrana peritrófica; Rm: célula R madura; s: secreción; v: vacuola. Escala: 60 µm.



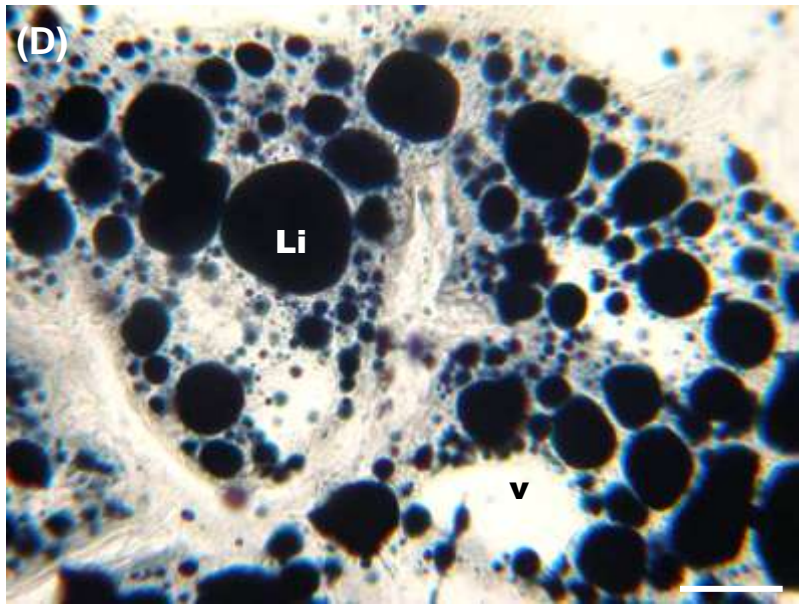
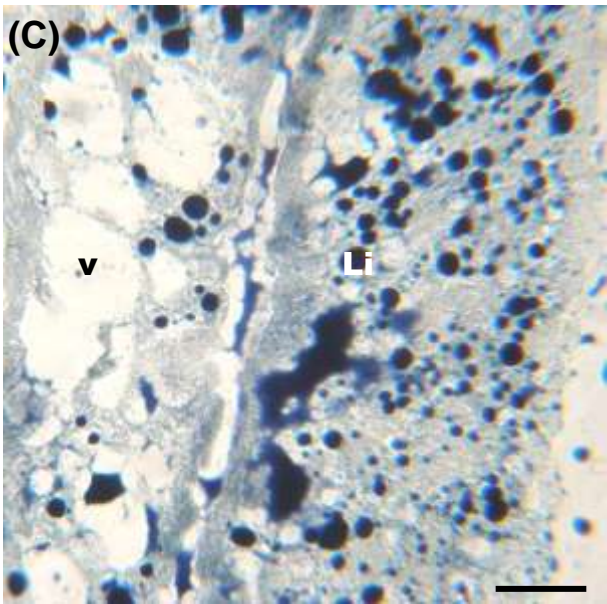
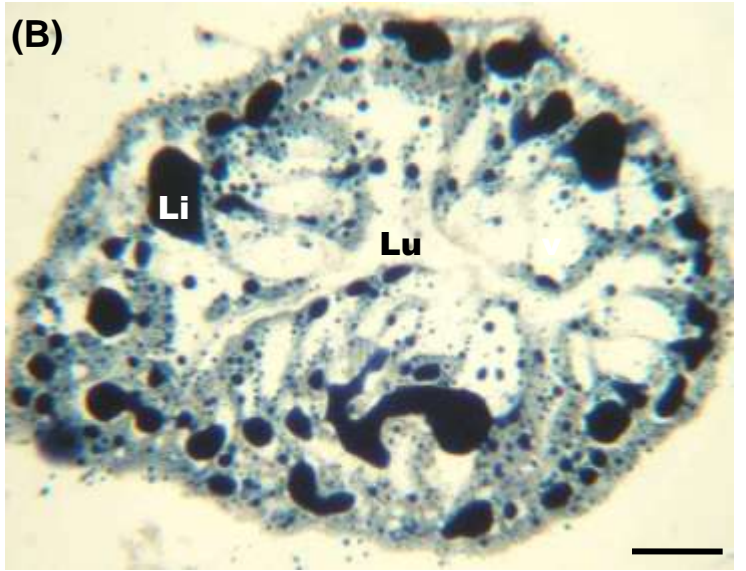
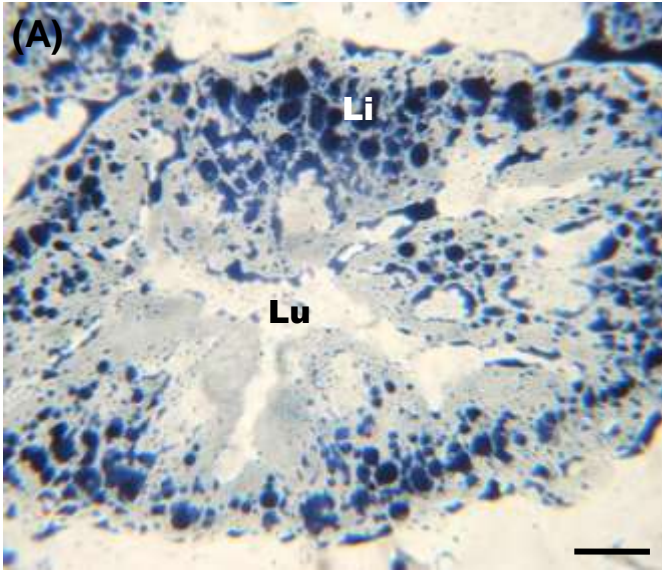
**Figura 38. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados a 35 ‰ de salinidad, coloreados con la técnica de AT. (A)-(B): pH 5,6. Nótese la metacromasia (color púrpura) de las vacuolas (v) de las células B (B), de algunas zonas de la chapa estriada (Ch) y de la secreción (s) en la luz tubular. (C)-(D): pH 4,2. Se observa metacromasia en las vacuolas de las células B.**

C: conectivo; E: célula E; F: célula F; lb: lámina basal; mp: membrana peritrófica. Escala: (A), (C): 120  $\mu\text{m}$ ; (B), (D): 60  $\mu\text{m}$ .



**Figura 39. Hepatopáncreas de *N. granulata* aclimatados a 10 ‰ de salinidad coloreado con la técnica Negro Sudan. (A)-(D):** Nótese el contenido elevado de gotas lipídicas (Li) en el epitelio hepatopancreático, evidenciadas como un puntillado negro en el citoplasma de los diversos tipos celulares.

Lu: lumen tubular; v: vacuolas de las células B. Escala: (A)-(C): 60  $\mu\text{m}$ ; (D): 30  $\mu\text{m}$ .



**Tabla 5.** Distribución histoquímica de GPs en el hepatopáncreas de *N. granulata*.

Tinción	Chapa Estriada	Célula E	Célula F	Célula B						Célula R						Membrana Peritrófica	Lámina Basal
				Inmaduras			Maduras			Inmaduras			Maduras				
				ZA	C	V	ZA	C	V	ZA	C	V	ZA	C	V		
PAS	3	2/3	2/3	2	2	4	2	2	4	4	4	0	2	3	0	4	3
$\alpha$ -amilasa PAS	2/3	2	2	1	1	2	1	1	2	0/1	0/1	0	1	0/1	0	3	3
AA 2,8	3	1/2	1/2 2	2	1	2	1/2 2	1	2/3	2 2/3	1/2	0	1/2	1 1/2	0	3	2/3
AA 1	3	0/1	0/1	0/1	0/1	2	0/1	0/1	3	0/1	0/1	0	0/1	0/1	0	3	2
AA 0,5	2/3	0	0	0	0	0/1	0	0	2/3	0	0	0	0	0	0	2/3	0/1
AT 5,6	2/3 m/or	3 or	4 or	2 or	2 or	2 m	2 or	2 or	2 m	2 or	2 or	0	2 or	2or	0	2 m/or	2/3or
AT 4,2	2/3 or	3 or	4 or	2 or	2 or	2 m	2 or	2 or	2 m	2 or	2 or	0	2or	2or	0	2 m/or	2/3or

Reactividad: (0), negativa; (1), positiva débil; (2), positiva moderada; (3), positiva fuerte; (4), positiva muy fuerte. C: citoplasma; m: metacromasia; or: ortocromasia; V: vacuolas; ZA: zona apical. Los valores en negro corresponden a ambas salinidades; los valores en rojo a la salinidad de 35 ‰; los valores en verde a la salinidad de 10 ‰.

#### 4.4. Discusión

Las modificaciones histológicas observadas en el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* frente a condiciones de baja salinidad concuerdan con las reportadas en *A. longinaris*, *P. muelleri* y *P. argentinus* expuestos a diferentes tipos de estrés salino (Cuartas y col., 2003; Masson, 2003; Díaz y col., 2010 a). Sin embargo, dichas modificaciones no son tan severas, observándose sólo en algunas zonas del hepatopáncreas, mientras que en otras, las características histológicas del órgano son normales. Esto podría deberse a que *C. angulatus* y *N. granulata* son cangrejos eurihalinos, capaces de tolerar cambios abruptos y frecuentes en la salinidad ambiental, mientras que *A. longinaris* y *P. muelleri* son marinos, y *P. argentinus* es de hábitos dulceacuícolas. Por otro lado, el hepatopáncreas del camarón eurihalino *L. vannamei* no exhibió alteraciones histológicas en diferentes condiciones de salinidad, mientras que el número de células B y R fue variable entre tratamientos (Li y col., 2008).

En el hepatopáncreas de *P. kerathurus*, el citoplasma de las células E, F y vacuoladas presentó GPs carboxiladas, mientras que la chapa estriada, la zona apical de las células, las vacuolas y el lumen tubular exhibieron GPs sulfatadas (Sarasquete y col., 1985). Estos resultados concuerdan con lo analizado en el presente estudio, donde se hallaron GPs ácidas en la chapa estriada, membrana peritrófica, lámina basal, zona apical de células B y R, y vacuolas de células B. Asimismo, el hepatopáncreas de ejemplares en intermuda del camarón *P. argentinus* exhibe GPs ácidas en la chapa estriada y en el citoplasma apical de las células R y B (Sousa, 2003). La presencia en la chapa estriada y zona apical del epitelio hepatopancreático de GPs ácidas que reaccionan metacromáticamente ha sido demostrada en el isópodo *Armadillidium vulgare* (Steeves, 1965) y en el langostino *P. kerathurus* (Sarasquete y col., 1985). Por otro lado, en el hepatopáncreas de los

cangrejos *O. platytarsis* y *Emerita asiática* no se detectaron GPs ácidas (Ramadevi y col., 1990; Kameswaramma y col., 1990).

Estudios más actuales analizan las características histoquímicas del epitelio del sistema digestivo de moluscos. Rodríguez de la Rúa y col. (2002) describieron la histología e histoquímica del aparato digestivo del ostión *Crassostrea angulata*. Los resultados demostraron la existencia de secreciones hepatopancreáticas compuestas por GPs neutras y muy sulfatadas. Por su parte, el análisis ultraestructural e histoquímico de distintas regiones del sistema digestivo del opistobranquio *Aplysia depilans* reveló la presencia de reservas de lípidos y glucógeno en células digestivas del hepatopáncreas y en células columnares del intestino (Lobo da Cunha, 2000; Lobo da Cunha y Batista Pinto, 2007). En el epitelio intestinal de *A. depilans* se evidenciaron GPs neutras y ácidas en células mucosas, y GPs neutras en células granulares (Lobo da Cunha y Batista Pinto, 2007). Estos resultados concuerdan con lo observado en *N. granulata* y *C. angulatus*.

La localización del glucógeno y los lípidos en el epitelio hepatopancreático de las especies analizadas en la presente tesis, coincide con lo descrito con respecto al hepatopáncreas de otros crustáceos, tales como el camarón *M. monoceros* (Madhyastha y Rangneker, 1974), los cangrejos *E. asiática* y *C. sapidus* (Kameswaramma y col., 1990; Johnston y col., 1998), y el camarón *P. argentinus* (Sousa, 2003). Durante su diferenciación, las células R almacenan tempranamente glucógeno en su citoplasma, y en estadios más avanzados comienzan la actividad lipogénica (Verri y col, 2001). Esto fue corroborado en el hepatopáncreas de *N. granulata* y *C. angulatus*, donde las células R inmaduras exhibieron un elevado contenido de glucógeno en su citoplasma, mientras que las vacuolas de las células R maduras no evidenciaron ningún tipo de GPs y mostraron un elevado contenido de gotas lipídicas. La existencia de reservas de lípidos en el citoplasma de otros tipos

celulares (excepto las células E) ha sido previamente demostrada en el hepatopáncreas del camarón *M. monoceros* (Madhyastha y Rangneker, 1974).

En crustáceos, el hepatopáncreas es un órgano clave en la movilización de reservas en situaciones de alta demanda energética, tales como la muda y reproducción (Marcolin y col, 2008). Sin embargo, el almacenamiento y/o utilización de las diferentes sustancias de reserva parece depender de la especie y del estado fisiológico de los individuos. Más aún, la secuencia de los tipos de sustratos utilizados como fuente energética durante el ayuno es muy variable (Sánchez Paz y col., 2006). La hiperregulación es un proceso fisiológico con alto costo energético. Requiere de una reorganización metabólica tal que permita afrontar las demandas de energía asociadas con la activación de la maquinaria osmoionorregulatoria (Freire y col., 2008).

La disminución de la concentración de glucógeno en condiciones de hiperregulación (salinidad de 10 ‰) en el hepatopáncreas de las especies estudiadas en la presente Tesis, concuerda con lo reportado por Asaro y col. (2011) en *N. granulata*, donde la actividad de amilasa hepatopancreática de cangrejos aclimatados a baja salinidad fue mayor. Asimismo, variaciones en la actividad de AP hepatopancreática de *C. angulatus* y de *N. granulata* en condiciones de baja salinidad, con respecto a 35 ‰ de salinidad, sugeriría el rol de esta enzima en mecanismos de ajuste secundarios a la hiperregulación tales como la utilización de reservas (Pinoni, 2009). De este modo, la movilización de glucógeno en el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* supliría el costo energético necesario durante la osmorregulación. Por otro lado, Nery y Santos (1993) utilizando métodos bioquímicos observaron un incremento en el contenido de glucógeno con el estrés hipo e hiperosmótico en el hepatopáncreas de *N. granulata* durante el verano, lo cual concuerda con el aumento de la actividad gluconeogénica observado en esta especie en condiciones hiposmóticas (Martins y col., 2011).

En el hepatopáncreas de los ejemplares de *C. angulatus* y *N. granulata* estudiados en el presente trabajo no hubo movilización de los lípidos durante la hiperregulación. Lo mismo fue reportado por Luvizotto-Santos y col. (2003) analizando bioquímicamente la concentración de lípidos en el hepatopáncreas de *N. granulata* en condiciones de salinidad reducida, y por Pinoni y López Mañanes (2011) estudiando el contenido de triacilglicéridos hepatopancreáticos en individuos de esta especie aclimatados a diferentes salinidades (6, 10, 35, 45 y 60 ‰). Asimismo, Martins y col. (2011) demostraron en *N. granulata* que la actividad lipogénica del hepatopáncreas no se modifica durante el estrés hiposmótico.

A partir del estudio de las variaciones estacionales en el metabolismo energético del cangrejo *O. quadrata* de la playa Siriú de Brasil, Vinagre y col. (2007) sugieren que los lípidos serían una fuente importante de energía durante la reproducción, mientras que el glucógeno sería utilizado en períodos de alta actividad o ayuno. En el hepatopáncreas de especímenes del camarón blanco *L. vannamei* privados de alimento durante un periodo máximo de cinco días se observó una rápida disminución de la glucosa y del glucógeno, mientras que el contenido de lípidos disminuyó significativamente al final del período de ayuno (Sánchez Paz y col., 2007). Estos resultados sustentan lo demostrado en el presente estudio, donde cangrejos sometidos a un ayuno de 24-48 hs experimentaron una disminución en la concentración hepatopancreática de glucógeno frente al estrés hiposmótico, mientras que el contenido lipídico no fue afectado.

Existe una diversidad de estudios que analizan el rol de las GPs en vertebrados (Çinar y Şenol, 2006; de Brito Gitirana y col., 2007; Easy y Ross, 2010; Pelli y col., 2010). Las GPs de alto peso molecular que forman geles altamente glicosilados se denominan mucinas, y junto con el agua, son componentes del mucus (Schumacher y col., 2004). Las mucinas del tracto digestivo tienen diferentes funciones, tales como la protección del epitelio subyacente frente a la degradación

proteolítica, al daño mecánico y a los microorganismos patógenos, así como también la lubricación y el incremento en la eficiencia digestiva (Domeneghini y col., 2005). Las GPs neutras actúan protegiendo y lubricando el epitelio contra el daño físico. Las GPs ácidas proveen alta viscosidad al mucus, favoreciendo la adhesión de partículas en suspensión y evitando la proliferación de microorganismos patógenos en la superficie epitelial. Dentro de las GPs ácidas, las sulfatadas son más resistentes a la degradación por enzimas bacterianas y por las proteasas digestivas propias del organismo (Deplancke y Gaskins, 2001). En los peces, las GPs del mucus branquial están involucradas, además, en la regulación iónica (Díaz y col., 2001; 2010 b). Se ha demostrado que la naturaleza polianiónica del mucus ayuda a capturar los cationes cercanos a la superficie branquial, generando un gradiente iónico desde la mucosa hacia el agua circulante, evitando la pérdida de sales en un ambiente hiposmótico (Shephard, 1989).

En invertebrados hay escasez de estudios sobre la función de las GPs. En el bivalvo *Mytella falcata* el mucus de las branquias participaría en la eliminación de partículas contaminantes (David y Fontanetti, 2009). La función de GPs ácidas podría asociarse con las propiedades digestivas de la secreción hepatopancreática, con el transporte activo a través de la membrana celular o con la capacidad de unión al calcio de las células B y R (Steeves, 1965). La existencia de GPs ácidas en la chapa estriada de las células R estaría relacionada con procesos de endocitosis (Momin y Rangneker, 1974). En la membrana peritrófica, las GPs ácidas estarían involucradas en la protección del epitelio frente a los patógenos, en la digestión por contacto y en el transporte de nutrientes digeridos hacia las células y de sustancias particuladas no digeridas hacia el intestino medio, y luego el posterior (Hopkin y Nott, 1980; Verri y col, 2001; Wilde y col., 2004).

En los vertebrados en general, la densidad de células secretoras de mucus y/o la naturaleza de su secreción, difieren entre especies y, en los peces en particular, estarían relacionadas con la

adaptación a diferentes condiciones del medio acuático. Por ejemplo, en dos especies de peces eritrínidos, la exposición a un ambiente hiposmótico o hiperosmótico resultó en cambios en la composición química de las GPs del mucus branquial (Moron y col., 2009).

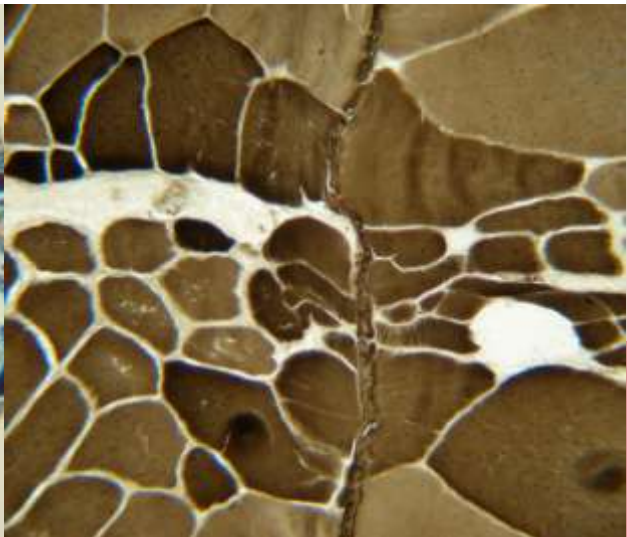
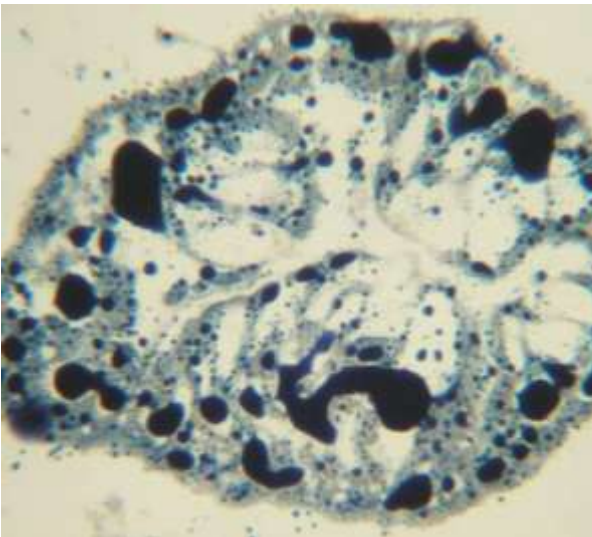
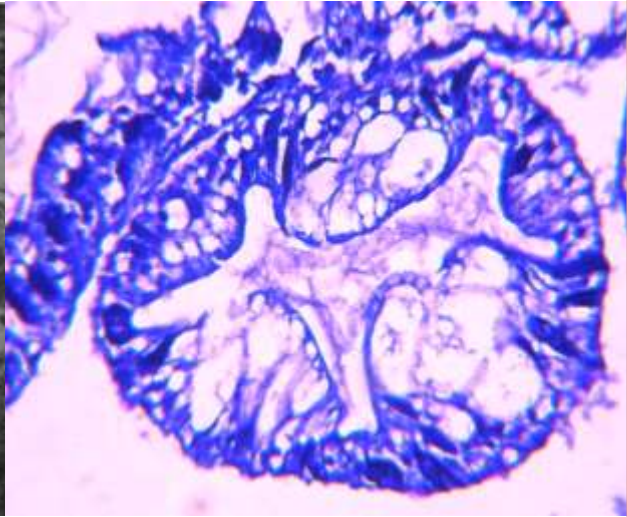
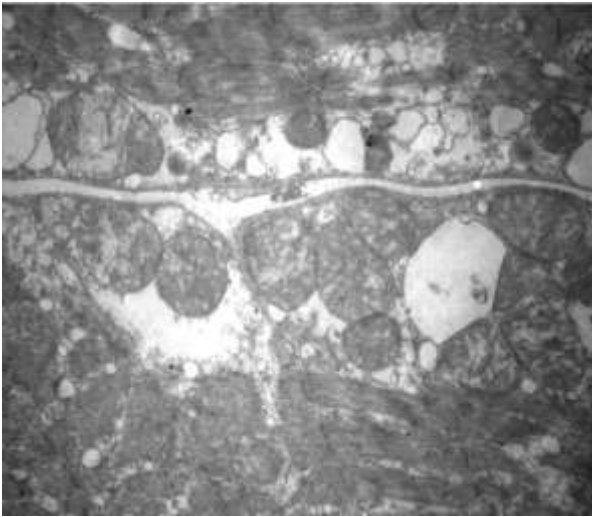
En el presente estudio se observó en ambas especies de cangrejos un leve aumento en la concentración de GPs ácidas del hepatopáncreas a 10 ‰ de salinidad. Como ya se mencionó, en condiciones de hiperregulación los cangrejos experimentarían un aumento en la actividad de proteasas, y esto conllevaría a una mayor secreción de sustancias que brinden protección contra esas enzimas, como es el caso de las GPs ácidas. Además, como se demostró en peces, un aumento en el contenido de GPs ácidas, reduciría la pérdida de sales en el ambiente hiposmótico.

#### 4.5. Conclusiones

- Se observaron modificaciones histológicas en el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* frente a condiciones de baja salinidad.
- Dichas modificaciones se manifestaron sólo en algunas zonas del hepatopáncreas, mientras que en otras, las características histológicas del órgano fueron normales. Esto podría deberse a que *C. angulatus* y *N. granulata* son cangrejos eurihalinos, capaces de tolerar cambios abruptos y frecuentes en la salinidad ambiental.
- Al igual que en otros crustáceos, en ambas especies de cangrejos las células R inmaduras almacenan principalmente glucógeno, mientras que en los estadios maduros predominan las reservas lipídicas.
- A menor salinidad disminuyó el contenido de glucógeno en el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata*, lo cual indicaría su utilización como fuente de energía durante la hiperregulación.
- En ambas especies el metabolismo de lípidos de reserva hepatopancreáticos no estaría involucrado en el ajuste energético frente a condiciones de salinidad reducida.
- En el hepatopáncreas de *C. angulatus* y *N. granulata* se evidenciaron GPs ácidas en la membrana peritrófica, chapa estriada, zona apical del epitelio hepatopancreático y vacuolas de células B. La función de las GPs ácidas podría asociarse con las propiedades digestivas de la secreción hepatopancreática, con el transporte activo a través de la membrana celular o con la capacidad de unión al calcio de las células B y R.

- En la membrana peritrófica, las GPs ácidas estarían involucradas en la protección del epitelio frente a los patógenos, en la digestión por contacto y en el transporte de nutrientes digeridos hacia las células y de sustancias particuladas no digeridas hacia el intestino medio, y luego el posterior.
- El leve aumento de la concentración de las GPs ácidas en *C. angulatus* y *N. granulata* aclimatados a 10‰ de salinidad indicaría una mayor protección del epitelio hepatopancreático frente al aumento de las proteasas y reduciría la pérdida de sales en el ambiente hiposmótico.

# CONCLUSIONES GENERALES



- El músculo de cierre de las quelas exhibe características ultraestructurales e histoquímicas similares en *C. angulatus* y *N. granulata*. En un sentido amplio, es un músculo de contracción moderada. La variación de la proporción de tipos de fibras del músculo de cierre de las quelas entre especies se relacionaría con hábitats y modos alimenticios diferentes.
  
- La distribución histoquímica de GPs y lípidos en el epitelio hepatopancreático es similar en ambas especies de cangrejos y se corresponde con la función que cumple cada tipo celular en el proceso digestivo.
  
- Los resultados de la presente Tesis muestran que *N. granulata* y *C. angulatus* exhiben respuestas diferenciales a nivel histoquímico en el músculo de cierre de las quelas frente a distintas condiciones de salinidad ambiental. Por otro lado, se observa un efecto de la salinidad de aclimatación sobre los caracteres histológicos e histoquímicos del hepatopáncreas, similar en ambas especies de cangrejos. Esto sugiere la existencia de diferentes mecanismos de ajuste en músculo y hepatopáncreas en relación al estado osmoionorregulatorio de ambas especies de cangrejos eurihalinos.
  
- Se debe enfatizar que existe un escaso conocimiento de la histología e histoquímica de los crustáceos decápodos en general, y de los cangrejos eurihalinos que habitan la laguna costera Mar Chiquita en particular. Los resultados de la presente Tesis aportan datos significativos sobre los caracteres histofisiológicos en crustáceos decápodos de

interés regional, favoreciendo la comprensión de los complejos mecanismos de ajuste frente al estrés salino en ambas especies de cangrejos eurihalinos, en particular.

# BIBLIOGRAFÍA



- Alberti, J.; Escapa, M.; Iribarne, O.; Silliman, B.; Bertness, M. 2008. Crab herbivory regulates plant facilitative and competitive processes in Argentinean marshes. *Ecology*, 89(1): 155-64.
- Al-Mohanna, S. Y.; Nott, J. A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda) during the moult cycle. *Mar. Biol.*, 101: 535-544.
- Alnaqueeb, M. A.; Goldspink, G. 1986. Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. *J. Anat.*, 153: 31-45.
- Andrews, F. M.; Spurgeon, T. L. 1986. Histochemical staining characteristics of normal horse skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1843-1852.
- Anger, K.; Spivak, E.; Bas, C.; Ismael, D.; Luppi, T. 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapods crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. *Helgol. Meeresunters.*, 48: 445-466.
- Artillo, R.; Pinoni, S. A.; Asaro, A.; López Mañanes, A. A. 2008. Glycogen storage sites in *Chasmagnathus granulatus* upon hyperegulation: differential postingesta response. *Biocell*, 32: 85 (Abstract).
- Asaro, A.; del Valle, J. C.; López Mañanes, A. A. 2011. Amylase, maltase and sucrase activities in hepatopancreas of the euryhaline crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Brachyura: Varunidae): partial characterization and response to low environmental salinity. *Sci. Mar.*, 75(3): 517-524.
- Atwood, H. L. 1973. An attempt to account for the diversity of crustacean muscles. *Am. Zool.*, 13: 357-378.
- Beltrame, M. O.; De Marco, S. G.; Marcovecchio, J. E. 2008. Cadmium and zinc in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina): salinity effects on lethal toxicity in juveniles of the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus*. *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 55: 78-85.

- Bianchini, A.; Machado Lauer, M.; Nery, L.; Pinto Colares, E.; Monserrat, J. M.; dos Santos Filho, E. A. 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 151: 423-436.
- Biewener, A. A. 2003. *Animal locomotion*. Oxford University Press. 281 pp.
- Bolognesi, R.; Terra, W. R.; Ferreira, C. 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *J. Insect Physiol.*, 54: 1413-1422.
- Bond-Buckup, G.; Ferreira Fontoura, N.; Possa Marroni, N.; Kucharski, L. C. 1991. *O caranguejo. Manual para o ensino prático em zoologia*. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 70pp.
- Bortolus, A.; Iribarne, O. 1999. Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 178: 79-88.
- Bortolus, A. 2001. Marismas del Atlántico Sudoccidental. En: O. Iribarne (Ed.): *Reserva de Biosfera de Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas*. Editorial Martín. Mar del Plata. p: 83-88.
- Boschi, E. E. 1964. Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). *Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata*, 6: 1-99.
- Botto, F.; Iribarne, O. 2000. Contrasting effects of two burrowing crabs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 51: 141-151.
- Boyle, K. L.; Dillaman, R. M.; Kinsey, S. T. 2003. Mitochondrial distribution and glycogen dynamics suggest diffusion constraints in muscle fibers of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool. A*, 297: 1-16.

- Brunet, M.; Arnaus, J.; Mazza, J. 1994. Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacean. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 32: 335–367.
- Chayen, J.; Bitensky, L; Butcher, R. G. 1973. *Practical histochemistry*. London: John Wiley & Sons. 271 pp.
- Childress, Ch. C.; Sacktor, B.; Grossman, I. W.; Bueding, E. 1970. Isolation, ultrastructure, and biochemical characterization of glycogen in insect flight muscle. *J. Cell Biol.*, 45: 83-90.
- Çınar, K.; Şenol, N. 2006. Histological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *Anat. Histol. Embryol.*, 35: 147–151.
- Collins, P. 2010. Environmental stress upon hepatopancreatic cells of freshwater prawns (Decapoda: Caridea) from the floodplain of Paraná River. *Nat. Sci.*, 2(7): 748-759.
- Côrrea Jr., J. D.; Farina, M; Allodi, S. 2002. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. *Tissue Cell*, 34(5): 315–325.
- Cuartas, E. I.; Petriella, A. M. 2000. Cytoarchitecture of the hepatopancreas of three species of crab from Mar Chiquita lagoon, Argentina. In: E. Escobar Briones and F. Alvarez (Eds.): *Modern approaches to the study of crustacean*. Kluwer Academic Plenum Publishers. New York, USA. pp: 39-44.
- Cuartas, E. I.; Petriella, A. M. 2001. Histología del hepatopancreas de *Chasmagnathus granulata* (Decapoda: Brachyura). *Physis A*, 58: 1-6.
- Cuartas, E. I.; Díaz, A. C.; Petriella, A. M. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Rev. Invest. Des. Pesq.*, 15: 5-13.

- Cuartas, E. I.; Díaz, A. C.; Petriella, A. M. 2003. Modificaciones del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeoidea) por efecto de la salinidad. *Biociencias*, 11: 53-59.
- David, J. A. d. O.; Fontanetti, C. S. 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) gills from polluted environments. *Water Air Soil Pollut.*, 203: 261–266.
- de Brito Gitirana, L.; Azevedo, R. A.; Pelli, A. A. 2007. Expression pattern of glycoconjugates in the integument of *Bufo ictericus* (Anuran, Bufonidae): Biochemical and histochemical (lectin) profiles. *Tissue Cell*, 39: 415–421.
- Deffendi, V.; Pearson, B. 1955. Quantitative estimation of succinic dehydrogenase activity in a single microscopic tissue section. *J. Histochem. Cytochem.*, 3: 61-69.
- De Jong-Moreau, L.; Brunet, M.; Casanova, J.-P.; Mazza, J. 2000. Comparative structure and ultrastructure of the midgut and hepatopancreas of five species of Mysidacea (Crustacea): functional implications. *Can. J. Zool.*, 78: 822–834.
- Deplancke, B.; Gaskins, H. R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 1131-1141.
- Devincenti, C. V.; Díaz, A. O.; Goldemberg, A. L. 1998. Characterization of lateral musculature in the striped weakfish (*Cynoscion striatus* Cuvier). *Anat. Histol. Embryol.*, 27: 399-406.
- Devincenti, C. V.; Díaz, A. O.; Goldemberg, A. L. 2000 a. Lateral musculature in the withemouth croaker (*Micropogonias furnieri*): its characterization with respect to different gonadal conditions. *Anat. Histol. Embryol.*, 29: 65-72.
- Devincenti, C. V.; Díaz, A. O.; Goldemberg, A. L. 2000 b. Characterization of the swimming muscle of the anchovy *Engraulis anchoita* (Hubbs and Martini 1935). *Anat. Histol. Embryol.*, 29: 197-202.

- Devincenti, C. V.; Díaz, A. O.; García, A. M.; Goldemberg, A. L. 2009. Pectoral fins of *Micropogonias furnieri*: a histochemical and ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 317-323.
- Díaz, A. O.; García, A. M.; Devincenti, C. V.; Goldemberg, A. L. 2001. Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: histochemistry and ultrastructure. *Anat. Histol. Embryol.*, 30: 135-139.
- Díaz, A. C.; Sousa, L. G.; Petriella, A. M. 2010 a. Functional cytology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) under osmotic stress. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53(3): 599-608.
- Díaz, A. O.; García, A. M.; Escalante, A. H.; Goldemberg, A. L. 2010 b. Glycoproteins histochemistry of the gills of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *J. Fish Biol.*, 77: 1665-1673.
- Domeneghini, C.; Arrighi, S.; Radaelli, G.; Bosi, G.; Veggetti, A. 2005. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal *Anguilla anguilla* L. *Acta Histochem.*, 106: 477-487.
- Easy, R. H.; Ross, N. W. 2010. Changes in Atlantic salmon *Salmo salar* mucus components following short- and long-term handling stress. *J. Fish Biol.*, 77(7): 1616-1631.
- El Haj, A. J.; Whiteley, N. M. 1997. Molecular regulation of muscle growth in Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 77: 95-106.
- Evans, D. H. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295: 704-713.

- Fasano, J. L. 1980. Geohidrología de la Laguna Mar Chiquita y alrededores, provincia de Buenos Aires. Proc. Simposio Problemas Geológicos del Litoral Atlántico Bonaerense. Mar del Plata. p: 59-71.
- Fernández, D. A.; Calvo, J.; Franklin, C. E.; Johnston, I. A. 2000. Muscle fibre types and size distribution in sub-antarctic notothenioid fishes. *J. Fish Biol.*, 56: 1295–1311.
- Fernández Giménez, A. V.; Goldemberg, A. L.; Díaz, A. O. 2007. Studies of the claws of the crab *Cyrtograpsus angulatus* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Biociencias (Brasil)*, 15: 29-39.
- Franceschini-Vicentini, I. B.; Ribeiro, K.; Papa, L. P.; Marques Junior, J.; Vicentini, C. A.; Valenti, P. M. C. M. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J. Morphol.*, 27(1): 121-128.
- Freire, C. A.; Cavassin, F.; Rodrigues, E. N.; Torres, A. H.; McNamara, J. C. 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 136: 771–778.
- Freire, C. A.; Amado, E. M.; Souza, L. R.; Veiga, M. P. T.; Vitule, J. R. S.; Souza, M. M.; Prodocimo, V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 149: 435–446.
- Georgi, R. 1969. Bildung peritrophischer membranen von decapoden. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 99: 570–607.
- Govind, C.K. 1984. Development of asymmetry in the neuromuscular system of lobster claws. *Biol. Bull.*, 167: 94-119.
- Govind, C. K.; Mearow, K. M.; Wong, A. 1986. Regeneration of fibre types in paired asymmetric closer muscles of the snapping shrimp, *Alpheus heterochelis*. *J. Exp. Biol.*, 123: 55-69.

- Govind, C. K.; Mellon, DeF.; Quigley, M. M. 1987. Muscle and muscle fiber type transformation in clawed crustaceans. *Am. Zool.*, 27: 1079-1098.
- Govind, C. K.; Pearce, J. 1994. Muscle remodeling in adult snapping shrimps via fast-fiber degeneration and slow-fiber genesis and transformation. *Cell Tissue Res.*, 276: 445-454.
- Gruhn, M.; Rathmayer, W. 2002. Phenotype plasticity in postural muscles of the crayfish *Orconectes limosus* Raf.: correlation of myofibrillar ATPase-based fiber typing with electrophysiological fiber properties and the effect of chronic nerve stimulation. *J. Exp. Zool.*, 293: 127-140.
- Günzel, D.; Galler, S.; Rathmayer, W. 1993. Fibre heterogeneity in the closer and opener muscles of crayfish walking legs. *J. Exp. Biol.*, 175: 267-281.
- Guth, L.; Samaha, F. J. 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.*, 28: 365-367.
- Hardy, K. M.; Dillaman, R. M.; Locke, B. R.; Kinsey, S. T. 2009. A skeletal muscle model of extreme hypertrophic growth reveals the influence of diffusion on cellular design. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 296: 1855–1867.
- Hardy, K. M.; Lema, S. C.; Kinsey, S. T. 2010. The metabolic demands of swimming behavior influence the evolution of skeletal muscle fiber design in the brachyuran crab family Portunidae. *Mar. Biol.*, 157: 221–236.
- Hegedus, D.; Erlandson, M.; Guillott, C.; Toprak, U. 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 54: 285-302.
- Hirayama, Y.; Sutoh, K.; Watabe, S. 2000. Structure-function relationships of the two surface loops of myosin heavy chain isoforms from thermally acclimated carp. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 269: 237–241.

- Hooper, S. L.; Thuma, J. B. 2005. Invertebrate Muscles: Muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.*, 85(3): 1001–1060.
- Hopkin, S. P.; Nott, J. A. 1980. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 60: 891-907.
- Hose, J. E.; Martin, G. G.; Sue Gerard, A. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.*, 178: 33-45.
- Hotchkiss, R. D. 1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparation. *Arch. Biochem.*, 16: 131-141.
- Hoyle G.; McNeill, P. A.; Selverston, A. I. 1973. Ultrastructure of barnacle giant muscle fibers. *J. Cell Biol.*, 56: 74-91.
- Icely, J. D.; Nott, J. A. 1992. Digestive System. In: F. W. Harrison and A. G. Humes (Eds.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, Inc., New York. 10: 147-201.
- Iribarne, O.; Martinetto, P.; Schwindt, E.; Botto, F.; Bortolus, A.; Garcia Borboroglu, P. 2003. Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 296: 167-182.
- Jacobs, W. 1928. Untersuchungen uber die cytology der sekretbildung in der mitteldarmdruse von *Astacus leptodactylus*. *Z. Zellforsch.*, 8: 1-62.
- Johnson, P. T. 1980. *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus. A model for the Decapoda*. Praeger Publishers, New York.
- Johnson, L. K.; Dillaman, R. M.; Gay, D. M.; Blum, J. E.; Kinsey, S. T. 2004. Metabolic influences of fiber size in aerobic and anaerobic locomotor muscles of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.*, 207: 4045-4056.

- Johnston, D. J.; Alexander, C. G.; Yellowhees, D. 1998. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *J. Crustacean Biol.*, 18: 271-278.
- Johnston, I. A.; Manthri, S.; Alderson, R.; Smart, A.; Campbell, P.; Nickell, D.; Robertson, B.; Paxton, C. G. M.; Burt, M. L. 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.*, 206: 1337-1351.
- Johnston, I. A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.*, 209: 2249-2264.
- Kameswaramma, A. L.; Shyamasundari, K. E.; Hanumantha Rao, K. 1990. Histological and histochemical changes of the hepatopancreas in relation to moult stages of the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards) (Crustacea: Anomura). *Riv. Idrobiol.*, 29(3): 781-796.
- Kier, W. M.; Curtin, N. A. 2002. Fast muscle in squid (*Loligo pealei*): contractile properties of a specialized muscle fibre type. *J. Exp. Biol.*, 205: 1907–1916.
- Kirschner, L. B. 1991. Water and ions. In: L. Prosser (Ed.): *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, London, pp. 13–107.
- Kirschner, L. B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.*, 207: 1439–1452.
- Koenders, A.; Lamey, T. M.; Medler, S.; West, J. M.; Mykles, D. L. 2004. Two fast-type fibres in claw closer and abdominal deep muscles of the Australian freshwater crustacean, *Cherax destructor*, differ in Ca<sup>2+</sup> sensitivity and troponin-I isoforms. *J. Exp. Zool. A*, 301: 588-598.
- Kondo, M.; Itami, T.; Takahashi, Y.; Fujii, R.; Tomonaga, S. 1998. Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. *Fish. Pathol.*, 33(4): 421-427.

- Lang, F.; Costello, W. J.; Govind, C. K. 1977. Development of the dimorphic claw closer muscles of the lobster *Homarus americanus*: I. Regional distribution of muscle fiber types in adults. *Biol. Bull.*, 152: 75-83.
- Lee, S. Y. 1995. Cheliped size and structure: the evolution of a multi-functional decapod organ. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 193(1-2): 161-176.
- Lev, R.; Spicer, S. S. 1964. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 309.
- Li, E.; Chen, L.; Zeng, C.; Yu, N.; Xiong, Z.; Chen, X.; Qin, J. G. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274: 80-86.
- Lison, L. 1953. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Gauthier-Villars, Paris.
- Lobo da Cunha, A. 2000. The digestive cells of the hepatopancreas in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): ultrastructural and cytochemical study. *Tissue Cell*, 32(1): 49–57.
- Lobo da Cunha, A.; Batista-Pinto, C. 2007. Ultrastructural, histochemical and cytochemical characterization of intestinal epithelial cells in *Aplysia depilans* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Acta Zool.- Stockholm*, 88: 211–221.
- Longo, M.V.; Díaz, A.O.; Goldemberg, A.L. 2011. The claw closer muscle of *Neohelice granulata* (Grapsoidae, Varunidae): a morphological and histochemical study. *Acta Zool.- Stockholm*, 92: 126-133.
- López Albors, O.; Ayala, M. D.; Gil, F.; García-Alcázar, A.; Abellán, E.; Latorre, R.; Ramírez-Zarzosa, G.; Vázquez, J. Ma. 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 220(1-4): 385-406.

- López Mañanes, A. A.; Meligeni, C. D.; Goldemberg, A. L. 2002. Response to environmental salinity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 274: 75–85.
- Luvizotto-santos, R.; Lee, J. T.; Pereira Branco, Z.; Bianchini, A.; Maia Nery, L. E. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *J. Exp. Zool. A.*, 295(2): 200-205.
- Madhyastha, M. N.; Rangneker, P. V. 1974. Observation on the moult cycle of the prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius). Part II: Cyclic histological and histochemical changes in the hepatopancreas. *Broteria*, 43(3-4): 135-149.
- Magnay, J. L.; Holmes, J. M.; Neil, D. M.; El Haj, A. J. 2003. Temperature-dependent developmental variation in lobster muscle myosin heavy chain isoforms. *Gene*, 316: 119-126.
- Maier, L.; Rathmayer, W.; Pette, D. 1984. pH lability of myosin ATPase activity permits discrimination of different muscle fibre types in crustaceans. *Histochemistry*, 81: 75-77.
- Marcolin, C. d. R.; Góes Carqueija, C. R.; Tozetto, S. d. O.; de Oliveira, D. C.; Araújo Côrrea, A. M. 2008. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos estádios de intermuda e pré-muda inicial. *Rev. Bras. Zoociên.*, 10(2): 97-104.
- Martin, G. G.; Hose, J. E. 1992. Vascular elements and blood (hemolymph). In: F. W. Harrison and A. G. Humes (Eds.): *Microscopic anatomy of invertebrates, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, Inc., 10: 117-146.
- Martin, G. G.; Simcox, R.; Nguyen, A; Chilingaryan, A. 2006. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability. *Biol. Bull.*, 211: 275–285.

- Martins, T. L.; Chittó, A. L. F.; Rossetti, C. L.; Brondani, C. K.; Kucharski, L. C.; Da Silva, R. S. M. 2011. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 158: 400–405.
- Martoja, R.; Martoja-Pearson, M. 1970. *Técnicas de histología animal*. Ed. Toray-Masson, S.A. 350 pp.
- Martos, P.; Reta, R. 1997. Aspectos hidrográficos de la región estuarial de la laguna de Mar Chiquita, Pcia de Buenos Aires. II Congreso Argentino de Limnología. I Reunión Argentina sobre Sistemas Costeros Mixohalinos. Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Buenos Aires, 18 al 24 de Septiembre de 1997.
- Masson, I. 2001. Efecto del estrés osmótico sobre la morfología funcional del hepatopáncreas de *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda). *Tesis de Grado*. Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Univ. Nac. Mar del Plata, Argentina.
- McDermott, M. P.; Stephens, P. J. 1988. Fiber types in the limb bender muscle of a crab (*Pachygrapsus crassipes*). *Biol. Bull.*, 175: 284-288.
- Mc Manus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23: 99-108.
- Medler, S.; Lilley, T.; Mykles, D. L. 2004. Fiber polymorphism in skeletal muscles of the American lobster, *Homarus americanus*: continuum between slow twitch (S1) and slow tonic (S2) fibres. *J. Exp. Biol.*, 207: 2755-2767.
- Mellon, F. Jr. 1992. Connective tissue and supporting structures. In: F. W. Harrison and A. G. Humes (Eds.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, Inc., New York. 10: 77-116.

- Menone M. L.; Miglioranza K. S. B.; Iribarne O.; Aizpún de Moreno J. E.; Moreno V. J. 2004. The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping organochlorine pesticides. *Mar. Pollut. Bull.*, 48(3-4): 240-247.
- Michiels, M. S. 2010. Actividad de lipasa en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*: modulación en relación a estados fisiológicos diferenciales. *Tesis de grado*. Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Univ. Nac. Mar del Plata, Argentina.
- Momin, M. A.; Rangneker, P. V. 1974. Histochemical localization of acid and alkaline phosphatases and glucose-6-phosphatase in the hepatopancreas of the crab, *Scylla serrata* (Forsk.) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 14: 1-16.
- Moriyasu, M.; Mallet, P. 1986. Molt stages of the snow crab *Chionoecetes opilio* by observation of morphogenesis of setae on the maxilla. *J. Crustacean Biol.*, 6(4): 709-718.
- Moron, S. E.; de Andrade, C. A.; Narciso Fernandes, M. 2009. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerhythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotrop. Ichthyol.*, 7(3): 491-498.
- Mykles, D. L. 1988. Histochemical and biochemical characterization of two slow fiber types in decapod crustacean muscles. *J. Exp. Zool.*, 245: 232-243.
- Neil, D. M.; Fowler, W. S.; Tobasnick, G. 1993. Myofibrillar protein composition correlates with histochemistry in fibres of the abdominal flexor muscles of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *J. Exp. Biol.*, 183: 185-201.
- Nery, L. E. M.; Santos, E. A. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 106(3): 747-753.

- Oliveira, G. T.; Rossi, I. C.; Kucharski, L. C.; Da Silva, R. S. M. 2004. Hepatopancreas and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 137: 383-390.
- Olivier, S. R.; Escofet, A.; Penchaszadeh, P.; Oresanz, J. M. 1972. Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita (Bs. As., Argentina). II. Relaciones tróficas interespecíficas. *An. Soc. Cient. Argent.*, 194: 89-104.
- Paniagua, R.; Royuela, M.; García-Anchuelo, R. M.; Fraile, B. 1996. Ultrastructure of invertebrate muscle cell types. *Histol. Histopathol.*, 11: 181-201.
- Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Álvarez-Uría, M.; Fraile, B.; Anadón, R.; Sáez, F. J. 2003. *Biología celular*. 2ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana. 381 pp.
- Peachey, L. D.; Huxley, A. G. 1964. Transverse tubules in crab muscle. *J. Cell Biol.*, 23: 70A.
- Pearse, A. G. E. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh. 624 pp.
- Pelli, A. A.; Paes Cinelli, L.; Souza Mourão, P. A.; de Brito-Gitirana, L. 2010. Glycosaminoglycans and glycoconjugates in the adult anuran integument (*Lithobates catesbeianus*). *Micron*, 41: 660–665.
- Perry, M. J.; Tait, J.; Hu, J.; White, S. C.; Medler, S. 2009. Skeletal muscle fiber types in the ghost crab, *Ocypode quadrata*: implications for running performance. *J. Exp. Biol.*, 212: 673-683.
- Pette, D.; Staron, R. S. 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.*, 115(5): 359-372.
- Piccolo, M. C.; Perillo, G. M. E. 1997. Geomorfología e hidrografía de estuarios. En: E. E. Boschi (Ed.): *El mar Argentino y sus recursos pesqueros*. INIDEP, Mar del Plata. 1: 133-161.

- Pinoni, S. A.; López Mañanes, A. A. 2004. Alkaline phosphatase activity sensitive to environmental salinity and dopamine in muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 307: 35-46.
- Pinoni, S. A.; Goldemberg, A. L.; López Mañanes, A. A. 2005. Alkaline phosphatase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*: Response to environmental salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 326: 217-226.
- Pinoni, S. A.; López Mañanes, A. A. 2008. Partial characterization and response upon hyperegulating conditions of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase and levamisole-sensitive alkaline phosphatase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Sci. Mar.*, p.15-24.
- Pinoni, S. A. 2009. Mecanismos de mantenimiento del medio interno en respuesta a estrés ambiental en crustáceos decápodos de interés regional. *Tesis Doctoral*. Fac. Cs. Exactas y Naturales, Univ. Nac. de Mar del Plata. Argentina.
- Pinoni, S. A.; López Mañanes, A. A. 2009. Na<sup>+</sup> ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: Differential response to environmental salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 372: 91–97.
- Pinoni, S. A.; Iribarne, O.; López Mañanes, A. A. 2011. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 158: 552–559.
- Pinoni, S. A.; López Mañanes, A. A. 2011. Biochemical and physiological flexibility in the euryhaline semiterrestrial crab *Neohelice granulata* from contrasting habitats. *Biocell*, 35(2): 136, 140 (Abstracts).

- Ramadevi, K. R. L. S.; Shyamasundari, K; Hanumantha Rao, K. 1990. Observation on the hepatopancreas of *Ocypoda platytarsis* (Milne-Edwards) (Crustacea, Brachyura). *Boll. Zool.*, 57: 261-265.
- Read, A. T.; Hessler, R. R.; Govind, C. K. 1994. Muscle and Nerve Terminal Fine Structure of a Primitive Crustacean, the Cephalocarid *Hutchinsoniella macracantha*. *Biol. Bull.*, 187: 16-22.
- Reta, R.; Martos, P.; Ferrante, A; Perillo, G. M. E.; Piccolo, M. C. 1995. Efectos de mareas y viento sobre temperatura y salinidad en la Laguna Mar Chiquita, Argentina. *An. VI Congreso Latinoamericano Cs. del Mar*, Mar del Plata.
- Reta, R.; Martos, P.; Perillo, G. M. E., Piccolo, M. C.; Ferrante, A. 2001. Características hidrográficas del estuario de la Laguna Mar Chiquita. En O. Iribarne (Ed.): *Reserva de Biosfera Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas*. Editorial Martin, Mar del Plata. p: 31-52.
- Rock, J.; Magnay, J. L.; Beech, S.; El Haj, A. J.; Goldspink, G.; Lunt, D. H.; Whiteley, N. M. 2009. Linking functional molecular variation with environmental gradients: Myosin gene diversity in a crustacean broadly distributed across variable thermal environments. *Gene*, 437: 60–70.
- Rodríguez de la Rúa, A.; González de Canales, M. L.; Sarasquete, C. 2002. Estudio histomorfológico del aparato digestivo y distribución histoquímica de carbohidratos en el ostión *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). *Bol. Inst. Esp. Oceanog.*, 18(1-4): 329-336.
- Rosenbluth, J.; Szent-Györgyi, A. G.; Thompson, J. T. 2010. The ultrastructure and contractile properties of a fast-acting, obliquely striated, myosin-regulated muscle: the funnel retractor of squids. *J. Exp. Biol.*, 213: 2430-2443.
- Ross, M. H.; Pawlina, W. 2007. *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5º edición, Editorial Médica Panamericana S.A. 974 pp.

- Royuela, M.; Meyer-Rochow, V. B.; Fraile, B.; Paniagua, R. 1998. Ultrastructure of muscle cells in *Acetabulostoma* (Crustacea, Ostracoda) – mussel shrimp from the Ross Sea (Antarctica). *Polar Biol.*, 20: 77-84.
- Royuela, M.; Fraile, B.; Arenas, M. I.; Paniagua, R. 2000 a. Characterization of several invertebrate muscle cell types: a comparison with vertebrate muscles. *Microsc. Res. Techniq.*, 48: 107-115.
- Royuela, M.; Meyer-Rochow, V. B.; Fraile, B.; Paniagua, R. 2000 b. Muscle cells in the tiny marine Antarctic mite *Halacarellus thomasi*: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Polar Biol.*, 23: 759-765.
- Ryu, J-H; Drain, J.; Kim, J. H.; McGee, S.; Gray-Weale, A.; Waddington, L.; Parker, G. J.; Hargreaves, M.; Yoo, S.-H.; Stapleton, D. 2009. Comparative structural analyses of purified glycogen particles from rat liver, human skeletal muscle and commercial preparations. *Int. J. Biol. Macromol.*, 45: 478–482.
- Sánchez Paz, A.; García-Carreño, F.; Muhlia-Almazán, A.; Peregrino-Uriarte, A. B.; Hernández-López, J.; Yepiz-Plascencia, G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36: 241–249.
- Sánchez Paz, A.; García-Carreño, F.; Hernández-López, J.; Muhlia-Almazán, A.; Yepiz-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 340: 184–193.
- Santos, E. A.; Nery, L. E. M. 1987. Blood-glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 87: 1033–1035.

- Sarasquete, M. C.; Gutiérrez, M.; Rodríguez, A. 1985. Caracteres citohistoquímicos de carbohidratos y proteínas del hepatopancreas del langostino *Penaeus kerathurus*. *Inv. Pesq.*, 49(3): 387-399.
- Schein, V.; Chittó, A. L. F.; Etges, R.; Kucharski, L. C.; Wormhoudt, A.; Da Silva, R. S. M. 2005. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*. Seasonal differences. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 316: 203–212.
- Schleich, C. E.; Goldemberg, A. L.; López Mañanes, A. A. 2001. Salinity dependent Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in gills of euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Gen. Physiol. Biophys.*, 20: 255-256.
- Schumacher, U.; Duku, M.; Katoh, M.; Jörns, J.; Krause, W. J. 2004. Histochemical similarities of mucins produced by Brunner's glands and pyloric glands: a comparative study. *Anat. Record A*, 278: 540-550.
- Silverston, A. 1967. Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers. *Am. Zool.*, 7: 515.
- Serrano, L.; Henry, R. P. 2008. Differential expression and induction of two carbonic anhydrase isoforms in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 3(2): 186-193.
- Shephard, K. L. 1989. The effect of mucus and mucilaginous materials on ion distributions at epithelial surfaces. In: E. Chantler and N. A. Ratcliffe (Eds.): *Mucus and related topics*. Company of Biologists Limited, Cambridge. p: 123-130.
- Silverman, H.; Charlton, M. P. 1980. A fast-oxidative crustacean muscle: Histochemical comparison with other crustacean muscle. *J. Exp. Zool.*, 211: 267-273.

- Sousa, L. G.; Petriella, A. M. 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell*, 24(3): 189-195.
- Sousa, L. G.; Petriella, A. M. 2001. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea) during moult. *Biocell*, 25(3): 275-281.
- Sousa, L. G. 2003. Estudios sobre las modificaciones tisulares del camarón *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea). Su empleo como indicadores de contaminación. *Tesis Doctoral*. Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Univ. Nac. de Mar del Plata. Argentina.
- Sousa, L. G.; Cuartas, E. I.; Petriella, A. M. 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell*, 29(1): 25-31.
- Sousa, L. G.; Petriella, A. M. 2006. Morphology and histology of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. *Biocell*, 30(2): 287-294.
- Sousa, L. G.; Petriella, A. M. 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Rev. Biol. Trop.*, 55(1): 79-86.
- Spivak, E.; Anger, K.; Luppi, T.; Bas, C.; Ismael, D. 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (province of Buenos Aires, Argentina). *Helgol. Meeresunters.*, 48: 59-78.
- Spivak, E. 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Invest. Mar. Valparaíso*, 25: 105-120.
- Spivak, E.; Luppi, T.; Bas, C. 2001. Cangrejos y camarones: las relaciones organismo-ambiente en las distintas fases del ciclo de vida. En O. Iribarne (Ed.): *Reserva de Biosfera de Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas*. Editorial Martín, Mar del Plata. p: 129-151.

- Steeves, H. R. 1965. The presence of mucopolysaccharides in the hepatopancreas of the isopod, *Armadillidium vulgare*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1026-1037.
- Stevenson, J. R. 1985. Dynamics of the integument. In: D. E. Bliss and L. H. Mantel (Eds.): *The biology of crustacea. Integument, pigments and hormonal processes*. Academic Press, Inc., New York. 9: 1-42.
- Sullivan, M. A.; Vilaplana, F.; Cave, R. A.; Stapleton, D.; Gray-Weale, A. A.; Gilbert, R. G. 2010. Nature of  $\alpha$  and  $\beta$  particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromolecules*, 11: 1094–1100.
- Sustaita, D. 2008. Musculoskeletal underpinnings to differences in killing behaviour between North American accipiters (Falconiformes: Accipitridae) and falcons (Falconidae). *J. Morphol.*, 269: 283-301.
- Taylor, G. M. 2000. Maximum force production: why are crabs so strong?. *Proc. R. Soc. London B*, 267: 1475-1480.
- Towle, D. W.; Henry, R. P.; Terwilliger, N. B. 2011. Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 6(2): 115-125.
- Tse, F. W.; Govind, C. K.; Atwood, H. L. 1983. Diverse fiber composition of swimming muscles in the blue crab: *Callinectes sapidus*. *Can. J. Zool.*, 61(1): 52-59.
- Ushio, H.; Watabe, S. 1993. Ultrastructural and biochemical analysis of the sarcoplasmic reticulum from crayfish fast and slow striated muscles. *J. Exp. Zool.*, 267: 9-18.
- Van Weel, P. B. 1974. Hepatopancreas?. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 1-9.

- Verri, T.; Mandal, A.; Zilli, L.; Bossa, D.; Mandal, P. K.; Ingrosso, L.; Zonno, V.; Viella, S.; Aheam, G. A.; Storelli, C. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 130(3): 585-606.
- Vinagre, A. S.; da Silva, R. S. M. 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.*, 80: 1413–1421.
- Vinagre, A. S.; Nunes do Amaral, A. P.; Pinto Ribarcki, F.; Fraga da Silveira, E.; Périco, E. 2007. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 146: 514–519.
- Vogt, G.; Stocker, W.; Storch, V.; Zwilling, R. 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry*, 91: 373-381.
- Vogt, G. 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreas cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 114: 83-101.
- Wernig, A.; Irintchev, A.; Weisshaupt, P. 1990. Muscle injury, cross-sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running. *J. Physiol.*, 428: 639-652.
- Whiteley, N. M.; Breeze, J. L. S.; McCann, L. 2001. Effects of water salinity on acid–base balance in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, 204: 1003-1011.
- Wilde, J. E.; Linton, S. M.; Greenaway, P. 2004. Dietary assimilation and the digestive strategy of the omnivorous anomuran land crab *Birgus latro* (Coenobitidae). *J. Comp. Physiol. B*, 174: 299–308.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice Hall, N. J. 5<sup>th</sup> edition. 944 pp.
- Zara, F. J.; Gaeta, H. H.; Costa, T. M.; Toyama, M. H.; Caetano, F. H. 2011. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). *Acta Zool.- Stockholm*, 00:1–13.

Zhuang, Z.; Ahearn, G. A. 1996.  $\text{Ca}^{+2}$  transport processes of lobster hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. *J. Exp.Biol.*, 199: 1195–1208.