

Tesis de Posgrado

Estudio sobre la muda y el crecimiento de *Cyrtograpsus angulatus*

Spivak, Eduardo Daniel

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Spivak, Eduardo Daniel. (1987). Estudio sobre la muda y el crecimiento de *Cyrtograpsus angulatus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2016_Spivak.pdf

Cita tipo Chicago:

Spivak, Eduardo Daniel. "Estudio sobre la muda y el crecimiento de *Cyrtograpsus angulatus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2016_Spivak.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO SOBRE LA MUDA Y EL CRECIMIENTO

DE Cyrtograpsus angulatus

Autor

Eduardo Daniel Spivak

Director de Tesis

Dr. Rafael Fernando Pont Lezica

Lugar de Trabajo

Instituto de Investigaciones Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Mar del Plata

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1987

- 2016 -
y.2

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	<u>iii</u>
INDICE DE FIGURAS	<u>iv</u>
AGRADECIMIENTOS	<u>vi</u>
INTRODUCCION	1
Ciclo de vida de crustáceos Brachyura	2
Crecimiento y muda	3
Crecimiento relativo	6
Sincronización de mudas	12
Regeneración de apéndices	13
Regeneración y muda	18
Composición química de la cutícula	19
Síntesis de componentes cuticulares	24
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y METODOS	27
Area de estudio	27
Estudio de las poblaciones naturales	27
Obtención y mantenimiento del material biológico	29
Muda y crecimiento	29
Crecimiento relativo	30
Sincronización de mudas	30
Regeneración de apéndices	31
Relaciones entre ciclo de muda y regeneración	31
Estructura del caparazón cefalotorácico	33
Composición química de la cutícula	33
Incorporación de precursores radiactivos	34
Identificación de compuestos marcados	36
ESTRUCTURA Y VARIACIONES DE LA POBLACION EN ESTUDIO	39
Resultados	39
Discusión	44

CRECIMIENTO Y MUDA	47
Resultados	47
Discusión	55
CRECIMIENTO RELATIVO	58
Resultados	58
Discusión	61
SINCRONIZACION DE MUDAS	63
Resultados	63
Discusión	71
REGENERACION DE APENDICES	72
Proceso de cicatrización	72
Crecimiento basal del muñón de regeneración	73
Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración	74
Curvas de R	86
Discusión	88
RELACIONES ENTRE REGENERACION Y CICLO DE MUDA	90
Relaciones entre regeneración simple, múltiple y ciclo de vida	90
Duración de la proecdisis	99
Discusión	100
ESTRUCTURA Y VARIACIONES DEL CAPARAZON	104
Incremento del peso seco del caparazón (postmuda)	104
Incremento del peso seco del caparazón (premuda)	109
Cociente entre pesos secos de caparazones en la ecdisis	112
Discusión	114
COMPOSICION QUIMICA DE LA CUTICULA Y PROCESOS BIOSINTETICOS	119
Composición química de la cutícula	119
Incorporación <i>in vivo</i> de precursores radiactivos	123
Discusión	131
RESUMEN Y CONCLUSIONES	135
PERSPECTIVAS	138
BIBLIOGRAFIA	139

INDICE DE TABLAS

I	Crecimiento relativo, datos de Hartnoll, 1974	11
II	Influencia del intervalo recolección-muda y del ancho del caparazón sobre el PIBS	48
III	Porcentaje de incremento de tamaño al mudar (PIBS)	49
IV	IMP y PIBS en dos mudas sucesivas	51
V	Efecto del fotoperiodo sobre la muda	53
VI	Proporción de ejemplares recién mudados	64
VII	Presencia de mudas en función del tiempo transcurrido luego de la recolección	66
VIII	Ocurrencia de distintas frecuencias semanales de mudas	67
IX	Frecuencias semanales de mudas en relación con las fases lunares y bajamares	70
X	Crecimiento de muñones de regeneración	92
XI	Relaciones regeneración-muda	94
XII	Duración de la proecdisis	100
XIII	Relaciones ancho-peso del caparazón en metecdisis	106
XIV	Peso seco del caparazón en la metecdisis	109
XV	Relaciones de pesos secos en la proecdisis	110
XVI	Composición química de la cutícula en postmuda	120
XVII	Composición química de la cutícula en premuda	122
XVIII	Radiactividad incorporada en distintas fracciones	123
XIX	Radiactividad incorporada en apéndices en regeneración	128
XX	Radiactividad incorporada en caparazones (glucosa y leucina)	129
XXI	Destino de la leucina radiactiva incorporada	130

INDICE DE FIGURAS

1	Dibujo de caparazón, abdomen (ambos sexos), quela y pleópodo masculino	7
2	Modelos de crecimiento relativo según Somerton (1980)	10
3	Dibujo de peretópodo y muñón de regeneración	14
4	Curva de R esquemática	16
5	Variaciones de temperatura en Mar del Plata, 1985	28
6	Histogramas de frecuencias mensuales de tallas (machos)	41
7	Histogramas de frecuencias mensuales de tallas (hembras)	42
8	Desplazamiento de las modas de los histogramas (machos)	43
9	Desplazamiento de las modas de los histogramas (hembras)	43
10	Gráfico del log IMP vs el ancho del caparazón	50
11	Comparación de las figuras 8-9 con un esquema de crecimiento discontinuo	52
12	Efectos del fotoperíodo sobre las mudas	54
13	Crecimiento relativo (largo de las quelas)	58
14	Crecimiento relativo (ancho del abdomen)	60
15	Crecimiento relativo (largo del primer pleópodo masculino)	61
16	Histogramas de frecuencias semanales de tallas	65
17	Porcentajes semanales de mudas en laboratorio	68
18	Fases lunares y bajamares en Mar del Plata, 1985	69
19	Cicatrización de apéndices autotomizados Cortes histológicos	78
20	Cicatrización de apéndices autotomizados	79
21	Crecimiento basal del muñón de regeneración	80
22	Crecimiento basal del muñón de regeneración	81
23	Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración	82
24	Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración	83
25	Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración	83

26	Muñón de regeneración poco antes de la muda	Cortes histológicos	84
27	Muñón de regeneración poco antes de la muda		85
28	Curvas R individuales		87
29	Curvas R promedio		91
30	Curvas R promedio		95
31	Curvas R promedio		97
32	Curvas R promedio		98
33	Curvas R promedio		99
34	Incremento del peso seco del caparazón en la metecdisis		105
35	Incremento del peso seco del caparazón en la metecdisis		107
36	Incremento del peso seco del caparazón en la proecdisis		111
37	Razón entre los pesos secos en la ecdisis		113
38	Variaciones de ancho y peso seco del caparazón en función del tiempo		117
39	Composición química de la cutícula		121
40	Digestión con quitinasa		125
41	Incorporación de glucosa radiactiva a cutículas a lo largo del ciclo de muda		126
42	Incorporación de glucosa radiactiva a cutículas (cinética)		126

AGRADECIMIENTOS

El autor de esta Tesis desea agradecer:

al CONICET y a la CIC, por el apoyo económico.

al Dr. Horacio G. Pontis, Director del Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Mar del Plata, por brindarme la posibilidad de utilizar las excelentes instalaciones del Instituto.

al Dr. Rafael F. Pont Lezica, por su Dirección y, especialmente, por haberme permitido transitar caminos que me fueron alejando de los temas que constituyen su área de investigación.

a Silvia G. L'Hoste, mi esposa, por su amor, su paciencia y (porqué no?) su valentía de permanecer tanto tiempo al lado de un tesista neurótico.

a mis hijas Ana Silvia y María Laura, por haberselas arreglado para crecer con un papá preocupado por los cangrejos.

al Dr. Aldo A. Brandani por su detallada lectura del manuscrito, sus críticas y sugerencias; en fin, por su amistad.

al Dr. Ernesto Christiansen y el grupo de histología del INIDEP (Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero) por su ayuda en la preparación e interpretación de los cortes histológicos y, además, por ser como son.

al Dr. Enrique E. Boschi, por la cordialidad con que, desde hace años, atiende mis preocupaciones (siempre expuestas a "último momento").

a mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Biológicas, por su diaria compañía a lo largo de 5 años, por compartir el humor y los sustos.

a los cientos o miles de *Cyrtograpsus angulatus* que se inmolaron para permitir la obtención de unos cuantos resultados provisionarios que les conciernen pero que, seguramente, no les interesan.

INTRODUCCION

Si el crecimiento se define como el aumento del tamaño de un organismo, el exoesqueleto rígido de los crustáceos debe considerarse como un factor que lo restringe a momentos específicos de su ciclo vital. En efecto, el incremento en las dimensiones externas es discontinuo en la mayoría de los grupos de crustáceos (Mauchline, 1977; Hartnoll, 1984); el aumento de tamaño del cuerpo se logra sólo cuando la cutícula inextensible es eliminada periódicamente durante las mudas o ecdisis. Aunque externamente el ciclo vital puede verse, en la mayoría de estos animales, como periodos de reposo separados por las mudas, el aumento de tamaño que tiene lugar en esos momentos es sólo la manifestación más conspicua del crecimiento. Antes y después de la ecdisis ocurren una serie de fenómenos asociados con el crecimiento, que incluyen: la degradación del viejo exoesqueleto, la síntesis de varias capas del nuevo, la formación de gastrolitos en ciertas especies, la atrofia y posterior reemplazo de la musculatura somática de las quelas (primer par de pereiópodos de algunos decápodos) y la regeneración de apéndices autolomizados (Skinner, 1985).

La fauna de crustáceos Brachyura del litoral marino de la República Argentina está constituida por un reducido número de especies (Boschi 1964); este autor menciona sólo 25 para las aguas costeras de la provincia de Buenos Aires. Aún así, no se dispone de una información detallada sobre la biología de muchas de esas especies.

El cangrejo *Cyrtograpsus angulatus* Dana, que tiene una amplia distribución geográfica sudamericana, es la especie de braquiuro más abundante en el medio e infralitoral argentino (Boschi, 1964).

En la presente Tesis se estudian aspectos poco conocidos relacionados con el crecimiento, la muda, la regeneración de apéndices y la cutícula de *Cyrtograpsus angulatus*

Ciclo de vida de crustáceos Brachyura Es difícil hacer generalizaciones sobre los ciclos de muda de los cangrejos dado que la biología de su reproducción es muy variable. En algunas especies las hembras producen sus crías una vez por año mientras que en otras se registran varias puestas durante una sola estación reproductiva (Hartnoll 1969); en este último caso puede tratarse de oviposiciones múltiples a partir de una sola fertilización (Morgan et al., 1983). En consecuencia, puede haber una o varias incorporaciones de jóvenes cangrejos a una determinada población (Klein-Breteler, 1975; Marchand, 1979). El crecimiento de los individuos puede ser estacional o continuo y es, generalmente, muy intenso a lo largo del primer año de vida (Klein Breteler, 1975). En una población pueden encontrarse, durante un ciclo anual, distintas proporciones de las siguientes categorías de animales: machos maduros e inmaduros, hembras ovígeras y no ovígeras y ejemplares cuyo sexo no se puede distinguir morfológicamente (Marchand, 1973a). Sin embargo, no siempre los cangrejos pertenecientes a las distintas categorías cohabitan en una misma zona y las proporciones encontradas pueden variar a causa de migraciones diarias y estacionales, tal como ocurre en los adultos de *Carcinus maenas* (Klein-Breteler, 1976).

Finalmente, algunas especies mudan y crecen durante toda su vida (crecimiento indeterminado); otras detienen su crecimiento externo cuando alcanzan la madurez sexual (crecimiento determinado), persistiendo en un estado de anecdisis terminal, sin variar de tamaño, hasta su muerte. Especies taxonómicamente próximas pueden presentar modelos de crecimiento distintos (Hartnoll, 1984).

Crecimiento y muda. La tasa de crecimiento externo en los crustáceos es el resultado de la interacción de dos "componentes" variables (Hartnoll, 1984), también denominados "factores de crecimiento" (Mauchline, 1977). Uno es el intervalo que separa dos mudas sucesivas o período intermudas (IMP). Su duración puede variar, en los distintos grupos, desde días hasta años (Hartnoll, 1984). El segundo componente es el aumento de tamaño que tiene lugar en cada muda. Se expresa comúnmente como el porcentaje de incremento en tamaño con respecto al anterior a la muda (PIBS). Se han registrado valores de PIBS desde 0 hasta 83% (Hartnoll, 1984). Tanto el IMP como el PIBS pueden ser afectados por factores extrínsecos como la temperatura y la disponibilidad de alimentos (Hartnoll, 1984), por el crecimiento relativo (Mauchline, 1977) y por procesos de regeneración (Skinner, 1985).

Las variaciones de IMP y de PIBS que tienen lugar a medida que el animal crece han sido estudiadas en numerosas especies de crustáceos. Se observaron grandes variaciones aún entre grupos taxonómicamente muy próximos (Mauchline, 1976 y 1977; Hartnoll, 1984). En general, el PIBS tiende a disminuir y el IMP a aumentar en mudas sucesivas (Mauchline, 1977; Hartnoll, 1984). Se han mencionado un cierto número de relaciones matemáticas que permiten vincular la muda y el crecimiento con la edad o el tamaño de varios crustáceos (Kurata, 1962). Se ha

demostrado en numerosas oportunidades la existencia de una correlación lineal entre los logaritmos de cada factor de crecimiento con algunas medidas seleccionadas del tamaño corporal tales como ancho o largo del caparazón, largo total, etc.

$$\text{En efecto:} \quad \text{IMP} = a \cdot b^x \quad \text{y} \quad \text{PIBS} = c \cdot d^x$$

$$\text{y, por lo tanto:} \quad \log \text{IMP} = \log a + x \cdot \log b, \quad \text{y} \quad \log \text{PIBS} = \log c + x \cdot \log d$$

donde x es la dimensión seleccionada (a, b, c, d son constantes). Hartnoll (1984) transcribe los valores de la pendiente de la regresión lineal (a, k) para cierto número de especies; en los *Brachyura* éstos oscilan entre 0.023 y 0.25 para el log IMP y entre -0.14 y -0.002 para el log PIBS.

Por otra parte, la deposición de capas del exoesqueleto, particularmente antes y después de la ecdisis, conduce a un intenso incremento de la masa del mismo (Drach, 1939; Bliss y Boyer, 1964). En efecto, la expresión de Drach (1939) "cycle d'intermue" (ciclo intermuda) sugiere que el crecimiento en los crustáceos es un proceso no restringido al momento de la ecdisis.

El ciclo intermuda o ciclo de muda (en la literatura inglesa se encuentran indistintamente las denominaciones "intermolt cycle" y "molt cycle") puede definirse como un conjunto de eventos que ocurren entre dos mudas y que se repite varias veces durante la vida del animal. Passano (1960) y Bliss & Boyer (1964) propusieron que el crecimiento de los crustáceos podría ser representado, de una manera gráfica, por un espiral en permanente expansión y compuesto por ciclos de muda sucesivos. Cada ciclo de muda ha sido dividido por Carlisle & Dohrn (1953) en cuatro estadios: proecdisis, ecdisis, metecdisis e intermuda; los términos premuda, muda y postmuda son sinónimos de los tres primeros. La intermuda puede ser corta (diecdisis) o larga (aneecdisis). Una descripción cualitativa mucho más detallada de los ciclos de muda fue

propuesta para *Cancer pagurus* por Drach (1939) y perfeccionada y generalizada por Drach & Tchernigovtzeff (1967) y Stevenson (1968). Incluye cinco estadios morfológicos y varios subestadios. La determinación de los mismos se hace por observación a través de alguna parte del cuerpo lo bastante transparente como para poder ver las sedas en desarrollo en su interior durante la premuda o bien las matrices de la mismas en la postmuda. Para ello a veces es necesario remover un apéndice, generalmente el epipodito del tercer maxilipodio (Stevenson, 1985). Uno de los eventos más importantes a lo largo del ciclo de muda, además de la ecdisis propiamente dicha, es la *apólis*. Se trata de la separación de la epidermis del viejo caparazón y constituye la primera evidencia observable del comienzo de la premuda (Jenkin & Hinton, 1966).

El sistema de Drach ha sido ampliamente usado en numerosos crustáceos para describir los ciclos de muda y fenómenos fisiológicos relacionados a determinados momentos de los ciclos. Las comparaciones entre estados de la premuda de diferentes especies pueden hacerse bastante bien aunque a veces se presentan problemas (Stevenson, 1985). En ciertos casos, debido al gran tamaño de los animales, existen estructuras opacas que no pueden ser analizadas por transparencia (Spaziani et al., 1981). La determinación de los estadios de postmuda parece ser más difícil, y muchos autores optan por términos más generales como "postmuda temprana" o "postmuda tardía" (Stevenson, 1985). Es probable además, que los eventos del ciclo de muda no ocurran de una manera sincrónica en todo el exoesqueleto del animal; Drach (1939) y Andrieux (1979) demostraron tal hecho en la apólis. Recientemente se han explorado otros métodos para asignar especímenes a determinados estadios del ciclo de muda. Uno de ellos, basado en mediciones de 26 variables (especialmente el contenido

de agua y sales en diferentes tejidos) analizadas con técnicas de taxonomía numérica, fue desarrollado con éxito para *Cancer antennarius* por Spaziani et al. (1981).

Crecimiento relativo. En el transcurso del crecimiento es común que ciertas dimensiones se incrementen a distintas velocidades, que otras, lo que origina cambios en las proporciones relativas a medida que el organismo crece. Esto puede llamarse crecimiento relativo (Hartnoll, 1978, entre otros) o crecimiento diferencial (Miller y Hoy, 1939). Gould (1966), por su parte, define alometría de una manera amplia como el estudio de los cambios de las proporciones relacionados con las variaciones en tamaño del organismo o de la parte en consideración.

El tegumento duro que facilita las mediciones externas, el proceso de ecdisis que permite establecer etapas definidas en la ontogenia y las notables diferencias morfológicas que se observan entre machos y hembras y entre individuos maduros e inmaduros, han hecho del crecimiento relativo de los crustáceos un tema de investigación muy frecuentado (Huxley, 1932, citado por Hartnoll, 1978).

El tamaño relativo de dos dimensiones del cuerpo puede describirse por la ecuación del crecimiento alométrico simple: $y = B \cdot x^a$, que es una función de potencia, donde y es la dimensión relativa o variable, x es la dimensión de referencia y a y B son coeficientes indeterminados. En los crustáceos *Brachyura* la dimensión de referencia es usualmente el tamaño (ancho o largo) del caparazón; las dimensiones variables más frecuentemente estudiadas (Hartnoll, 1974) son: el largo del *propodus* de las quelas o primer par de pereiópodos, el ancho del abdomen y, en los machos, el largo del primer pleópodo. (Figura 1).

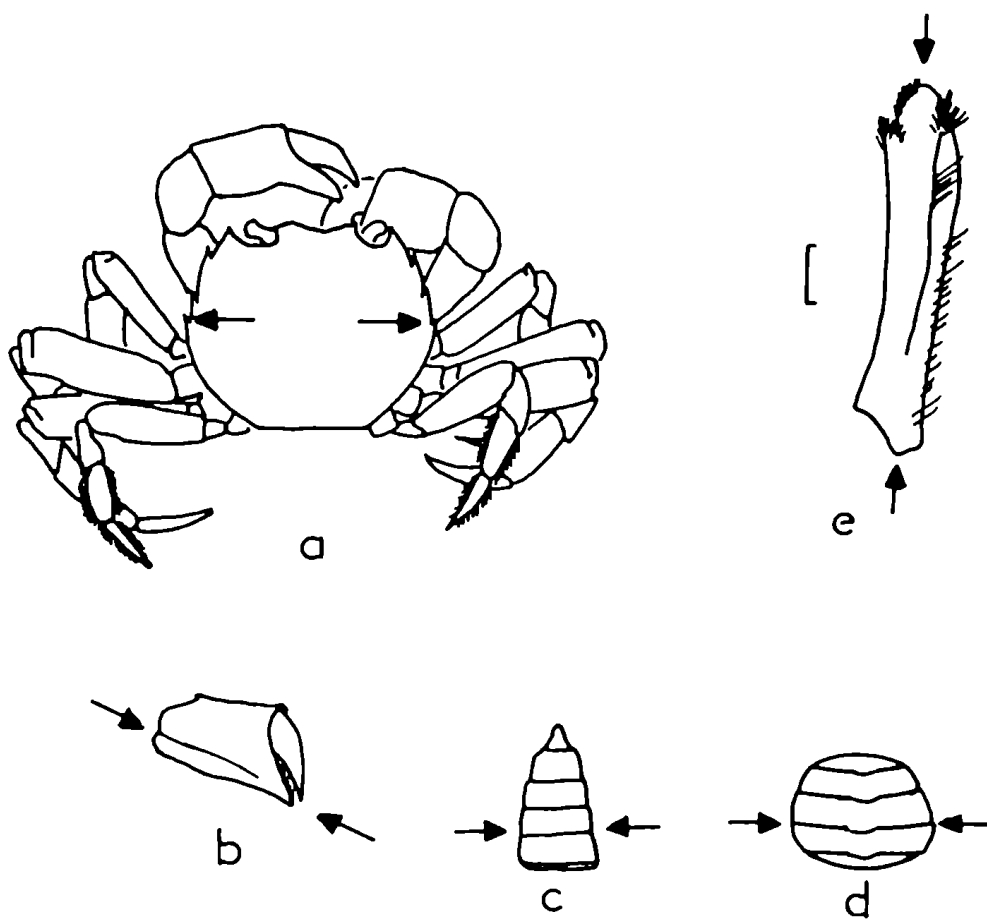


Figura 1.- Esquemas de las partes del cuerpo de *Cyrtograpsus angulatus* que fueron medidas a lo largo de este trabajo (indicadas por flechas). a: ancho del caparazón; b: largo del quelípodo; c: ancho del segundo segmento abdominal, machos; d: ancho del segundo segmento abdominal, hembras; e: largo del primer pleópodo, machos. Las figuras son en tamaño natural, excepto e (la barra representa 1 mm)

La ecuación de alometría simple, que se empezó a utilizar a fines del siglo XIX, fue generalizada por Sir Julian Huxley en 1924 y 1932 (Gould, 1966). Sin embargo este autor aclara que la función de potencia no es la única forma de describir el fenómeno del crecimiento relativo: a veces una recta, con ordenado al origen distinta de cero, puede representarlo; en otras oportunidades se han utilizado expresiones más complejas, tales como las polinomiales que describen el crecimiento abdominal de *Pinnotheres pisum* (A. Needham, 1950).

La transformación lineal, en escala doble logarítmica, de la ecuación del crecimiento alométrico: $\log y = \log B + \sigma \cdot \log x$ es generalmente usada porque

facilita los cálculos de coeficientes y el análisis del crecimiento relativo (Hartnoll, 1978). El coeficiente α , usado como criterio para determinar la intensidad del crecimiento diferencial, fue definido por Gould (1966) como la razón de las tasas específicas de crecimiento de x e y . Si las dimensiones de x e y son las mismas, el coeficiente α tiene un valor de 1 cuando el crecimiento es isométrico, mayor que la unidad cuando es positivamente alométrico (la dimensión relativa, y , se incrementa con mayor velocidad que la de referencia, x) y menor que la unidad cuando es negativamente alométrico.

Gould (1966) menciona tres tipos de desviaciones de la alometría simple descritas por Reeve y Huxley (1945):

a) representaciones doble logarítmicas suavemente curvadas, indicando un cambio continuo de α . Gould (1966) enumera varios casos en los que se observó este fenómeno en Brachyura: *Cancer magister* (Weymouth y Mackay, 1936), *Pinnotheres pisum* (A. Needham, 1950) y *Carcinus maenas* (Day, 1935). En muchos casos el análisis se ha simplificado, quizá impropriamente, considerando esas curvas como compuestas por dos o más segmentos rectos.

b) hay pocas variables que mantienen la misma ecuación de alometría a lo largo de la ontogenia. Surgió entonces el concepto de estadios o puntos críticos, muy frecuentemente utilizado en crustáceos y revisado por Teissier (1960). Las rupturas generalmente están asociadas con importantes cambios fisiológicos de los organismos, tales como la madurez sexual. Durante el crecimiento postlarval, los crustáceos Brachyura exhiben generalmente dos fases con distinto crecimiento relativo, juvenil y adulta; a ellas se agrega, a veces, una tercera más breve, la fase púber (Hartnoll, 1974 y 1978; Somerton, 1980). Cada una de dichas fases está caracterizada por una

ecuación simple de crecimiento alométrico para un determinado par de variables. Existen transiciones entre las fases que pueden ser mínimas o muy marcadas. En el último caso, se origina un punto crítico evidente, que podría incluso llamarse metamorfosis. Ese punto coincide siempre con una muda y así se conocen, por ejemplo, las mudas de pubertad y prepubertad. Las mudas críticas no aparecen necesariamente en una posición definida en las etapas del crecimiento postlarval; diferentes variables pueden además tener su transición simultáneamente o en distintas mudas (Hartnoll, 1978).

c) se han descrito (Gould, 1966) unos pocos casos de fluctuaciones rítmicas de la alometría. El polimorfismo en la fase madura terminal, mencionado por Hartnoll (1978) podría ser incluido en esta categoría de desviaciones de la simple alometría. Por ejemplo, hay dos fases en la madurez de las hembras de *Pachygrapsus marmoratus* (Vernet-Cornubet, 1958) que son características de las estaciones de cría y reposo. Las hembras mudan entre estas dos fases.

Somerton (1980) discrimina cuatro tipos posibles de modelos de crecimiento relativo en crustáceos Brachyura que exhiben desviaciones de la alometría simple del segundo tipo (Gould, 1966), a partir de las características de la transición entre las fases. En el primer tipo (Figura 2 a), todos los individuos maduran en un valor específico de x , y las líneas correspondientes a dos fases sucesivas se encuentran en ese punto. Cerca del tamaño de madurez sexual, los juveniles y los adultos difieren primariamente en la tasa de crecimiento relativo, indicado por las pendientes de las líneas de cada fase, más que en el tamaño relativo real de las dos dimensiones del cuerpo. En consecuencia, la madurez sexual de un individuo no puede ser fácilmente determinada. En el segundo tipo (Figura 2 b), la madurez sexual tiene lugar a lo

largo de un rango de tamaños y las líneas que representan cada fase se superponen parcialmente. En la madurez sexual un individuo crece abruptamente en la dimensión Y relativa a X , pero las tasas de crecimiento relativo antes y después de la madurez son iguales. Si el incremento obtenido en la madurez es suficientemente grande, como ocurre generalmente en los caracteres sexuales secundarios, adultos y juveniles pueden distinguirse por su apariencia. Para la mayor parte de los cangrejos el modelo de líneas de fase es probablemente intermedio entre estos dos tipos y se parece a ambos (Figura 2 c y d). Consideraciones semejantes se expresan en el trabajo de Hartnoll (1978).

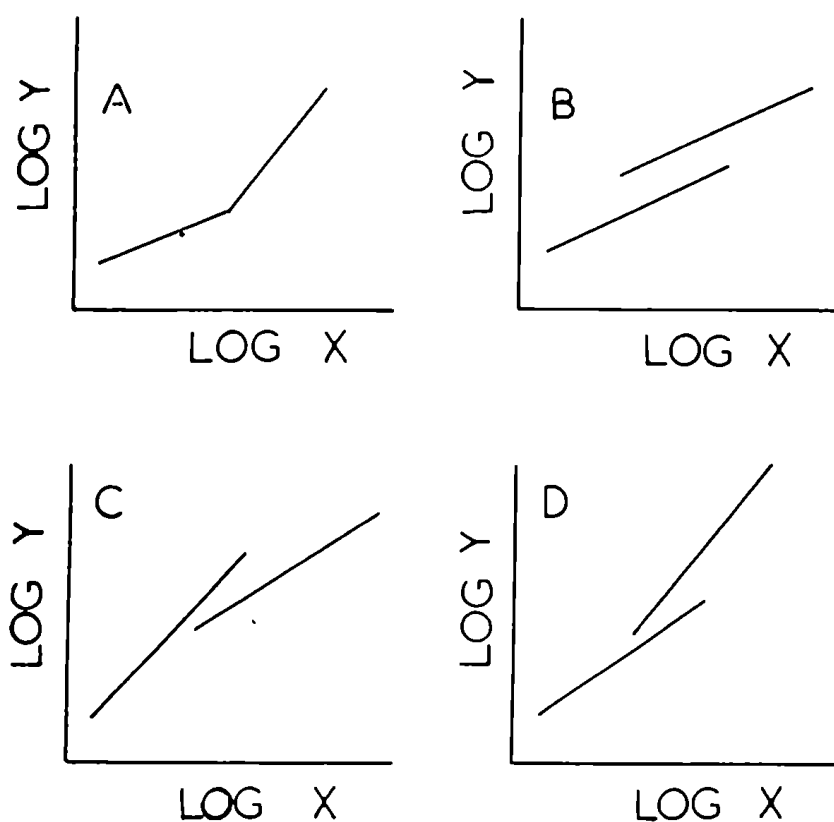


Figura 2.- Cuatro modelos de crecimiento relativo en crustáceos, según Somerton (1980). Ver texto.

En consecuencia, la madurez sexual y la muda de pubertad se producen en

individuos de tamaño algo variable en las poblaciones de la mayoría de los Brachyura. Un método para determinar el tamaño medio en que se alcanza la madurez sexual, por medio del uso de papel de probabilidad, fue desarrollado por Wenner et al. (1974). Existe en la actualidad de una técnica de computación para estimar ese tamaño, a partir de datos morfométricos (Somerton, 1980).

Es necesario tener en cuenta que la muda de pubertad también se puede producir en animales cuyos tamaños varían de un año a otro de acuerdo con las cambiantes condiciones ecológicas, la temperatura por ejemplo (Marchand, 1973b).

Hartnoll (1974) revisó los valores de a (que él denomina tasa de crecimiento) en 26 especies de Brachyura, para las tres variables mencionadas más arriba. Estos valores, una vez promediados, constituyen la Tabla I.

Tabla I. Crecimiento relativo antes y después de la pubertad y cambios de tamaño en la muda de pubertad, promediados para 26 especies de Brachyura (según Hartnoll, 1974). Se expresan los valores de a (razón de las tasas específicas de crecimiento o tasa de crecimiento relativo; ver texto) antes y después de la pubertad

	MACHOS			HEMBRAS		
	a		% de cambio de tamaño en la pubertad	a		% de cambio de tamaño en la pubertad
	prepuber	postpuber		prepuber	postpuber	
Largo del <i>propodus</i> de la quela	1.26	1.53	+23	1.11	1.10	±2.5
Ancho del abdomen	1.06	0.97	+6	1.34	1.16	+22
Largo del primer pleópodo	1.14	0.93	+7			

Sincronización de mudas. La sincronización de las mudas de los distintos individuos que componen una población es un hecho reconocido en varias especies de crustáceos marinos (Conan, 1984). En general se lo considera una consecuencia de presiones selectivas que resultan en una mejor adaptación del organismo a su medio o en una disminución de la mortalidad relacionada con la muda (Reaka, 1976). En efecto, todos los crustáceos son especialmente susceptibles cuando muden a la acción de los depredadores, incluso conespecíficos, y poseen a menudo adaptaciones de comportamiento que minimizan la mortalidad en ese momento (Passano, 1960). Por otra parte, la transitoria disminución de su capacidad de trasladarse en el momento de la muda expone a los crustáceos que habitan en la zona entre mareas a daños físicos a causa de la desecación (Klapow, 1972) o una excesiva inmersión (Olaçon, 1968). En esos casos, se observó una sincronización de mudas coincidente con las mareas menos extremas. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la sincronización de la muda no siempre es consecuencia del efecto de presiones selectivas sino que podría ser considerado en algunos casos como un resultado de una adecuada disponibilidad energética (Stegel, 1984).

Se han reconocido un cierto número de factores físicos y biológicos capaces de conducir a una sincronización de las mudas. Dentro de los primeros se puede citar la temperatura del agua (Dall, 1965; Webster, 1981), el fotoperíodo (Aiken y Waddy, 1976; Conan, 1984), las fases lunares (Braley, 1979; La Hue, 1981 -citado por Siegel, 1984-) y las mareas (Bocquet, 1956; Olaçon, 1968; Klapow, 1972; Reaka, 1976). Todos ellos tienen en común el hecho de ser fenómenos cíclicos, ya sea diarios, bisemanales o anuales. Los factores biológicos pueden ser la alimentación (Siegel, 1984) o la liberación de feromonas (Howe, 1981). Las relaciones entre muda y

reproducción han sido intensamente estudiadas en crustáceos (Adiyodi y Adiyodi, 1970) y se han descrito casos de correlación entre sincronización de mudas y ciclos reproductivos (Klapow, 1972; Dagg, 1976; Steel, 1980; Pandian y Balasundaran, 1982; Anderson et al., 1985). No ha sido posible establecer en esos casos una relación definida causa-efecto.

Regeneración de apéndices. La capacidad de regenerar tejidos y órganos se encuentra en cierta medida desarrollada en todos los metazoos, si bien los fenómenos más complejos de regeneración, involucrando partes del cuerpo o extremidades, se hallan en grupos de animales evolutivamente más primitivos (Bullough, 1967).

Es frecuente que el proceso de regeneración esté asociado con la capacidad de autotomizar una parte del cuerpo cuando el animal está sometido a situaciones de peligro. La autotomía consiste en la ruptura o sección, por un plano predeterminado, de una parte del cuerpo sin mayores consecuencias para el organismo en su conjunto.

Los crustáceos decápodos presentan el fenómeno de autotomía y regeneración de sus apéndices (Barnes, 1968). Éstos se relacionan con la muda de dos maneras:

a) La posibilidad de pérdida de un apéndice parece ser mayor luego de la muda, cuando el animal no ha consolidado su exoesqueleto y se encuentra, en general, indefenso. En efecto, la existencia de la autotomía y la regeneración en distintas especies de crustáceos parece estar relacionada con el modo de vida y la posibilidad cierta de perder apéndices (Weis, 1982).

b) La regeneración tiene lugar durante el tiempo que media entre la amputación y la siguiente muda, cuando emerge el nuevo apéndice completamente formado, aunque generalmente de menor tamaño. La ecdisis y la regeneración están

recíprocamente relacionadas (Skinner, 1985) y se piensa que el control de ambas está ligado y finamente coordinado (Hopkins, 1982).

El estudio de la regeneración en crustáceos data de muy antiguo. Skinner (1985) cita observaciones e hipótesis de Réaumur (1712). Ha merecido la atención de numerosos investigadores, quienes han trabajado sobre todo en cuatro aspectos: el mecanismo de la autotomía, el proceso de la regeneración, el control nervioso y hormonal de la regeneración y las interacciones entre la regeneración y la muda. Existen dos importantes revisiones de los trabajos realizados hasta la fecha: Bliss (1960) y Skinner (1985) y se puede decir que aún resta mucho por aclarar sobre el control de la regeneración y sus relaciones con la muda.

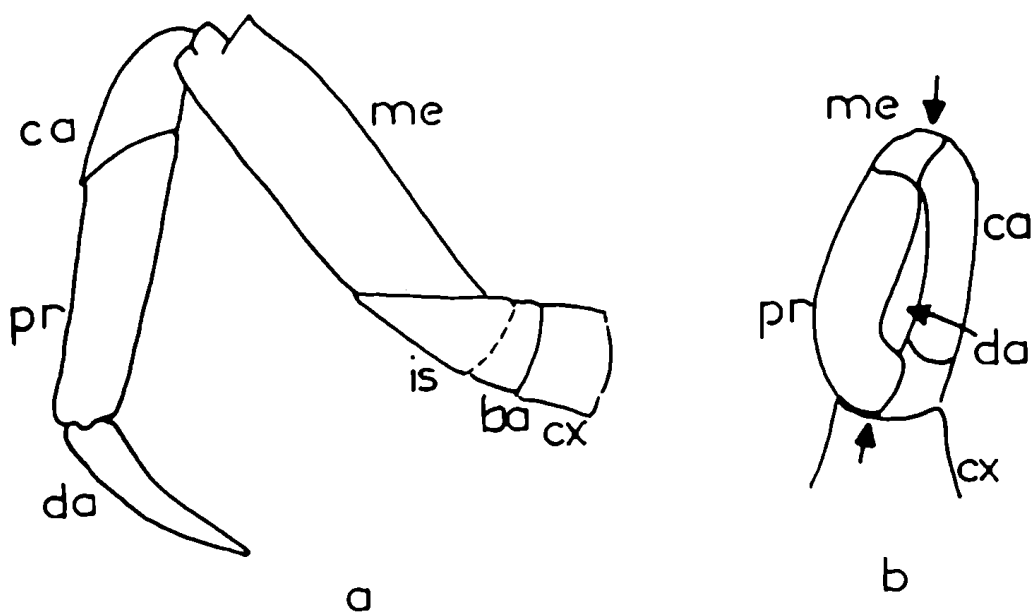


Figura 3.- Esquema de un apéndice normal (a) y de un muñón de regeneración, vista ventral, (b) en *Cyrtograpsus angulatus*. Se indican los distintos artejos que componen un pereiópodo (cx, ba, is, me, ca, pr, da son respectivamente coxa, basis, isquium, merus, carpus, propodus y dactilus) y los puntos entre los que se mide el largo del muñón (flechas).

Los crustáceos decápodos poseen un plano de autotomía en todos sus pereiópodos. Los estudios morfológicos de estos apéndices suelen distinguir seis artejos: coxopodito o *coxa*, basi e isquiopodito o *basi-isquium*, meropodito o *merus*, carpopodito o *carpus*, propodito o *propodus*, dactilopodito o *dactylus* (Figura 3). El *basi-isquium* presenta una partición interna, la membrana de autotomía, que separa ambas partes restringiendo la pérdida de líquidos corporales y produciendo un daño mínimo en la autotomía (Adiyodi, 1972).

El apéndice en regeneración es interno y replegado en Isopoda, externo y extendido en Macrura y externo y replegado en Brachyura.

La dinámica del proceso de regeneración ha sido estudiada desde el punto de vista de las variaciones en forma y tamaño que sufre el muñón de regeneración desde la amputación hasta la muda y subsecuente expansión del nuevo apéndice, en varias especies de crustáceos decápodos Brachyura (Skinner, 1985). Con el fin de independizar las medidas del muñón del tamaño del animal, Bliss (1956) definió para *Gecarcinus lateralis* el coeficiente R o índice de regeneración:

$$R_n = \text{largo del muñón} \cdot 100 / \text{ancho del caparazón}$$

donde n es el número del pereiópodo considerado (n varía entre 1 y 5, siendo 1 el quelípodo o pinza). Aunque cangrejos más grandes produzcan mayor cantidad de tejido del apéndice que los más pequeños, con respecto al tamaño del cuerpo todos los cangrejos producen aproximadamente la misma cantidad (Bliss & Boyer, 1964). El índice R ha sido adoptado por numerosos autores; en todos los casos se ha considerado al largo del muñón como la distancia entre el extremo superior del mismo y el plano de

autotomía. Las ya clásicas curvas de R en función del tiempo que transcurre entre la amputación y la muda (Figura 4), reflejan que el crecimiento del muñón de regeneración en *Brachyura* tiene lugar durante varias etapas que pueden estar interrumpidas por períodos de detención del crecimiento o mesetas. Bliss & Boyer (1964) describen en forma exhaustiva las diferentes etapas; los términos que dichas autoras emplearon se usan habitualmente para caracterizar las curvas de R

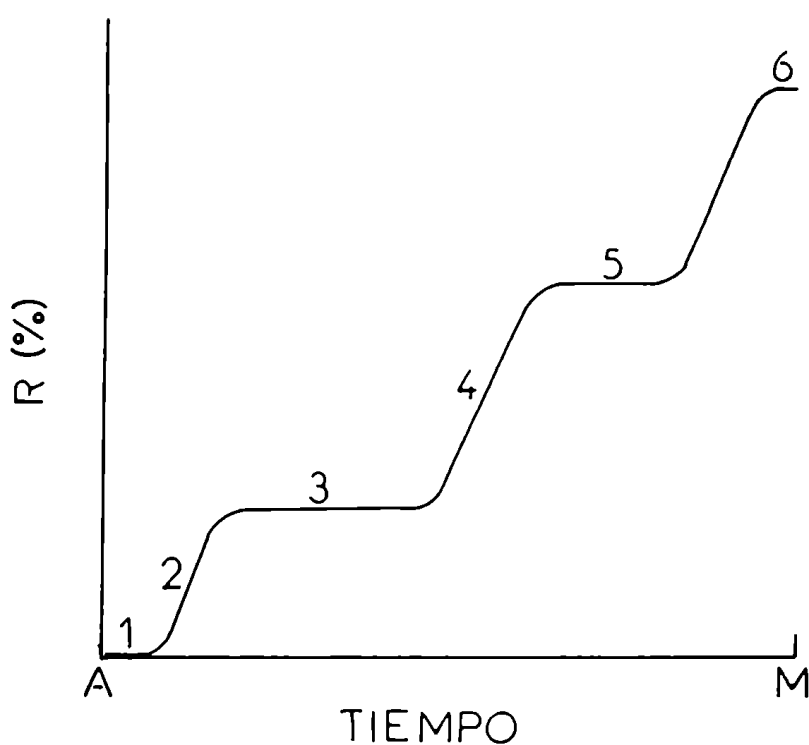


Figura 4.- Esquema generalizado de las variaciones del índice de regeneración en función del tiempo transcurrido entre mudas (curva de R). 1: período sin crecimiento; 2: crecimiento basal; 3: meseta de aneclisis; 4: crecimiento proeclisial; 5: meseta proeclisial; 6: meseta terminal.

Varios días después de la autotomía tiene lugar un crecimiento rápido (*crecimiento basal*) de una papila que, atravesando el plano de autotomía, alcanza un valor de R que puede permanecer estable durante semanas (*meseta de aneclisis*), en

especial en especies con prolongados periodos entre mudas. El crecimiento del muñón se reinicia luego a gran velocidad, aunque este *crecimiento proecdisial* pueda interrumpirse por una nueva meseta (*meseta proecdisial*). Finalmente, el muñón alcanza un valor de R que depende del apéndice considerado, pudiendo permanecer en ese estado durante un tiempo (*meseta terminal*). La ecdisis permite la expansión del apéndice, quedando en la exuvia la membrana que lo envolvía durante todo su desarrollo. Las curvas de R varían en función del momento del ciclo de muda en que se produce la autotomía, pudiendo incluso ser el crecimiento del muñón ininterrumpido desde la papila inicial hasta la ecdisis.

Durante este proceso de crecimiento del muñón de regeneración se pueden observar algunas modificaciones de su morfología externa: color, presencia de cromatóforos y segmentación (Adiyodi, 1972). En los Brachyura, el muñón que contendrá el nuevo apéndice plegado dos veces sobre sí mismo, fue estudiado en su estructura interna en *Gecarcinus lateralis* (Hodge, 1958 -citado por Adiyodi, 1972-) y en *Parathelphusa hydrodromous* (Adiyodi, 1972). Los principales eventos descritos por estos autores son:

- 1) cicatrización del plano de autotomía,
- 2) formación de un blastema indiferenciado, internamente, bajo el plano de autotomía,
- 3) erupción del blastema y su crecimiento hasta llegar a una papila (crecimiento basal),
- 4) desarrollo y crecimiento del muñón (crecimiento proecdisial).

El apéndice ya formado emerge luego de la ecdisis, generalmente de igual forma pero menor tamaño que su homólogo contralateral (Skinner, 1985). En *♂*

lateralis el nuevo apéndice es, al menos, parcialmente funcional y con un déficit proteico con respecto a su homólogo de 1/6 que es restaurado durante la metecdisis (Skinner, 1966a).

Regeneración y muda Las relaciones entre muda y regeneración pueden ser enfocadas, al menos, desde dos puntos de vista:

- a) en qué momentos del ciclo de muda la regeneración es posible,
- b) de qué manera la presencia de apéndices en regeneración afecta las características del ciclo de muda.

La regeneración de apéndices puede iniciarse durante la mayor parte del ciclo de muda, con excepción de las etapas que preceden a la ecdisis. Esto indica la existencia de un periodo crítico durante el cual no hay actividad regeneradora, si bien distintos autores no coinciden en su ubicación en el ciclo de muda: Demeusy (1971) en *Carcinus maenas* y Tchernigovtzeff (1974) en *G. lateralis* lo ubican a partir del subestado D_1 de la nomenclatura de Drach (1939). Para Sardá (1983) está ubicado en *Nephrops norvegicus* un poco antes, en D_0 .

En algunos casos fue posible relacionar las distintas etapas del proceso de regeneración con subestados específicos del ciclo de muda definidos por Drach & Tchernigovtzeff (1967). Skinner (1962) sostiene que en *G. lateralis* el crecimiento proecdisial ocurre durante los subestados D_0 y que la meseta terminal es típica de los subestados D_2 a D_4 . Tchernigovtzeff (1972) relaciona, en la misma especie, la

regeneración activa de apéndices con los subestados D_0 y D_1 . Sin embargo, en *Homarus americanus* se demostró que no existe correlación entre la apólisis y el crecimiento del muñón (Stevenson et al., 1968; Aiken, 1973).

Por otra parte, Bliss & Boyer (1964) han demostrado que *O. lateralis* amputados al comenzar, o algo después de comenzada, la proecdisis exhiben curvas de R sin meseta basal. En esos casos, el crecimiento del muñón ocurre directamente desde la autotomía hasta la ecdisis, sin poder diferenciar el crecimiento basal del proecdisial. De esta forma, las curvas de R pueden proporcionar una idea de la duración del estadio proecdisial del ciclo de muda.

El ciclo de muda influye también sobre el tamaño del apéndice regenerado. Si la proecdisis es demasiado breve, el tamaño será aún menor que lo usual (Skinner, 1985).

La regeneración afecta a su vez ciertas características del ciclo de muda, en especial si tiene lugar en varios apéndices al mismo tiempo. Se ha demostrado, en por lo menos 13 especies de crustáceos decápodos, que el período intermuda se abrevia luego de una amputación múltiple. La regeneración intensiva también conduce a una disminución del incremento relativo de tamaño luego de cada muda (Skinner, 1985).

Composición química de la cutícula. El tegumento de los crustáceos está constituido por una capa celular, la hipodermis, y por un exoesqueleto rígido, o cutícula, segregado por ella (Richards, 1951). La cutícula puede considerarse un tejido mineralizado cuya estructura es afectada ciclicamente por el proceso de la muda o ecdisis (Roer & Dillaman, 1984). Este tejido no es homogéneo sino que contiene

cuatro capas discretas; esto ha dado origen a una terminología muy variada, en parte resumida por Drach & Tchernigovtzeff (1967). En la actualidad la mayoría de los autores utilizan la propuesta por Travis (1963): epicutícula, exocutícula endocutícula y capa membranosa. La estructura microscópica de la cutícula de los braquiuros ha sido descrita en detalle en varias especies (Green & Neff, 1972; Hegdahl et al., 1977 a-c; Giraud-Guille, 1984 y Roer & Dillaman, 1984). Si bien la composición química de las distintas capas de la cutícula presenta variaciones (Roer & Dillaman, 1984), los principales constituyentes de la misma son quitina, proteínas, sales de calcio y lípidos; también se pueden encontrar mucopolisacáridos ácidos, varios pigmentos y moléculas pequeñas, como aminoácidos (Stevenson, 1985).

La quitina es un polisacárido semejante a la celulosa pero constituido por un 80 a un 90 % de N-acetil-D-glucosamina y un 10 a un 20 % de D-glucosamina (Hackman & Goldberg, 1974). En realidad, se afirma que la quitina no sería una simple entidad polimérica sino que representaría una familia de productos muy relacionados, derivados de complejos naturales quitina-proteínas (Austin et al., 1971).

Las proteínas que integran la cutícula son variadas y las moléculas están unidas entre sí y con el polisacárido por fuerzas de distinto tipo (de Van der Waal's, puentes de hidrógeno, uniones electro y covalentes, etc.). En consecuencia, pueden ser separadas usando una serie de solventes apropiados (Stevenson, 1985). La organización espacial del complejo quitina-proteínas fue estudiada en detalle (Giraud-Guille, 1984), si bien la naturaleza detallada de las uniones entre los dos tipos de moléculas aún permanece poco conocida (Stevenson, 1985). La matriz orgánica así constituida deja espacios que son ocupados por las sales minerales

(Girard-Guille, 1984): cristales de calcita, valerita, aragonita y carbonato de calcio amorfo (Roer & Dillaman, 1984; Stevenson, 1985).

La calidad y la cantidad de los componentes de la cutícula es muy variable entre los distintos crustáceos de modo que no es posible hacer generalizaciones al respecto. Degens et al. (1967) cuantificaron los constituyentes cuticulares de varias especies de cangrejos Portunidae y obtuvieron los siguientes resultados para los caparazones: 62 a 92 % de minerales, 1.9 a 13 % de quitina y 5.7 a 24 % de proteínas. Welinder (1974) estudió las siguientes especies: *Astacus fluviatilis*, *Cancer pagurus*, *Carcinus maenas*, *Leander adspersus*, *Nephrops norvegicus* y *Penaeus duorarum*, encontrando que -en la intermedia- la proporción de sales minerales variaba entre un 55 y un 93 % de acuerdo a la especie, la pieza del exoesqueleto sometida a estudio y la técnica de extracción; el porcentaje restante en peso, estuvo constituido entre un 63 y un 72 % por quitina y entre un 28 y un 36 % por proteínas. Estos valores concuerdan con los obtenidos por Lafon (1941, 1943 y 1948) y Drech & Lafon (1942). Por otra parte, Voss-Foucart & Jeuniaux (1978) encontraron que la tasa de mineralización de la capa principal o endocutícula del caparazón de *Homarus vulgaris*, *Nephrops norvegicus*, *Scyllarus arctus* y *Callinassa subterranea* era bastante constante y se situaba alrededor del 80% del peso; era un poco menor en *Polycheles typhlops* mientras que *Xantho floridus* estaba más mineralizado. La fracción proteica representó entre un 7 y un 14 % de la capa principal descalcificada pero fué mucho más variable en la capa membranosa; la quitina constituyó entre un 53 y un 67 % del peso de la misma. Welinder (1975b) encontró que, en *Cancer pagurus*, la quitina constituye el 34 % y el 73% en peso de los compuestos orgánicos de la exo y la endocutícula respectivamente. Austin et al.

1981 describieron la composición de la cutícula de los siguientes crustáceos: *Callinectes sapidus*, *Menippe mercenaria*, *Geryon quinquedon* y *Artemia salina*, en cuanto a las proporciones de quitina y proteínas. Así, en los tres Brachyura, las proteínas totales variaron entre un 12.3 y un 16.4 % del peso seco; entre un 3.1 y un 5.7% del mismo correspondió a aquellas que estaban unidas covalentemente a la quitina; esta última osciló entre 14.9 y 27.2 %.

Algunos autores diferencian entre dos tipos de proteínas no covalentemente ligadas a la quitina, según se extraigan con EDTA 15 % o con urea 7 M (Austin et al., 1981). Hackman & Goldberg (1958) encontraron que no era posible diferenciar las proteínas de la cutícula de la larva del coleóptero *Agrianome spinicollis* extraídas con ambos solventes y propusieron que, probablemente, aún las proteínas unidas en forma covalente a la quitina serían estructuralmente semejantes a las que no lo están. (Hackman y Goldberg, 1976).

La composición química de la cutícula de los crustáceos varía a lo largo de un ciclo de muda. La quitina se deposita principalmente luego de la muda. En *Callinectes sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982) su masa aumenta 4 veces en los 10 primeros días luego de la muda, llegando a un 11.4% del peso seco de la cutícula; en *Astacus fluviatilis* lo hace 2.1 veces en 14 días (Welinder, 1975a).

Existe una considerable divergencia en cuanto al momento en que comienza la deposición de sales en los crustáceos que acaban de mudar. El calcio comienza a depositarse desde 5 minutos hasta 2 días después de la muda en diferentes especies, aunque parte de estas variaciones pueda deberse a la sensibilidad de los métodos de detección (Vigh & Dendinger, 1982).

La mayor parte de la información existente consigna que, en los crustáceos,

las sales minerales se depositan durante un tiempo relativamente corto luego de la ecdisis. Se han citado tiempos de 12, 24 y 48 horas para que el porcentaje en peso de calcio en caparazones en postmuda se mantenga constante en *Penaeus californiensis* (Huner et al., 1976), *A. fluvialitis* (Welinder, 1975a) y *C. sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982) respectivamente. Sin embargo, en el último caso se sostiene que, dado que el contenido de quitina y proteínas de la cutícula sigue aumentando hasta los 10 días, la cantidad absoluta de calcio por mm^2 de cutícula queda enmascarada aunque continúa incrementándose. Drach & Lafon (1942) también concluyeron que la calcificación tiene lugar muy rápidamente después de la muda: en *Cancer pagurus* el porcentaje de sales de calcio en la cutícula 6 horas después de la muda fue del 20.4%, el correspondiente a las 48 horas fue del 73.7% y el final del 87.2 %.

En *C. sapidus* se verificó un aumento de 2.5 veces la cantidad total de proteínas desde la muda hasta 10 días más tarde, lo que indica que la mayor parte de las proteínas de la cutícula de este cangrejo se sintetizan durante la postmuda (Vigh & Dendinger, 1982). Estos resultados no concuerdan con los de Welinder (1975a) quien sostiene que en *A. fluvialitis* sólo una pequeña cantidad de proteínas se sintetiza luego de la muda. Por otro lado, Drach & Lafon (1942) encontraron que existían más proteínas que quitina en las cutículas blandas de *C. pagurus*; esta relación se invertía cuando se completaba el endurecimiento del exoesqueleto, pero probablemente ambos componentes se sintetizaran durante la postmuda. En *C. sapidus* se depositan, durante la premuda, primeramente proteínas que se pueden extraer con NaOH (unidas covalentemente) y más tarde otras que se pueden extraer con HCl (unidas por medio de puentes salinos) que pasarán luego a ser las dominantes (Vigh & Dendinger, 1982).

Síntesis de componentes cuticulares. Los probables caminos metabólicos que conducen a la síntesis de quitina por el tegumento de los crustáceos han sido estudiados a través de dos metodologías diferentes: la incorporación de precursores radiactivos *in vivo* e *in vitro*. Se demostró la síntesis de quitina *in vivo* inyectando [^{14}C]-glucosa como precursor y recobrando la radiactividad en la quitina en *Hemigrapsus nudus* y en *Cancer magister* (Hu, 1958; Meenakshi & Scheer, 1961). En ambos casos la mayor incorporación de ^{14}C tenía lugar después de la ecdisis; antes de dicho evento, la incorporación era mucho menor, y nula en la intermuda. Hornung & Stevenson (1971) demostraron que en la cutícula de *Orconectes obscurus*, la incorporación de [^{14}C]-glucosa a quitina ocurre durante todo el ciclo de muda pero comienza a aumentar significativamente en los últimos momentos de la premuda para alcanzar un máximo poco después de la muda. Stevenson (1972) observó que la síntesis de quitina era constante durante el subestado A de la postmuda de *O. obscurus* pero mucho mayor durante el subestado B. En *Astacus fluviatilis* la deposición de quitina en el caparazón fué máxima en el segundo día después de la muda (Welinder, 1975a).

Sin embargo, se ha demostrado que la quitina se sintetiza durante todo el ciclo de muda de los crustáceos, incluso en el viejo caparazón a punto de ser eliminado (Gwinn & Stevenson, 1973). Parece posible que existan dos vías diferentes que conducen a la síntesis del polisacárido (Stevenson, 1985): durante la postmuda la glucosa movilizada a partir de los tejidos de reserva proporciona las unidades de azúcar, previa transformación en N-acetilglucosamina-6-fosfato; durante la premuda dichas unidades son provistas por la N-acetilglucosamina y por la glucosamina provenientes de la degradación del viejo caparazón. En efecto, Gwinn & Stevenson (1973) demostraron que la incorporación de [^{14}C]-N-acetilglucosamina a la quitina

presente en el exoesqueleto de *O. obscurus* también tenía lugar a lo largo del ciclo de muda pero comenzaba antes en la premuda y, durante ese estadio, alcanzaba valores mucho mayores que los reportados previamente para la incorporación de [¹⁴C]-glucosa (Hornung & Stevenson, 1971).

Por medio de la segunda metodología, ha sido posible demostrar en distintos crustáceos la síntesis de quitina por sistemas libres de células a partir de UDP-N-acetil glucosamina (Carey, 1965; Honhnke, 1971; Horst, 1981a). Recientemente, se comprobó la participación de poliprenoles como intermediarios en dicha biosíntesis (Horst, 1981 b).

La síntesis de proteínas por la epidermis se verificó, a partir de ensayos *in vivo*, en diferentes estadios del ciclo de muda de *Gecarcinus lateralis* (Skinner, 1966), *Orconectes virilis*, (McWhinnie & Mohrherr, 1970) y *O. sanborni* (Humphreys & Stevenson, 1973). En estos casos la síntesis de proteínas por las células de la epidermis fué baja en la premuda temprana, alcanzó un pico en la premuda tardía, en coincidencia con el comienzo de la síntesis de la nueva cutícula, y pareció caer luego marcadamente. Esto último se interpretó como debido a una intensa exportación de las proteínas recientemente sintetizadas con rumbo a la cutícula en formación (Stevenson, 1985).

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS

1.- Estudio de la estructura y el ciclo de vida de una población natural de *Cyrtograpsus angulatus* organización espacial, épocas de reproducción e incorporación de juveniles; crecimiento.

2.- Establecimiento de la estrategia de crecimiento; evaluación de las variaciones de los "factores de crecimiento" (IMP y PIBS) con el tamaño; estudio de otros factores que afectan a la muda.

3.- Estudio del crecimiento relativo; determinación de los tamaños en que se alcanza la madurez sexual.

4.- Evaluación de una posible sincronización de las mudas en la población natural.

5.- Estudio morfológico y anatómico del proceso de regeneración de apéndices.

6.- Estudio de las relaciones entre la regeneración simple y múltiple y la muda; determinación del "período crítico" y de la duración de la proecdisis.

7.- Estudio de las variaciones del peso seco de la cutícula a lo largo de un ciclo de muda; propuesta de modelos cuantitativos que las describan.

8.- Análisis de la composición química de la cutícula y sus variaciones durante un ciclo de muda.

9.- Estudio de procesos biosintéticos de la cutícula: quitina y proteínas.

MATERIALES Y METODOS

Area de estudios. Se trabajó con una población de *Cyrtograpsus angulatus* que habita en una playa rocosa en el puerto de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, República Argentina (lat. 38 ° 03 ' S ; long. 57 ° 33 ' W). Las observaciones y recolección del material biológico se realizaron siempre durante las bajas mareas.

Estudio de la población natural. Desde 1981 se realizaron observaciones no sistemáticas sobre la población de *Cyrtograpsus angulatus* del puerto de Mar del Plata. Ejemplares de ambos sexos, predominantemente juveniles, se hallan formando densos grupos bajo pequeñas rocas ubicadas en la zona intertidal. En consecuencia, los cangrejos quedan expuestos al aire durante las bajas mareas.

Se efectuaron muestreos mensuales entre enero y diciembre de 1985. En cada oportunidad se recolectaron todos los individuos presentes sobre la misma área de playa, de los cuales se registró: sexo, estado de madurez, grado de consistencia del exoesqueleto y ancho máximo del caparazón, medido con un calibre. El número de individuos en cada muestra osciló entre 235 y 661, con un promedio de 404. Los datos de cada mes fueron agrupados en intervalos de 0.5 mm de ancho del caparazón y con ellos se construyeron histogramas de frecuencias. Las modas de esos histogramas se calcularon usando papel de probabilidad, según el método de Cassie (1950). Se trazó una curva de frecuencias acumulativas para cada sexo y para cada muestreo. A partir

de dichas curvas, que no se incluyen en esta Tesis, se obtuvieron gráficamente los valores modales y sus desviaciones standard. Durante los meses de febrero y marzo se realizaron muestreos semanales, procediéndose de la misma manera. Los datos diarios de la temperatura del agua de mar y del aire durante 1985 fueron obtenidos, a las 8 y a las 18 horas, por la estación mareográfica de Mar del Plata; se calcularon a partir de ellos los promedios mensuales (Figura 5).

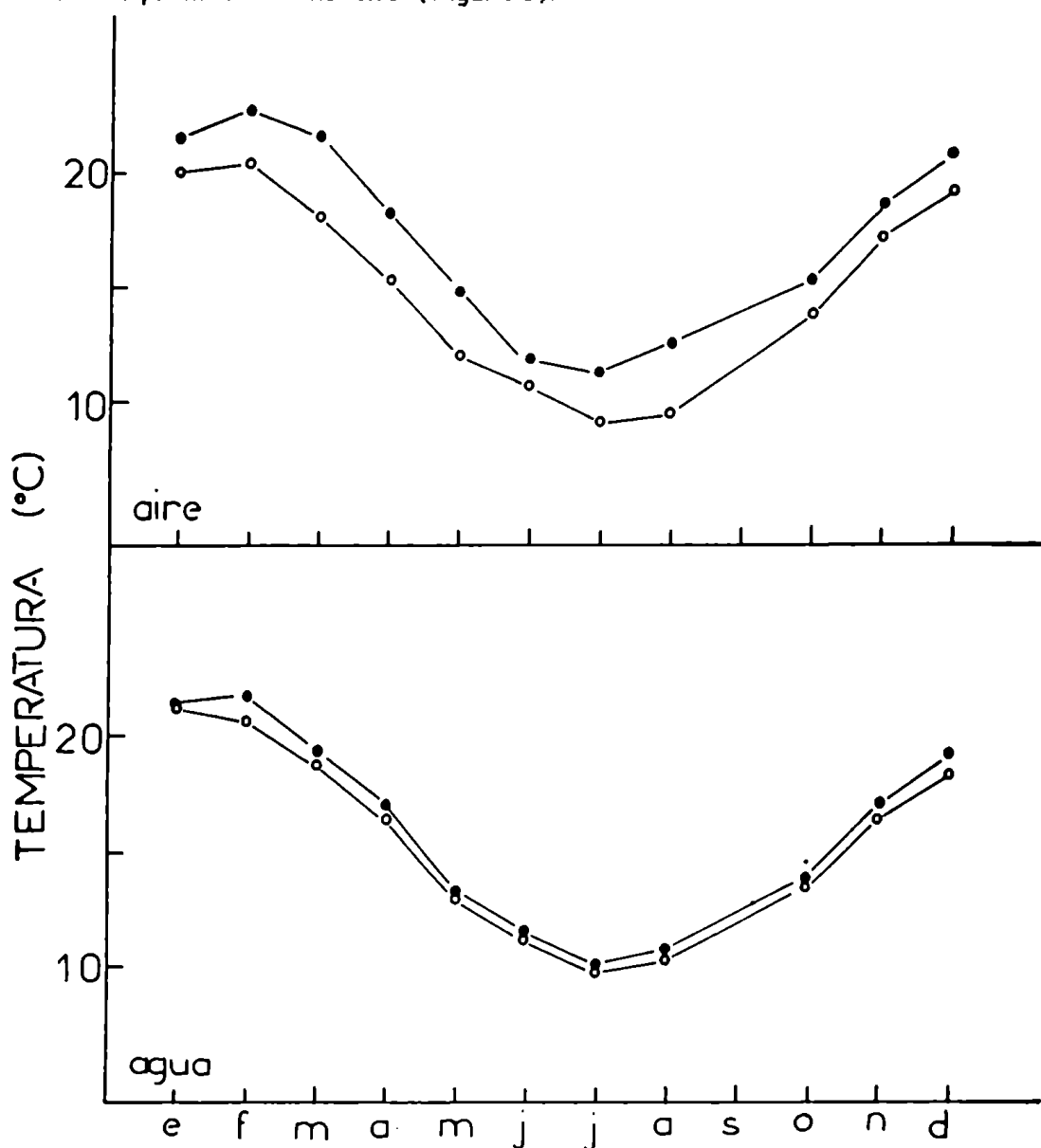


Figura 5.- Variaciones de la temperatura del agua y del aire a las 8 (círculos vacíos) y 18 horas (círculos llenos) en Mar del Plata durante 1985.

Obtención del material biológico y mantenimiento en laboratorio. Los cangrejos fueron recolectados en su ambiente natural. Desde su llegada al laboratorio, todos los especímenes fueron ubicados en acuarios compartimentalizados debido al alto grado de canibalismo observado, el que afecta especialmente a los ejemplares recién mudados. Los compartimentos son recipientes de polietileno de 10 cm de diámetro y 25 cm de altura, perforados para que el agua circule libremente entre y dentro de los mismos. Están dispuestos en número de 20 a 30 en acuarios de PVC, llenos con agua de mar obtenida en la costa de Mar del Plata, permanentemente aerada y mantenida a una temperatura constante de 25 ± 1 °C, hasta una altura de 20 cm. Los acuarios pudieron someterse a cuatro fotoperíodos diferentes: 24 horas diarias de luz artificial (tubos fluorescentes Sylvania FL 40SBR), 16 horas de luz y 8 de oscuridad, 8 horas de luz y 16 de oscuridad y 24 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados diariamente con pequeñas piezas de camarón (*Artemesia longinaris*) o isópodos marinos (*Sphaeroma sp.*), tomándose la precaución de no dejar el alimento por más de media hora y retirando los restos no utilizados. Con la misma frecuencia se registraron los compartimentos con el fin de detectar la presencia de animales recién mudados y de exuvias.

Muda y crecimiento. Para cada espécimen que mudó en el laboratorio se calculó el aumento porcentual de tamaño en cada muda:

$$PIBS = (Wi_a - Wi_b) \cdot 100 / Wi$$

donde Wi_a y Wi_b son el ancho máximo del caparazón después y antes de la muda.

Esos valores fueron obtenidos midiendo la distancia entre los dientes anterolaterales

del caparazón (Figura 1) mediante un calibre. En aquellos animales que mudaron dos o más veces, se calculó el tiempo transcurrido entre cada dos mudas o período intermudas (IMP). Se calcularon las relaciones entre los logaritmos de PIBS e IMP y el ancho del caparazón.

Crecimiento relativo. Se midieron el ancho máximo del caparazón, el largo del *propodus* del primer pereiópodo y el ancho del segundo segmento abdominal de 150 ejemplares machos, 150 ejemplares hembras y 15 ejemplares pequeños cuyo sexo no pudo ser establecido; también se midió el largo del primer pleópodo de 100 ejemplares machos (Figura 1). Se utilizó un calibre o un estereomicroscopio equipado con ocular micrométrico, de acuerdo al tamaño del animal. Siempre que ello fue posible, los ejemplares se disecaron anotándose la presencia o ausencia de órganos reproductivos. De esta manera, los datos pudieron clasificarse en cinco grupos: machos y hembras, inmaduros y maduros, e indiferenciados. Los valores obtenidos, transformados en logaritmos, fueron utilizados para obtener las correspondientes ecuaciones de alometría.

Sincronización de mudas. A lo largo de 1985, se recolectaron muestras semanales de entre 40 y 80 cangrejos los que, llevados al laboratorio, fueron mantenidos en acuarios compartimentalizados y alimentados como se indica más arriba. Durante los 15 días posteriores a cada muestreo se anotaron diariamente las mudas observadas. Los datos de mareas fueron obtenidos de tablas, representándose los valores más bajos de cada día en función del tiempo y calculándose el promedio

mensual de las bajas mareas. Al unir dichos valores promedio se obtuvo una curva anual que permite distinguir las menores y mayores bajamares (aquellas que están por debajo y por encima del promedio), técnica usada por Reaka (1976). Se anotaron las fechas de las distintas fases lunares, dividiéndose cada ciclo lunar en cuatro intervalos con centro en cada una de dichas fases.

Regeneración de apéndices. Las variaciones morfológicas de los apéndices en regeneración que tienen lugar a lo largo de un ciclo de muda fueron estudiadas mediante la observación de ejemplares bajo un estereomicroscopio. Algunos de ellos fueron fijados en solución de Bouin y se obtuvieron cortes histológicos de los muñones en distintas etapas del proceso de cicatrización y regeneración. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina, observados y fotografiados bajo distintos aumentos.

Relaciones entre ciclo de muda y regeneración. La amputación de uno o más apéndices se obtuvo presionando el meropodito con una pinza, lo cual provoca el reflejo de la autotomía; ello fue hecho inmediatamente luego de mudar o en otros momentos del ciclo de muda. Se efectuaron los siguientes tratamientos:

- amputación de 1, 2, 4 y 6 apéndices inmediatamente después de la muda,
- amputación de 2 o 4 apéndices inmediatamente después de la muda y de otros 2, cuando los primeros alcanzaron valores de R_4 de 12, 14 o 16,
- amputación de 1 apéndice a los 7, 14 o 21 días después de la muda,
- amputación de 1 apéndice por semana, hasta un total de cuatro.

Los animales tratados, al igual que controles sin amputar, se mantuvieron en acuarios compartimentalizados; se los alimentó día por medio y se midió la longitud de sus muñones de regeneración con la misma frecuencia o a diario, bajo un estereomicroscopio Bausch & Lomb equipado con ocular micrométrico (magnificación = 10 X). Se calcularon así los valores del índice de regeneración:

$$R = \text{largo del muñón} \cdot 100 / \text{ancho del caparazón},$$

que fueron representados en función del tiempo, primero en forma absoluta y luego en forma relativa, considerando como 100% al tiempo transcurrido entre muda y muda o período intermuda (IMP): se trata de las curvas de R individuales. Éstas fueron utilizadas para establecer el número y la duración de las etapas en las que se pudiera dividir el proceso de la regeneración y no se incluyen en esta Tesis salvo las presentadas, a modo de ejemplo, en la figura 28. El subíndice de R (1 a 5) expresa, en cada caso, el período amputado. Con el fin de obtener curvas de R promedio para cada condición experimental, se tomaron las curvas individuales representadas en forma relativa y se dividieron los períodos intermuda en 10 intervalos. Los valores de R de cada curva individual al fin de cada intervalo (cada 10% del período intermuda) fueron hallados gráficamente y luego promediados (el número de individuos usado en cada experimento nunca fue menor de 6 ni mayor de 10). En algunas ocasiones, cuando la amputación fue muy posterior a la muda, las curvas promedio fueron recalculadas, considerando como 100% al tiempo transcurrido entre la amputación y la muda (AMP). Los valores de la velocidad de crecimiento del muñón fueron estimados en forma aproximada a partir de la pendiente de las curvas promedio

y se expresaron como la variación de R cada 10% del IMP o del AMP (\underline{VR}). Los valores del IMP y del incremento porcentual de tamaño en cada muda (PIBS) obtenidos en cada animal estudiado fueron promediados para cada condición experimental.

Estructura del caparazón cefalotorácico. Se sacrificaron cangrejos a distintos tiempos luego de la muda (0, 25, 50, 100, 125 y 250 horas) por congelamiento a $- 20^{\circ}\text{C}$. Se midió el ancho de sus caparazones, los cuales fueron luego cuidadosamente disecados separando todos los tejidos adheridos, secados a 100°C durante 24 horas y pesados en una balanza Mettler H 54 con una precisión de 0.01 mg. Las exuvias provenientes de los ejemplares sacrificados no más de una hora después de mudar fueron conservadas y su ancho y su peso seco fueron registrados. Los logaritmos del peso seco y del ancho del caparazón fueron relacionados por funciones lineales. Animales recolectados en el estadio proecdisial fueron muertos inmediatamente y medidos. Sus caparazones fueron disecados, separando si era posible el nuevo y el viejo; luego fueron secados y pesados en forma separada. En los ejemplares que presentaron muñones de regeneración, se midió la longitud de los mismos y se calculó R. Se calcularon las relaciones entre el peso seco del nuevo caparazón y R; entre los pesos secos del nuevo y del viejo caparazón y entre la razón de ambos pesos y el ancho del caparazón.

Composición química de la cutícula. Caparazones de cangrejos en intermuda, postmuda y premuda (viejos y nuevos) fueron disecados, medidos, secados hasta peso constante y pesados. Luego fueron sometidos a una extracción secuencial, por medio de

la siguiente serie de solventes

EDTA 15% , 24 horas a temperatura ambiente

Urea 7 M , 72 horas a temperatura ambiente

NaOH 0.1 N , 24 horas a 30 °C

NaOH 1 N, 6 horas a 100 °C

Luego de cada extracción el caparazón, que nunca pierde su forma original, fué lavado, secado y pesado. El material solubilizado fué dializado contra agua destilada, concentrado por liofilización y resuspendido en agua destilada o NaOH 0.01 N. Las proteínas presentes se midieron por el método de Lowry (1951). El material que permaneció, formando el caparazón, luego de la extracción con álcali caliente fué considerado como quitina.

En otros ejemplares se determinó el peso de las cenizas de caparazones previamente disecados, secados y pesados, y colocados en un horno a 550 °C durante 6 horas. Ese peso fué considerado como una medida de la cantidad de sales minerales presentes.

Incorporación de precursores radiactivos a macromoléculas de la cutícula Se inyectaron las siguientes soluciones radiactivas a través de la membrana que une el caparazón y el abdomen de cangrejos en distintos momentos del ciclo de muda:

[¹⁴C]- glucosa 5 mM (6 mCi/mmol)

[³H]- glucosa 5 mM (10 mCi/mmol)

[¹⁴C]- leucina 5 mM (6 mCi/mmol)

Estas soluciones se prepararon a partir de material radiactivo suministrado por The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra, y fueron inyectadas en cangrejos previamente anestesiados por inmersión en agua de mar a 4 °C por medio de una jeringa Hamilton con una capacidad máxima de 50 μ l. La dosis fue de 10 μ l por gramo de peso fresco del animal o de 1 μ l por mm de ancho del caparazón. Los animales inyectados eran vueltos a colocar en acuarios y sacrificados por congelamiento a tiempos variables luego de la inyección.

Los cangrejos inyectados fueron luego sometidos a distintos tratamientos; en una primera experiencia fueron homogeneizados enteros, por medio de un mortero, procediéndose luego a una extracción secuencial con distintos solventes, que dió origen a las siguientes fracciones:

a) soluble en cloroformo-metanol (2:1)	4 °C
b) soluble en cloroformo-metanol-agua (10:10:3)	4 °C
c) soluble en Tris HCl 100 mM	4 °C
d) soluble en NaOH 0.1 N	4 °C
e) soluble en NaOH 2 N	100 °C
f) insoluble en NaOH 2 N	100 °C

El material solubilizado en cada una de estas fracciones fue separado: en a) y b) por evaporación, en c), d) y e) por diálisis y liofilización. El material insoluble en álcali caliente fue lavado con alcohol 66 % y 100 %, secado y pesado. En cada caso

se intentó la identificación de los compuestos marcados radiactivamente y también se midió la radiactividad por medio de un contador de centelleo líquido Beckman LS 7000 . Para efectuar esto último, las muestras provenientes de solventes orgánicos se disolvieron en una mezcla de centelleo constituida por PPO (4 g/l) y POPOP (0.3 g/l) ; en esa misma mezcla se colocaron las muestras formadas por residuos sólidos. Las muestras provenientes de solventes acuosos se disolvieron en una mezcla que también contenía Tritón X 100 (33 % v/v).

En una segunda experiencia, los caparazones de los cangrejos inyectados fueron disecados, secados, pesados y luego sometidos a una extracción secuencial con EDTA 15 %, Urea 7 M e HONa (0.1 y 1 N) tal como se indica más arriba. Luego de cada extracción, el material remanente -lavado con agua destilada y secado- y el material extraído -dializado y concentrado- fueron sometidos a una medición de la radiactividad.

Identificación de compuestos marcados radiactivamente. La identificación de compuestos con marca radiactiva se intentó por medio de las siguientes técnicas por separado o combinadas:

a) hidrólisis ácida total: la muestra se disolvió con HCl 11 N a 0 °C, llevandola luego durante 6 horas a 40 °C. Se neutralizó con Amberlite IR 4B (OH) y se liofilizó, los productos fueron sometidos a cromatografía y/o electroforesis en papel.

b) hidrólisis parcial: la muestra se disolvió con HCl 11 N a 0 °C, llevandola

luego durante 2 horas a 40 °C. Se neutralizó con NaOH 40 % y se cromatografió.

c) desacetilación: la muestra se trató con NaOH 40 % durante 6 horas a 115 °C, luego se hidrolizó como en a) o en b).

e) hidrólisis enzimática: se utilizó quitinasa de *Streptomyces griseus* (3.1 U/mg) provista por Sigma Chemical Co., previamente se demostró la ausencia de glicosidasas contaminantes incubándola con paranitrofenil derivados. La muestra se incubó en un buffer McIlvaine, pH 6, a 30 °C, con una suspensión de enzima cuya concentración inicial fué de 10 mg/ml, durante 72 o 96 horas. A diferentes períodos se extrajeron muestras y se repusieron volúmenes iguales de suspensión. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos, durante unos instantes, en agua hirviendo. Las alícuotas extraídas fueron centrifugadas y se midió la radiactividad en el sobrenadante y en el precipitado. El sobrenadante final fué cromatografiado en papel.

f) cromatografía en papel: se utilizó papel Whatman n° 1 y los siguientes solventes:

n-butanol-piridina-agua-ácido acético	(4-3-4-0.3 v/v)
n-butanol-piridina-agua	(4-3-4 v/v)
acetato de etilo-piridina-agua	(8-2-1 v/v)

Se utilizaron como patrones para la determinación de azúcares, las siguientes soluciones: xilosa, arabinosa, glucosa, manosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, N-acetil glucosamina, trehalosa y maltosa (en todos los casos, 100 mM), las que se revelaron con reactivo de plata (Litwack, 1960). La radiactividad en los cromatogramas se detectó con un contador proporcional para cromatografía en papel

Berthold LB 280.

g) electroforesis en papel: se utilizó papel 3MM, con ácido fórmico 5 % durante 60 minutos a 1000 V. Se revelaron los standards como en el caso anterior; de igual forma se procedió en la detección de la radiactividad.

ESTRUCTURA Y VARIACION ANUAL DE LA POBLACION EN ESTUDIO.

Resultados. El porcentaje de individuos mayores de 20 mm de ancho del caparazón que comparte el habitat con los más pequeños no excedió, entre febrero y diciembre de 1985, el 2.0 % en los machos y el 4.0 % en las hembras, con promedios de 0.75 % y 1.20 % respectivamente. En enero de ese año, los porcentajes correspondientes fueron de 9.5 % y 8.0 %. Aparentemente, los cangrejos de tallas superiores suelen localizarse en aguas más profundas, donde no son sometidos a periódicas exondaciones. Por lo tanto, el estudio cuantitativo de la población se efectuó sobre la parte de la misma compuesta principalmente por juveniles. La proporción de sexos en las muestras osciló alrededor del 50 %.

Los histogramas mensuales de frecuencias de tallas presentan, durante todo el año, una distribución polimodal, no se observan diferencias marcadas entre machos y hembras, y las modas se van desplazando continuamente hacia tallas mayores a medida que transcurren el tiempo (Figuras 6 y 7). De acuerdo con estas observaciones, el crecimiento de esta especie -dentro de los tamaños aquí considerados- parece ser continuo en ambos sexos. Durante los meses de enero a marzo se detecta la presencia de ejemplares de muy pequeña talla (menos de 4 mm de ancho del caparazón) incluyendo muchos que no presentan evidencias externas que permitan establecer su sexo. Es probable que la incidencia de estos ejemplares pequeños en la composición de la población sea subestimada ya que su tamaño hace que puedan pasar desapercibidos ocultos en oquedades del substrato o en conchillas vacías de cirripedios. Entre abril y agosto se siguen observando hembras menores de 6 mm de ancho; en los machos esto

sólo ocurre entre abril y junio. A partir del mes de agosto se registra un continuo desplazamiento de la distribución de frecuencias de tallas hacia valores más altos.

Las distribuciones, analizadas mediante el uso de papel de probabilidad, presentan varias modas que se grafican en función del tiempo en las figuras 8 y 9. El desplazamiento de las modas a lo largo del año se observa aquí claramente. Las modas fueron unidas en forma tentativa con líneas, de modo de obtener una representación del crecimiento registrado mes a mes. Resulta evidente que las curvas ofrecen una versión simplificada del crecimiento de las dimensiones externas, puesto que no se tiene en cuenta la naturaleza discontinua del mismo. Así se observa que los ejemplares de sexo masculino que poseen un ancho promedio de 4.6 mm en enero, crecen con una velocidad constante hasta el mes de setiembre, que se puede estimar en 0.5 a 0.7 mm diarios. A partir de entonces, habiendo alcanzado en promedio un ancho de 16.5 mm, su velocidad disminuye a 0.3 mm diarios (Fig. 8). Ejemplares cuyo promedio en abril es de 5.4 mm, alcanzan 15 mm en octubre, para luego disminuir el ritmo de crecimiento. Por otro lado, hembras cuyo ancho promedio en enero era de 4.2 mm o en marzo de 5.1 mm, podrían alcanzar 17.5 mm en noviembre (Figura 9).

Durante los meses de verano y principios del otoño las ocasionales hembras adultas que se recolectaron llevaban larvas bajo su abdomen, en diferentes estadios de desarrollo embrionario (hembras ovígeras). Algunas de ellas, llevadas al laboratorio, dieron lugar a una camada de larvas nadadoras y, al poco tiempo, presentaban nuevamente huevos en la cámara de incubación. Durante el resto del año, se encontraron también hembras ovígeras; en todos los casos, llevaban embriones en el estadio que precede a la eclosión. Nunca se observaron mudas en hembras con embriones en su cámara incubadora.

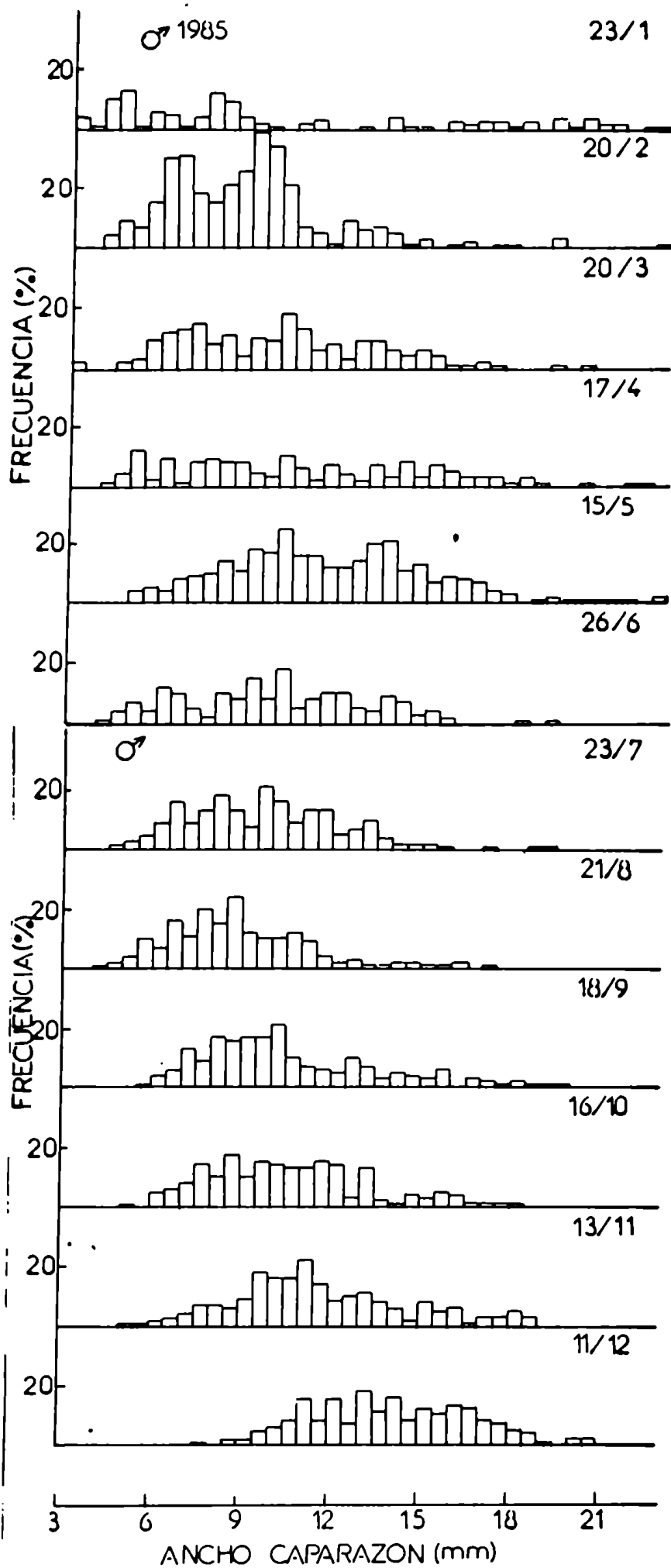


Figura 6.- Histogramas mensuales de frecuencias de tallas (ancho del caparazón) de *Cyrtograpsus angulatus* machos, durante 1985.

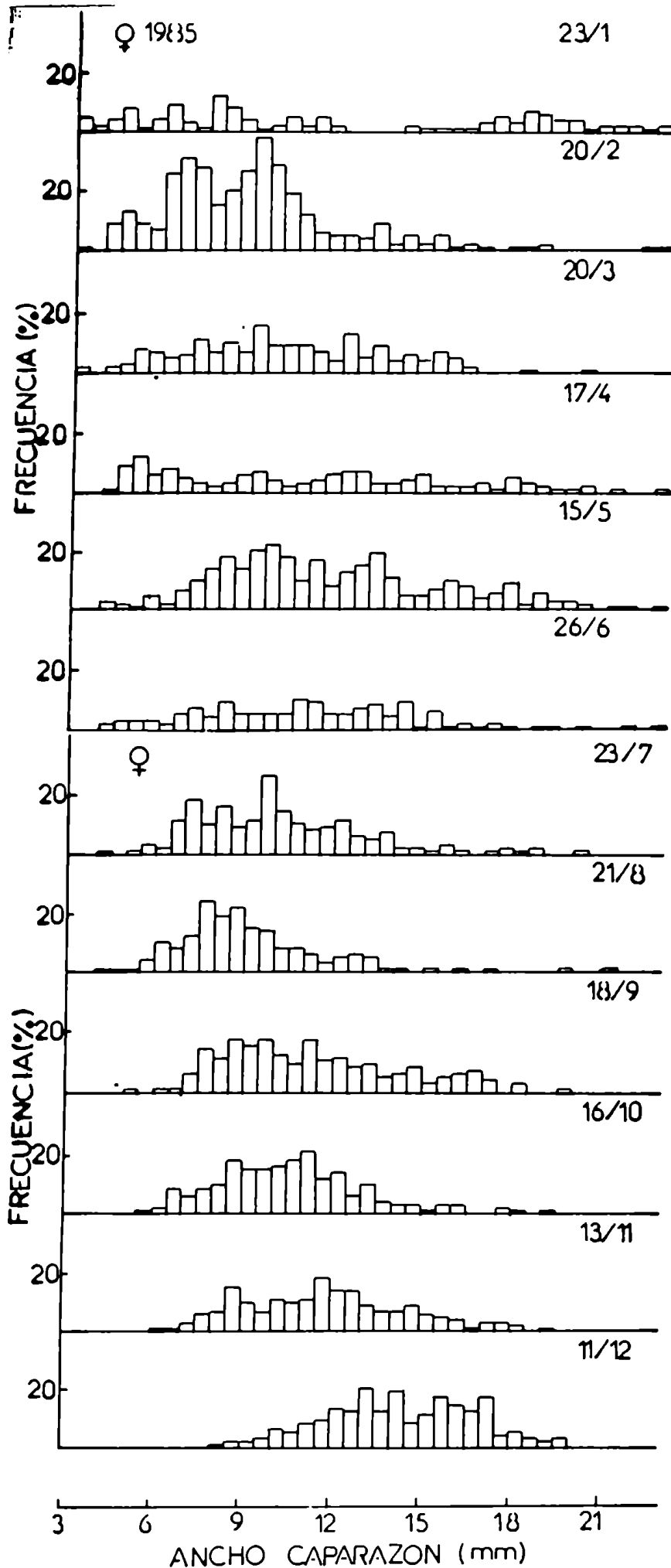


Figura 7.- Histogramas mensuales de frecuencias de tallas (ancho del caparazón) de *Cyrtograpsus angulatus*, hembras, durante 1985.

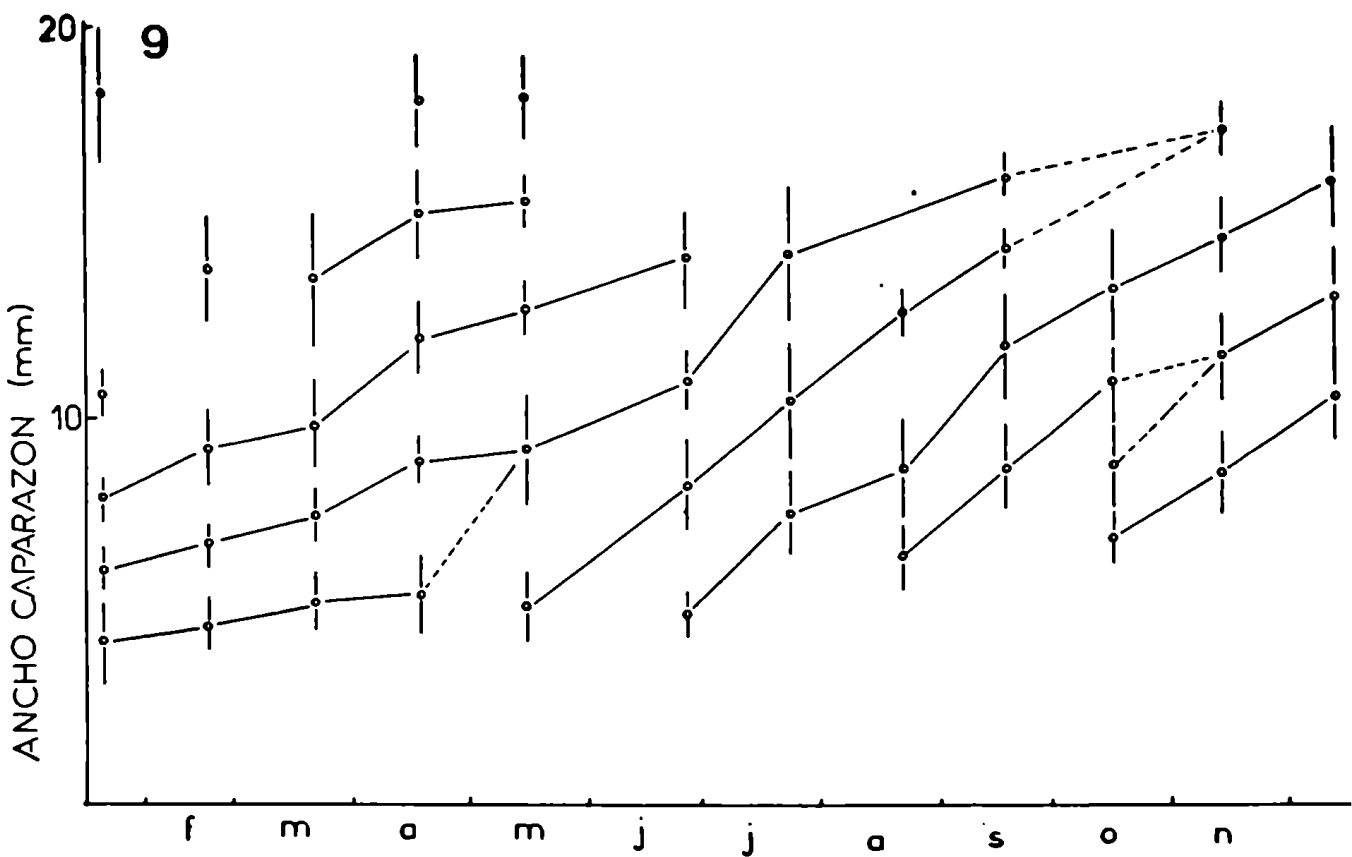
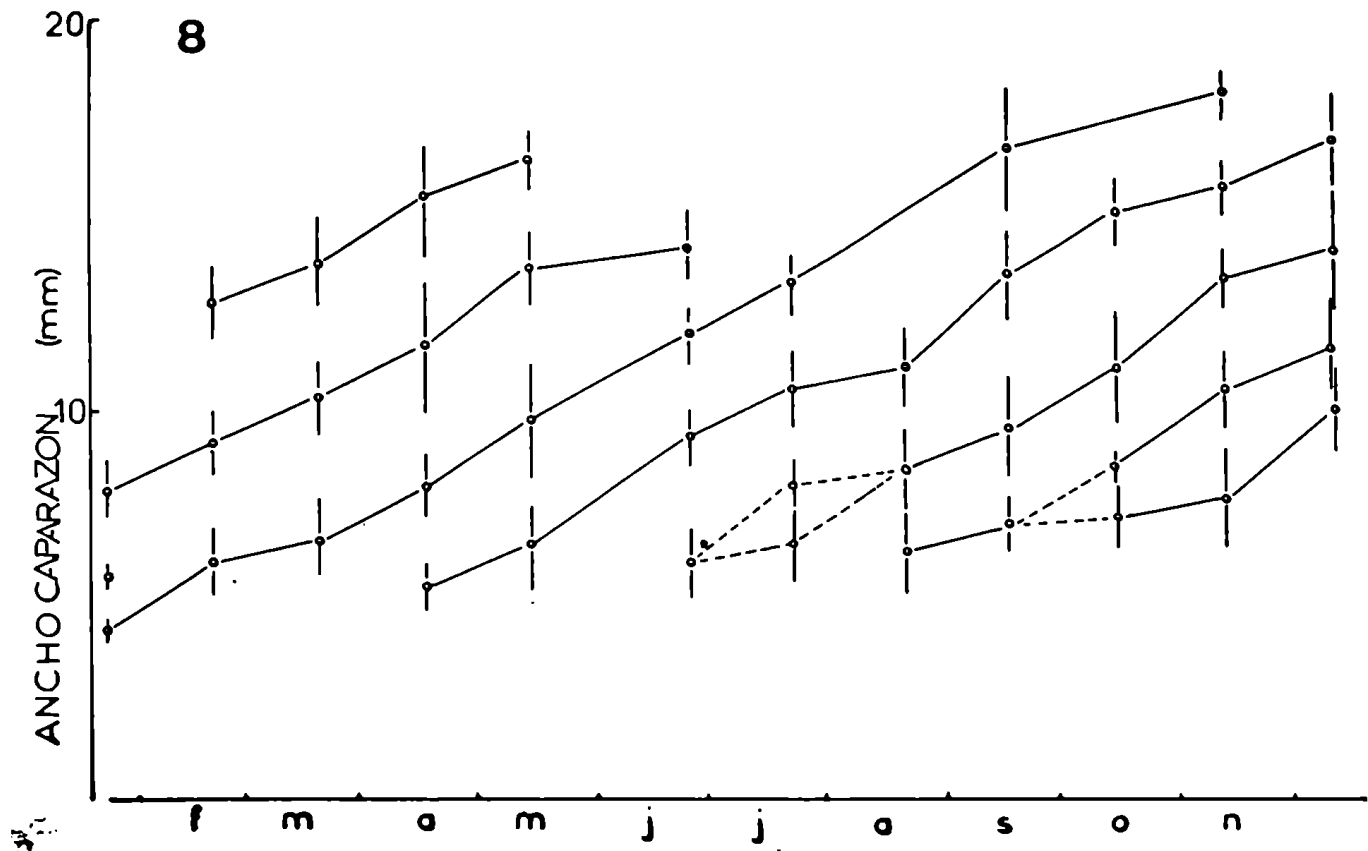


Figura 8.- Valores modales de las distribuciones mensuales de frecuencias de tallas de *Cyrtograpsus angulatus* calculados por el método de Cassie (1950) y su probable evolución en 1985. Machos.
Figura 9.- Idem figura 8. Hembras.

Discusión. La población de *Cyrtograpsus angulatus* del puerto de Mar del Plata exhibe una segregación por tamaños, al menos durante la bajamar. Desde su incorporación a la misma y hasta que alcanzan su madurez sexual, los individuos pueden hallarse bajo rocas ubicadas en la zona entre mareas. Los animales de mayor tamaño raramente se encuentran fuera de la zona permanentemente cubierta por las aguas. Estas mismas características se presentan en uno de los cangrejos más comunes de las costas europeas, *Carcinus maenas*: los individuos se ocultan, cuando la marea desciende, bajo piedras o algas en todos los niveles de la costa pero los mayores tienden a hallarse en los niveles inferiores, en especial en invierno. Los ejemplares totalmente crecidos habitan en el infralitoral (Hogarth, 1983).

No hay evidencias que permitan establecer si la distribución espacial de *C. angulatus* es estable o si se modifica en relación con las condiciones ambientales, entre ellas los ritmos de mareas, tal como ocurre en *C. maenas*. Klein Breteler (1976) señala en esta última especie la existencia de dos tipos de migraciones: algunos individuos se desplazan diariamente, siguiendo el ritmo de las mareas (migración diaria); otros permanecen ocultos bajo rocas durante la bajamar. Sin embargo estos movimientos diarios se reducen o cesan por completo en los meses más fríos, cuando los animales permanecen continuamente sumergidos (migración estacional). Las ocasionales disminuciones en la densidad poblacional de *C. angulatus* en la zona entremareas del puerto de Mar del Plata, observadas a lo largo de estos 5 años, especialmente en invierno, podrían tener su origen en fenómenos de este tipo.

Las características de la segregación por tamaño son algo diferentes en otra

conspicua población de *C. angulatus*, ubicada en las playas arenosas próximas a la desembocadura de la laguna de Mar Chiquita, aproximadamente a 25 Km al norte de Mar del Plata. Los ejemplares pequeños participan de las comunidades asentadas en torno de los "bochones", constituidos por masas de tubos calcáreos del poliqueto serpúlido *Ficopomatus enigmaticus* (Pezzani & Obenat, 1986). Allí encuentran un habitat análogo al de las costas rocosas marplatenses. Los adultos, en cambio, viven muy cerca de la orilla, y pasan mucho tiempo fuera del agua (Boschi, 1964).

Los ejemplares juveniles de ambos sexos mudan y crecen durante todo el año. En este aspecto, *C. angulatus* se diferencia de cangrejos que viven en habitats semejantes y que presentan una definida estación de crecimiento, como *Rhithropanopeus harrisi* (Marchand, 1973a) o *C. maenas* (Klein Breteler, 1975).

El rápido crecimiento que se observa en *C. angulatus* a partir de su incorporación a la población durante el verano parece conducir, en la siguiente primavera, a la adquisición de la madurez sexual. En efecto, en los últimos meses del año los animales alcanzan tamaños de más de 16 mm de ancho del caparazón, que corresponden a ejemplares sexualmente maduros; su ritmo de incremento de tamaño se atenúa a partir de entonces, aunque aún se registran mudas.

La adquisición de la madurez sexual no implica, en *C. angulatus*, una finalización del crecimiento corporal: se observaron cangrejos en postmuda y exuvias en ejemplares mayores de 20 mm de ancho del caparazón, si bien éstos están presentes sólo de una manera ocasional en el sector estudiado. En consecuencia, debido a la ausencia de una aneudisis terminal, el crecimiento de esta especie es del tipo indeterminado (Hartnoll, 1984). Este hecho parece ser común en varias especies de grápsidos: *Cyclograpsus punctatus* (Broekhuysen, 1941), *Hemigrapsus sanguineus*

(Kurata, 1962) y *Pachygrapsus crassipes* (Mauchline, 1976). Estas especies alcanzan anchos máximos del caparazón de 25, 26 y 38 mm respectivamente; *C. angulatus* puede ser más grande habiéndose observado, en Mar Chiquita, machos cuyo ancho superaba los 50 mm.

La incorporación de ejemplares juveniles a la población se presenta en cambio sólo durante los meses cálidos del verano y principios del otoño, cuando la temperatura del agua oscila entre 16°C y 22°C y la temperatura del aire entre 15°C y 21°C. Esto es consecuencia de una actividad reproductiva estacional, al igual que lo que sucede en *C. maenas* en esta especie la cópula ocurre en los meses del verano (Hogarth, 1983). Aún se desconoce el momento de la fecundación en la población de *C. angulatus* del puerto de Mar del Plata; nunca pudieron observarse cangrejos en cópula a lo largo de estos 5 años. En Mar Chiquita se informó, al menos una vez, sobre la aparición de una masiva actividad reproductiva; ello tuvo lugar en marzo de 1961 (Boschi, 1964).

Al igual que otros Brachyura como *R. harrisi* (Morgan et al., 1983) y *Menippe mercenaria* (Cheung, 1968), *C. angulatus* es capaz de múltiples oviposiciones a partir de una sola cópula. Nuestras observaciones y las de Boschi (1964) coinciden en que hay hembras ovígeras durante todo el año; es probable que luego de varias ovoposiciones sucesivas durante el verano, algunas hembras permanezcan ovígeras durante el resto del año, llevando embriones en un estado avanzado del desarrollo. Estos embriones darían origen a la primera camada de cangrejos en la temporada siguiente, quizá en forma anticipada a la nueva estación de reproducción.

CRECIMIENTO Y MUDA

Resultados. Los valores promedio del incremento porcentual de tamaño en cada muda (PIBS) disminuyen cuando el ancho del caparazón (W_{i_b}) aumenta (Tabla II) pero también son afectados por el tiempo transcurrido entre la recolección y la muda. Sin embargo, para una muestra total ($n = 132$; ambos sexos) el logaritmo de PIBS no está significativamente relacionado con W_{i_b} ($r = 0.28$) e incluso una submuestra que incluyó 61 cangrejos que mudaron en el laboratorio hasta dos días más tarde de haber sido recolectados, muestra un coeficiente de correlación lineal de $r = 0.30$. Esto hizo rechazar la suposición que indicaba que se podría obtener una relación lineal entre estas dos variables. Más aún: las diferencias entre los valores medios de PIBS para diferentes clases de tamaño de cangrejos pertenecientes a esta submuestra (Tabla II, primera línea) no son significativas ($P > 5\%$). Sólo cuando la clase de 11-12.9 mm es comparada con las clases de 3-4.9 mm ($P < 2.5\%$), de 5-6.9 mm ($P < 5\%$) y de 7-8.9 mm ($P < 0.5\%$) y cuando la clase de 7-8.9 mm es comparada con la clase de 15-16.9 mm ($P < 1\%$), se encontraron diferencias significativas. También ocurren diferencias significativas cuando se comparan cangrejos de 3-4.9 mm de ancho del caparazón, recolectados entre 0 y 2 días y entre 3 a 5 días antes de la muda ($P < 0.5\%$) y también cuando se comparan cangrejos de 7-8.9 mm y de 9-10.9 mm, recolectados entre 6 y 8 y entre 9 y 14 días antes de la muda ($P < 0.1\%$ y $P < 1\%$ respectivamente).

Tabla II. Valores del porcentaje de incremento de tamaño al mudar (PIBS) para diferentes intervalos entre la recolección de los cangrejos y la muda y para diferentes anchos del caparazón, en *Cyrtograpsus angulatus*, expresado como valor promedio para n ejemplares \pm 1 desviación standard. (ND: no determinado)

Ancho (mm)	Intervalo entre la recolección y la muda (días)				
	0-2	3-5	6-8	9-14	15-22
3-4.9	25.16 \pm 6.09 n=11	18.17 \pm 2.44 n=7	16.74 \pm 1.69 n=9	ND	ND
5-6.9	23.62 \pm 4.42 n=7	21.52 \pm 3.20 n=8	ND	ND	ND
7-8.9	23.75 \pm 2.63 n=9	21.52 \pm 3.79 n=7	19.22 \pm 2.97 n=7	11.67 \pm 2.20 n=6	ND
9-10.9	21.28 \pm 2.25 n=10	20.68 \pm 3.51 n=16	20.28 \pm 3.13 n=14	14.94 \pm 6.06 n=11	ND
11-12.9	19.62 \pm 2.37 n=10	21.33 \pm 2.69 n=15	19.92 \pm 3.26 n=24	18.44 \pm 4.00 n=27	14.21 \pm 2.97 n=4
13-14.9	20.45 \pm 5.58 n=7	20.12 \pm 2.71 n=13	20.47 \pm 3.45 n=15	18.35 \pm 2.97 n=18	ND
15-16.9	18.17 \pm 2.02 n=4	20.48 \pm 2.15 n=11	16.24 \pm 3.83 n=7	16.61 \pm 3.25 n=17	14.13 \pm 2.95 n=5
17-18.9	ND	ND	17.02 \pm 2.46 n=7	17.34 \pm 2.79 n=13	ND

Con el objeto de reducir las posibles fuentes de variación de PIBS entre cangrejos de un ancho de caparazón dado, se decidió clasificar 160 animales, que mudaron hasta 3 días después de la recolección, que no tenían apéndices en regeneración ni signos externos de haber sufrido la muda de pubertad, en varios grupos de tamaño, considerando machos y hembras por separado (Tabla III).

Solamente los cangrejos más grandes (16-18.9 mm) exhibieron diferencias significativas cuando fueron comparados con otros grupos ($P < 0.1\%$). Los valores de PIBS no difirieron significativamente entre machos y hembras.

Tabla III . Porcentaje de incremento en tamaño al mudar en *Cyrtograpsus angulatus*, para cangrejos clasificados de acuerdo con el sexo y el ancho del caparazón, expresado como promedio de n ejemplares \pm la desviación standard.

Ancho (mm)	Porcentaje de incremento en tamaño al mudar			
	Hembras	n	Machos	n
4-6.9	22.40 \pm 3.92	10	24.09 \pm 3.61	11
7-9.9	22.33 \pm 2.68	13	22.02 \pm 2.74	19
10-12.9	20.87 \pm 3.03	26	20.34 \pm 2.87	25
13-15.9	21.58 \pm 2.63	20	21.05 \pm 1.93	13
16-18.9	17.99 \pm 3.57	15	16.01 \pm 2.72	6

Cuando se consideraron las variaciones de la duración del período intermudas (IMP) que tienen lugar con el tamaño de animal, se encontró que el logaritmo de IMP (Figura 10) se correlacionaba linealmente con el ancho del animal (W_{iD}). Para 66 cangrejos, cuyos W_{iD} variaron entre 8 y 18 mm de ancho y que mudaron dos veces en el laboratorio, los valores de IMP oscilaron entre 20 y 66 días y se estableció la siguiente relación:

$$\log \text{IMP} = 1.058 + 0.038 \cdot W_{iD} ; r = 0.68 \quad (P < 0.1 \%) \quad (1)$$

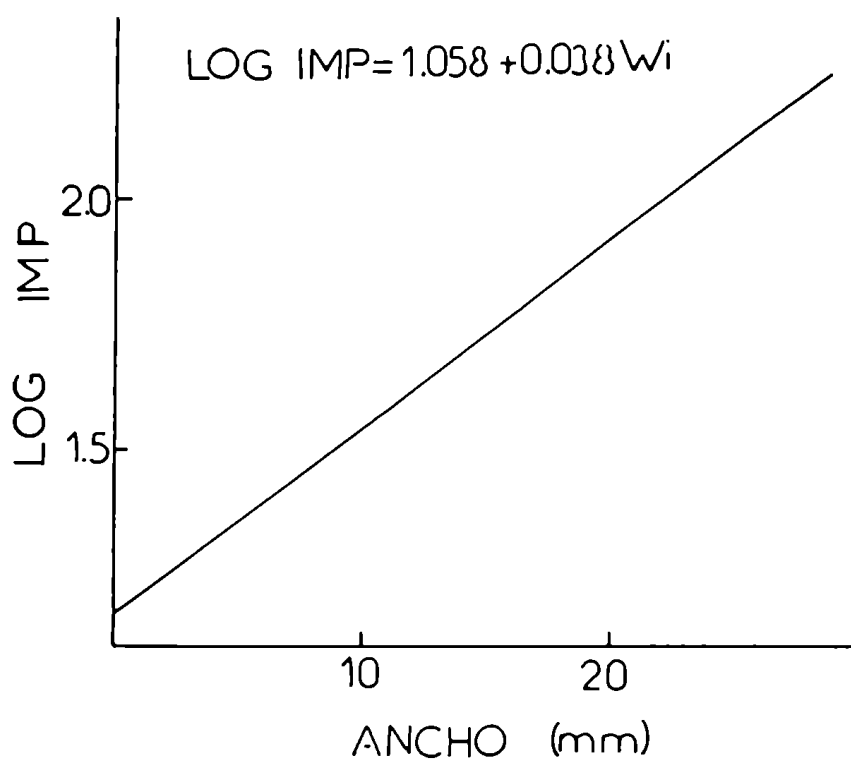


Figura 10.- Variaciones del período intermuda de *Cyrtograpsus angulatus* en función del tamaño (ancho del caparazón).

Un reducido número de ejemplares fue mantenido en el laboratorio hasta obtener una tercera muda. Se comprobó con ellos que, en estas condiciones, tanto PIBS como IMP no varían significativamente entre dos períodos intermuda sucesivos (Tabla IV).

Tabla IV. Comparación de los valores de la duración del período intermuda (IMP) y el porcentaje de incremento de tamaño en cada muda (PIBS) correspondientes a dos mudas sucesivas, en *Cyrtograpsus angulatus*, por medio del test de Student.

	IMP (días)	PIBS (%)
Muda 1	45.93	9.02
Muda 2	50.00	9.62
Número de ejemplares	14	8
t	0.63	0.66
P (%)	>0.5	>0.5

Se intentó determinar si los valores de IMP y de PIBS calculados a partir de observaciones hechas en el laboratorio eran coherentes con los resultados obtenidos a partir de los muestreos mensuales efectuados en 1985. En la figura 11 se comparan curvas de crecimiento que provienen de las figuras 3 y 4 con un esquema de

crecimiento discontinuo generado considerando un PIBS promedio del 20 % y un IMP calculado a partir de la ecuación (1). El punto de origen de este esquema se hizo coincidir con el de las curvas de crecimiento en un valor del ancho del caparazón de 4.5 mm. En ambos sexos el crecimiento en el ambiente natural (líneas continuas) coincide apreciablemente con el esquema escalonado obtenido a partir de las observaciones de laboratorio, hasta que el caparazón alcanza un ancho de 16 mm.

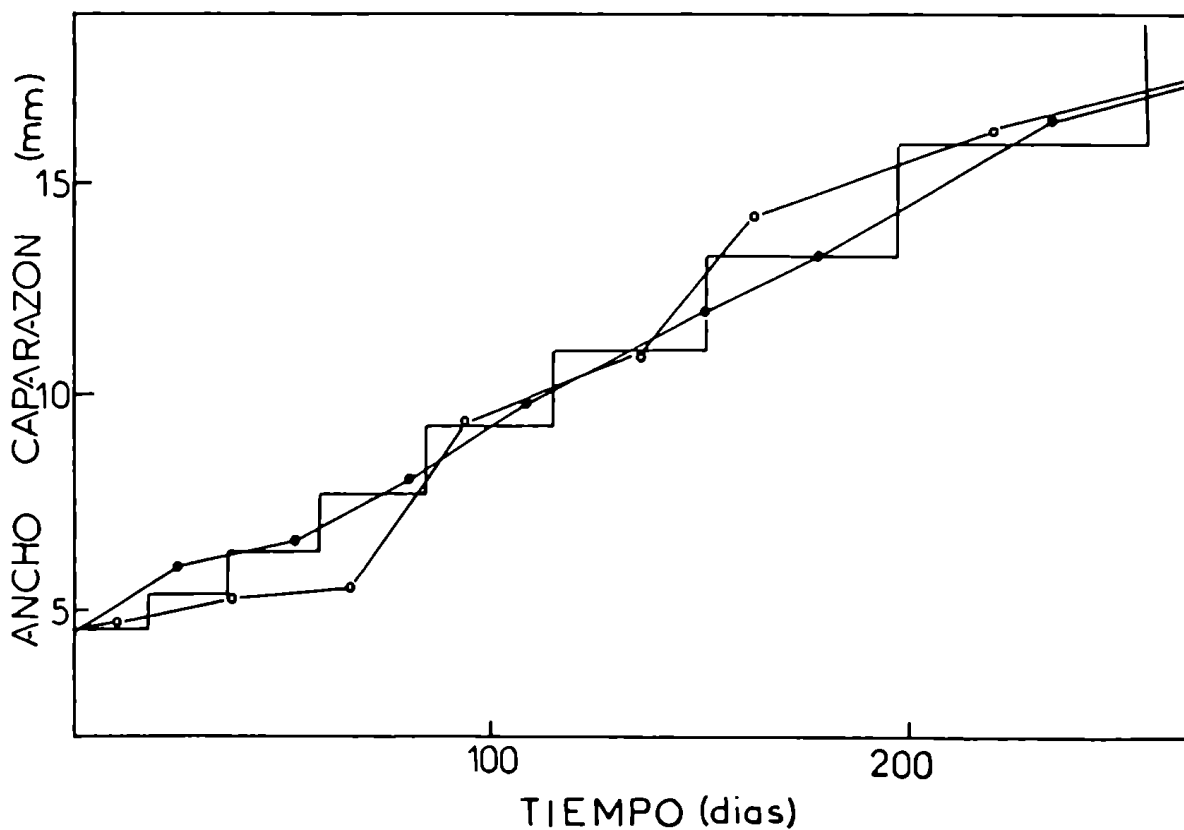


Figura 11.- Curvas de crecimiento de cangrejos juveniles machos (círculos llenos) y hembras (círculos abiertos) y su comparación con los datos provenientes de estudios de laboratorio sobre los componentes o factores de crecimiento (línea escalonada).

Por otro lado se realizó una experiencia acerca del efecto del fotoperiodo sobre el IMP, que duró 50 días y cuyos resultados se exponen en la Tabla V. Se observó una diferencia entre el número de ejemplares que mudaron dos veces en las distintas condiciones; un máximo del 29 % corresponde a 16 horas diarias de luz y un mínimo del 5 % a 0 horas diarias de luz. Sin embargo, los valores de IMP no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas (test de Student).

Tabla V . Efectos de diferentes condiciones de iluminación sobre la muda de *Cyrtograpsus angulatus* , en laboratorio, a lo largo de 50 días.

Horas diarias de luz	24	16	8	0
Total de ejemplares	36	21	21	21
Mudaron una vez	27	16	14	7
Siguen sin mudar	2	0	3	7
Muertos sin mudar	7	5	4	7
Mudaron dos veces	9	6	3	1
Mudaron dos veces (porcentaje del total inicial)	25	29	14.3	5
Intervalo promedio entre dos mudas (días)	29±6.1	23.3±5.5	35.3±3.5	35

En la figura 12 se muestra el porcentaje, en forma acumulativa, de animales que mudan por primera vez con respecto al total inicial, a lo largo de la experiencia y para cuatro fotoperíodos distintos.

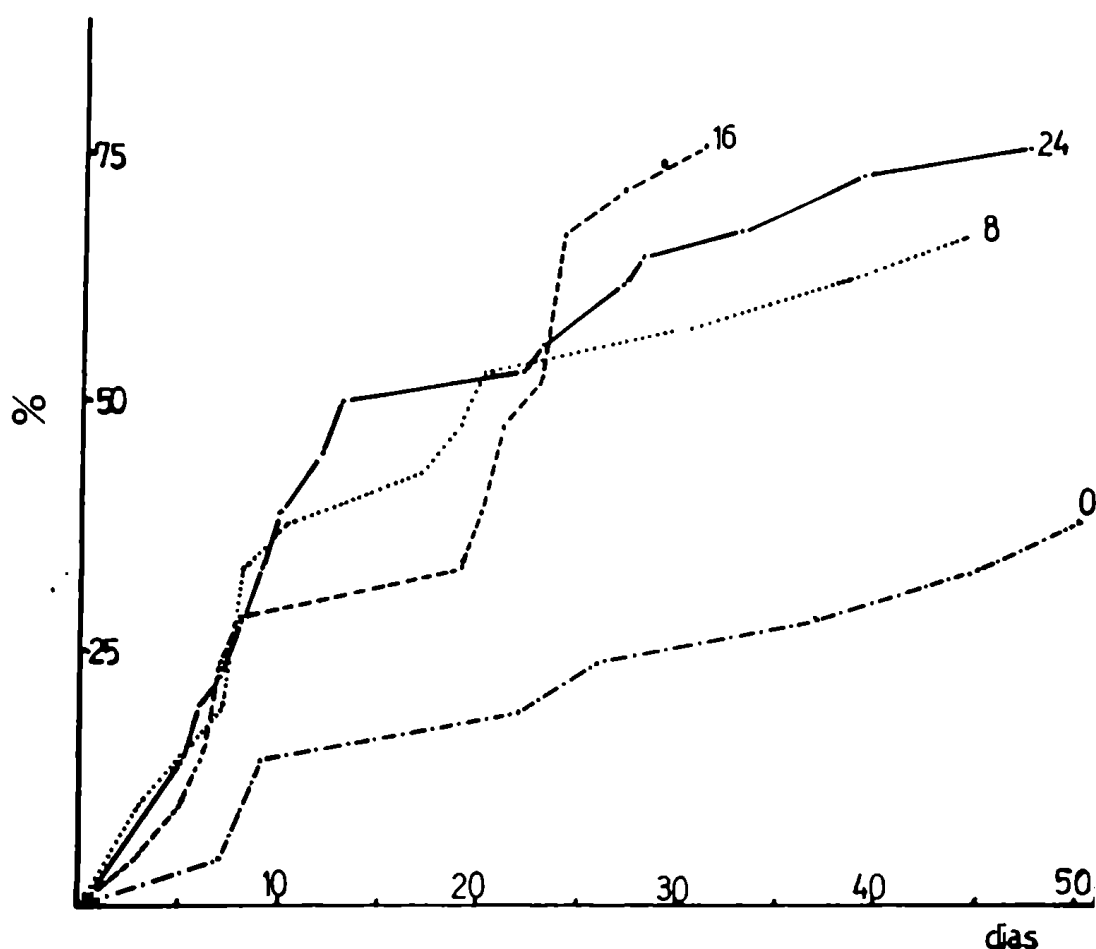


Figura 12.- Porcentaje de *Cyrtograpsus angulatus* mantenidos en laboratorio que mudan por primera vez con respecto al total inicial, representado en forma acumulativa, en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la experiencia. Se consideran cuatro condiciones de iluminación: 24, 16, 8 y 0 horas diarias de luz.

Las curvas son similares, excepto la que se obtuvo en condiciones de oscuridad permanente. En este caso se observó que los animales ingerían menos alimento y era frecuente hallar el mismo intacto luego de un tiempo de haber sido colocado en los acuarios. Debido a la mortalidad registrada (Tabla V), en ningún caso se alcanzó un

100% de mudas. Sólo en la condición de 16 horas diarias de luz, el total de los supervivientes (75% del número inicial) mudó una vez; ello se logró 30 días después de comenzada la experiencia. En la condición de 24 horas diarias de luz, igual porcentaje se alcanzó a los 50 días del comienzo pero dos ejemplares aún continuaban sin haber mudado. En ese momento habían mudado un 67% de los ejemplares sometidos a 8 horas y un 34% de los sometidos a 0 horas diarias de luz.

Discusión. En *C. angulatus*, el periodo intermudas es más largo en animales de mayor tamaño corporal. Ejemplares juveniles, con caparazones de 3 a 16 mm, mudarían una vez cada 15 a 46 días, de acuerdo a lo calculado en base a la ecuación (1). Los promedios de los valores obtenidos por Boschi (1970) en esta misma especie oscilaron entre 27 y 72 días. La pendiente de la regresión entre el logaritmo del IMP y el ancho del caparazón fue de 0.038, similar a la de otros grápsidos: 0.036 en *Cyclograpsus punctatus* (Broekhuysen, 1941) y 0.025 en *Hemigrapsus sanguineus* (Kurata, 1962). Entre todas las especies citadas en la revisión de Hartnoll (1984), sólo otro Brachyura, *Cancer anthonyi* (Anderson & Ford, 1976) tiene valores similares de pendiente: 0.023. No siempre puede establecerse una relación entre el IMP y el tamaño corporal: *Gecarcinus lateralis* (Skinner & Graham, 1972) y *Uca pugilator* (Hopkins, 1982), ambos frecuentemente utilizados en estudios experimentales, tienen periodos intermudas extremadamente variables.

El porcentaje de incremento del tamaño corporal en la muda varía mucho entre especímenes de tamaño semejante, por lo cual las representaciones gráficas del logaritmo del PIBS versus el ancho del caparazón no pudieron ser utilizadas. Sin embargo, parecería existir una tendencia a la reducción del PIBS a medida que el

tamaño corporal aumenta (Tabla II), tal como ocurre en muchos cangrejos y otros crustáceos (Hartnoll, 1984).

En la estrategia de crecimiento indeterminada (Hartnoll, 1984), el IMP tiende a aumentar y el PIBS a disminuir con el tamaño, aunque hay excepciones en ambas tendencias, principalmente en la segunda (Hartnoll, 1984). El crecimiento externo de *C. angulatus* correspondería a este tipo de estrategia. Las variaciones observadas en el PIBS, sin embargo, no permiten generar una curva de crecimiento precisa ni calcular el máximo tamaño corporal alcanzable. Pese a ello, se intentó comparar el crecimiento en laboratorio a partir del IMP y del PIBS con los datos provenientes de la población natural. Para ello, se consideró un valor constante de PIBS del 20 % y un IMP calculado para cada tamaño a partir de la regresión entre el logaritmo de IMP y el ancho del caparazón (ecuación 1). El esquema de crecimiento discontinuo así generado muestra, en general, cierta coincidencia con curvas de crecimiento obtenidas a partir de las distribuciones mensuales de tallas de la población natural (Figura 11). Para que la coincidencia subsista más allá de valores del ancho superiores a los 16 mm, sería necesario considerar PIBS menores, lo cual es aceptable de acuerdo a los datos expuestos previamente (Tabla III).

El fenómeno de la muda en *C. angulatus* es afectado por las condiciones ambientales de laboratorio. El simple hecho del traslado al mismo conduce a una postergación de la muda aún en ejemplares que se hallaban muy próximos a ella en el momento de la recolección (Tablas VI y VII). Los distintos fotoperíodos afectan poco la iniciación de la muda pero algo más su frecuencia. En efecto, sólo en condiciones de oscuridad completa se observan diferencias en cuanto a la aparición de cangrejos recién mudados en función del tiempo transcurrido luego de la recolección (Figura

12). Estos animales prácticamente no se alimentaron, siendo ésta una posible causa de las variaciones detectadas. La posibilidad de mudar una segunda vez y de completar exitosamente un ciclo de muda parece, en cambio, ser favorecida por el aumento de las horas diarias de luz (Tabla V). El fotoperíodo no afecta la duración del intervalo entre mudas.

CRECIMIENTO RELATIVO

Resultados. Se estudiaron las variaciones del largo del *propodus* del quelípodo en machos y hembras, del ancho del segundo segmento abdominal, también en ambos sexos, y del largo del primer pleópodo de los machos, en función del ancho del caparazón. El largo del dedo fijo del quelípodo (LQ) de las hembras puede ser relacionado con el ancho del cuerpo (AC) por medio de la siguiente ecuación:

$$\log LQ = 1.0009 \log AC - 0.4147 ; \quad r = 0.99 \quad (n = 150)$$

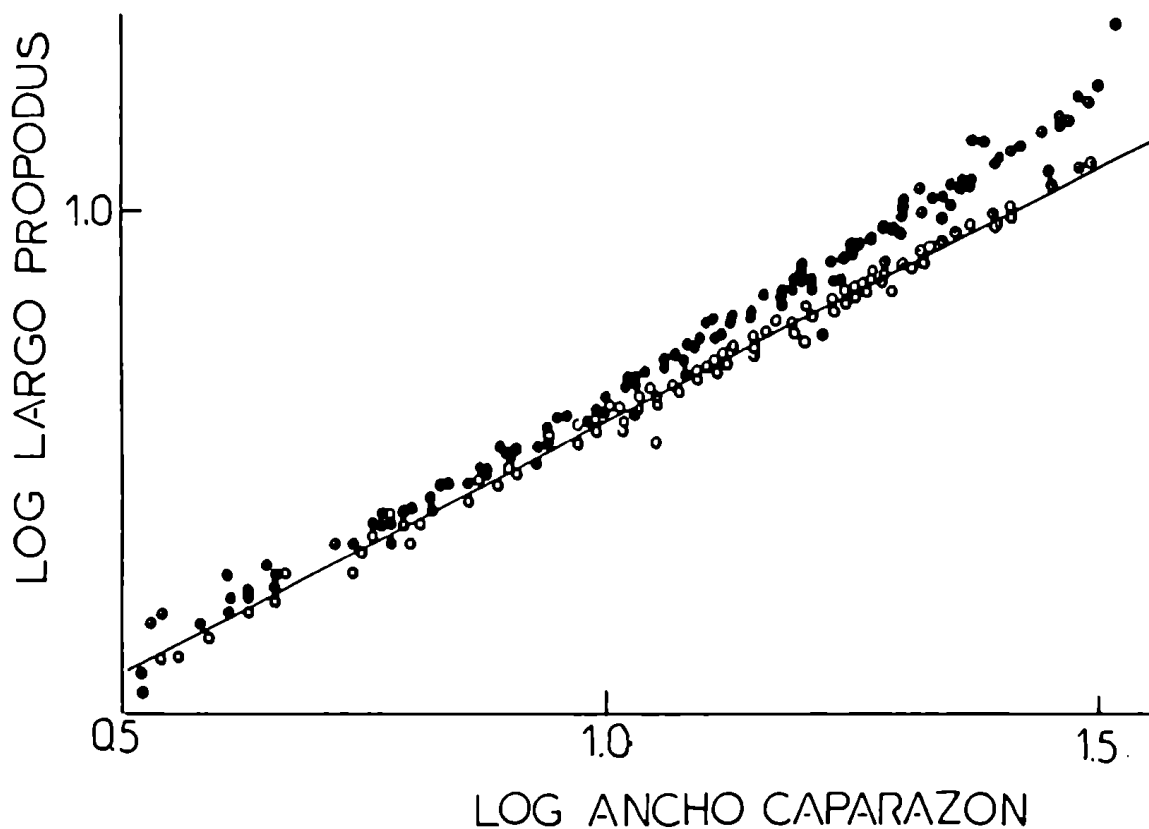


Figura 13.- Crecimiento relativo entre el ancho del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* y el largo del dedo fijo del quelípodo (ver figura 1); representación doble logarítmica. Machos (círculos llenos) y hembras (círculos vacíos).

Por el contrario, en el caso de los machos, la representación doble logarítmica está suavemente curvada hacia arriba, lo que indica que hay un pequeño pero continuo aumento del valor del coeficiente a (Figura 13).

En realidad, recién a partir de valores de AC de 8 mm, se puede empezar a establecer una diferencia entre el ritmo de crecimiento de ese artejo en ambos sexos.

El logaritmo del ancho del segundo segmento abdominal (AS) de los machos menores de 15 mm de ancho del caparazón es directamente proporcional al logaritmo de AC, pudiendo establecer entre ellos la siguiente relación:

$$\log AS = 1.030 \log AC - 0.5275 ; \quad r = 0.99 \quad (n = 90)$$

mientras que para los machos mayores de 15 mm de ancho, la relación es:

$$\log AS = 0.976 \log AC - 0.3630 ; \quad r = 0.96 \quad (n = 60)$$

En el caso de las hembras también se distinguen dos relaciones de alometría simple, separadas por un cambio brusco en las proporciones (Figura 14). Las hembras en las que el abdomen no alcanza a llegar a las bases de las patas torácicas, pueden denominarse inmaduras puesto que en ellas aún no se ha terminado de establecer la cámara incubadora. En los ejemplares con estas características:

$$\log AS = 1.3570 \log AC - 0.7253 ; \quad r = 0.99 \quad (n = 130)$$

En las hembras adultas, la mayoría llevando huevos bajo su abdomen:

$$\log AS = 0.9730 \log AC - 0.1440 ; \quad r = 0.98 \quad (n = 20)$$

En este caso es evidente una superposición en los tamaños de las hembras inmaduras más grandes (26.2 mm) y las maduras más pequeñas (19.2 mm). Ambos sexos comienzan a diferenciarse muy tempranamente en las medidas de su abdomen, cuando su AC es de 4 mm. El sexo de ejemplares más pequeños no se puede distinguir externamente.

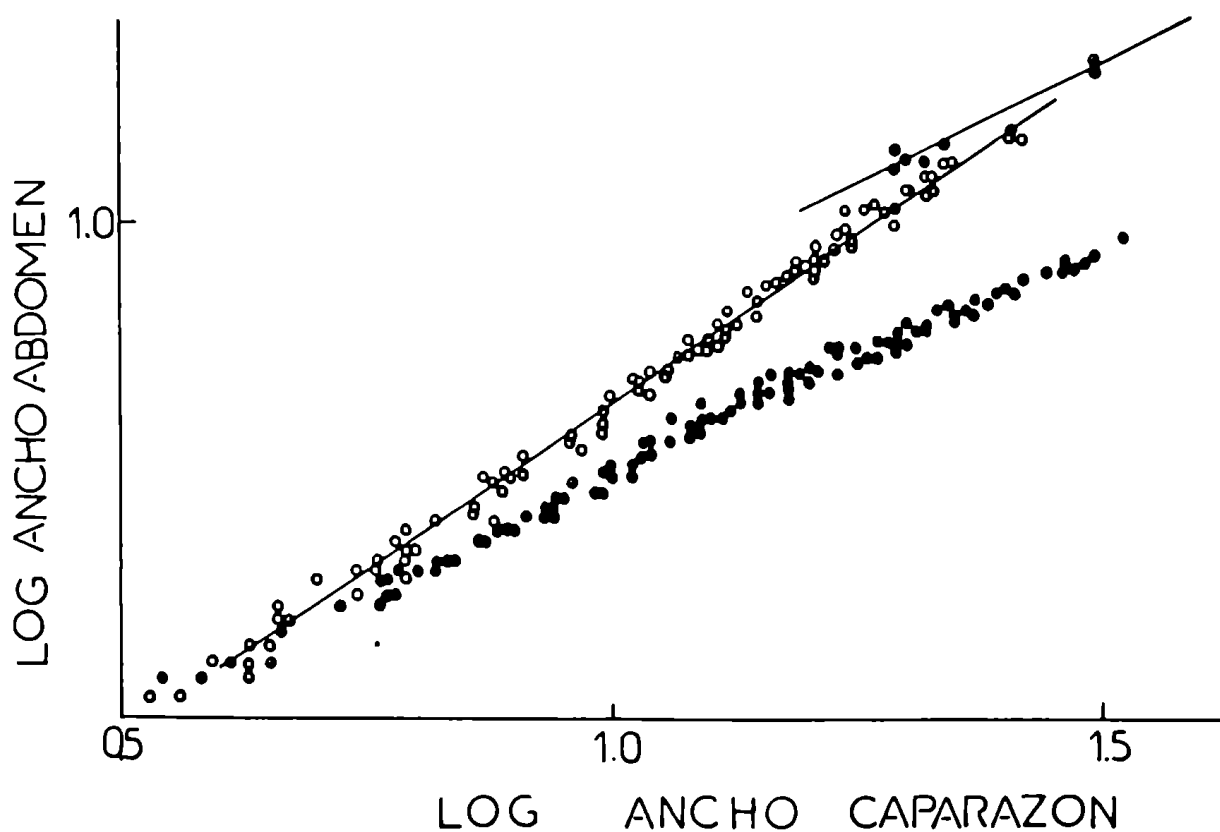


Figura 14.- Crecimiento relativo entre el ancho del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* y el ancho del abdomen (ver figura 1); representación doble logarítmica. Machos (círculos llenos), hembras (círculos vacíos).

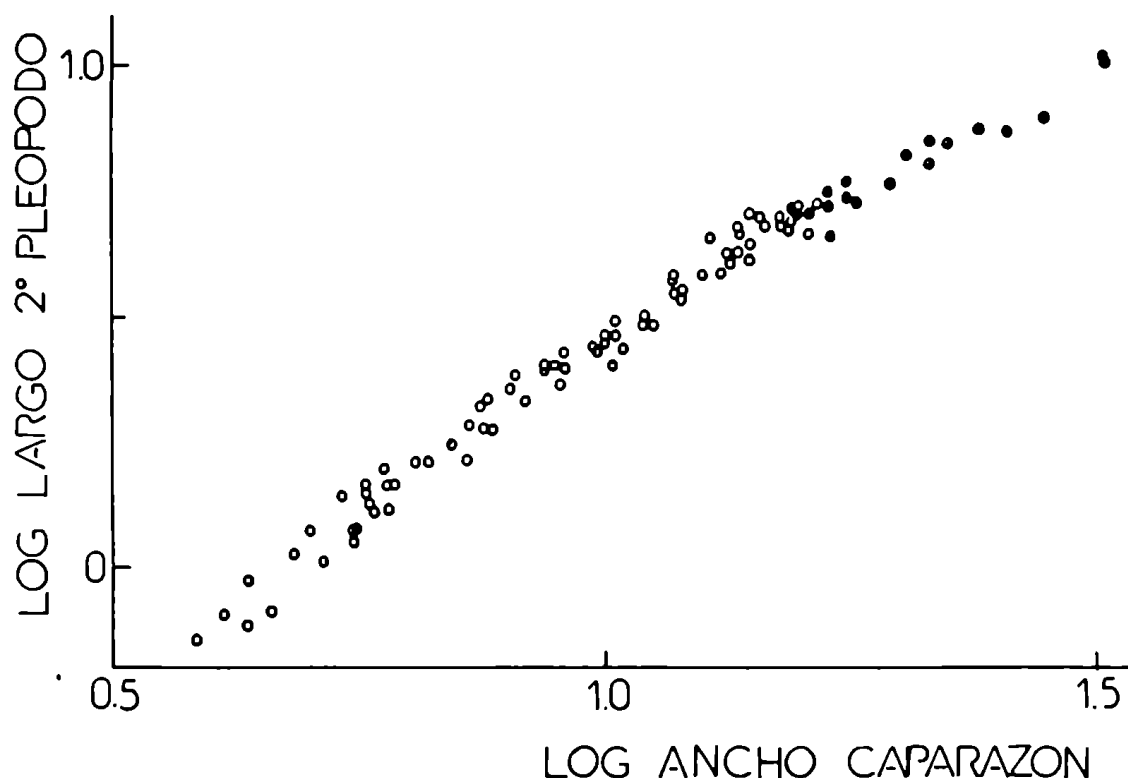


Figura 15.- Crecimiento relativo entre el ancho del caparazón y el largo del primer pleópodo (ver figura 1) de *Cyrtograpsus angulatus* machos inmaduros (círculos vacíos) y maduros (círculos llenos); representación doble logarítmica.

La representación del logaritmo del largo del primer pleópodo de los machos (LP) en función del logaritmo de AC (Figura 15) muestra que ambas variables tienen una relación en la que el coeficiente a va disminuyendo suavemente a medida que aumenta el tamaño del animal (línea suavemente curvada). Los machos más pequeños en los que se encontraron testículos maduros tenían un ancho del caparazón de poco más de 15 mm.

Discusión. El largo del dedo fijo (*propodus*) del quelípodo crece, con respecto al ancho del caparazón, en forma isométrica en las hembras y con una alometría caracterizada por un débil pero continuo aumento del coeficiente a en los machos (Figura 14), correspondiendo al primer tipo de desviación de la alometría simple mencionado por Gould (1966). El largo del primer pleópodo de los machos también presenta, con respecto al ancho del caparazón, este tipo de desviación. Sin embargo,

aquí se trata de una alometría caracterizada por una disminución pequeña y permanente del coeficiente a (Figura 15). En consecuencia, en ninguno de los dos casos mencionados precedentemente existe una transición brusca que permita determinar, a partir de la morfología externa, la aparición de la madurez sexual. Se pudo detectar, en cambio, que si bien en los machos menores de 15 mm hay una leve alometría positiva entre los incrementos de tamaño del abdomen y del ancho del caparazón ($a = 1.03$), a partir de ese tamaño la relación alométrica se hace algo negativa ($a = 0.976$) (Figura 13). La situación en este caso se asemeja a la descrita en la figura 2a. El tamaño en el cual la pendiente de la recta de alometría se modifica corresponde al menor en el cual se detectaron machos con gónadas maduras. Con respecto a estas variables, en las hembras (Figura 13) se pudo observar claramente un estado crítico, correspondiente a una probable muda de pubertad, con una transición brusca entre dos rectas de alometría de pendiente diferente. En este caso se presenta una desviación de la alometría simple del segundo tipo de las mencionadas por Gould (1966) y que puede corresponder a la representada en la figura 2 c. La alometría es primeramente positiva, en las hembras que pueden definirse externamente como inmaduras ($a = 1.357$), y luego negativa, en aquellas cuyo abdomen ya permite establecer una cámara de cría -la cual puede o no estar ocupada- ($a = 0.973$). Existe un amplio intervalo de tamaños en que puede producirse la transición de una a otra recta y, por lo tanto, lograrse la madurez sexual. El crecimiento relativo del abdomen sigue los patrones generales correspondientes varias especies de *Brachyura* (Tabla 1). La distinción entre el sexo de los ejemplares juveniles puede lograrse, mediante la observación del abdomen, a partir de tamaños muy pequeños (4 mm).

SINCRONIZACION DE LAS MUDAS

Resultados. Desde el comienzo de nuestro trabajo con la población de *C. angulatus* del puerto de Mar del Plata se observó que, en ciertas ocasiones, se hallaban numerosas exuvias de distintos tamaños en las playas arenosas del área de estudio. Dado que las exuvias son extremadamente frágiles, era de suponer que la muda a partir de la cual se habían originado había tenido lugar con uno o dos días de anticipación a ese momento. Ello dió origen a la hipótesis de una posible sincronización de las mudas en dicha población. En la tabla VI se pueden observar datos provenientes de varios muestreos realizados a lo largo de 1985. Los ejemplares recién mudados se distinguen fácilmente por su consistencia blanda, el porcentaje de los mismos oscila entre 1.01 % y 11.3 %, sin observarse diferencias sistemáticas entre ambos sexos.

En la figura 16 se muestran distribuciones de frecuencias de tallas para ambos sexos, obtenidas a partir de muestreos semanales realizados entre febrero y marzo de 1985. Se observa que en ciertos momentos (entre el 27/2 y el 13/3) no hay desplazamientos notables en las modas de las distribuciones. Entre el 20 y el 27/2 y menos claramente entre el 13 y el 20/3, por el contrario, tales desplazamientos se hacen manifiestos. Esto coincide con la observación de un 5.6 % de ejemplares en postmuda en las fechas que coinciden con desplazamientos modales (20/2 y 13/3) y de un 2.8 y un 3.8 % que se verifican en momentos en que las modas permanecen estables (27/2 y 6/3 respectivamente).

Tabla VI. Proporción de ejemplares recién mudados en muestras de *Cyrtograpsus angulatus* a lo largo de 1985. Referencias: n: número total de ejemplares de la muestra; m: número de machos recién mudados; h: número de hembras recién mudadas; t: número total de ejemplares recién mudados; p: porcentaje de los mismos; FL: fases lunares (N: nueva, C: creciente, L: llena y M: menguante); BM: bajas mareas promedio (+: datos por encima, -: datos por debajo). Nota: la muestra del 26/6/85, obtenida en dos días separados, no se tiene en cuenta.

Fecha	n	m	h	t	p (%)	FL	BM
23/01/85	239	8	19	27	11.30	N	
20/02/85	661	18	19	37	5.60	N	
27/02/85	180	2	3	5	2.78	C	
06/03/85	444	9	8	17	3.83	L	
13/03/85	392	12	10	22	5.61	M	
20/03/85	370	4	5	9	2.43	N	
17/04/85	292	16	8	24	8.22	N	
15/05/85	615	9	6	15	2.44	M	
26/06/85	309	16	6	22			
23/07/85	398	0	3	3	1.01	C	
21/08/85	362	4	2	6	1.66	C	
18/09/85	411	13	14	27	6.57	C	
16/10/85	396	18	16	34	8.58	N	
13/11/85	391	4	6	10	2.56	N	
11/12/85	413	13	4	17	4.12	N	

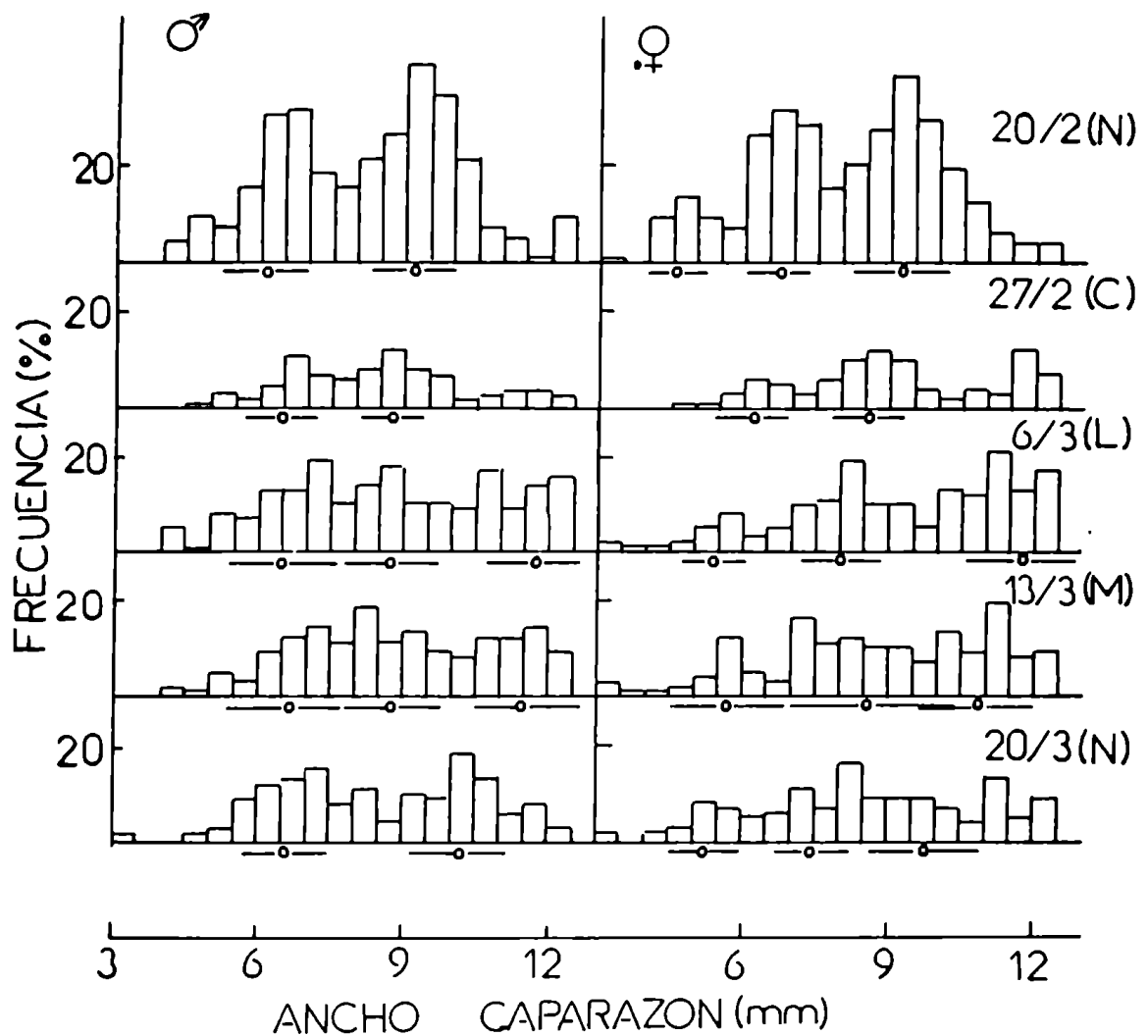


Figura 16.- Histogramas de frecuencias semanales de mudas en *Cyrtograpsus angulatus* entre el 20/2 y el 20/3/85. Bajo cada histograma se representa el valor modal y su desviación standard, calculados por el método gráfico de Cassie (1950). (N, C, L y M: lunas nueva, creciente, llena y menguante respectivamente).

Con el fin de comprobar experimentalmente la existencia de alguna clase de sincronización entre los momentos de la muda de diferentes individuos, se llevó un registro diario de las mudas de ejemplares traídos todas las semanas al laboratorio, durante 1985. Los datos de las frecuencias diarias observadas no pudieron, sin embargo, considerarse como representativos de lo que ocurre en la población natural. En efecto, se observó una marcada tendencia a no mudar en los primeros días luego de la recolección (Tabla VII).

Tabla VII . Número de oportunidades en que se registraron, o no, mudas de *Cyrtograpsus angulatus* en el laboratorio, en función del tiempo transcurrido desde la recolección, a lo largo de 57 muestreos semanales realizados durante 1985.

Días luego de la recolección	No se registran mudas	Se registran mudas
1	30	24
2	35	21
3	34	20
4	28	27
5	23	31
6	10	46
7	11	40
8	17	37
9	24	30
10	26	29
11	24	30

En consecuencia se decidió utilizar la información disponible considerando el número total de individuos que mudaron durante los 7 días posteriores a la recolección. Es posible suponer que todos ellos estaban, cuando fueron recolectados, en un momento avanzado del ciclo de muda, tal que la ecdisis también hubiera ocurrido en la naturaleza durante el mismo período. Los resultados obtenidos se representan en los histogramas de la figura 17. Los porcentajes semanales de muda oscilan entre 0 y 68 % , lo que representa un valor diario que varía entre 0 y 10 % . El promedio a lo largo del año es de 18.45 % por período y de 2.63 % diario; sin embargo las mudas parecen ocurrir en determinados momentos más que continuamente. Hay semanas en que la cantidad de mudas observadas es alta, separadas por otras en que es mucho menor.

La tabla VIII representa la cantidad de veces en que se observan distintas frecuencias de muda a lo largo del año. Si las variaciones en las frecuencias semanales se debieran exclusivamente al azar, los valores agrupados en la tabla deberían mostrar una distribución de Poisson. Tal cosa no ocurre, los datos difieren significativamente de un ajuste a la distribución mencionada ($P < 0.1 \%$) indicando que las variaciones observadas no se deben al azar.

Tabla VIII . Número de oportunidades en que se registraron distintas frecuencias semanales de mudas de *Cyrtograpsus anquilatus* en el laboratorio, a lo largo de 54 muestreos.

Frecuencia de mudas	0-9.9	10-19.9	20-29.9	>40
Número de oportunidades	20	13	9	3

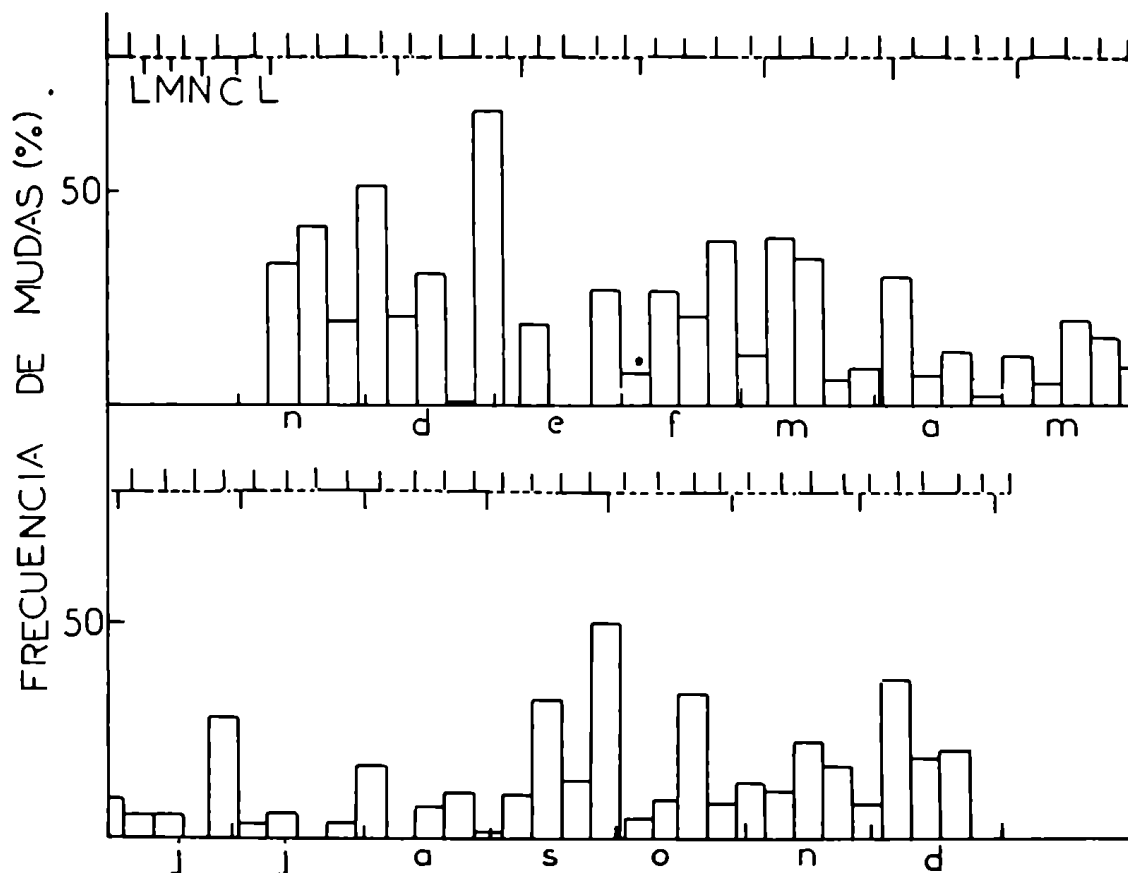


Figura 17.- Frecuencias semanales de mudas en *Cyrtograpsus angulatus* traídos al laboratorio durante 1985. Se indican las fases lunares (segmentos separados por barras verticales en la línea superior, L: llena; M: menguante; N: nueva; C: creciente) y los períodos con bajas mareas por debajo (línea superior llena) y por encima (línea superior punteada) de los promedios mensuales.

No hay una periodicidad muy evidente de las frecuencias semanales de muda (Figura 17). Por otra parte, se observa que los picos mayores de 30 % semanal (4-5 % diario) se presentan en los meses cálidos (setiembre a marzo); en cambio, entre abril y agosto, con la excepción de la última semana de junio, las mayores frecuencias de muda no alcanzan al 20 % semanal (3 % diario) si bien continúan alternando valores mayores y menores. Es evidente que una variación estacional se superpone a las semanales.

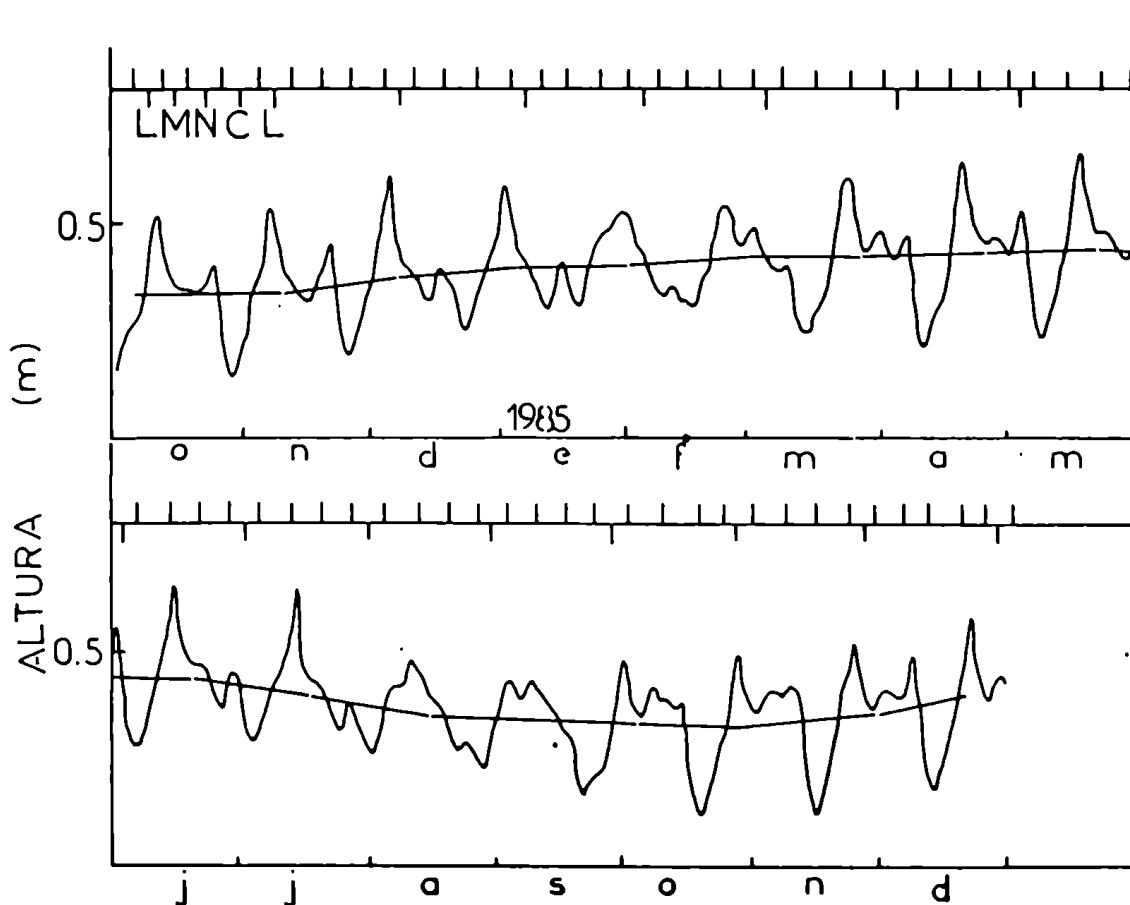


Figura 18.- Bajas mareas en Mar del Plata (1985), según datos de tablas, su promedio y las fases lunares (representadas sobre la línea superior): L: llena; M: menguante; N: nueva y C: creciente.

Con el objeto de verificar la hipótesis de una coordinación entre el ritmo de mudas y ciertos factores abióticos que presentan variaciones cíclicas, se trató de relacionar el régimen de mareas y fases lunares con las variaciones de frecuencia de mudas observadas. En la figura 18 se representan los cambios de fase lunar, los intervalos alrededor de cada uno de ellos y el promedio diario de las bajas mareas en el puerto de Mar del Plata. Esos tres factores no están exactamente coordinados entre sí, si bien se puede decir que, con respecto a las bajas mareas, hay aproximadamente igual número de días en que las bajamareas están por encima y por debajo del promedio

mensual. En la figura 17, junto a los valores de frecuencias semanales de muda, se representan los posibles modelos de coordinación periódica sugeridos. Se observa que, en 15 oportunidades se presentan frecuencias de muda mayores del 25 % semanal. De ellas, 11 corresponden a bajamares por encima de los promedios, distribuidas de la siguiente manera: 3 veces con luna llena y menguante, 4 con creciente y una con nueva. En 10 oportunidades se observaron frecuencias menores del 5 %, de ellas 7 tuvieron lugar con mareas por debajo del promedio: una vez con luna llena y creciente, 2 con nueva y 3 con menguante (Tabla IX).

Tabla IX . Número de oportunidades en que se registraron frecuencias semanales de muda de *Cyrtograpsus angulatus*, en laboratorio, mayores del 25 % y menores del 5 %, en relación con las bajas mareas promedio (BM) y las fases lunares (L: llena, M: menguante, C: creciente y N: nueva)

Fases lunares	>25%		<5%	
	sobre BM	bajo BM	sobre BM	bajo BM
L	3	0	0	1
M	3	2	1	3
C	4	1	1	1
N	1	1	1	2

Al considerar bajo este punto de vista los histogramas de la figura 16, se

observa que los desplazamientos más evidentes de la moda, que indicarían un pico de mudas, tienen lugar entre el 20 y el 27/2, cuando las bajamares están por encima de la media y la luna en nueva-creciente, mientras que el periodo de mayor estabilidad modal (27/2-13/3) coincide con mareas por debajo del promedio en 9 de los 14 días y con fases lunares llena y menguante.

Discusión. Existen evidencias que indican que las marcadas variaciones semanales en la frecuencia de mudas de *Cyrtograpsus angulatus* en el puerto de Mar del Plata no se deben al azar. Por una parte, distribuciones polimodales de frecuencias de tallas obtenidas a partir de muestreos semanales muestran periodos con visibles desplazamientos de las modas alternando con otros en los que éstas permanecen constantes (Figura 16). Por otra parte, las frecuencias de muda cada siete días observadas en ejemplares traídos al laboratorio se alejan significativamente de lo esperado por azar. Los periodos con muchos (picos) o pocos (valles) animales mudados exceden marcadamente las expectativas (Figura 17, Tabla VIII).

Varios estudios (Bocquet, 1956; Reaka, 1976; Klapow, 1972) demostraron la sincronización rítmica de la muda en poblaciones naturales o de laboratorio de diferentes crustáceos litorales. Los periodos observados en estos casos coincidían con ritmos de mareas o fases lunares. Aunque parece detectarse alguna relación (Tabla IX) entre este tipo de ritmos bisemanales y los picos y valles observados en la frecuencia de mudas de *C. angulatus*, ello aún no ha podido demostrarse definitivamente. Existen otros mecanismos de sincronización de mudas en crustáceos que también podrían dar cuenta de los fenómenos aquí observados: comunicación química (Howe, 1981), régimen de alimentación (Siegel, 1984) y temperatura (Webster, 1981)

REGENERACION DE APENDICES.

Proceso de cicatrización. La autotomía tiene como consecuencia que el extremo distal del basipodito quede expuesto. Se trata de una superficie "limpia" pues la comunicación con el isquiopodito se establece sólo a través de un haz vasculo- nervioso (McVean, 1973, 1975). Esa superficie presenta externamente el aspecto de una placa circular con algunas pocas células pigmentarias y un punto oscuro, levemente excéntrico, que corresponde al sitio de ruptura del filete nervioso. Un corte longitudinal del basipodito (Figura 19 a) muestra ese extremo distal protegido por una delgada capa de tejido, resto de la membrana de autotomía o *septum*, revestida exteriormente por un exudado de apariencia cuticular pero poco consolidado que se engrosa a la altura del nervio seccionado, en coincidencia con el punto oscuro que se observa externamente. Bajo el *septum* se observa un epitelio incipiente, más conspicuo hacia los bordes (Figura 19 b) y que en el centro coincide con células emigrantes. Ese epitelio en organización, descansa sobre un tejido conjuntivo sin que exista una membrana basal neta que los separe. El tejido conjuntivo, de tipo edematizado, varía desde la periferia hacia el centro del artejo, donde se ubica un eje nervioso vascular que remata en una especie de botón neural terminal (Figura 19 c). En el interior de dicho botón se observan axones, aparentemente seccionados, retraídos e hipertrofiados; en torno al mismo se forma una estructura conjuntivo-granulomatosa con células indiferenciadas y elementos fijos desde donde parecen irradiar células diferenciadas libres. Entre estas células se destacan los componentes isodiamétricos, algunos con ciertas características de polimorfismo nuclear y otros en los que acontecen procesos de diferenciación citoplasmática con génesis de gránulos

eosinófilos (Figura 19 d). Los granulocitos que parecen originarse en las inmediaciones del botón terminal se distribuyen no sólo en torno al mismo sino que su presencia es manifiesta en toda la zona de reparación.

Por debajo del botón neural hay un vaso hemolinfático de gran tamaño y, en planos más profundos, un tejido conjuntivo laxo, con algunos elementos celulares fijos y libres y surcado por fascículos musculares que se insertan en la base de la zona cuticular.

En un corte transversal del basipodito, efectuado en forma algo oblicua al septo, se puede observar en los planos más superficiales (Figura 20 a) una intensa movilización apical y un núcleo necrobiótico que debe corresponder al punto de comunicación nerviosa entre el basi y el isquiopodito. En planos más profundos, se pueden ver aspectos del nervio seccionado con sus membranas, las retracciones axónicas y elementos granulocíticos periféricos (Figura 20 b).

Crecimiento basal del muñón de regeneración. Pocos días después de la amputación, la placa circular parece romperse por su parte central, emergiendo un pequeño muñón. Este crece hasta alcanzar un tamaño estable (con un valor de R que oscila entre 4 y 5), dos o tres días más tarde. Alrededor del muñón subsiste la placa de cicatrización con escasas células pigmentarias y un marcado reborde cuticular, de color oscuro, en todo su contorno. El muñón carece de células pigmentarias, es de color blanquecino y, en un principio, no hay signos exteriores de segmentación. Internamente su estructura es típicamente embrionaria, con un epitelio hipertrofiado periférico y un núcleo central mesenquimatoso (Figura 21 a y 22). Se observan también los tabiques cuticulares que separan los futuros artejos. El epitelio (Figura

21 b y 21 c) es cilíndrico, alto, con varias hileras de núcleos que pueden conferir la apariencia de estratificado y presenta una reacción basófila característica de tejidos de alta actividad sintética. El núcleo central de cada artejo (Figura 21 b) posee una estructura laxa, con escasos componentes libres y en su seno comienzan a diferenciarse componentes mioblásticos (Figura 21 c). El *septum* o membrana de autotomía es ya un neto estrato celular que separa esta estructura embrionaria del basipodito (Figura 21 d). La epidermis de éste último, de aspecto bastante normal, rodea a un tejido granulomatoso en el que predominan los elementos libres sobre los fijos, desde células con aspecto linfocitoide hasta otras con inclusiones citoplasmáticas acidófilas. La cutícula del basipodito, en especial en su extremo distal, es fuertemente acidófila en tanto que la correspondiente a los artejos en diferenciación presenta reacción basófila.

Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración. El tamaño del muñón suele permanecer constante durante unos días (meseta de aneudisis), período en el cual sigue sin mostrar pigmentación de su superficie, pero permitiendo ver, por transparencia, la segmentación interior. Cuando el crecimiento se reinicia, no sólo la longitud del muñón aumenta sino también su diámetro, tomando la forma de una cúpula. La placa distal del basipodito queda restringida a un anillo, cada vez más estrecho, en el que se pueden observar aún algunas células pigmentarias. Internamente continúa la estructuración de los distintos artejos, que ya pueden ser individualizados (Figura 23 a). En ellos se observa la cutícula, aún basófila y un epitelio hipertrofiado (Figura 23 b) que rodea a un tejido conjuntivo con escasas diferenciaciones. En el seno de este tejido se encuentra un eje neurohemal (Figura 23 c) y fascículos de mioblastos

cuya inserción en el epitelio es ya bien visible (Figura 23 b) y que presentan numerosas divisiones celulares (Figura 23 d). El *septum* se halla más diferenciado, es de aspecto parenquimatoso y, por debajo, subsiste una intensa granulomatosis (Figura 23 a). El epitelio del basipodito aún presenta algunas características de hipertrofia.

En etapas posteriores del desarrollo del muñón se produce un cambio en el aspecto general del mismo, si bien las estructuras internas no varían de forma radical. Cuando el muñón ha crecido hasta el punto de ocupar todo el espacio que corresponde a la placa cicatricial, se puede observar con claridad, bajo una cubierta cuticular aún pobremente pigmentada, la disposición de los futuros artejos. Estos están plegados dos veces, de modo que el *isquium* y el *merus* ocupan el borde anterior del muñón, el *carpus* y el *propodus* el borde posterior y el *dactilus* se encuentra apoyado en una depresión o canaleta que dejan los dos anteriores en el lado ventral del mismo.

El crecimiento en longitud y diámetro se acelera luego, sobrepasando el diámetro del basipodito. Al mismo tiempo que aparecen células pigmentadas en la pálida superficie del muñón, primero sobre el *carpus*, luego expandiéndose hacia el *propodus* y el *merus*.

En la figura 24 a se muestra un corte longitudinal de un muñón de regeneración en un estado más avanzado del crecimiento proecdisial. El epitelio de los artejos continúa siendo alto y de apariencia estratificada, advirtiéndose con claridad las zonas para la inserción muscular (Figura 24 b). El interior de cada artejo presenta un aspecto parenquimatoso y está surcado por diferenciaciones mioblásticas incipientes y fascículos de formaciones miocelulares embrionarias que presentan ya

algunas características de fibras estriadas (probable presencia de mioglobina). En los espacios hemolinfáticos hay elementos libres, algunos granulocíticos.

El desarrollo del muñón prosigue con una reducción de los espacios hemolinfáticos (Figura 25 a), desaparición de elementos musculares embrionarios y aumento de las áreas ocupadas por musculatura en diferenciación y crecimiento; los fascículos de miocélulas poseen ya evidente estriación aunque aún no hayan completado su desarrollo. El epitelio continúa siendo hipertrófico y aparentemente estratificado (Figura 25 b)

La inminencia de la ecdisis se detecta externamente por el cambio de coloración de la superficie del muñón, que se va oscureciendo. Internamente (Figura 26 a), se observa en cada artejo que las miocélulas forman haces claramente delimitados por membranas conjuntivas (Figura 27). Presentan, además de su neta estriación (Figura 26 b), núcleos periféricos. La proporción de campos de miocélulas y espacios hemolinfáticos varía de acuerdo al corte que se observa, pero ambos componentes están poblados de elementos granulocíticos. Estos son más abundantes que en estados anteriores, pueden agruparse masivamente en los espacios hemolinfáticos o bien infiltrar los campos de miocélulas (Figura 26 c). El epitelio presenta el aspecto de las etapas anteriores (Figura 26 d), el *septum*, en cambio, al igual que los elementos neurales asociados a vasos hemolinfáticos, presentan el aspecto característico de los apéndices normales (Figuras 26 e).

Al mudar, un apéndice de igual apariencia que el normal aunque de tamaño algo menor y carente de pigmentación, es extraído de la cubierta cuticular, la que permanece formando parte de la exuvia.

Abreviaturas correspondientes a las figuras 19 a 27

ax	extremos axónicos retraídos
bn	botón neural
cu	cutícula
ec	exudado cuticular
eh	epitelio hipertrófico
en	eje neuro-hemal
gr	granulocitos
hm	haces de miocélulas
in	inserciones de mioblastos y miocélulas
mb	mioblastos
mc	miocélulas estriadas
md	mioblastos en división
me	núcleo mesenquimático
mr	muñón en regeneración
ne	nervio pedal
nu	núcleo necrobiótico
se	septum
ta	tabiques entre artejos

(Los números sobre las barras representan μm)

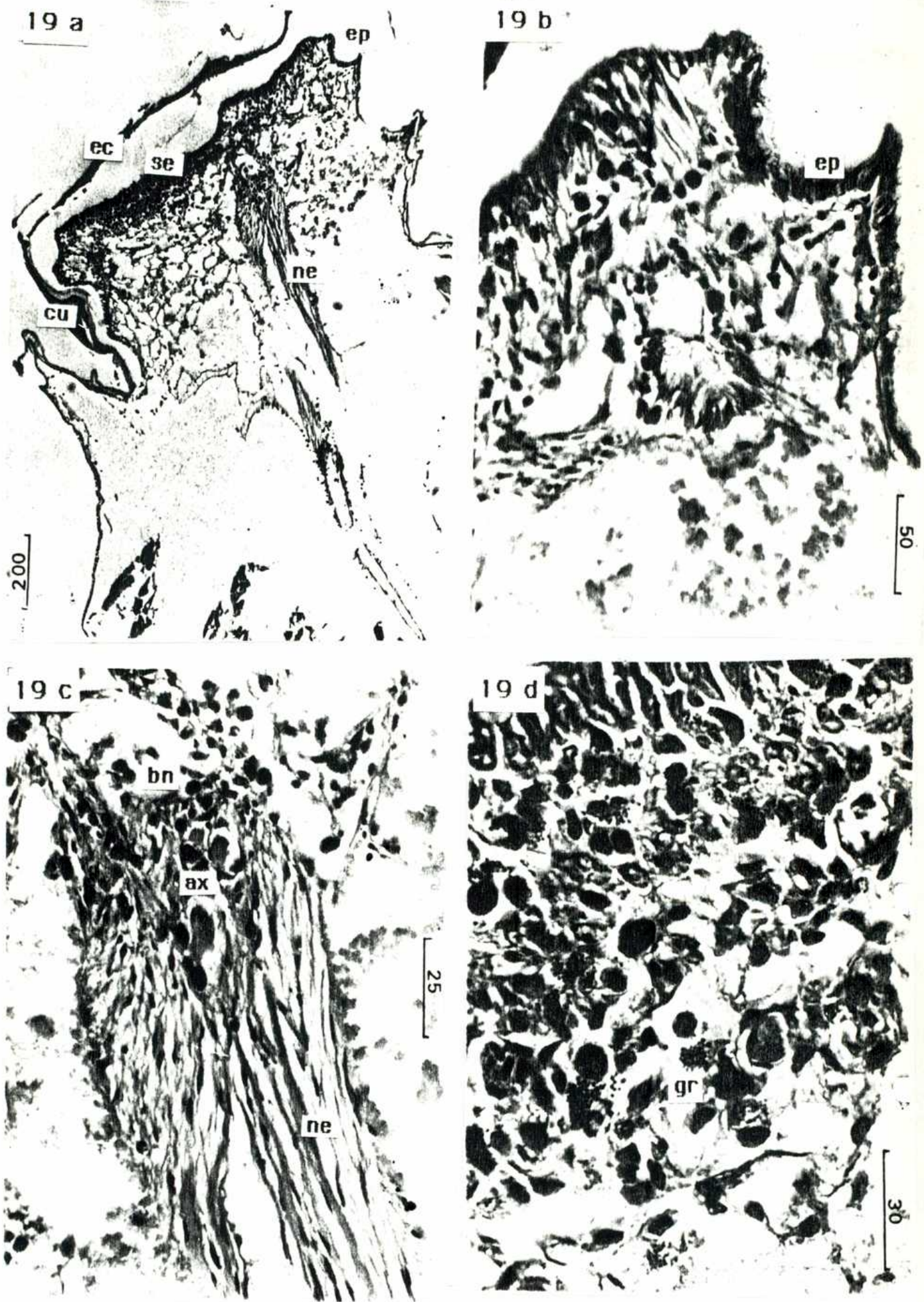


Figura 19.- Cicatrización posterior a la autotomía en *Cyrtograpsus angulatus*. **a.** Corte longitudinal del basipodito (40X); **b.** Epitelio bajo el septo de cicatrización (250X); **c.** Eje nervioso vascular seccionado (400X); **d.** Estructura conjuntivo-granulomatosa (400X).

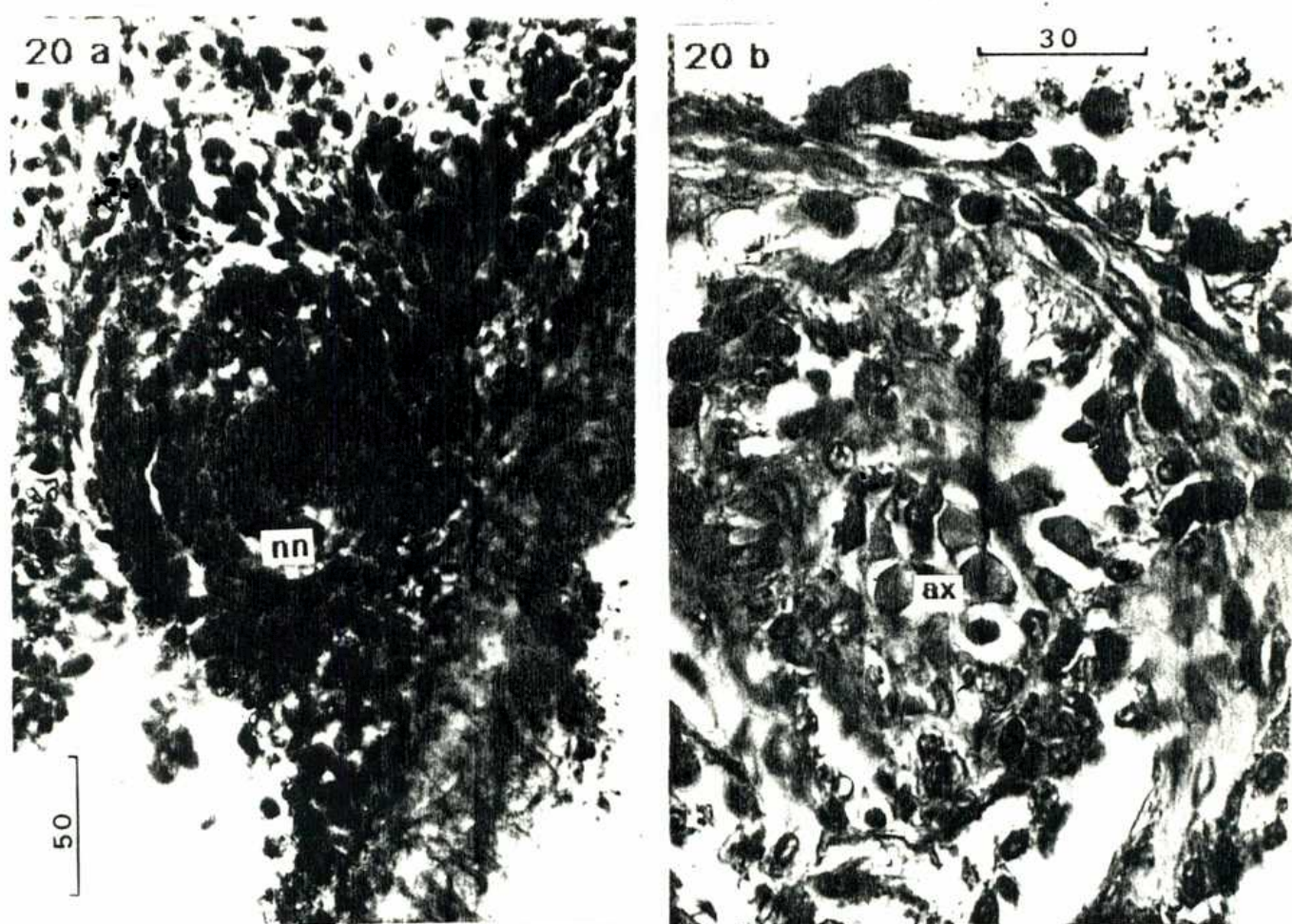


Figura 20.- Cicatrización posterior a la autotomía en *Cyrtograpsus angulatus*. Corte transversal del basipodito. **a.** Plano superficial (250X); **b.** Plano profundo (400X).

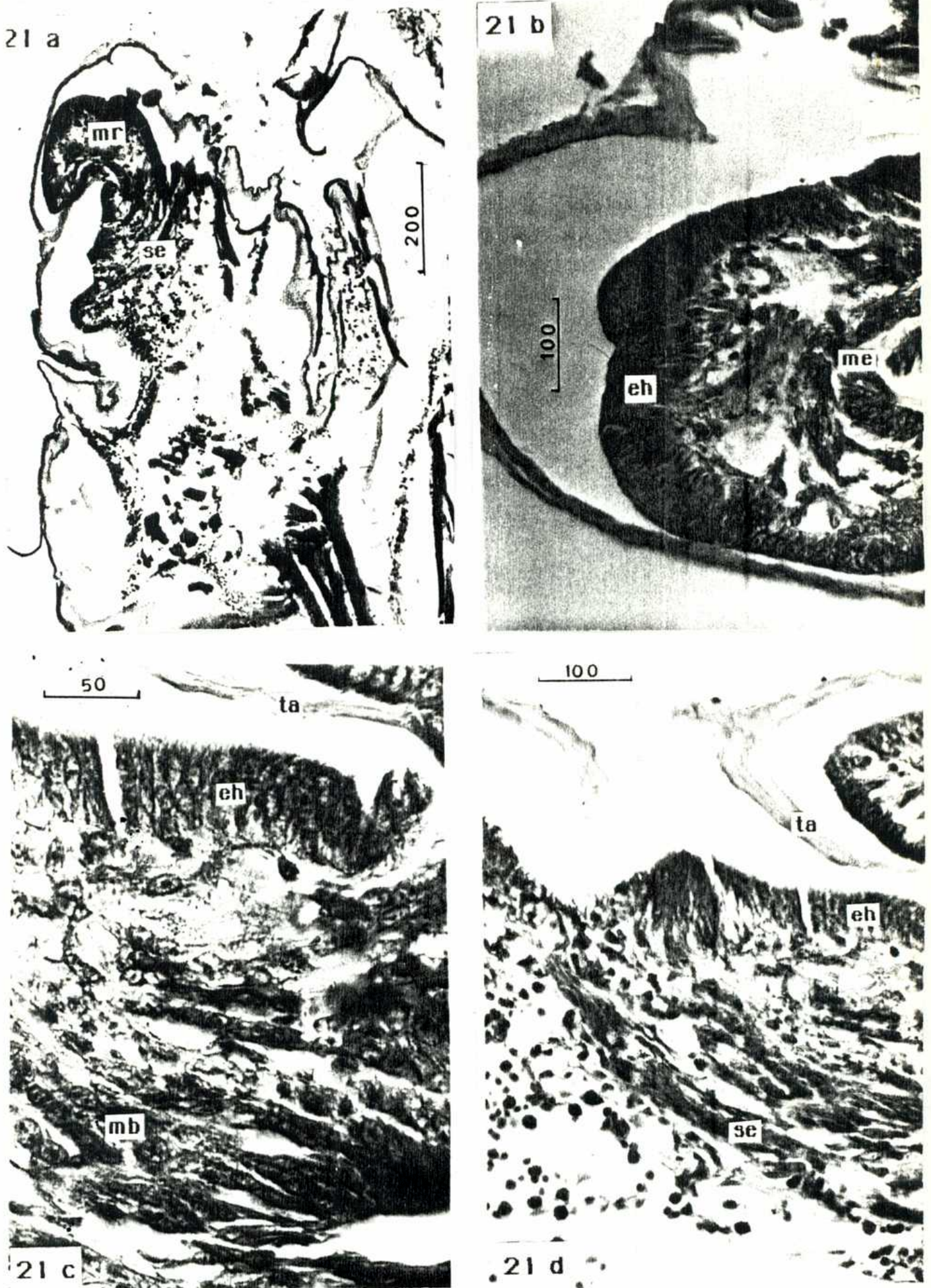


Figura 21.- Crecimiento basal del muñón de regeneración en *Cyrtograpsus angulatus*. a. Corte longitudinal del coxopodito y el muñón (40X); b y c. Detalles del muñón (100 y 400 X, respectivamente); d. Septum (100X).

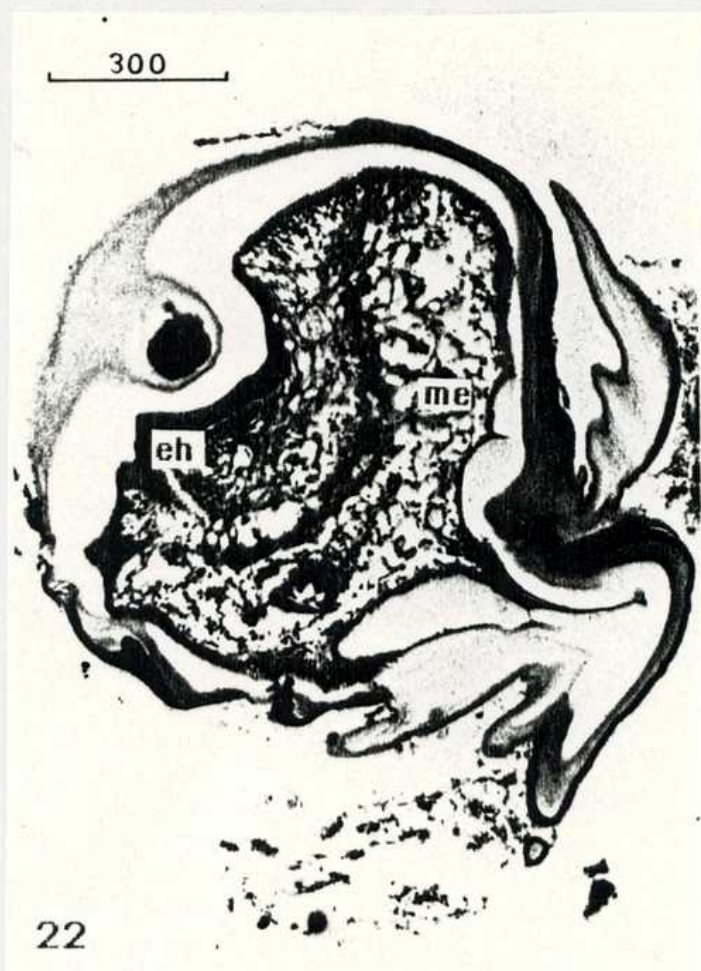


Figura 22.- Crecimiento basal del muñón de regeneración en *Cyrtograpsus angulatus*. Corte transversal (40X).

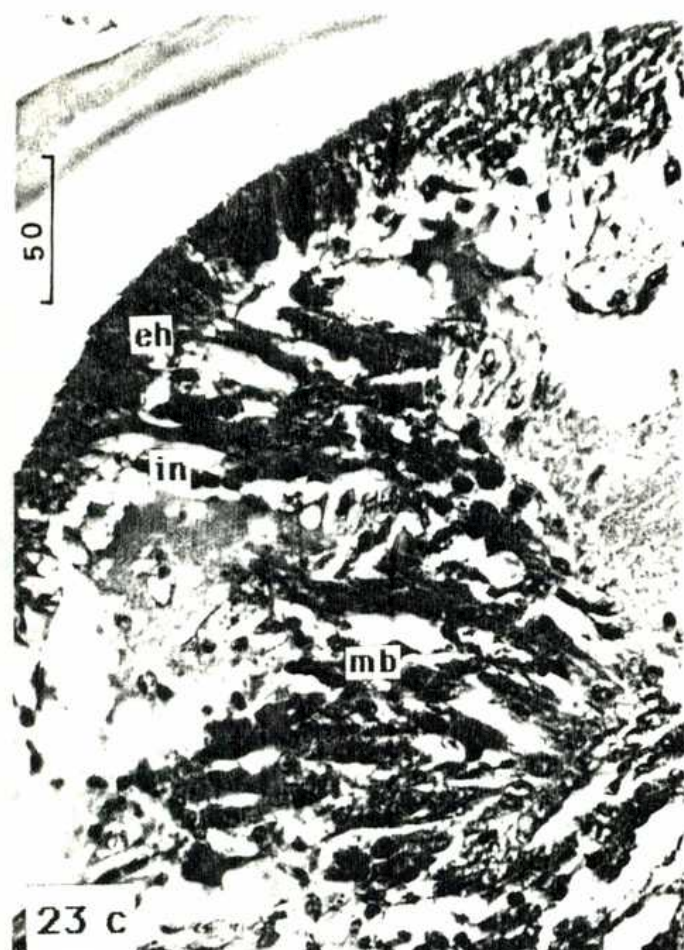
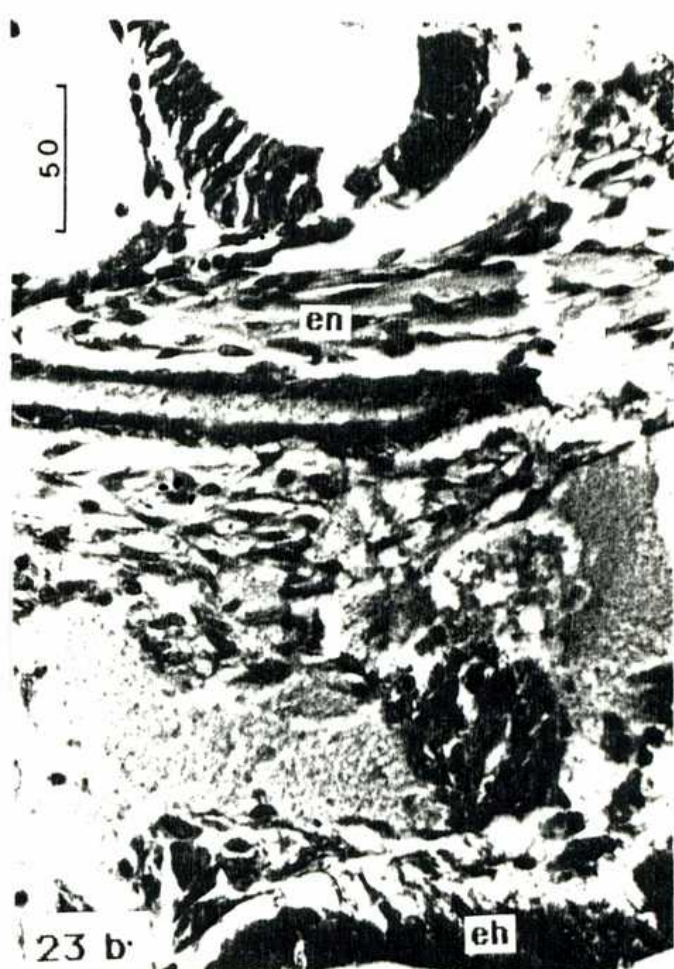


Figura 23.- Crecimiento proecdisial del muñón de regeneración en *Cyrtograpsus angulatus*. a. Corte longitudinal (40X); b y c. Detalles del mismo (250X); d. Mioblastos (400X).

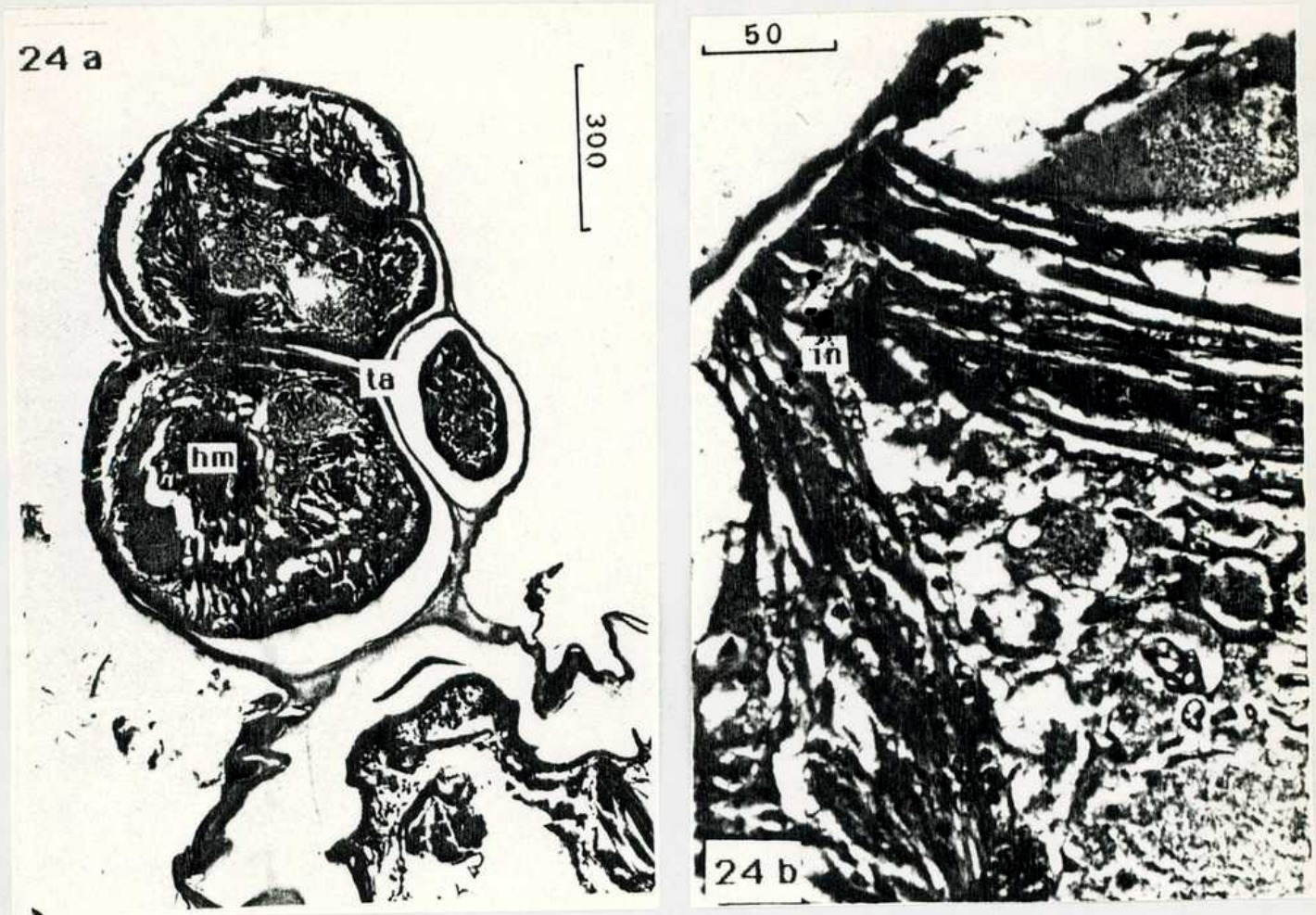


Figura 24.- Crecimiento proecdysial avanzado del muñón de regeneración en *Cyrtograpsus angulatus*. a. Corte longitudinal (40X); b. Inserciones musculares (250X).

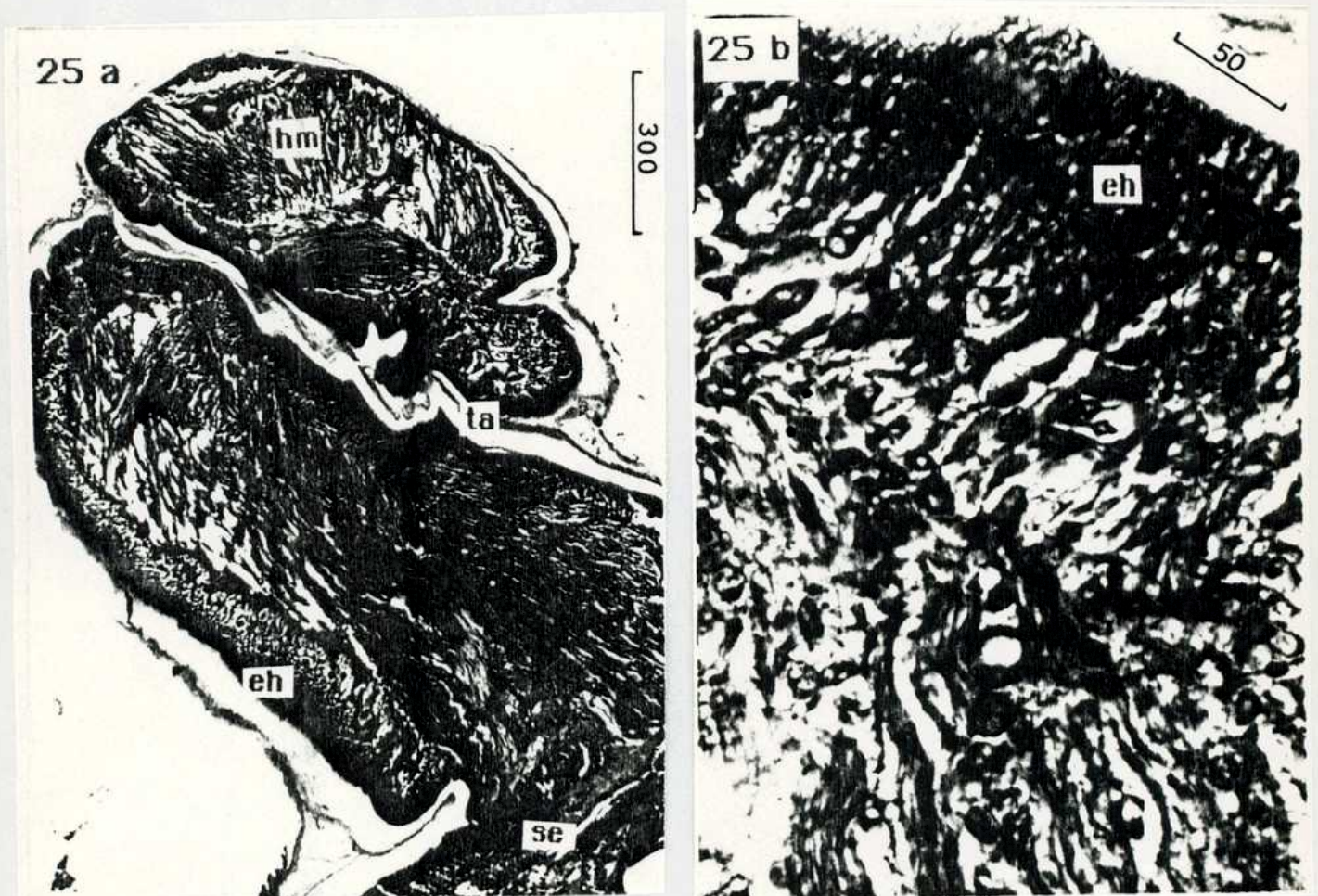
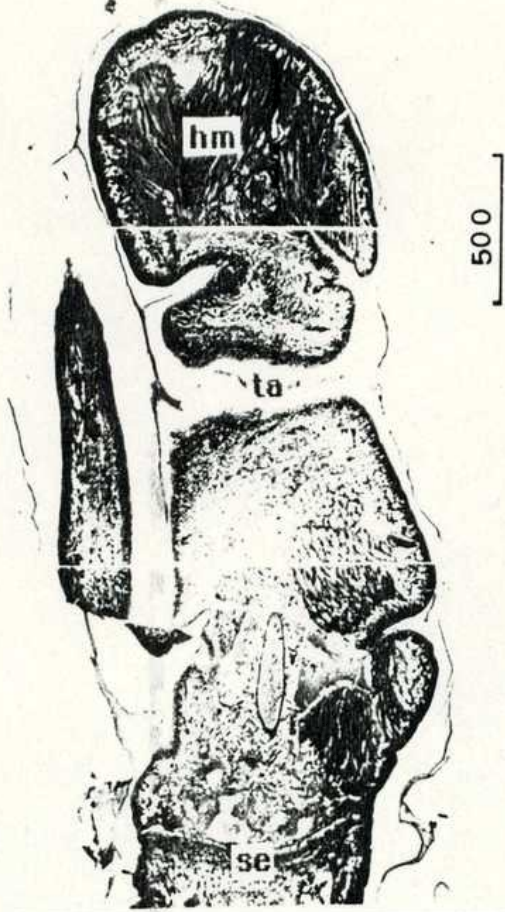
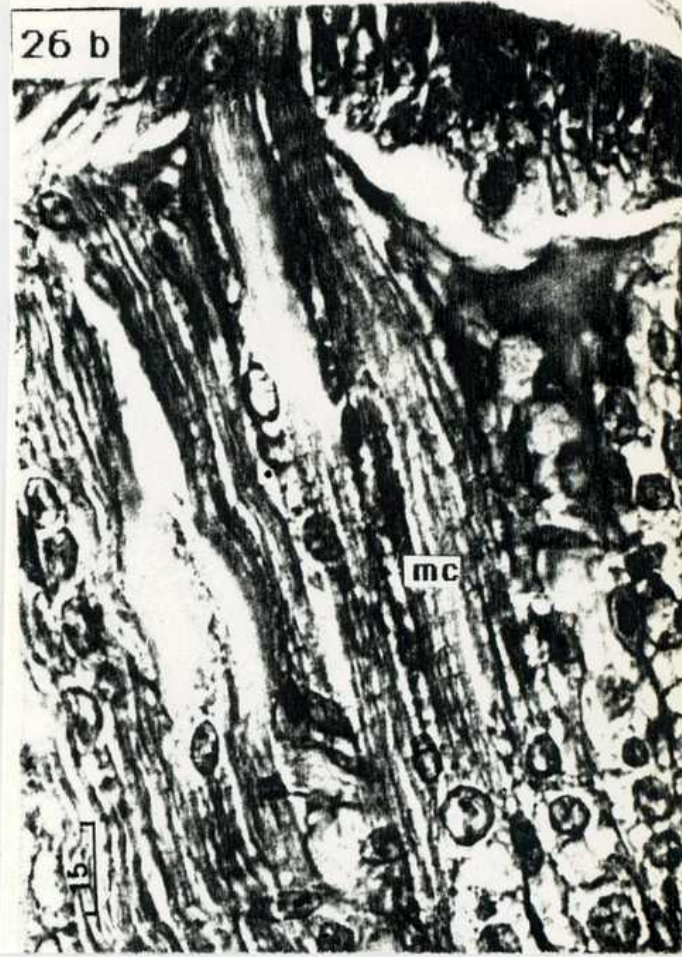


Figura 25.- Crecimiento proecdysial avanzado del muñón de regeneración en *Cyrtograpsus angulatus*. a. Corte longitudinal (40X); b. Detalle (250X).

26 a



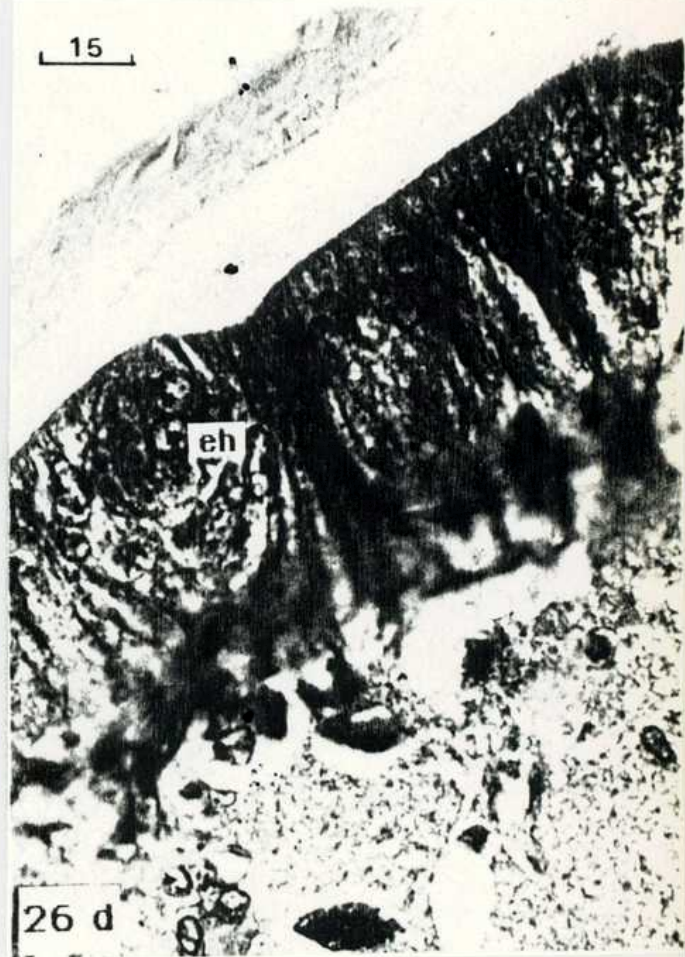
26 b



26 c



15



26 d

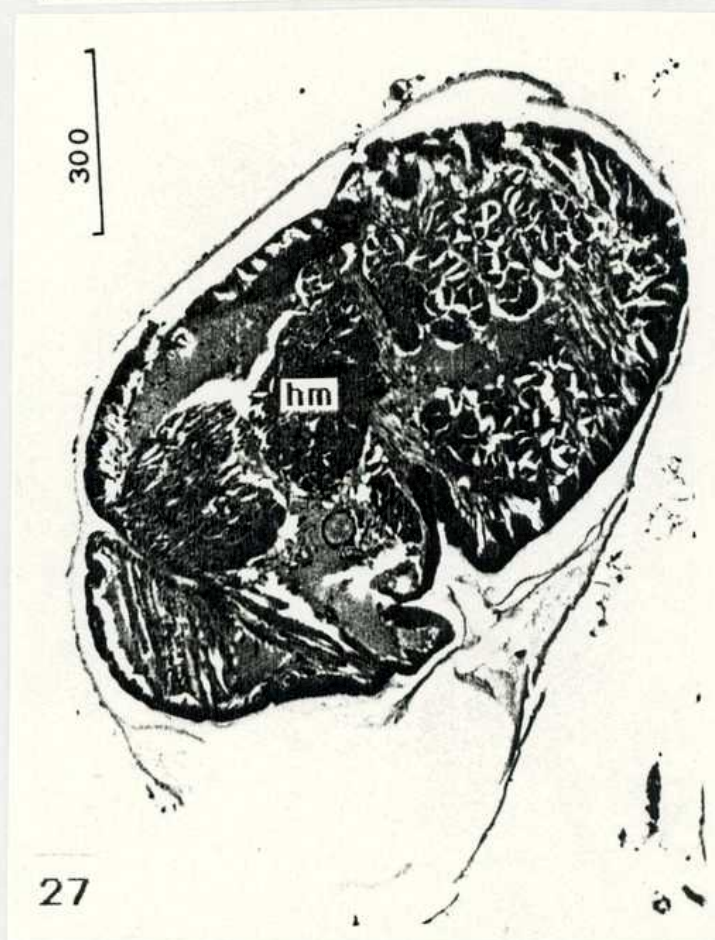
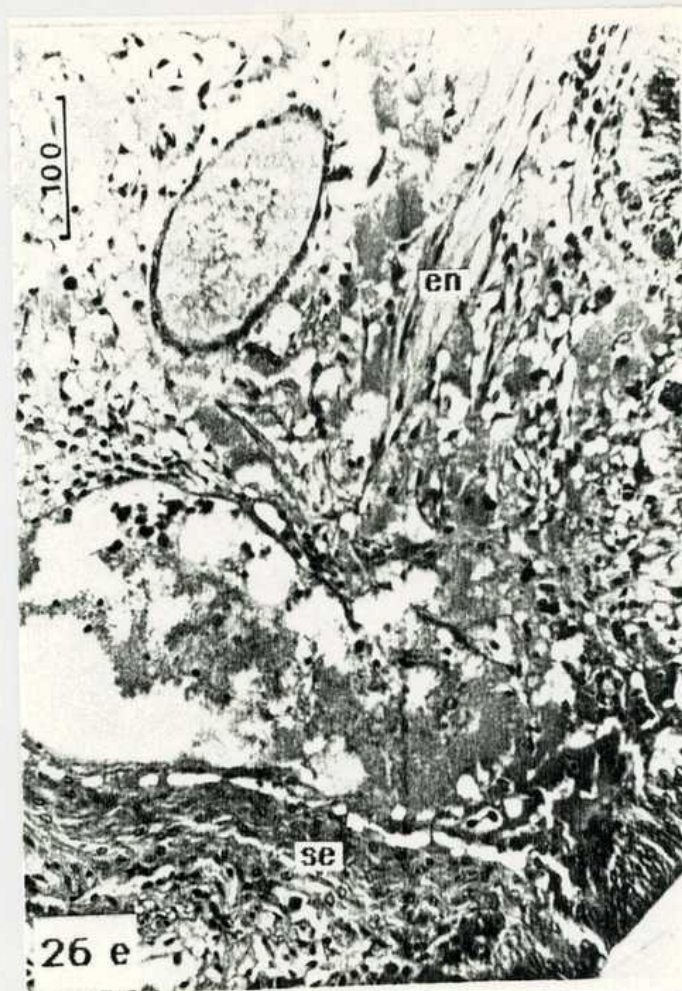


Figura 26.- Muñón de regeneración de *Cyrtograpsus angulatus* poco antes de la muda. **a.** Corte longitudinal (40X); **b.** Campos de miocélulas (400X); **c.** Idem con granulocitos infiltrados (400X); **d.** Epitelio (400X); **e.** Detalle del septum (100X).

Figura 27.- Muñón de regeneración de *Cyrtograpsus angulatus* poco antes de la muda. Corte transversal (40X).

Curvas de R (Índice de regeneración). En la figura 28a se muestran curvas de R para diferentes pereiópodos en regeneración en un mismo animal que fué recolectado presentando una múltiple amputación. Los muñones de todos los apéndices tenían valores de R de 2 a 3. El desarrollo de las curvas es semejante pero los valores finales de R, que se alcanzan poco antes de la muda, varían de acuerdo al apéndice considerado.

Por otro lado, se mantuvieron en el laboratorio cuarenta ejemplares de *Cyrtograpsus angulatus*, cuyos caparazones medían entre 14 y 17 mm de ancho máximo, durante un ciclo intermuda completo. Fueron divididos en 4 grupos de diez individuos cada uno, a los que se forzó a autotomizar sus cuartos pereiópodos 1, 7, 14 y 21 días después de la muda. En la figura 28b se representan típicas curvas R_4 . Se distingue un crecimiento basal del muñón en especímenes que autotomizaron sus pereiópodos desde 36 a 54 días antes de la segunda muda. Este estado duró 6 o 7 días, permitiendo que el muñón alcance un valor de R de 3 a 4 y fue seguido por una meseta de aneodisis que se extendió entre 6 y 15 días. El crecimiento proeodisial del muñón duró desde 13 hasta 35 días y fue interrumpido a veces por una meseta de proeodisis (4 y 10 días) a valores de R de 10. Aquellos especímenes que sufrieron la autotomía desde 26 a 35 días antes de la segunda muda, no mostraron esas fases de crecimiento del muñón; éste creció continuamente desde la amputación hasta la muda. Los especímenes estudiados raramente presentaron una meseta terminal definida; cuando ésta existió, duró 2 a 3 días. Los valores de R finales se encontraron entre 19 y 23 aunque muñones de varios cangrejos alcanzaron menores valores finales (15-16); en estos últimos el tamaño de los apéndices que emergieron después de la muda fue mucho más pequeño que en los normales.

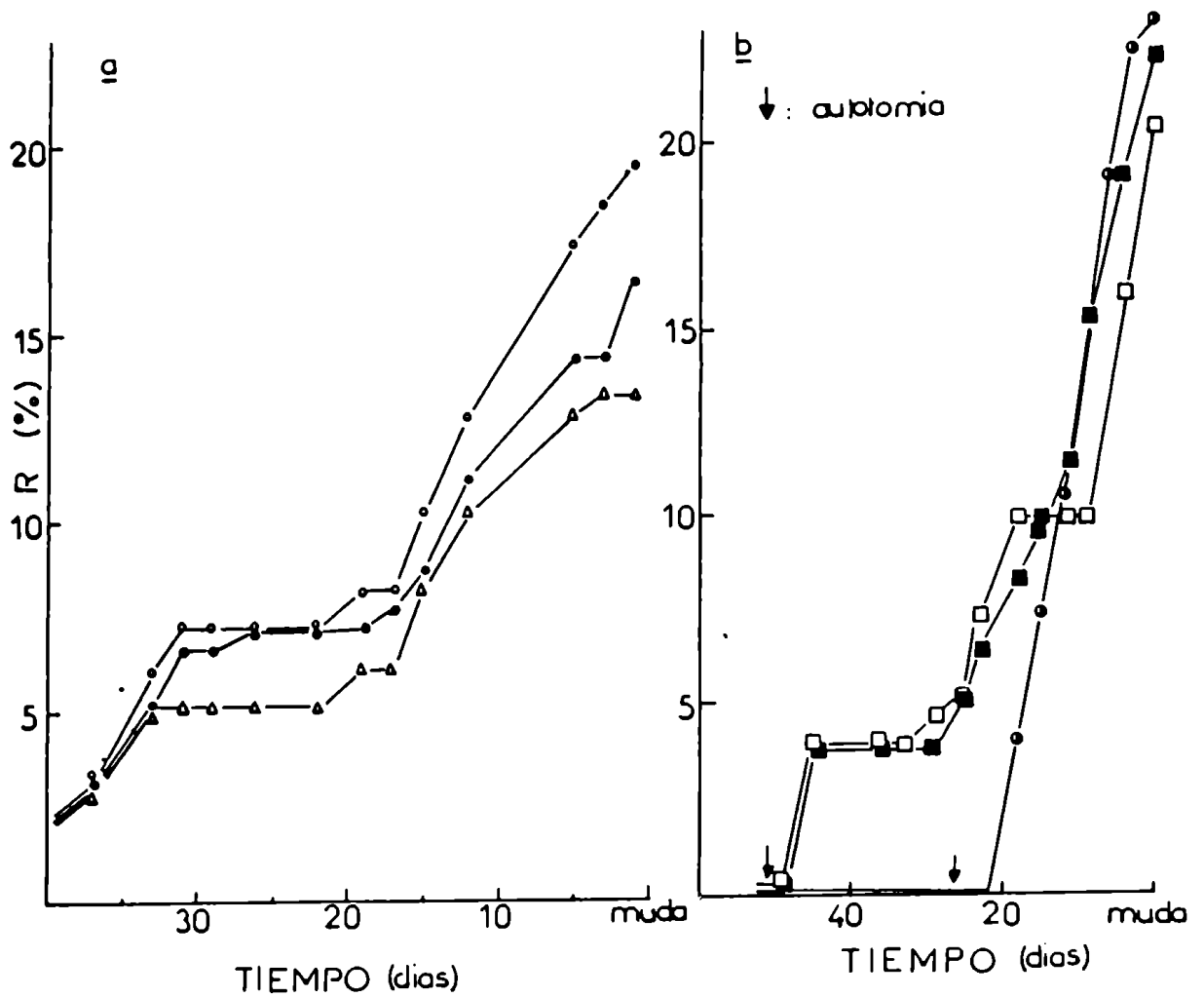


Figura 28. Curvas R individuales en *Cyrtograpsus angulatus*. a) Se trata de tres apéndices en regeneración simultánea en el mismo ejemplar: R₃ círculos abiertos; R₂ : círculos llenos y R₅ : triángulos. b) Se trata de curvas R₄ correspondientes a tres ejemplares amputados poco (cuadrados) o mucho (círculos) después de la muda. En el caso de la curva con cuadrados vacíos, se aprecia una meseta proecdisial.

Discusión. El proceso de cicatrización posterior a la autotomía de un apéndice en *Cyrtograpsus angulatus* parece estar vinculado con un exudado que podría ser similar a la "sangre" coagulada mencionada por Adiyodi (1972) en su completo trabajo sobre la histología de la regeneración de *Paratelphusa hydrodromous*. Al igual que en esa especie, el papel de los granulocitos eosinófilos en este proceso parece ser remarcable en *C. angulatus*, y también parece evidente que los mismos se originan en inmediaciones del filete nervioso interrumpido. La presencia de las retracciones en masa localizadas en el extremo seccionado del nervio pedal que se observan en *C. angulatus*, no fue señalada por Adiyodi (1972). La influencia trófica de los nervios seccionados sobre la cicatrización se menciona frecuentemente, tanto en vertebrados como en invertebrados (una síntesis de esa información es presentada por Adiyodi, 1972) pero su naturaleza y mecanismo de acción permanecen oscuros.

Luego de la aparición del muñón de regeneración a través de la placa basi-isquial o plano de autotomía, comienza en *C. angulatus* la miogénesis, que sigue el esquema observado en *P. hydrodromous*: diferenciación de mioblastos, posiblemente a partir de diferentes tipos celulares, incluso hipodérmicos (los mioblastos, y luego las miocélulas permanecen asociados con la hipodermis por medio de tonofibrillas), división celular de los mioblastos y posterior fusión para dar miocélulas multinucleadas.

La diferenciación del muñón de regeneración parece ser continua en *C. angulatus*; no se encontraron evidencias morfológicas que puedan ser relacionadas con ciertas detenciones del crecimiento del muñón (mesetas en las curvas de R) que suelen observarse en esta especie, al igual que en muchas otras (Skinner, 1985). La separación entre los artejos, dentro de la cutícula que los protege, es muy incipiente

en *C. angulatus* ; comienza casi simultáneamente con la aparición del muñón. Su disposición dentro de la envoltura cuticular, formando dos pliegues, coincide con lo usual en otros *Brachyura* (Skinner, 1985); la presencia de células pigmentarias sobre esa envoltura se verifica gradualmente y comienza por el sector que se encuentra sobre el meropodito. La coloración de base de la cubierta cuticular del muñón cambia poco antes de la muda, constituyendo un indicio externo de su inminencia.

RELACIONES ENTRE REGENERACION Y CICLO DE MUDA

Relaciones entre regeneración simple, múltiple y ciclo de muda. El número de apéndices autotomizados y el tiempo transcurrido entre la última muda y el momento de la autotomía modifican el proceso de regeneración. Las figuras 29 a 33 muestran las curvas de R promedio correspondientes a distintas situaciones experimentales. La Tabla X resume los valores de R previos a la muda y de la velocidad de crecimiento proecdisial del muñón de regeneración en dichas situaciones. Las unidades de velocidad (VR) representan los cambios en el coeficiente R que tienen lugar cada 10% del intervalo de tiempo considerado (muda-muda o amputación-muda). En la figura 29a se observan las variaciones promedio del índice de regeneración R durante un ciclo de muda, para un conjunto de animales a los que se produjo la amputación de un sólo apéndice poco después de la muda. La curva así obtenida representa, en consecuencia, un promedio de las curvas R individuales y exhibe 5 etapas netamente diferenciables. La primera y la última están caracterizadas por una velocidad máxima de crecimiento del muñón de 4 VR (Tabla X) y representan el crecimiento basal y la última parte del crecimiento proecdisial del muñón respectivamente. Luego del crecimiento basal, la velocidad disminuye a 1.5 VR, aumenta más tarde a 2.5 VR para por último alcanzar su valor más bajo: 0.5 VR. A partir de allí el crecimiento comienza a acelerarse hasta alcanzar, en la etapa final, el valor ya mencionado de 4 VR. Probablemente, cada una de estas tres etapas intermedias corresponda, respectivamente, a la meseta anecdisial, a la primera parte del crecimiento proecdisial y a la meseta proecdisial de las curvas R individuales. Se debe tener en cuenta que esta curva promedio se construye a partir de 10 curvas R obtenidas de otros tantos animales: es poco probable que los ciclos de

muda de los mismos estén sincronizados perfectamente y, por lo tanto, que las mesetas mencionadas aparezcan con claridad como tales. El crecimiento basal, la meseta anecdisial y la primera parte del crecimiento proecdisial durarían cada uno una décima parte del ciclo de muda, al igual que el período inicial que no muestra signos de regeneración. La meseta proecdisial y la última parte del crecimiento del muñón durarían un 20 y un 30 % respectivamente.

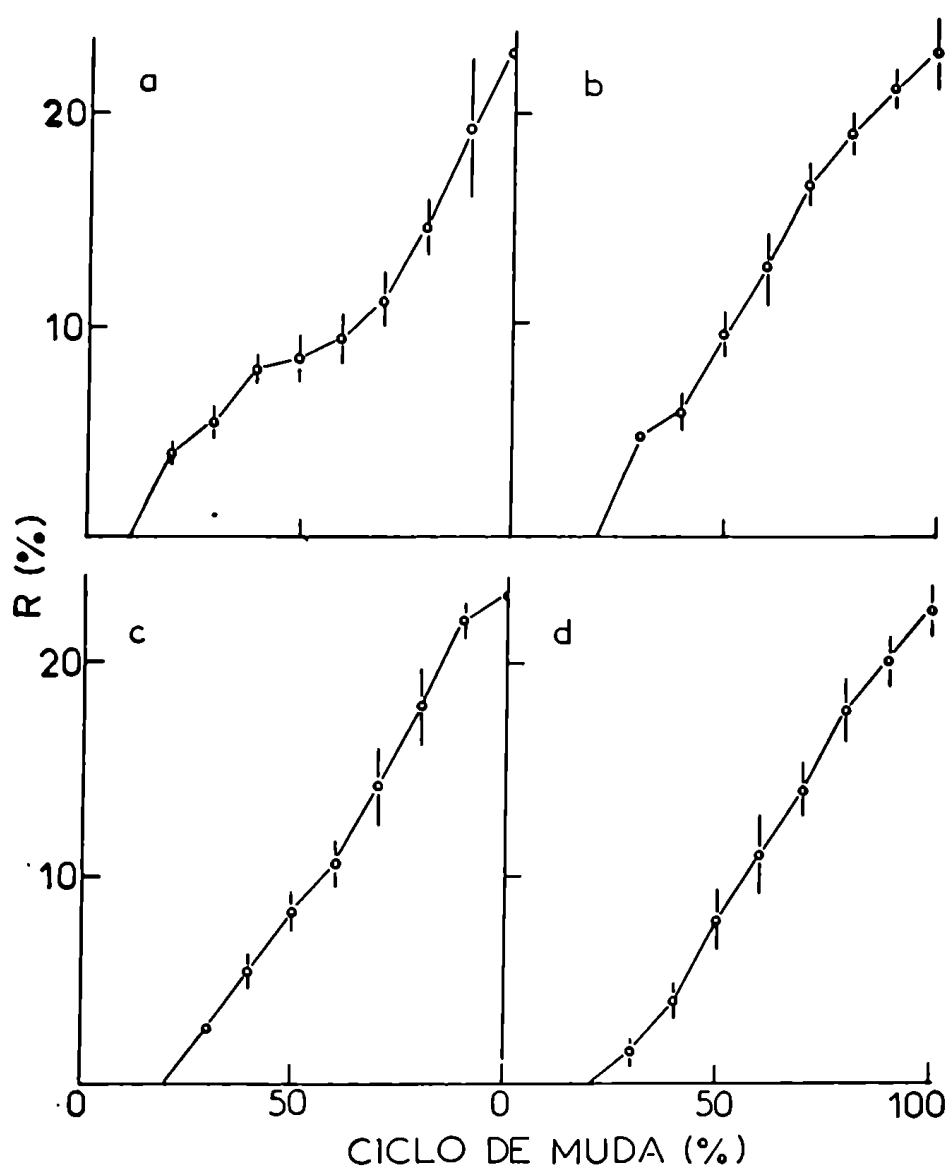


Figura 29.- Curvas promedio R_4 en grupos de *Cyrtograpsus angulatus* con 1 (a), 2 (b), 4 (c) y 6 (d) apéndices amputados poco después de la muda.

Tabla X . Velocidades de crecimiento del muñón de regeneración durante la proecdisis y valores de R finales que se alcanzan en *Cyrtograpsus anquilatus* de acuerdo con el número de apéndices amputados y el tiempo amputación-muda, obtenidos de las figuras 29 a 33. M₁ y M₂: mudas 1 y 2; A: amputación; CM: ciclo de muda; n: número de ejemplares.

n	Número de apéndices	Tiempo M ₁ -A (% CM)	Figura	Escala de tiempo (0-100)	Velocidad de regeneración (VR)	R final
10	1		29a		4.0	23.0
7	2	0	29b	M ₁ -M ₂	3.5	22.8
8	4		29c		3.7	23.2
9	6		29d		3.3	22.6
6	2+2		30a		4.0	23.0
6	2+2	0	30a	M ₁ -M ₂	8.0	23.0
7	4+2		30b		2.4	22.0
7	4+2		30b		7.0	22.0
6	2+2		31a		4.0	23.0
7	4+2	0	31b	A-M ₂	3.5	22.0
8	1+1+1+1		31c		3.3	22.2
7	1	0	32a		3.0	23.2
7	1	20-30	32b	M ₁ -M ₂	3.7	23.5
6	1	40-60	32b		6.0	23.2
7	1	20-30	33a		3.0	23.5
6	1	40-60	33b	A-M ₂	3.0	23.2

Cuando se estudian curvas R promedio de animales a los que se amputaron 2 pereiópodos (Figura 29 b), se observa una reducción de las etapas ya descritas, probablemente por desaparición de la cuarta (meseta proecdisial) y fusión de la tercera y la quinta para originar un crecimiento proecdisial continuo, que ocupa un 60 % del ciclo de muda, con una velocidad de 3.5 VR (Tabla X). El crecimiento basal también dura aquí un 10 % del ciclo de muda y durante el mismo R se incrementa en casi 5 unidades. La meseta aneecdisial insume otro 10 % del ciclo de muda, durante el cual R aumenta una unidad. Al amputarse 4 o 6 apéndices (Figura 29 c y d), la distinción entre crecimiento basal y proecdisial desaparece y un 80 % del ciclo de muda está ocupado por un rápido proceso de crecimiento del muñón de regeneración: 3.7 y 3.3 VR respectivamente, valores próximos al correspondiente al crecimiento proecdisial en animales con 1 o 2 apéndices en regeneración (Tabla X). El valor máximo de R (que se alcanza poco antes de mudar) no varía en las distintas condiciones estudiadas (Tabla X).

El proceso de regeneración afecta las características del ciclo de muda. El intervalo promedio entre dos mudas para animales de tamaño semejante tiende a acortarse a medida que aumenta el número de apéndices amputados (Tabla XI), llegando a valores de menos de la mitad cuando se amputan en forma simultánea 6 apéndices. Al mismo tiempo, la dispersión de los datos observados alrededor del promedio disminuye marcadamente, indicando la existencia de un posible mecanismo de sincronización de los ciclos de muda. El porcentaje promedio de incremento del tamaño del caparazón observado en la muda varía escasamente entre individuos con distinto número de apéndices amputados, sin observarse una tendencia definida. En algunos pocos casos (cuando ese número alcanza a 6), no se registra aumento de tamaño al mudar.

Tabla XI. Relaciones entre el número de apéndices amputados y regenerados, el tiempo transcurrido entre la muda (M) y la amputación (A), y los factores de crecimiento en *Cyrtograpsus anquilatus*. (n: número de ejemplares; IMP: período intermuda; PIBS: porcentaje de incremento de tamaño en cada muda. Los dos últimos se expresan como promedios \pm la desviación standard. A veces, una segunda amputación se efectuó cuando los primeros muñones no alcanzaban (*), o sobrepasaban (**), un valor de R_4 de 16.

Tiempo M-A	Número de apéndices		Ancho del caparazón	IMP	PIBS	n
	amputados	regenerados				
(días)			(mm)	(días)	(%)	
	0		10.6 \pm 0.81	39 \pm 12.0	10.4 \pm 2.3	5
	0		13.5 \pm 0.94	55 \pm 8.0	10.0 \pm 1.3	9
	1	1	10.1 \pm 0.74	36 \pm 4.2	6.6 \pm 3.0	4
	1	1	14.7 \pm 1.02	48 \pm 4.2	8.0 \pm 2.7	6
	2	2	10.5 \pm 0.49	32 \pm 3.3	4.7 \pm 1.9	5
0	2	2	13.9 \pm 1.39	32 \pm 5.3	6.6 \pm 1.2	4
	4	4	10.8 \pm 0.86	30 \pm 6.6	9.7 \pm 2.5	4
	4	4	13.5 \pm 1.06	34 \pm 4.8	9.0 \pm 1.6	10
	6	6	13.6 \pm 1.11	20 \pm 1.5	6.3 \pm 1.4	9
	4+2 (*)	4	9.7 \pm 0.78	22 \pm 1.7	8.0 \pm 1.7	5
	4+2 (**)	6	10.9 \pm 0.41	33 \pm 6.3	6.4 \pm 0.9	7
0	1	1	15.8 \pm 1.29	50 \pm 3.8	8.4 \pm 2.6	7
7	1	1	16.4 \pm 1.97	56 \pm 3.5	3.4 \pm 0.5	3
14	1	1	15.4 \pm 1.16	53 \pm 8.1	7.9 \pm 2.9	7
21	1	1	15.4 \pm 0.97	51 \pm 6.9	10.0 \pm 3.3	5

El efecto de una segunda amputación, de dos apéndices, efectuada sobre cangrejos que estaban regenerando 2 y 4 apéndices, se observa en las figuras 30 a y b respectivamente. Si bien la amputación parece reducir la velocidad de crecimiento de los muñones en curso de regeneración, el proceso en general no presenta demasiadas variaciones con respecto a lo observado. Los valores de la velocidad de crecimiento proecdisial son de 4 y 2.4 VR respectivamente (Tabla X).

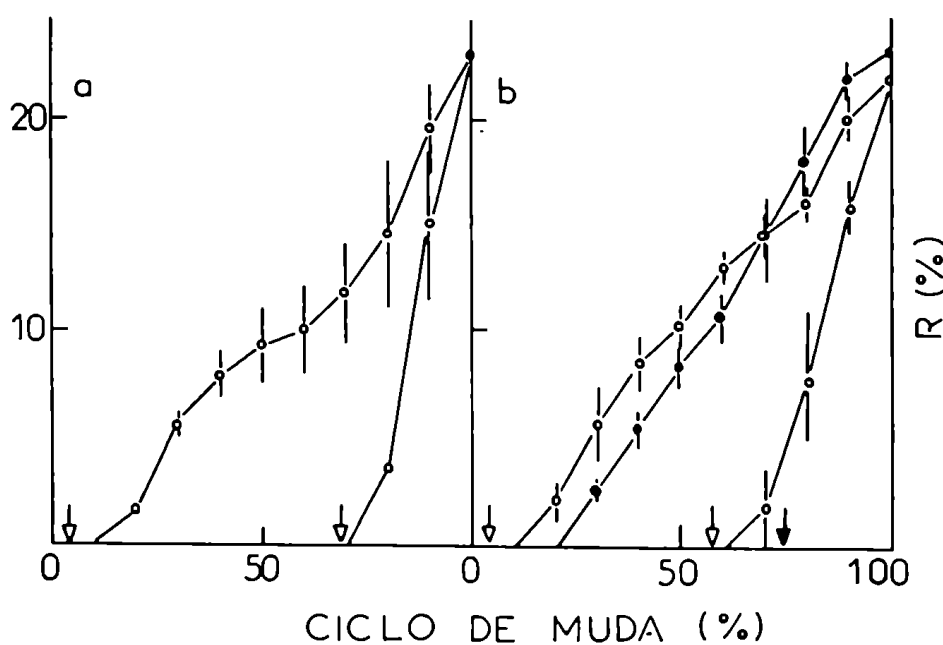


Figura 30.- Efecto de una segunda amputación de 2 apéndices sobre la regeneración de otros 2 (a) o 4 (b) que fueron amputados previamente, en *Cyrtograpsus angulatus*. Las flechas indican el momento de la amputación. En a y en b, con círculos abiertos se representa el caso de una segunda amputación ocurrida antes del período crítico y el proceso de desarrollo de los respectivos muñones. En b, con círculos y flechas llenos, se muestra el caso de una segunda amputación posterior al período crítico y que no dió lugar a regeneración. Son siempre curvas promedio R_4 .

Se produce regeneración si la amputación adicional de dos apéndices tiene lugar luego que otros dos o cuatro, en proceso de regeneración, alcancen valores de R_3 o R_4 menores de 16. La velocidad con que se regeneran los apéndices amputados en segundo término es del doble de la que se registra para los primeros dos o cuatro (8 y 7 VR respectivamente) de modo que todos los muñones alcanzan valores de R equivalentes en el momento de la muda (Figura 30 a y 30 b, círculos llenos, siempre se comparan apéndices contralaterales). Sin embargo, cuando la curva de R de los apéndices amputados en segundo lugar se representa considerando como 100 % al tiempo transcurrido entre la amputación y la muda (Figura 31), se observan velocidades de regeneración de 3.3 a 4 VR (Tabla X). Esto ocurre tanto en animales que ya tenían dos apéndices en regeneración (Figura 31 a), cuatro apéndices en regeneración (Figura 31 b, círculos abiertos) o 3 apéndices en regeneración amputados con una semana de diferencia entre cada uno (Figura 31 b, círculos llenos). Esos valores son análogos a los que se registran en el crecimiento proecdisial de los pereiópodos que se vienen regenerando a lo largo del ciclo de muda completo (Tabla X). El IMP de animales con seis apéndices en regeneración es muy semejante ya sea si las amputaciones fueron simultáneas o bien si se efectuaron primero cuatro y luego otras dos (Tabla XI).

La regeneración no tiene lugar si dos apéndices son amputados cuando otros cuatro, amputados previamente, llegan a un valor R_4 mayor de 16. En ese caso el crecimiento de los primeros cuatro muñones no se modifica (Figura 30 b, círculos abiertos) y el IMP no varía con respecto a animales con sólo cuatro apéndices en regeneración (Tabla XI).

La regeneración puede tener lugar cuando un apéndice es amputado en distintos momentos del ciclo de muda. En efecto, considerando que el crecimiento de un muñón alcanza valores de R iguales a 16 cuando ha transcurrido algo más de un 80 % del ciclo de muda (Figura 29 a) y que una nueva amputación no conduce a una regeneración cuando la primera alcanza dichos valores (Figura 30 b), se puede concluir que la regeneración puede tener lugar durante cualquier momento del ciclo, excepto el 20 % final.

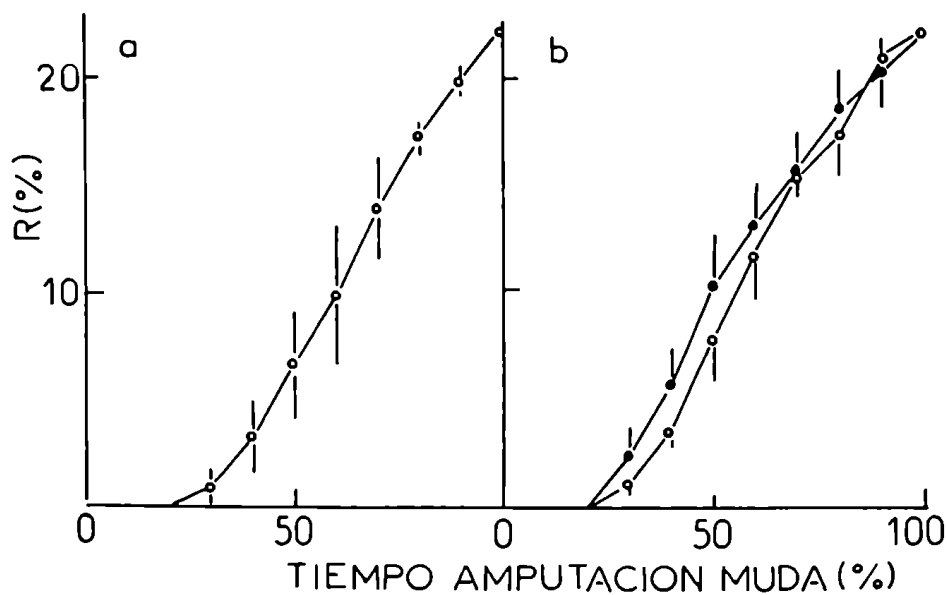


Figura 31.- Curvas R_4 promedio de muñones producto de una segunda amputación efectuada en *Cyrtograpsus angulatus* que tenían 2 (a), 4 (b, círculos abiertos) o 3 (b, círculos llenos) apéndices en regeneración, representadas en función del tiempo amputación muda. Las figuras 31a y 31 b (círculos abiertos) provienen de 30a y 30 b respectivamente.

El crecimiento de muñones de regeneración correspondientes a apéndices amputados en distintos momentos luego de la muda se muestra en la figura 32. A

medida que se va retrasando el momento de la amputación, las etapas de las curvas de R se van perdiendo de una manera semejante a la descrita en los casos de amputación múltiple, sin modificar los valores finales de R (Figura 32 b). La velocidad final de crecimiento del muñón, aumenta a medida que se posterga la amputación (Tabla X), alcanzando valores de 6 VR cuando se produce aproximadamente en la mitad del ciclo de muda. En este caso, dicha velocidad es muy semejante desde la amputación a la muda (Figura 32 b, círculos llenos). Ni el IMP ni el PIBS son afectados por el momento del ciclo de muda en que se produce una amputación sola (Tabla XI).

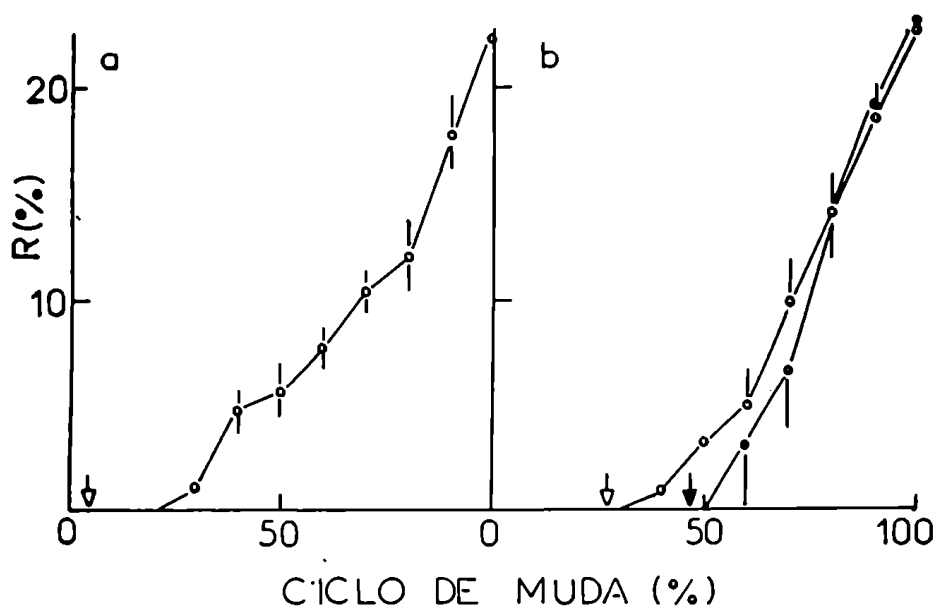


Figura 32.- Curvas R_4 promedio en *Cyrtograpsus angulatus* luego de una amputación inmediatamente posterior a la muda (a), efectuada cuando ha transcurrido entre un 20 y un 30 % del ciclo de muda (b, círculos abiertos) y entre un 40 y un 60 % del ciclo de muda (b, círculos llenos). Las flechas representan el momento de la amputación.

De todas maneras, cuando los valores de R se representan en función del tiempo transcurrido entre la amputación y la muda (Figura 33), las velocidades se aproximan en los grupos de cangrejos que fueron amputados en distintos momentos del ciclo de muda (Tabla X).

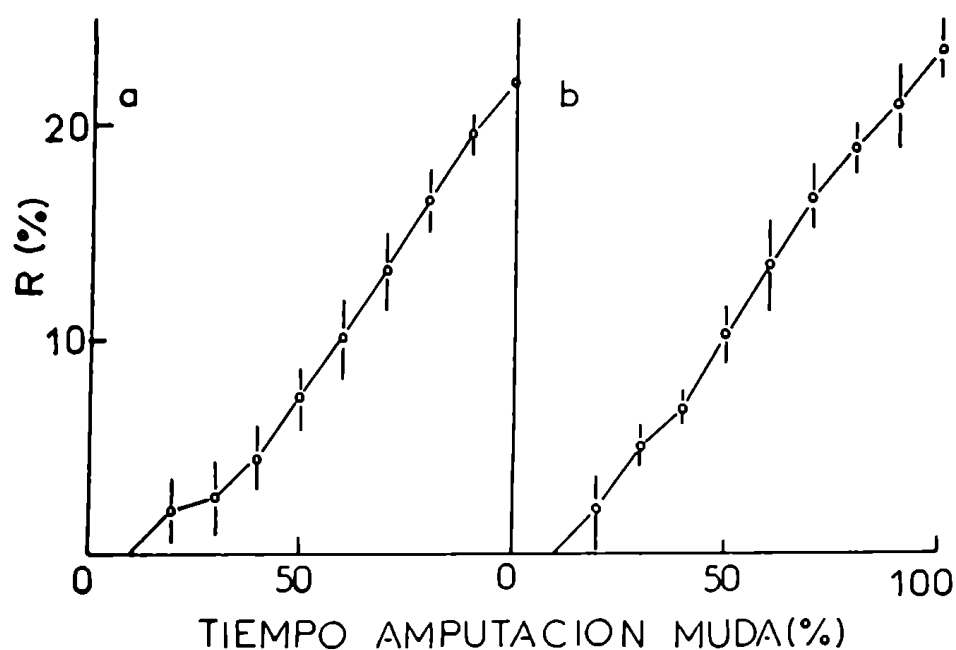


Figura 33.- Curvas R_4 promedio de la figura 32b, representadas en función del tiempo amputación-muda.

Duración de la proecdysis. Si se acepta que el crecimiento proecdysial del muñón en animales que tienen apéndices en regeneración coincide coincide con el estadio proecdysial del ciclo de muda (Bliss & Boyer, 1964), el comienzo de la proecdysis puede establecerse aproximadamente por medio de las curvas de R de dos maneras:

analizando los cambios de pendiente que pueden representar el comienzo del crecimiento proecdial del muñón o encontrando en qué momento antes de la muda una autotomía inducida genera curvas de R sin variaciones apreciables de pendiente desde la emergencia de la papila hasta la ecdisis. En *C. angulatus* con 14 y 15 mm de ancho del caparazón la proecdial comienza en promedio 29 días antes de la muda y con 10 mm de ancho, ese valor se reduce a 22 días (Tabla XII). En consecuencia, puede establecerse que, en nuestros estudios de laboratorio, la premuda comienza cuando ha transcurrido entre un 36 y un 40 % del ciclo de muda.

Tabla XII . Duración de la etapa proecdial de *Cyrtograpsus angulatus*. La misma fué estimada tomando en consideración los cambios de pendiente en las curvas de R (*). Si las curvas de R no presentaban mesetas desde la emergencia del muñón hasta la muda (**), se consideró que la proecdial coincidía con todo el período de regeneración (tiempo desde la autotomía hasta la ecdisis). Los valores se expresan como promedios \pm la desviación standard.

Ancho (mm)	Período de regeneración (días)	Período intermuda (IMP) (días)	Estimación de la duración de la premuda (P) (días)	Razón IMP/P (%)	
15.53 \pm 1.09	47.83 \pm 3.92	49.83 \pm 3.92	29.83 \pm 2.71	59.86	(*)
14.36 \pm 1.07	29.62 \pm 4.10	46.12 \pm 5.03	29.62 \pm 4.10	64.22	(**)
10.10 \pm 0.74	34.00 \pm 4.24	36.00 \pm 4.24	21.75 \pm 3.20	60.41	(*)

Discusión. El crecimiento del muñón de regeneración a lo largo del ciclo de muda en cangrejos a los que se amputó un solo apéndice muestra un período inicial y

otro final de máxima velocidad, separados por otros de menor velocidad. A medida que aumenta el número de apéndices autotomizados, la separación entre ambas fases de máximo crecimiento va desapareciendo hasta obtener una curva de R de pendiente uniforme desde la amputación hasta la muda. Esto también ha sido señalado en *Gecarcinus lateralis* (Skinner & Graham, 1970, 1972) y en *Uca pugilator* (Fingerman & Fingerman, 1974). El período entre mudas se abrevia a medida que el número de apéndices autotomizados aumenta, al igual que ocurre en por lo menos 13 especies de Brachyura (Skinner, 1985); en cambio, a lo largo de nuestras experiencias el incremento de tamaño por muda generalmente no varía. Sólo ocasionalmente tienen lugar ecdisis con regeneración pero sin crecimiento, como ocurre con frecuencia en *U. pugilator* (Hopkins, 1982).

Una segunda amputación puede dar lugar a una nueva regeneración si ocurre antes de transcurrido una cierta parte del ciclo de muda, el llamado "período crítico". En *C. angulatus*, el período crítico se correlacionó con el valor de R de pereiópodos que venían regenerándose. El mismo método fué usado en *U. pugilator* (Weis, 1976) y en ambos cangrejos el valor determinado fue de R_{3-4} igual a 16. El proceso de regeneración de un apéndice no parece variar cuando uno nuevo es amputado, ya sea que ello se produzca antes o después del período crítico. Si una nueva regeneración se inicia, tiene lugar a una velocidad del doble de la que desarrollaba el primer apéndice en regeneración. De esta manera, si se trata de apéndices contralaterales, ambos alcanzan juntos un mismo valor de R en el momento de la muda. Sin embargo, cuando se comparan las curvas de R dando un valor de 100 al intervalo amputación-muda, se observa que la velocidad relativa de crecimiento es la misma para los apéndices amputados en primer lugar (en ellos el intervalo amputación-muda es casi igual al

muda-muda; se considera sólo la velocidad de la etapa final) y para aquellos amputados posteriormente.

A diferencia de lo que ocurre en *U. pugillator* (Weis, 1976), el intervalo entre dos mudas no varía cuando una segunda amputación tiene lugar antes que el primer apéndice en regeneración alcance valores de R correspondientes al período crítico, pero se acorta si ello ocurre luego de ese momento.

A lo largo de un 80 % del ciclo de muda, antes del período crítico, puede haber regeneración. Las curvas de R de apéndices amputados en distintos momentos del ciclo de muda tienden a hacerse lineales, perdiendo las mesetas e incluso la diferencia entre crecimiento basal y proecdisial, a medida que la amputación es más tardía. Los valores finales de R tampoco se modifican en este caso. Ello es semejante a lo comunicado por Bliss (1956), quien relaciona el fenómeno de la desaparición de la meseta anecdisial de las curvas de R con el momento del comienzo de la proecdisis. La velocidad de regeneración también aumenta en las amputaciones más retrasadas. En este caso, si se representa R en función del período transcurrido entre la amputación y la muda, se verifica nuevamente que la velocidad relativa de crecimiento del muñón es la misma en todos los casos. Los muñones de regeneración crecen, entonces, con una velocidad que es independiente del tiempo en que se produjo la amputación.

Se observa un cambio marcado en la pendiente de las curvas individuales de R (Figura 28) cuando el tiempo transcurrido desde la muda es un 40% del ciclo de muda total, indicando el comienzo del crecimiento proecdisial del muñón. En *O. lateralis* (Bliss & Boyer, 1964) y en *U. pugillator* (Hopkins, 1982), el crecimiento proecdisial del muñón comienza cuando ha transcurrido entre un 70 y un 80 % del ciclo de muda. Estas especies tienen, sin embargo, un período intermuda varios meses

más largo que el de nuestros juveniles *C. angulatus*. Los animales a los que se forzó a autotomizar su 4º pereiópodo cuando había transcurrido entre un 32 y 40 % del ciclo de muda, tienen curvas sin cambios de pendiente desde la emergencia del muñón hasta la ecdisis. Proponemos que en esta especie la premuda dura aproximadamente un 60% de la totalidad del ciclo de muda; es algo más larga que la de *Podophthalmus vigil*, determinada a partir del estudio del tegumento de los apéndices (Sather, 1966).

ESTRUCTURA Y VARIACIONES DEL CAPARAZON CEFALOTORACICO

Incremento del peso seco del caparazón durante la metecdisis (postmuda).

Seis submuestras de cangrejos sacrificados en diferentes momentos después de la muda fueron procesados como se describe en materiales y métodos. La figura 34 muestra gráficos del peso seco del caparazón en función del ancho del mismo para animales desde el momento de la muda (T = 0) hasta 250 horas más tarde (T = 250). También se representan los datos provenientes de las exuvias de animales recientemente mudados. La relación general que vincula estas dos variables tiene la siguiente forma:

$$W_e = b \cdot W_i^a$$

donde W_e es el peso seco del caparazón, W_i es su ancho y a y b son coeficientes calculados a partir de la regresión doble logarítmica de los datos.

La Tabla XIII resume los valores de a , b , y el coeficiente de correlación r de cada regresión lineal. Los valores de r son siempre altos y las correlaciones significativas ($P < 0.1 \%$). Sin embargo, r disminuye después de la muda, alcanzando un valor mínimo para la relación correspondiente a $T = 50$. Se registran variaciones del coeficiente a pequeñas y no significativas ($P > 1 \%$), pero el coeficiente b exhibe un incremento continuo desde la regresión $T = 0$ hasta $T = 250$. Los parámetros correspondientes a la regresión de las exuvias muestran marcadas diferencias con respecto a las otras curvas (Tabla XIII).

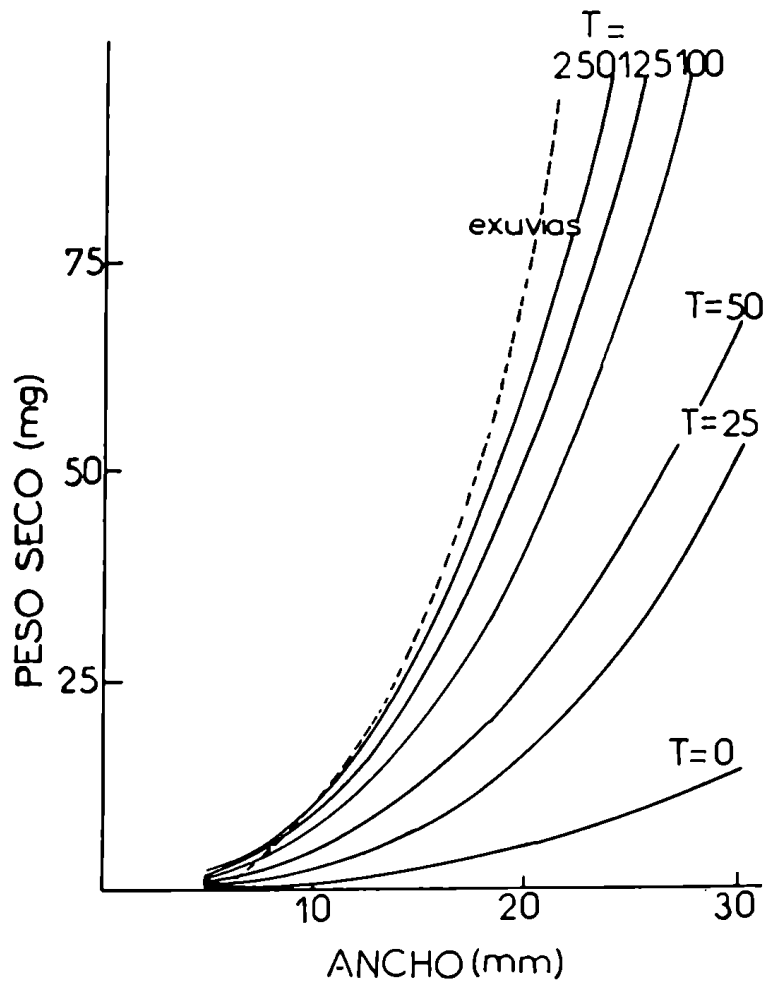


Figura 34.- Relaciones entre el peso seco y el ancho del caparazón en *Cyrtograpsus angulatus*: curvas de regresión del peso (W_e) vs el ancho (W_i), transcurridos diferentes tiempos (T, expresado en horas) luego de la muda, correspondientes a la ecuación general $W_e = b \cdot W_i^a$.

Tabla XIII . Relaciones entre el peso seco (We) y el ancho (Wi) del caparazón de *Cyrtograpsus anquilatus* para diferentes tiempos transcurridos desde la muda. a y b son coeficientes de regresión y r el coeficiente de correlación.

Tiempo transcurrido desde la ecdisis (horas)	Coeficientes de la ecuación $We = Wi^a \cdot b$			Número de ejemplares
	a	b	r	
0	2.61	0.0019	0.98	21
25	2.76	0.0040	0.94	14
50	2.47	0.0150	0.86	19
100	2.60	0.0170	0.92	21
125	2.64	0.0188	0.95	40
250	2.64	0.0214	0.99	38
Exuvias	2.95	0.0105	0.99	21

Se seleccionaron tres valores de ancho del caparazón, 10, 15, y 20 mm respectivamente, y se calcularon los pesos secos del caparazón correspondientes a distintos tiempos transcurridos luego de la muda por medio de los modelos de regresión de la figura 34 y la Tabla XIII ; con esos datos se trazó la figura 35.

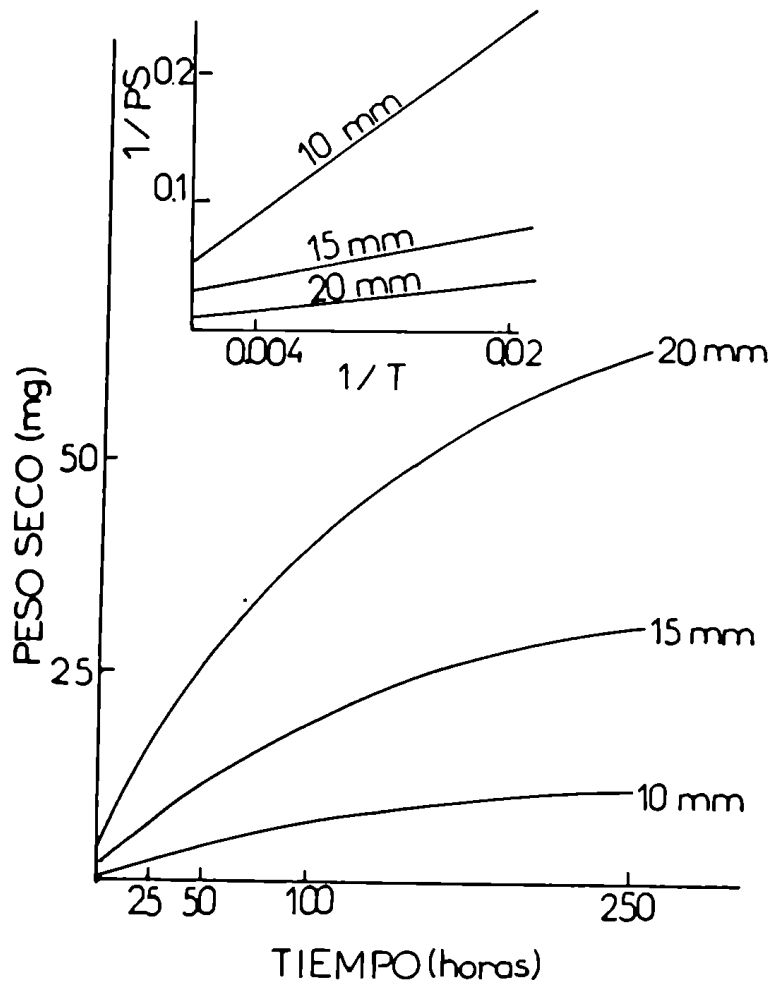


Figura 35.- Incremento del peso seco del caparazón de *Cratogeomys angulatus* luego de la muda. Se seleccionaron tres valores de ancho del caparazón (10, 15 y 20 mm) y se calcularon los pesos secos correspondientes a distintos tiempos luego de la muda usando las relaciones ancho-peso. En el recuadro, se representa la inversa del peso contra la inversa del tiempo para cada ancho considerado.

La inversa de los valores de peso seco está relacionada linealmente con la inversa del tiempo de acuerdo a la ecuación general:

$$1/W_e = 1/(T \cdot WIR_i) + 1/W_{e_{\infty}}$$

donde T es el tiempo transcurrido desde la muda, $W_{e_{\infty}}$ el peso seco máximo hipotético

que podría ser alcanzado después de un ciclo de muda infinitamente largo, y WIR_j la tasa inicial de incremento de peso seco. Tanto We_{∞} como WIR_j son constantes para cada ancho de caparazón. En consecuencia, los datos del incremento de peso seco del caparazón después de la muda pueden ser ajustados por curvas hiperbólicas que tienen la forma general:

$$We = \frac{We_{\infty} \cdot T}{(We_{\infty}/WIR_j) + T}$$

La pendiente de estas curvas es la tasa de incremento del peso seco WIR

$$WIR = We/T = \frac{We_{\infty}}{(We_{\infty}/WIR_j) + T}$$

y el incremento del peso seco puede ser comparado entre diferentes anchos del caparazón por medio de las tasas iniciales WIR_j

$$WIR_j = We_0/T_0$$

Los parámetros de las ecuaciones, los valores de correlación y los coeficientes de las regresiones de $1/We$ y $1/T$ fueron calculados para varios anchos del caparazón (Tabla XIV). También se presentan los tiempos necesarios para alcanzar un 50, 75 y

90 % del We_{∞} (T 50%, T 75% y T 90% respectivamente).

Tabla XIV . Peso seco del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* en función del tiempo luego de la muda. Los parámetros de las ecuaciones (WIR_j ; We_{∞}) fueron calculados a partir de las conversiones lineares (ver texto) para cinco valores del ancho de caparazón. Se incluyen el coeficiente de correlación lineal r y el tiempo necesario para alcanzar pesos del 50%, 75% y 90% del We_{∞} .

Ancho	WIR_j	We_{∞}	r	T50%	T75%	T90%
(mm)	(mg/hora)	(mg)		días		
5	0.015	4.43	0.9823	12.14	36.35	108.40
10	0.107	18.28	0.9967	7.12	21.36	64.04
15	0.321	49.75	0.9983	6.45	19.34	58.01
20	0.714	96.15	0.9964	5.61	16.82	50.46
25	1.316	163.93	0.9914	5.19	15.57	46.71

Incremento del peso seco del caparazón durante la proecdisis (premuda).

Durante esta etapa del ciclo de muda, la hipodermis segrega una nueva cutícula debajo de la existente. Los cocientes entre los pesos secos del nuevo y viejo caparazón y los valores de R fueron calculados simultáneamente para 84 cangrejos sacrificados en la proecdisis. Los datos totales fueron clasificados de acuerdo con el apéndice en regeneración y los valores de dichos cocientes (Tabla XV). También se calculó el promedio de R para cada grupo.

Tabla XV . Relaciones entre el largo de los muñones de regeneración de diferentes pereiópodos de *Cyrtograpsus angulatus* y la razón entre los pesos secos de la nueva y vieja cutícula durante la muda. Los valores de R (ver texto) se expresan como promedio \pm la desviación standard de n ejemplares, para dos grupos de diferente razón entre los pesos secos cuticulares y para un grupo en el cual no fué posible separar las cutículas vieja y nueva.

Pereiópodo en regeneración	Cociente entre los pesos secos de las cutículas		
	No separable	3-9%	9.1-15%
	R	R	R
2º	16.41 \pm 2.00 (n=5)	18.91 \pm 1.79 (n=7)	22.94 \pm 1.35 (n=4)
3º o 4º	19.69 \pm 2.29 (n=16)	21.92 \pm 2.15 (n=26)	25.09 \pm 1.08 (n=11)
5º	12.39 \pm 0.68 (n=4)	15.55 \pm 1.53 (n=7)	19.19 \pm 2.47 (n=4)

En el caso de los muñones muy pequeños (a los que corresponden los menores valores de R) fue imposible, en todos los apéndices, separar la nueva caparazón intacta y por lo tanto, calcular la razón de los pesos secos. Por otra parte, los valores de R se incrementan cuando lo hace el cociente entre los pesos secos del caparazón nuevo y el viejo (Tabla XV). Ambos caparazones pueden ser separados pocos días antes de la muda pero el estadio proecdisial comienza antes, probablemente durante la segunda fase del crecimiento proecdisial del muñón de regeneración. La figura 36 muestra valores del peso seco de nuevos caparazones representado en función de valores de R_4 , para dos grupos de cangrejos cuyos anchos variaron entre 11 y 12.9

mm y entre 9 y 10.9 mm (11 y 7 especímenes respectivamente).

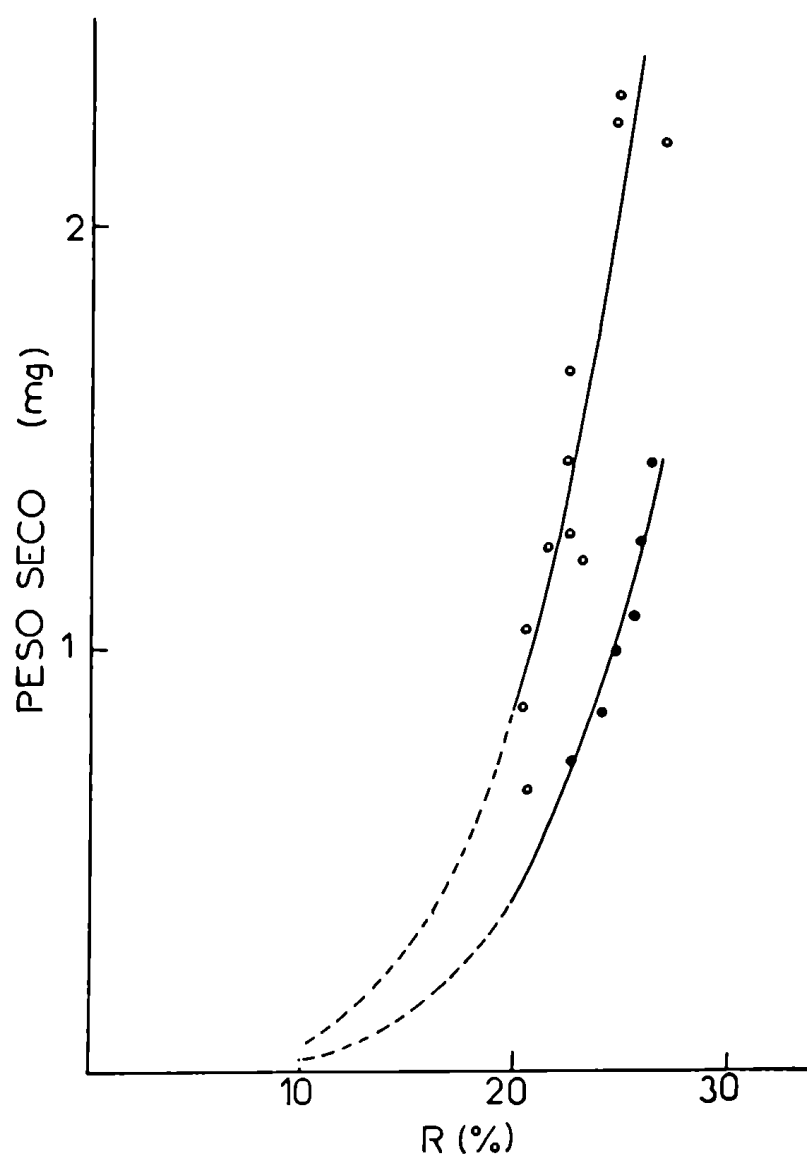


Figura 36.- Incremento en el peso seco del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* durante la proecdisis, para cangrejos de 9- 10.9 (círculos llenos) y de 11 a 12.9 (círculos vacíos) mm de ancho del mismo. R es la longitud relativa de muñones de regeneración. El nuevo exoesqueleto sólo puede ser completamente separado del viejo cuando $R = 20$.

Estas dos variables están relacionadas por ecuaciones del tipo:

$$We = m \cdot R^n$$

Para el primer grupo, $m = 5.92 \cdot 10^{-6}$ y $n = 3.963$ ($r = 0.895$, $P < 0.1$ %) y para el segundo, $m = 8.91 \cdot 10^{-7}$ y $n = 4.340$ ($r = 0.960$, $P < 0.1$ %).

Cociente entre el peso seco de los caparazones nuevo y viejo en la ecdisis. Si se supone un incremento continuo en el peso seco del nuevo caparazón (We_n) simultáneo con una disminución del correspondiente al viejo (We_o), debido a la reabsorción del mismo, su cociente deberá ser máximo en el momento de la ecdisis. Se midieron los pesos secos de los caparazones de cangrejos sacrificados no más de una hora después de la muda y de sus correspondientes exuvias (We_{ex}). Ambas variables son directamente proporcionales (Figura 37, recuadro):

$$We_n = 0.45 + 0.09 We_{ex} \quad (2) \quad (r = 0.965, P < 0.1 \%)$$

La razón entre los pesos secos del nuevo y viejo caparazón es máxima en la muda pero varía de acuerdo al ancho del caparazón. Para calcular el cociente esperado en la ecdisis para cangrejos de diferentes tamaños, el peso seco de las exuvias correspondiente a un ancho dado en la premuda fue calculado usando la relación:

$$We = 0.0105 \cdot W_i^{2.95} \quad (\text{Tabla XIII})$$

mientras que el peso seco de la correspondiente nueva caparazón fue obtenido de la ecuación (2). Luego pudo ser calculada la razón entre ambos pesos, tal como se hizo en los cangrejos en proecdisis y representada en función del ancho en la premuda (Figura 37).

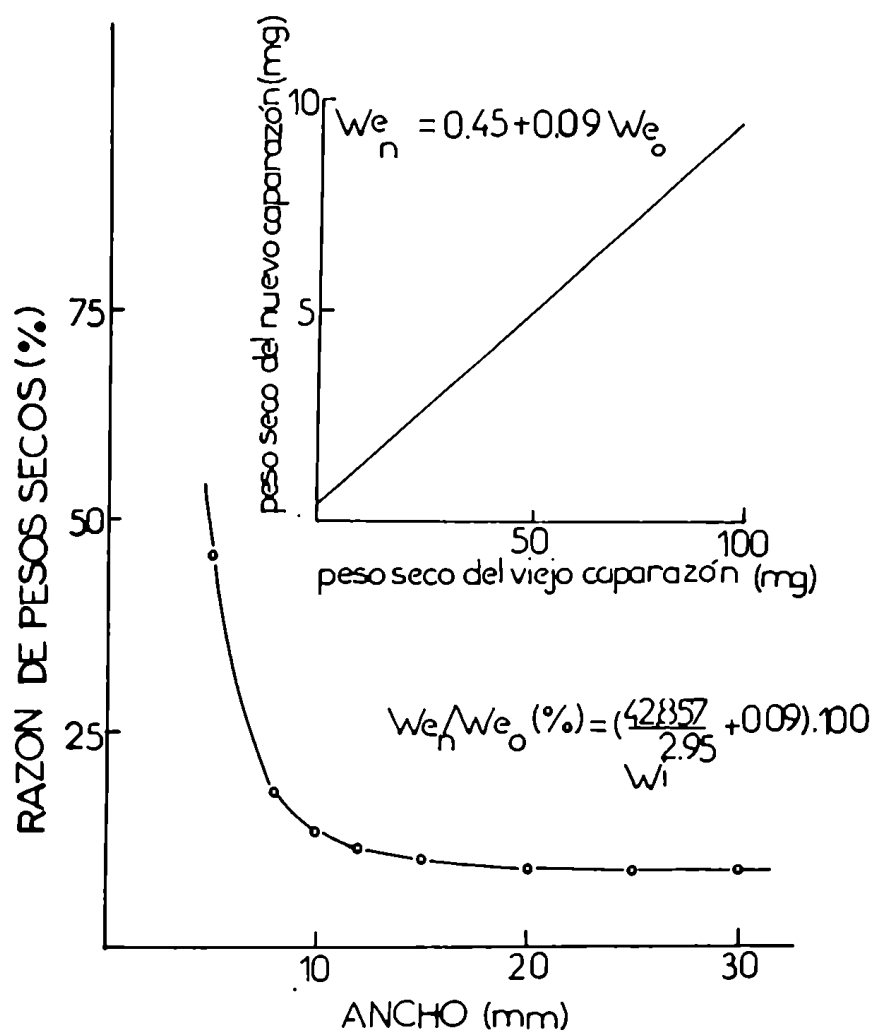


Figura 37.- Razón entre los pesos secos del nuevo y viejo caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* en la ecdisis. Esa razón se representa versus el ancho del viejo caparazón. En el recuadro, relaciones entre los pesos secos de ambos caparazones inmediatamente después de la muda.

Los animales más pequeños muestran cocientes mayores; a partir de un ancho de 15 mm, el cociente permanece entre 9 y 10 %. De la ecuación para esta curva, el cociente entre los pesos secos del nuevo y del viejo caparazón en la ecdisis es:

$$We_n/We_o \% = [(42.857/W_i^{2.95}) + 0.09] \cdot 100$$

De 100 especímenes recolectados en la proecdisis, sólo 7 excedieron los valores de la razón máxima calculados usando esta ecuación.

Discusión. El peso seco del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* aumenta durante la totalidad del ciclo de muda. El crecimiento metecdisial comienza inmediatamente después de la muda y puede representarse por una curva hiperbólica del peso seco del caparazón en función del tiempo (Figura 35). En consecuencia, el peso seco se incrementa con una velocidad que disminuye con el tiempo que transcurre a partir de la muda. Las velocidades iniciales son más altas y los tiempos necesarios para alcanzar un porcentaje determinado del We_{∞} son más cortos para tamaños mayores (Tabla XIV). Incluso, los tiempos necesarios para alcanzar un 90% del We_{∞} en animales de 5 o 10 mm de ancho superan con exceso la duración del IMP correspondiente. Este inesperado hecho podría explicarse suponiendo que cuanto más pequeños son los cangrejos, alcanzan un máximo peso seco del caparazón cada vez menor que el correspondiente We_{∞} .

El peso seco y el ancho del caparazón están relacionados por la ecuación general $We = b \cdot Wi^a$. Existe una curva, caracterizada por valores particulares de los

coeficientes a y b , pero siempre con coeficientes de correlación r significativos, para cada diferente tiempo transcurrido desde la muda. La pequeña caída en r observada durante los primeros días después de la muda (Tabla XIII) es consecuencia de una mayor variabilidad en las velocidades de incremento del peso del caparazón entre individuos. El exponente a representa la relación entre ancho y volumen del caparazón y es casi constante, lo cual sugiere que la forma del mismo no cambia durante la metecdisis. Las variaciones en los valores de a , pequeñas y no significativas, están relacionadas con coeficientes de r menores (Tabla XIII). Llama la atención el aumento de los valores de b a medida que se incrementa el tiempo transcurrido desde la muda. Ese coeficiente varía desde 0.0019 hasta 0.0214 en diez días y representa las variaciones en la densidad del material del caparazón. Esto podría indicar que el crecimiento metecdisial del caparazón de *C. angulatus* está causado por la deposición de minerales y compuestos orgánicos tal como ocurre en otros crustáceos (Vigh & Dendinger, 1982). Las exuvias muestran notables desviaciones tanto en los coeficientes a y b ; la densidad del material del caparazón podría ser afectada por la reabsorción de las sales de calcio durante la premuda (Graf, 1978). La forma y la relación ancho-volumen de los caparazones pueden cambiar también en las exuvias. No tenemos evidencias directas sobre cuando se detiene el incremento del peso seco del caparazón durante la metecdisis, pero ello ocurre probablemente en el momento de la apólisis, cuando la cutícula comienza a separarse de la hipodermis, permitiendo la secreción de una nueva debajo de la antigua.

El crecimiento preecdisial se refleja en el incremento de peso del nuevo caparazón, pero desafortunadamente éste sólo puede ser medido en sus etapas finales, cuando puede ser separado enteramente del viejo. El proceso de regeneración de

apéndices puede ser usado como un sistema de referencia para datar los acontecimientos que ocurren durante la muda de *C. angulatus*. Esta especie posee un tegumento muy opaco y por lo tanto, al igual que lo que ocurre en *Cancer antennarius* y otros grandes cangrejos (Spaziani et al., 1981), es difícil el estudio de los apéndices por transparencia para determinar los subestados de la proecdisis de acuerdo con los criterios de Drach (1939) y Drach & Tchernigovtzeff (1967).

Durante la última parte de la proecdisis, R tiene un incremento rápido y casi lineal con el tiempo (Figura 28) y el peso seco del nuevo caparazón puede ser medido debido a que esta estructura puede ser completamente separada de la antigua (Tabla XV). De acuerdo con las relaciones entre We y R que se han calculado, podría esperarse que el peso seco del nuevo caparazón aumente lentamente durante el comienzo de la proecdisis (Figura 36). El aumento en el peso seco del caparazón durante la proecdisis es causado no sólo por el engrosamiento de la cutícula sino también por un aumento de la superficie. En este estado, fue demostrado el crecimiento (Skinner, 1962, 1985) y la multiplicación celular (Tchernigovtzeff, 1959; Wittig & Stevenson, 1975) en la hipodermis de varios crustáceos. En consecuencia, la cutícula segregada será mayor que la antigua y permanecerá replegada hasta la muda. En ese momento tiene lugar una expansión repentina del exoesqueleto y el ancho y la superficie del caparazón quedan fijados en un nuevo valor.

Durante todo el ciclo de muda de *C. angulatus* el crecimiento del exoesqueleto sigue un modelo continuo que puede ser dividido en dos fases. Comienza en la apólisis con el incremento simultáneo de la nueva cutícula y el decrecimiento por reabsorción de la antigua. En la ecdisis, la nueva cutícula todavía parcialmente formada sufre una expansión bidimensional e inmediatamente continúa incrementando su peso seco hasta

la nueva apólisis.

La figura 38 representa tridimensionalmente el crecimiento somático, con las variaciones del peso seco y del ancho del caparazón representadas en función del tiempo.

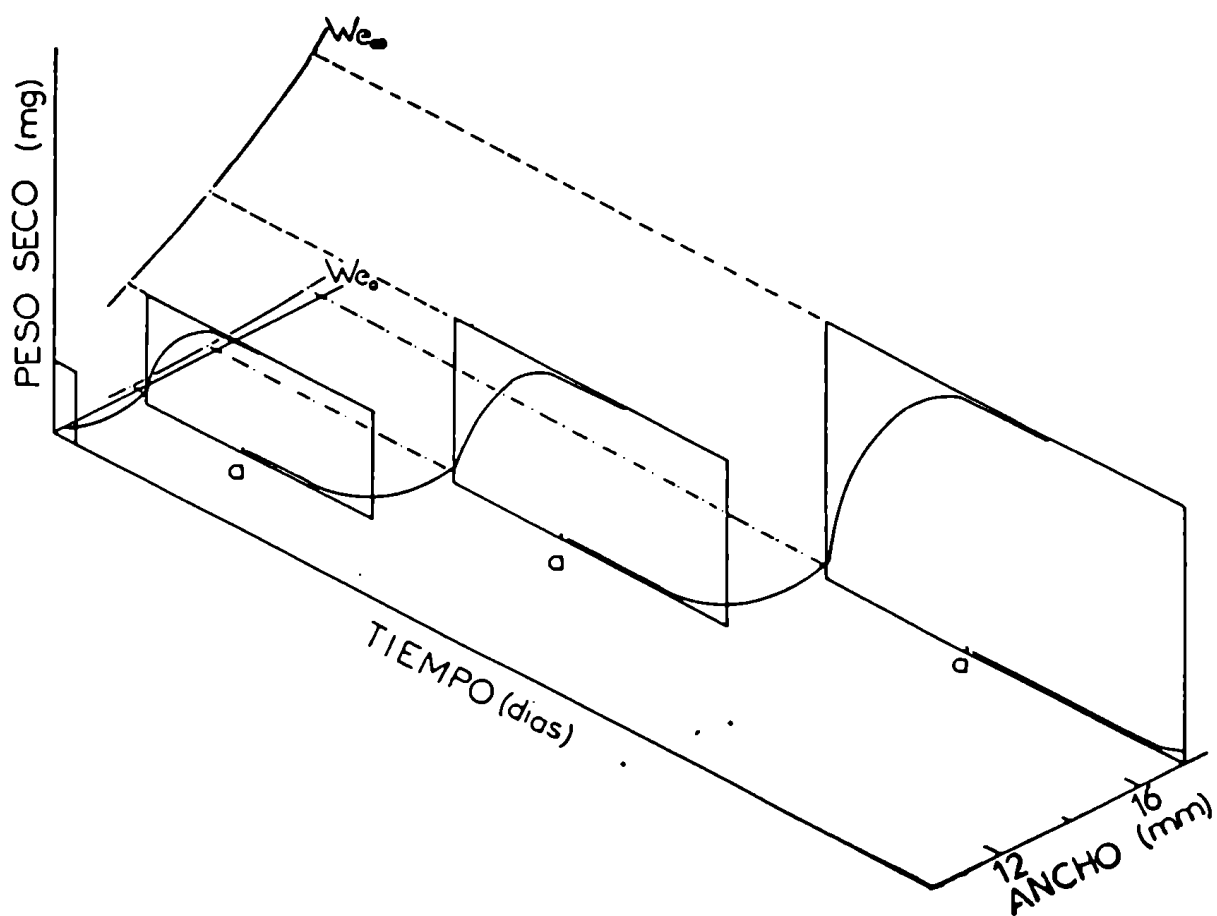


Figura 38.- Representación tridimensional del crecimiento somático de *Cyrtograpsus angulatus* en las que se grafican las variaciones del peso seco y del ancho en función del tiempo.

Hay un plano para cada ancho del caparazón donde se dibujó el incremento de peso seco en la metecdisis. El valor de We_{∞} establece un límite superior a dicho plano. Se asignó un valor del 20% al PIBS; cada valor de IMP fué calculado a partir de la ecuación (1) y se consideró que un 60% del IMP corresponde a la premuda. Las curvas proecdiales, sin embargo, no pueden ser representadas en un plano a causa del

aumento de la superficie y el ancho del caparazón característicos de este estadio.

A veces, en algunos casos de amputación múltiple de apéndices o permanencia muy prolongada en el laboratorio en condiciones de poca o nula alimentación, puede tener lugar una muda sin aumento de tamaño. En estos casos el incremento de peso seco en la premuda se debe sólo a un engrosamiento de la cutícula y la curva estará confinada al plano que corresponde al crecimiento metecdisial. Puede verse que la principal discontinuidad del crecimiento del caparazón de *C. angulatus* no ocurre en el momento de la muda sino en aquel en el cual la nueva cutícula comienza a ser secretada.

COMPOSICION QUIMICA Y PROCESOS BIOSINTETICOS DE LA CUTICULA.

Composición química de la cutícula. La cutícula deshidratada de *C. angulatus* en intermuda está formada por alrededor de un 75 % en peso de sales minerales, por un 14 % de una fracción que puede ser extraída con una secuencia de solventes (EDTA 15 %, urea 7 M e HONa 1 N), que incluye las proteínas cuticulares, y por un 11 % de un residuo que subsiste luego de la extracción con álcali caliente, constituido sobre todo por quitina. Un análisis semejante, de exuvias de animales que ya mudaron demostró que contienen un 93 % de sales, un 3 % que corresponde a la fracción con proteínas y un 4 % que permanece en el caparazón.

La variación en la composición química del exoesqueleto, con referencia a las sales minerales, proteínas y quitina fue estudiada en distintos momentos del ciclo de muda.

La Tabla XVI describe la composición química de la cutícula de caparazones cefalotorácicos de cangrejos sacrificados a distintos tiempos luego de la muda. Se señala la proporción de sales minerales, determinada por la diferencia de peso entre antes y después de la extracción con EDTA 15 %, de proteínas no covalentemente unidas (conjunto de las extraídas con EDTA 15 % y urea 7 M; una corrida electroforética en gel de poliacrilamida demostró que ambos solventes extraen las mismas proteínas) y de proteínas unidas covalentemente (extraídas con NaOH 1 N) a la quitina. También se indica la proporción de quitina, calculada a partir del peso seco del caparazón luego de todas las extracciones.

El porcentaje de sales minerales aumenta durante los cuatro primeros días hasta alcanzar valores de un 75 a un 80 % del peso seco del caparazón. No parece

haber una reabsorción importante de sales durante la muda. A medida que se produce la mineralización, la contribución al peso total de la quitina y las proteínas, disminuye.

Tabla XVI. Composición química de caparazones de *Cyrtograpsus anquilatus* sacrificados en distintos momentos luego de la muda. La cantidad de minerales presentes se estimó por diferencia entre el peso seco total y el peso seco luego de la extracción con EDTA 15%; la cantidad de quitina por el peso seco del residuo insoluble en NaOH 1 n (100 °C); las proteínas no covalentemente unidas al polisacárido (NC) fueron aquellas solubles en EDTA 15% y urea 7 M, las unidas en forma covalente (C) aquellas solubles en NaOH 1 N (100 °C); en ambos casos se determinó su cantidad por el método de Lowry (1951).

Tiempo luego de la muda (días)	Minerales (%)	Quitina (%)	Proteínas NC (%)	Proteínas C (%)
0-1	43.8	21.2	5.5	15.2
1-2	62.6	15.3	3.4	7.8
2-3	75.0	13.6	2.7	4.8
3-4	74.6	12.8	3.7	4.5
4-5	79.7	13.3	4.3	5.2
5-6	80.9	10.9	2.5	4.3
10-11	80.5	11.7	3.0	3.4

En la figura 39 se representan los valores absolutos de dichos constituyentes en función del tiempo transcurrido desde la muda, calculados a partir de las tablas XIV

y XVI para un animal de 15 mm de ancho del caparazón. La mineralización y la cantidad de quitina aumentan durante los 10 días posteriores a la muda, la primera de una manera más intensa. Las proteínas se incrementan durante 3 a 4 días, luego parecen mantenerse estables.

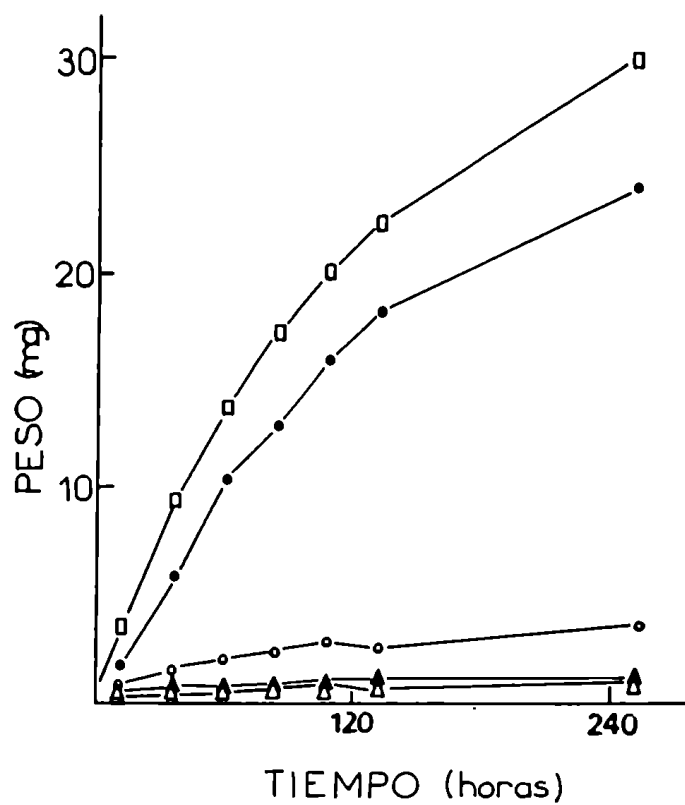


Figura 39.- Composición química de la cutícula del caparazón de *Cyrtograpsus angulatus* de 15 mm de ancho, en función del tiempo transcurrido desde la muda. Calculado a partir de la Tabla XVI y la figura 35. (cuadrados: peso seco; círculos vacíos: quitina; círculos llenos: sales minerales; triángulos vacíos: proteínas unidas en forma covalente; triángulos llenos: proteínas unidas en forma no-covalente).

Las proteínas probablemente se sintetizan en gran parte durante la premuda. La quitina del viejo caparazón se reabsorbe parcialmente durante esta etapa; no parece ocurrir lo mismo con las proteínas. Con el fin de complementar esa información, se analizaron caparazones nuevos (en formación) y viejos provenientes de ejemplares sacrificados en distintos momentos de la premuda. Los datos obtenidos se representan en la Tabla XVII en función de la relación entre los pesos secos de ambas cutículas. Esta relación (Tabla XV) aumenta hasta alcanzar un máximo en el momento de la muda (Figura 37). Se observa que, a medida que progresa la premuda, en la nueva cutícula aumenta la proporción relativa de quitina, disminuye la de proteínas covalentemente unidas a ella y de sales minerales y permanece constante la de proteínas no covalentemente unidas a la quitina. En la cutícula vieja, al tiempo que aumenta la proporción de sales, la de quitina disminuye y las proteínas permanecen constantes.

Tabla XVII. Composición química de las nuevas (N) y viejas (V) cutículas del caparazón de *Cyrtograpsus anquilatus* en premuda, en relación con el cociente entre sus respectivos pesos secos (PSN/PSV) Excepto los minerales, estimados a partir del peso seco de las cenizas luego de someter las piezas a 550 °C durante 6 horas, las fracciones fueron obtenidas como en la Tabla XVI.

PSN/PSV (%)	Minerales (%)		Quitina (%)		Proteínas NC (%)		Proteínas C (%)	
	N	V	N	V	N	V	N	V
5-7.9	7.5	77.1	24.6	13.2	7.4	1.3	59.3	4.3
8-10.9	6.1	80.8	32.2	12.1	8.8	1.1	51.8	4.9
11-13	5.7	83.0	39.8	10.8	7.2	1.4	45.6	4.7

Cuando se compara la composición de la nueva cutícula con la de ejemplares recién mudados, se observa un brusco aumento en la proporción de sales, una disminución en la de quitina y otra, algo menor en la de las proteínas unidas en forma covalente al polisacárido; aquellas que sólo están debilmente unidas, en cambio, aumentan su participación relativa.

Incorporación *in vivo* de precursores radiactivos. Se detectó radiactividad en fracciones extraídas con distintos solventes a partir de homogenatos totales de cangrejos inyectados con una solución de [^{14}C]-glucosa, en distintas etapas del ciclo de muda.

Tabla XVIII. Incorporación de carbono 14 a distintas fracciones extraídas de homogenatos totales de *Cyrtograpsus angulatus* en post-muda, inyectados con glucosa marcada radiactivamente y sacrificados a distintos tiempos luego de la inyección. Los valores se expresan como porcentaje incorporado sobre el total inyectado.

Fracción	Tiempo transcurrido luego de la inyección		
	1 hora (%)	3 horas (%)	5 horas (%)
Soluble en cloroformo-metanol-agua (lípidos-oligosacáridos)	0.47	0.57	0.75
Soluble en soluciones salinas y alcalinas diluidas (proteínas)	32.03	19.59	24.06
Insoluble en NaOH 2 N (quitina)	2.81	4.35	7.46

La Tabla XVIII muestra los porcentajes de la radiactividad total inyectada a animales recientemente mudados, sacrificados luego de 1, 3 o 5 horas luego de la inyección y homogeneizados en conjunto, que fue incorporada a diferentes fracciones.

Uno de los compuestos marcados radiactivamente se pudo identificar en forma fehaciente: se trata de la quitina, presente en la fracción álcali insoluble. En efecto, se obtuvieron las siguientes evidencias:

a) Los productos de la hidrólisis ácida fuerte del precipitado migran, tanto en cromatografías como en electroforesis en papel, exactamente igual que standards de N-acetil-glucosamina.

b) Los productos de una hidrólisis similar, de un precipitado previamente desacetilado, se comportan como lo hacen standards de glucosamina en ambos procedimientos.

c) El precipitado es digerido por la quitinasa (Figura 40).

d) Los productos de la hidrólisis enzimática llevada a cabo durante 96 horas se comportan, cromatográficamente, de una manera igual a como lo hacen las diferentes fracciones de un hidrolizado parcial de quitina preparado de acuerdo al método de Rupley (1964).

Por otro lado, la cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis total de una de las fracciones solubles en solventes orgánicos (cloroformo - metanol) mostró que la misma no contiene residuos de N-acetil-glucosamina marcada radiactivamente pero si, probablemente, glucosa, manosa y galactosa. La hidrólisis parcial de la otra fracción soluble en solventes orgánicos (cloroformo-metanol-agua)

liberó compuestos que contenían marca radiactiva y que eran digeridos, al menos parcialmente, por quitinasa. La hidrólisis total y posterior cromatografía en papel de los productos liberados por la quitinasa, puso en evidencia la presencia de N-acetil-glucosamina marcada acompañada por otros compuestos, también marcados, probablemente galactosa, glucosa y manosa.

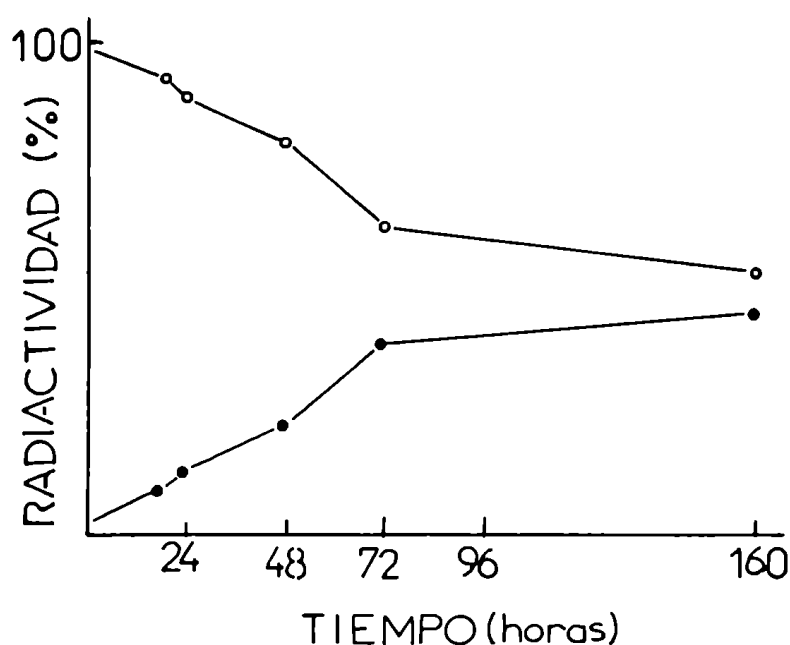


Figura 40.- Digestión con quitinasa de la fracción insoluble en álcali caliente que se obtiene luego de una extracción secuencial practicada en exoesqueletos de *Cyrtograpsus angulatus* (ver Materiales y Métodos). Círculos vacíos: radiactividad en el precipitado (fracción insoluble en álcali caliente, conteniendo quitina); círculos llenos: radiactividad en el sobrenadante (N-acetilglucosamina liberada).

Las fracciones extraídas con soluciones salinas o alcalinas pudieron ser filtradas por tamices moleculares del tipo del Sephadex G-100. Se observó que algunas submuestras que contenían proteínas (determinadas por picos de absorbancia a 280 nm) también incluían una apreciable marca radiactiva. Al menos una parte de esta

marca parecía estar formada por oligosacáridos que pueden ser digeridos por quitinasa.

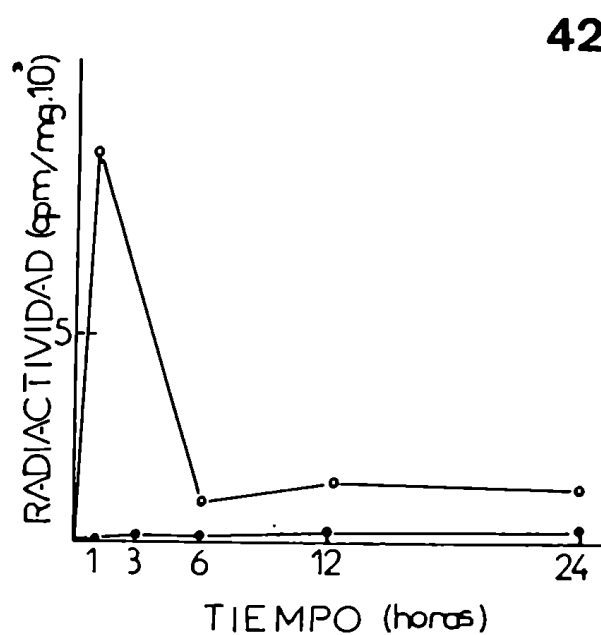
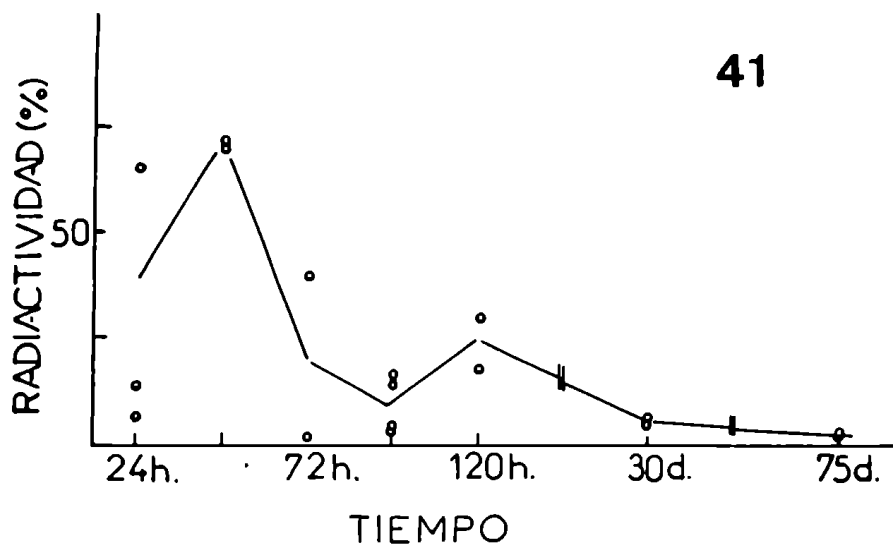


Figura 41.- Incorporación de radiactividad a quitina a partir de [^{14}C]-glucosa en distintos momentos luego de la muda de *Cyrtograpsus angulatus*. El animal se sacrifica 24 horas después de la inyección. Los datos se expresan como el porcentaje de la radiactividad inyectada que se recupera en quitina.

Figura 42.- Cinética de la incorporación de [^3H]-glucosa a quitina en *Cyrtograpsus angulatus* en postmuda (círculos vacíos) e intermuda (círculos llenos). El animal se sacrifica a tiempos variables luego de ser inyectado. Los datos se representan como cpm por mg de quitina.

La incorporación de precursores radiactivos a la quitina varía a lo largo del ciclo de muda (Figura 41). El máximo de incorporación se produjo 48 horas después de la muda; llama la atención la amplia variabilidad de los resultados.

Se estudiaron también las variaciones en la incorporación de [^3H]-glucosa a quitina en caparazones de ejemplares en postmuda (entre 24 y 48 horas luego de la muda) y en intermuda (15 días luego de la misma) para diferentes intervalos entre la inyección y la muerte del animal (Figura 42). El porcentaje de azúcar marcado que se incorporó a la quitina con respecto al inyectado fue muy bajo durante la intermuda. En la postmuda, en cambio, se observó un porcentaje muy alto de incorporación en la primeras tres horas luego de la inyección; a partir de ese momento disminuyó pero manteniendo un cierto nivel hasta las 24 horas.

La incorporación de [^3H]-glucosa fue particularmente notable en la cutícula de los apéndices que acaban de ser regenerados. En la Tabla XIX se muestra la radiactividad por mg de quitina observadas en el caparazón, el apéndice regenerado y su contralateral normal, en tres ejemplares de *C. angulatus*.

No se detectó radiactividad en ninguna de las fracciones extraídas de caparazones por medio de la secuencia de solventes ya mencionada (agua, EDTA 15 %, urea 7 M e HONa 1 N) cuando se inyectaron soluciones de ^3H -glucosa a cangrejos en post e intermuda.

Tabla XIX . Incorporación de tritio a caparazones, apéndices normales y regenerados de 3 ejemplares de *Cyrtograpsus angulatus* en postmuda, luego de una inyección de glucosa uniformemente marcada con el isótopo. Los valores se expresan como cpm/mg de peso seco

Ejemplar número	Caparazón	Apéndices	
		normales	regenerados
1	1236.9	1826.8	4918.6
2	1181.3	695.8	4485.0
3	1072.2	290.0	524.1

La incorporación de leucina radiactiva a la cutícula de *C. angulatus* fue evaluada en paralelo con la incorporación de glucosa radiactiva (Tabla XX). La incorporación de glucosa a la cutícula, bajo la forma de quitina, se efectuó sobre todo en los primeros días luego de la muda, para disminuir luego continuamente, no detectándose durante la premuda, ni en la cutícula en formación, ni en la que se está degradando. La leucina, que en parte entra a constituir las proteínas del exoesqueleto, se incorpora con una dinámica distinta: es estable y relativamente importante en la postmuda, pero aumenta al doble 10 días después de mudar, para luego disminuir a la cuarta parte en la premuda. En las etapas finales de la misma, la incorporación a la cutícula vieja desciende más aún, al tiempo que se incrementa la que es derivada a la nueva.

Tabla XX Incorporación de precursores radiactivos a caparazones intactas de *Cyrtograpsus angulatus* inyectados con glucosa tritiada y leucina marcada con carbono 14, en distintos momentos del ciclo de muda. V y N: cutículas vieja y nueva respectivamente (en premuda); NI: no incorpora. Los valores expuestos son cpm/ mg de peso seco en promedio en cuatro ejemplares \pm la desviación standard.

Condición	[³ H]-glucosa			[¹⁴ C]-leucina	
	R	V	N	V	N
Premuda	19	NI	NI	430 \pm 51	
	21	NI	NI	100 \pm 38	53 \pm 8
	23	NI	NI	153 \pm 20	375 \pm 44
Postmuda	Dias				
	0	980 \pm 540		220 \pm 91	
	1	1522 \pm 717		977 \pm 381	
	2	824 \pm 225		747 \pm 443	
	3	3066 \pm 1408		805 \pm 494	
	4	1097 \pm 364			
	10	483 \pm 337		1817 \pm 145	

Con el fin de determinar cual es el destino de la leucina incorporada a la

cutícula de cangrejos en distintos momentos del ciclo de muda se trataron, con la secuencia de solventes mencionada más arriba, un grupo de caparazones pertenecientes a cangrejos inyectados con [^{14}C]-leucina. Los resultados se muestran en la Tabla XXI.

Tabla XXI. Destino del carbono 14 incorporado a caparazones de *Cyrtograpsus angulatus* luego de la inyección de leucina radiactivamente marcada en distintos momentos del ciclo de muda. Cinco cangrejos fueron inyectados en cada condición y sus caparazones disecados, midiéndose luego la radiactividad incorporada en forma inicial, luego de una extracción con EDTA 15% y urea 7 N (E_1) y luego de una extracción con NaOH 1 N a 100 °C (E_2). V y N: cutículas vieja y nueva respectivamente, durante la premuda.

Condición	Incorporación		
	Inicial (cpm)	Luego de la extracción	
		E_1 (cpm)	E_2 (cpm)
Premuda inicial	1242	1059	94
Premuda (V)	450	120	66
Premuda (N)	1982	815	905
Postmuda	3240	1676	1515

En los ejemplares en postmuda, la cantidad total de radiactividad incorporada a la cutícula disminuye a la mitad luego de la extracción de las proteínas unidas debilmente a la quitina pero ya no se altera tras una posterior extracción de aquellas

unidas en forma covalente a la misma; lo mismo ocurre con las cutículas en formación durante la muda. En etapas previas de la muda, cuando aún no es posible separar ambas cutículas, así como en la cutícula vieja cuando la separación ya es posible, la situación es distinta: una parte de la leucina fijada a la cutícula es eliminada junto a las proteínas unidas débilmente a la quitina; el resto lo es junto con las que están asociadas al polisacárido de una manera más fuerte.

Discusión. La cutícula de *Cyrtograpsus angulatus* en la intermuda está constituida por aproximadamente un 80.5 % de sales minerales, un 11.7 % de quitina y un 6.4 % de proteínas (Tabla XVI). De estas últimas, un 3.4% estarían unidas en forma covalente a la quitina mientras que un 3% lo estaría por uniones más débiles, del tipo de puente hidrógeno o salino. No se pueden distinguir cualitativamente distintos grupos de proteínas correspondientes al segundo tipo. Las proporciones de los distintos componentes se encuentran dentro del rango establecido para otros braquiuros marinos (Lafon, 1941, 1943, 1948; Drach & Lafon, 1942; Degens et al., 1967; Welinder, 1974; Voss-Foucart & Jeuniaux, 1978; Austin et al. 1981).

Las variaciones en la composición química de la cutícula de los crustáceos a lo largo del ciclo de muda no son fáciles de estimar. Durante la postmuda, el peso seco de la misma aumenta y por lo tanto no puede ser tomado como valor de referencia; durante la muda no sólo aumenta el peso del nuevo caparazón sino también disminuye el del viejo. Además, el ancho o la superficie del caparazón en formación durante la muda no puede medirse. En el caso de la postmuda, al menos, se puede establecer el momento de la ecdisis como un punto de origen para definir cualquier secuencia temporal; en la muda ese momento corresponde a la finalización del estadio y debe poder predecirse. La predicción de la próxima muda puede lograrse en el caso de los animales que tienen apéndices en regeneración. El cálculo del coeficiente R permite indicar aproximadamente en que momento de la muda se encuentra el

especimen pero no establecer una cronología precisa. La relación entre el peso seco del nuevo y del viejo caparazón también puede aplicarse para el mismo fin.

La incorporación de los constituyentes en la cutícula de *C. angulatus* en la postmuda (Tabla XVI y Figura 39) sigue el modo descrito para *Callinectes sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982). La quitina se deposita con intensidad luego de la muda, alcanzando un valor 2.5 veces más alto que el inicial en 4 días y 3 veces más alto luego de 10 días. Esto indica que una buena parte de la quitina de este cangrejo es sintetizada y depositada en la cutícula durante este estadio. Una situación similar tiene lugar en *C. sapidus*: un aumento de 4 veces en 10 días (Vigh & Dendinger, 1982); y en *Astacus fluviatilis*: un aumento de 2.1 veces en 14 días (Welinder, 1975a). El valor del 11.7 % del peso seco del caparazón que se registra a los 10 días de haber mudado es muy semejante al 11.4 % reportado para *C. sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982). Parece probable que se incorpore quitina a la cutícula en formación de *C. angulatus* también en la premuda: a lo largo de dicho estadio el porcentaje en peso de quitina en la cutícula nueva aumenta mientras que en la vieja disminuye.

En *C. angulatus* las sales minerales se incorporan activamente durante los 10 días posteriores a la muda, siguiendo una dinámica muy semejante al aumento total del peso seco. Los datos obtenidos (Tabla XVI) muestran una gran semejanza con los de *C. sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982) y con los de *C. pagurus* (Drach & Lafon, 1942). Durante la premuda se verifica, en *C. angulatus*, una disminución del porcentaje de sales minerales en el nuevo caparazón y un aumento de las mismas en el viejo (Tabla XVII) que reflejan, respectivamente, una deposición y una reabsorción de materia orgánica en ambas estructuras. En consecuencia, el contenido relativo de sales de las exuvias es máximo; las especies marinas abandonan exuvias muy mineralizadas ya que las sales no son un factor limitante en ese ambiente (Graf, 1978).

En *C. angulatus* las proteínas unidas en forma covalente a la quitina duplican su masa en los primeros dos días, luego parecen alcanzar su máximo. Las restantes

cuadruplican su cantidad en 4 a 5 días, cuando se estabilizan (Figura 39). La incorporación de proteínas a la cutícula durante la postmuda también se demostró en *C. sapidus* (Vigh & Dendinger, 1982). Si bien, como se mencionó más arriba, la cantidad de materia orgánica parece aumentar en la nueva cutícula durante la premuda, no hay evidencias de una deposición de proteínas durante esta etapa del ciclo de muda de *C. angulatus*.

Luego de la inyección de glucosa radiactiva a cangrejos en postmuda, se observa la incorporación de la marca a diferentes compuestos, incluso a la quitina que forma parte del exoesqueleto (Tablas XVIII y XX). La incorporación al polisacárido alcanza un máximo entre las 24 y 48 horas después de la muda, para luego disminuir a valores casi nulos (Figura 41); en la intermuda y en la premuda prácticamente no se produce (Tabla XX). La cinética de incorporación a la quitina muestra que hay un máximo entre la primera y la tercera hora luego de la inyección (Figura 42). Si bien la radiactividad se incorpora a diferentes compuestos en los distintos órganos de los cangrejos, ninguna fracción separada de la cutícula -con excepción de la quitina- lo hace.

La incorporación de radiactividad a quitina, proveniente de glucosa, no se efectúa de una manera uniforme en todo el animal. Distintas partes del exoesqueleto lo hacen de manera diferente, en cuanto a la intensidad. Es particularmente interesante el caso de los apéndices que se regeneran luego de la muda: en ellos la radiactividad incorporada es alta, comparada con el caparazón y con los apéndices normales (Tabla XIX).

Los resultados obtenidos muestran tendencias claras, pero gran variabilidad entre individuos -sobre todo en la postmuda- que dificultan el análisis cuantitativo. La síntesis de quitina a partir de [^{14}C]-glucosa sólo en postmuda demostrada en *C. angulatus* coincide con lo establecido por Hu (1958), Meenakshi & Scheer (1961) y

Hornung & Stevenson (1971) y está de acuerdo con lo propuesto por Stevenson (1985) acerca de la existencia de dos vías biosintéticas diferentes: una en premuda y otra en postmuda.

La incorporación de [^{14}C]-leucina a la cutícula de *C. angulatus* tiene lugar durante todo el ciclo de muda y el aminoácido puede, en algunos casos, entrar a formar parte de las proteínas de la misma (Tablas XX y XXI), probablemente las que están unidas de una manera más débil. Aproximadamente un 50% de la marca incorporada a caparazones de este cangrejo en el final de la premuda y en la postmuda fué eliminada luego de la extracción de proteínas débilmente unidas que se realizó con EDTA 15% y con urea 7 M; el resto permaneció incluso luego de la extracción con álcali concentrado que removió el resto de las proteínas (Tabla XXI). En este caso cabe pensar, entonces, que la leucina, transformada en azúcares, quedó incorporada a la quitina. En la premuda temprana una buena parte de la marca incorporada al caparazón a partir de la inyección del aminoácido radiactivo permaneció luego de la primera extracción, pero fué eliminada en su totalidad luego de la segunda (Tabla XXI). Parece probable en consecuencia, que las proteínas cuticulares que incorporan leucina radiactiva varíen de acuerdo al momento del ciclo de muda. Cuando el exoesqueleto está aún blando (premuda tardía, postmuda), lo harían proteínas unidas de una manera débil; cuando ya está totalmente endurecido (intermuda o premuda inicial), la leucina sería incorporada a proteínas que están unidas a la quitina en forma covalente.

Los datos obtenidos en *C. angulatus*, que indican un máximo de incorporación en la premuda tardía y en la postmuda, coinciden con las observaciones sobre síntesis de proteínas en la hipodermis efectuadas en *Gecarcinus lateralis* (Skinner, 1966), *Orconectes virilis* (McWhinnie & Mohrherr, 1970) y *O. sanborni* (Humphreys & Stevenson, 1973).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- La población de *Cyrtograpsus angulatus* que habita en el puerto de Mar del Plata (Provincia de Buenos Aires, Argentina) exhibe una incorporación estival de varias camadas de nuevos individuos y una segregación por tamaños, de modo tal que los juveniles se encuentran en la zona entre mareas, al menos en las bajamares. Durante su primer año de vida los cangrejos crecen rápidamente y alcanzan la madurez sexual. La cópula, que es seguida de varias oviposiciones, tendría lugar una vez al año; la última camada de larvas sería retenida hasta el próximo verano bajo el abdomen de las hembras.

2.- El crecimiento de esta especie es continuo, aunque más veloz en los ejemplares juveniles, y no se detiene en la madurez sexual: esto define una estrategia de tipo indeterminado. El período intermudas se alarga y el incremento de tamaño en cada muda se reduce, irregularmente, a medida que los animales crecen.

3.- El estudio del crecimiento relativo de las dimensiones externas no conduce a una determinación simple del tamaño en que se alcanza la madurez sexual. Se exceptúa el caso de la utilización del ancho del abdomen que permite establecer que, al menos en las hembras, este hecho ocurre cuando el caparazón alcanza un ancho de entre 19 y 26 mm. Los machos más pequeños con testículos maduros tienen un ancho de 15 mm.

4.- Las mudas de los cangrejos de esta población estarían sincronizadas y mostrarían cierta coincidencia con ritmos de mareas o fases lunares.

5.- La regeneración de los apéndices autotomizados ocurre de una manera semejante a la descrita en otras especies. El proceso de regeneración y el de la muda se afectan reciprocamente; es notable la reducción del período intermudas y la sincronización entre distintos individuos cuando tiene lugar una múltiple autotomía. Puede iniciarse la regeneración durante un 80% del ciclo de muda; la velocidad final con que crece el muñón es independiente del momento del ciclo de muda en que se produce la amputación y de la presencia de otros muñones en regeneración. Se calculó, mediante la observación de este proceso, que la proecdisis se extiende a lo largo de un 60% del ciclo de muda.

6.- El peso seco (W_e) del caparazón luego de la muda está relacionado con el ancho (W_i) mediante la ecuación general $W_e = b \cdot W_i^a$. Durante la metecdisis, a varía poco pero b se incrementa continuamente. La representación gráfica de W_e versus el tiempo transcurrido desde la muda adopta la forma de una hipérbola. Durante la proecdisis, el peso seco del nuevo exoesqueleto aumenta mientras el del viejo disminuye; el primero puede ser relacionado con el tamaño relativo de muñones en regeneración. La razón entre los pesos secos del nuevo y el viejo caparazón aumenta hasta un máximo en la ecdisis; cangrejos pequeños tienen valores mayores para este máximo. Se discute la naturaleza continua del incremento en el peso seco de la cutícula a lo largo de un ciclo de muda y se propone una representación tridimensional que complementa estos hechos con las observaciones acerca del crecimiento externo.

7.- La composición química de la cutícula y las variaciones de la misma a lo largo del ciclo de muda, son establecidas aquí por primera vez en *Cyrtograpsus angulatus* y no presentan diferencias llamativas con respecto a otras especies de Brachyura.

8.- Precursores radiactivos inyectados en los senos hemolinfáticos de este cangrejo se incorporan en diversos órganos del mismo. Es particularmente intensa la incorporación de glucosa marcada con ^{14}C y con ^3H a la quitina, que tiene un máximo entre 24 y 48 horas luego de la muda y que es casi nula en la intermuda y en la premuda. Los datos obtenidos parecen confirmar la existencia de dos vías alternativas en la síntesis de quitina a partir de N-acetilglucosamina y de glucosa, que corresponden respectivamente a pre y postmuda. El aminoácido leucina se incorpora en distintas proteínas cuticulares durante todo el ciclo de muda, especialmente en los períodos previos y posteriores a la ecdisis.

PERSPECTIVAS

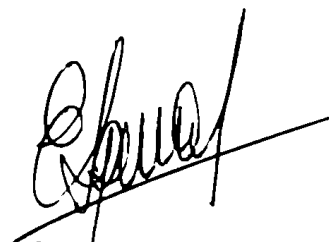
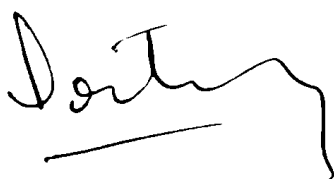
*Es característico de la Ciencia y el Progreso que
abren continuamente nuevos campos a nuestra visión.*

Pasteur

Esta investigación sobre la biología de *Cyrtograpsus angulatus* crea más preguntas que las respuestas que proporciona. Entre los aspectos que merecen una atención detallada e inmediata sobresalen los siguientes:

- Alimentación: alimentación en el medio natural y establecimiento de una dieta óptima en animales de laboratorio.
- Biología de la reproducción: época y características del apareamiento, tiempo de permanencia de las larvas en la cavidad de incubación y sus variaciones a lo largo del año, estudio de las etapas larvales.
- Sincronización de mudas: causas que originan los ritmos observados y su significado adaptativo.
- Ciclo de muda: variaciones en la estructura y la ultraestructura de la cutícula y la hipodermis; correlación con los niveles hormonales en la hemolinfa.
- Regeneración de apéndices: influencia de los sistemas nervioso y endócrino.

Esta especie, por su abundancia y facilidad de obtención, es especialmente apta para la investigación experimental. Se ha comprobado que los apéndices en regeneración y recientemente regenerados son poderosos sistemas para el estudio de la diferenciación celular y procesos biosintéticos. Las variaciones observadas entre los ciclos de muda individuales, pueden ser compensadas mediante el uso de animales con autotomía múltiple; sería importante, sin embargo, obtener el ciclo vital completo del cangrejo en condiciones controladas de laboratorio.



BIBLIOGRAFIA

- Adiyodi, R. G. 1972. Wound healing and regeneration in the crab *Paratelphusa hydrodromous*. *Int. Rev. Cytol.*, **32**: 257-289.
- Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi 1970. Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. *Biol. Rev.*, **45**: 121-165.
- Aiken, D. E. & S. L. Waddy 1976. Controlling growth and reproduction in the American lobster. *Proc. Ann. Meet. World Maric. Soc.*, **7**: 415-430.
- Anderson, S. L.; Clark, W. H. & E. S. Chang. 1985. Multiple spawning and molt synchrony in a free spawning shrimp (*Sicyona ingentis*: Penaeoidea). *Biol. Bull.*, **168**: 377-394.
- Anderson, W. R. & R. F. Ford 1976. Early development, growth and survival of the yellow crab *Cancer anthonyi* Rathbun (Decapode, Brachyura) in the laboratory. *Aquaculture*, **7**: 267-279.
- Andrieux, N. 1979. L'apolyse au cours du cycle d'intermue de deux Crustacés Décapodes Brachyours, *Carcinus maenas* Linné et *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **288**: 1595-1597.
- Austin, P. R.; Brine, C. J.; Castle, J. E. & J. P. Zikakis 1981. Chitin: new facets of research. *Science*, **212**: 749-753.
- Barnes, R. D. 1968. *Invertebrate Zoology*, 1-761, W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Bliss, D. E. 1956. Neurosecretion and the control of growth in a decapod crustacean. // Bertil Hanstrom. *Zoological Papers in Honour of his Sixty-fifth Birthday* (Wingstrand, K. G. Ed.), pp 56-75, Zool. Inst., Lund, Sweden.
- Bliss, D. E. (1960). Autotomy and regeneration. // *The Physiology of Crustacea* (Waterman, T. H. Ed.), vol. 1, pp 561-589, Academic Press, N. Y.
- Bliss, D. E. & J. R. Boyer 1964. Environmental regulation of growth in the decapod crustacean *Gecarcinus lateralis*. *Gen. Compar. Endocrinol.* **4**: 15-41.
- Bocquet, J. 1956. Corrélation entre le rythme des marées et la mue d'une population de *Chthamales*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **243**: 2159-2162.
- Boschi, E. E. 1964. Los Crustáceos Decápodos Brachyura del Litoral Bonaerense (R. Argentina). *Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)*, **6**: 1-99.
- Boschi, E. E. 1970. Crecimiento de los crustáceos superiores. V Congreso Argentino de Ciencias Biológicas, pp 70-76, Bs. As.

- Braley, R. D. 1979. Penaeid prawns in Fanga uta lagoon, Tongatapu. *Pac. Sci.*, **33**: 315-321.
- Broekhuysen, G. J. 1941. The life history of *Cyclograpsus punctatus*, M. Edw.: breeding and growth. *Trans. R. Soc. S. Afr.*, **28**: 331-366.
- Bullough, W. S. 1967. *The Evolution of Differentiation*. i-vi, 1-206, Academic Press, N. Y.
- Carey, F. G. 1965. Chitin synthesis *in vitro* by crustacean enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **16**: 155-158.
- Carlisle, D. B. & P. F. R. Dohrn 1953. Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea Decapoda). II. Experimental evidence for a growth- and moult-accelerating factor obtainable from eyestalks. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, **24**: 69-83.
- Cassie, R. M. 1950. The analysis of polymodal frequency distributions by the probability paper method. *N. Z. Sci. Rev.*, **8**: 89-91.
- Conan, G. Y. 1984. Periodicity and phasing of molting. *In Crustacean Issues*, vol. 2 Crustacean growth (Wenner, A. M. Ed), Balkema, Netherlands.
- Cheung, T. S. 1968. Transmolt retention of sperm in the adult female stone crab *Menippe mercenaria* (Say). *Crustaceana*, **15**: 117-120.
- Dagg, M. J. 1976. Complete carbon and nitrogen budgets for the carnivorous amphipod *Calliopius laeviusculus* (Kroyer). *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **61**: 297-357.
- Day, J. H. 1935. Heterogonic growth in the abdomen of *Carcinus maenas* Rep. Dove mar. Lab 3rd ser., **3**: 48-59.
- Dall, W. 1965. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus sp.* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Aust. J. Mar. Fresh. Res.*, **16**: 1-12.
- Degens, E. I.; Carey, F. G. & D. W. Spencer 1967. Amino-acids and amino-sugars in calcified tissues of Portunid crabs. *Nature*, **216**: 601-603.
- Demeusy, N. (1971). Influence de la régénération sur la première exuviation post-opératoire chez *Carcinus maenas* (Crustacés, Décapodes, Brachyours). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **273**: 1140-1143.
- Drach, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. *Ann. Inst. Océanogr. Monaco*, **19**: 103-391.
- Drach, P. & Lafon, M. 1942. Études biochimiques sur le squelette tégumentaire des décapodes brachyours (variations au cours du cycle d'intermue). *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **82**: 100-118.
- Drach, P. & C. Tchernigovtzeff 1967. Sur la méthode de détermination des stades

- d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu*, **18 A**: 595-610.
- Fingerman, M. & S. W. Fingerman 1974. The effects of limb removal on the rates of ecdysis of eyed and eyestalked crabs, *Uca pugilator*. *Zool. jb. Physiol.*, **78**: 301-309.
- Giraud-Guille, M. -M. 1984. Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue Cell*, **16**: 75-92.
- Glaçon, R. 1968. Influence du phénomène des marées sur la mue du Crustacé Isopode *Lygia oceanica* (L.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **267**: 221-224.
- Gould, S. J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol. Rev.*, **41**: 587-640.
- Graf, F. 1978. Les sources de calcium pour les Crustacés venant de muer. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **119**: 143-161.
- Green, J. P. & M. R. Neff 1972. A survey of the fine structure of the integument of the fiddler crab. *Tissue Cell*, **4**: 137-171.
- Gwinn, J. F. & J. R. Stevenson 1973. Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish. I. Correlation of ^{14}C -acetylglucosamine incorporation with stages of the molting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **45 B**: 769-776.
- Hackman, R. H. & M. Goldberg 1958. Proteins of the larval cuticle of *Agrionome spinicollis* (Coleoptera). *J. Insect Physiol.*, **2**: 221-231.
- Hackman, R. H. & M. Goldberg 1974. Light-scattering and infrared-spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives. *Carbohydr. Res.*, **38**: 35-45.
- Hackman, R. H. & M. Goldberg 1976. Comparative chemistry of arthropod cuticular proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55 B**: 201-206.
- Hartnoll, R. G. 1969. Mating in the Brachyura. *Crustaceana*, **16**: 161-181.
- Hartnoll, R. G. 1974. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*, **27**: 131-136.
- Hartnoll, R. G. 1978. The determination of relative growth in Crustacea. *Crustaceana*, **34**: 281-293.
- Hartnoll, R. G. 1984. Strategies of crustacean growth. *The Australian Museum Memoir*, **18**: 121-131.
- Hegdahl, T. ; Silness, J. & F. Gustavsen 1977a. The structure and mineralization of the carapace of the crab *Cancer pagurus* L. 1. The endocuticle. *Zool. Scr.*, **6**: 89-99.
- Hegdahl, T. ; Gustavsen, F. & J. Silness 1977b. The structure and mineralization of the

- carapace of the crab *Cancer pagurus* L. 2. The exocuticle. Zool. Scr., **6**: 101-105.
- Hegdahl, T. ; Gustavsen, F. & J. Silness 1977c. The structure and mineralization of the carapace of the crab *Cancer pagurus* L. 3. The epicuticle. Zool. Scr., **6**: 215-220.
- Hodge, M. H. 1956a. Autotomy and regeneration in *Gecarcinus lateralis*. Anat. Rec., **125**: 633.
- Hodge, M. H. 1956b. Variations on the normal pattern of limb regeneration in *Gecarcinus lateralis*. Anat. Rec., **125**: 635-636.
- Hodge, M. H. 1958. Ph.D. Thesis, Radcliffe College, Cambridge, Massachusetts.
- Hogarth, P. J. 1983. Crabs in labs: the shore crab (*Carcinus maenas*) as teaching material. J. Biol. Educ., **17**: 105-111.
- Hohnke, L. A. 1971. Enzymes of chitin metabolism in the decapod, *Hemigrapsus nudus*. Comp. Biochem. Physiol., **40 B**: 757-779.
- Hopkins, P. M. 1982. Growth and regeneration patterns in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Biol. Bull., **163**: 301-319.
- Hornung, D. E. & J. R. Stevenson 1971. Changes in the rate of chitin synthesis during the crayfish molting cycle. Comp. Biochem. Physiol., **40 B**: 341-346.
- Horst, M. N. 1981. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. J. Biol. Chem., **256**: 1412-1419.
- Horst, M. N. 1983. The biosynthesis of crustacean chitin. Isolation and characterization of polyprenol-linked intermediates from brine shrimp microsomes. Arch. Biochem. Biophys., **223**: 254-263.
- Howe, N. R. 1981. Partial molting synchrony in the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: a chemical communication hypothesis. J. Chem. Ecol., **7**: 487-499.
- Hu, A. S. L. 1958. Glucose metabolism in the crab *Hemigrapsus nudus*. Arch. Biochem. Biophys., **75**: 387-395.
- Humphreys, C. R. & J. R. Stevenson 1973. Changes in epidermal DNA, protein, and protein synthesis during the molt cycle of the crayfish *Orconectes sanborni* (Faxon). Comp. Biochem. Physiol., **44 A**: 1121-1128.
- Huner, J. V. ; Kowalczyk J. G. & J. W. Avault Jr. 1976. Postmolt calcification in subadult red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda, Cambaridae). Assoc. S. E. Biol. Bull., **23**: 68-73.

- Huxley, J. S. 1924. Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature*, London, **114**: 895-896.
- Huxley, J. S. 1932. Problems of relative growth. i-xix, 1-276, Methuen, London.
- Jenkin, P. M. & H. E. Hinton 1966. Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature*, London, **211**: 871.
- Klapow, L. A. 1972. Fortnightly molting and reproductive cycles in the sand-beach isopod, *Excirrolana ciltoni*. *Biol. Bull.*, **143**: 568-591.
- Klein Breteler, W. C. M. 1975. Growth and molting of juvenile shore crabs, *Carcinus maenas*, in a natural population. *Neth. J. Sea Res.*, **9** : 86-99.
- Klein Breteler, W. C. M. 1976. Migration of the shore crab *Carcinus maenas*. *Neth. J. Sea Res.*, **10**: 338-353.
- Kurata, H. 1962. Studies on the age and growth of Crustacea. *Bull. Hokkaido reg. Fish. Res. Lab.* **24**: 1-115.
- Lafon, M. 1941. Sur la composition du tégument des crustacés. *C. R. Seanc. Soc. Biol.*, **135**: 1003-1006.
- Lafon, M. 1943. Recherches biochimiques et physiologiques sur le squelette tégumentaire des arthropodes. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Animale*, **11**: 113-146.
- Lafon, M. 1948. Nouvelles recherches biochimiques sur le squelette tégumentaire des crustacés. *Bull. Inst. Oceanogr., Monaco*, **45**: 1-28.
- La Hue, A. K. 1981. Factors influencing molt rate and size at maturity in *Pachygrapsus crassipes* Randall (Brachyura, Grapsidae). M. A. Thesis, University of California, Santa Barbara.
- Litwack, G. 1960. *Experimental Biochemistry. A laboratory manual.* i-xv, 1-313, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & R. J. Randall 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Marchand, J. 1979. Observations sur des populations naturelles de *Rhithropanopeus harrisi tridentatus* dans l'estuaire de la Loire: fréquence des mues et taux de croissance des femelles adultes. *Cah. Biol. Mar.*, **20**: 461-469.
- Marchand, J. 1973a. Structure de la population d'un Crustacé Décapode Brachyoure: *Rhithropanopeus harrisi* (Gould) *tridentatus* (Maitland) dans l'estuaire de la Loire. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **276**: 2581-2584.
- Marchand, J. 1973b. Observations sur des populations naturelles de *Rhithropanopeus harrisi* (Gould) *tridentatus* (Maitland) (Crustacé, Décapode, Brachyoure)

- dans l'estuaire de la Loire: détermination des tailles auxquelles se produisent les stades critiques. C. R. Acad. Sci. Paris, **277**: 2549-2552.
- Mauchline, J. 1976. The Hiatt Growth Diagram for Crustacea. Mar. Biol., **35**: 79-84.
- Mauchline, J. 1977. Growth of shrimps, crabs and lobsters - an assessment. J. Cons. int. Explor. Mer, **37**: 162-169.
- McVean, A. R. 1973. Autotomy in *Carcinus maenas* (Decapoda: Crustacea). J. Zool., Lond., **169**: 349-364.
- McVean, A. R. 1975. Autotomy. Comp. Biochem. Physiol., **51 A**: 497-506.
- McWhinnie, M. A. & C. J. Mohrherr 1970. Influence of eyestalk factors, intermolt cycle and season upon ^{14}C -leucine incorporation into protein in the crayfish (*Orcoconnectes virilis*). Comp. Biochem. Physiol., **34**: 415-437.
- Meenakshi, V. R. & B. T. Scheer 1961. Metabolism of glucose in the crabs *Cancer magister* and *Hemigrapsus nudus*. Comp. Biochem. Physiol., **3**: 30-41.
- Miller, M. A. & E. A. Hoy 1939. Differential growth and evolution in a subterranean isopod. Am. Nat., **73**: 347-364.
- Morgan, S. O.; Goy, J. W. & J. D. Costlow, Jr. 1983. Multiple ovipositions from single matings in the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. J. Crustacean Biol., **3**: 542-547.
- Needham, A. E. 1950. The form-transformation of the abdomen of the female pea-crab *Pinnotheres pisum* Leach. Proc. R. Soc. B, **137**: 115-136.
- Pandian, T. J. & C. Balasundaram 1982. Moulting and spawning cycles in *Macrobrachium nobilii* (Henderson & Mathai). Intl. J. Invert. Reprod., **5**: 21-30.
- Passano, L. M. 1960. Molting and its control. // The Physiology of Crustacea (Waterman, T. H., Ed.), vol. 1, pp 473-536, Academic Press, N. Y.
- Reaka, M. L. 1976. Lunar and tidal periodicity of molting and reproduction in stomatopod crustacea: a selfish herd hypothesis. Biol. Bull., **150**: 468-490.
- Reeve, E. C. R. & J. S. Huxley 1945. Some problems in the study of allometric growth. // Essays on growth and form (Le Gros Clark, W. E. & P. B. Medawar Eds.), pp: 121-156, Oxford.
- Richards, A. O. 1951. The integument of Arthropods. University of Minnesota Press. Minneapolis.
- Roer, R. & R. Dillaman 1984. The structure and calcification of the crustacean cuticle. Amer. Zool., **24**: 893-909.

- Rupley J. A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **83**: 245-255.
- Sardá, F. 1983. El proceso de la regeneración de quelas en la cigala *Nephrops norvegicus* (L). *Invest. Pesq.*, **47**: 113-123.
- Sather, B. T. 1966. Observations on the molt cycle and growth of the crab *Podophthalmus vigil* (Fabricius) (Decapoda, Portunidae). *Crustaceana*, **11**: 185-197.
- Siegel, P. R. 1984. Food-induced size-specific molt synchrony of the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson). *Biol. Bull.*, **167**: 579-589.
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *Biol. Bull.*, **123**: 635-647.
- Skinner, D. M. 1966. Macromolecular changes associated with the growth of crustacean tissues. *Amer. Zool.*, **6**: 235-242.
- Skinner, D. M. 1985. Molting and Regeneration. *In* The Biology of Crustacea, Vol. 9, (Bliss, D. E. & L. H. Mantel Eds.), pp. 43-135, Academic Press Inc., N. Y.
- Skinner, D. M. & D. E. Graham 1970. Molting in land crabs: stimulation by leg removal. *Science*, **169**: 383-385.
- Skinner, D. M. & D. E. Graham 1972. Loss of limbs as a stimulus to ecdysis in *Brachyura* (True crabs). *Biol. Bull.*, **143**: 222-233.
- Somerton, D. A. 1980. A computer technique for estimating the size of sexual maturity in crabs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**: 1488-1494.
- Spaziani, E.; Ostedgaard, L. S.; Vensel, W. H. & J. P. Hegmann 1981. The molt cycle of the crab, *Cancer antennarius* : computer-aided staging. *J. Exp. Zool.*, **218**: 195-202.
- Steel, C. G. H. 1980. Mechanisms of coordination between moulting and reproduction in terrestrial isopod Crustacea. *Biol. Bull.*, **159**: 206-218.
- Stevenson, J. R. 1968. Metecdysial molt staging and changes in the cuticle in the crayfish *Orconectes sanborni* (Faxon). *Crustaceana*, **14**: 169-177.
- Stevenson, J. R. 1972. Changing activities of the crustacean epidermis during the molting cycle. *Am. Zool.*, **12**: 373-380.
- Stevenson, J. R. 1985. Dynamics of the integument. *In* The Biology of Crustacea, Vol. 9, (Bliss, D. E. & L. H. Mantel Eds.), pp 1-42, Academic Press Inc., N. Y.
- Stevenson, J. R.; Guckert, R. H. & J. D. Cohen 1968. Lack of correlation of some

- proecdysial growth and developmental processes in the crayfish. Biol. Bull., **134**: 160-175.
- Tchernigovtzeff, C. 1959. Croissance épithéliale et cycle d'intermue chez *Leander serratus*. C. R. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, **248**: 600-602.
- Tchernigovtzeff, C. 1972. Régénération et cycle d'intermue chez le crabe *Gecarcinus lateralis*. I. Étude de la relation entre la croissance préexuviale des bourgeons des pattes et les étapes de la morphogenèse des soies dans les épipodites branchiaux des maxillipèdes. Arch. Zool. Exp. Gén., **113**: 196-213.
- Tchernigovtzeff, C. (1974). Régénération et cycle d'intermue chez le crabe *Gecarcinus lateralis* II. Situation du moment critique et incidence d'une régénération tardive sur le cours de la premue. Arch. Zool. Exp. Gén., **115**: 423-440.
- Teissier, G. 1960. Relative growth. // The Physiology of Crustacea (Waterman, T. H. Ed.), vol. 1, pp 537-560, Academic Press, N. Y.
- Travis, D. F. 1963. Structural features of mineralization from tissue to macromolecular levels of organization in decapod Crustacea. Ann. N. Y. Acad. Sci. **109**:177-245.
- Vernet-Cornubet, G. 1958. Biologie générale de *Pisa tetradon*. Bull. Inst. océanogr. Monaco, **113**: 1-52.
- Vigh, D. A. & J. E. Dendinger 1982. Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Comp. Biochem. Physiol., **72 A**: 365-369.
- Voss-Foucart, M. F. & C. Jeniaux 1978. Étude comparée de la couche principale et de la couche membraneuse de la cuticle chez six espèces de Crustacés Décapodes. Arch. Zool. Exp. Gén., **119**: 127-142.
- Webster, S. G. 1981. Seasonal anecdysis and molting synchrony in field populations of *Palaeomon elegans* (Rathke). Estuarine Coastal Shelf Sci., **15**: 85-94.
- Weis, J. S. 1976. Regeneration of limbs autotomized at different times in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Can. J. Zool., **55**: 656-660.
- Weis, J. S. 1982. Studies on limb regeneration in the anomurans *Pagurus longicarpus* and *Emerita talpoides*. J. Crustacean Biol., **2**:227-231.
- Welinder, B. S. 1974. The crustacean cuticle. I. Studies on the composition of the cuticle. Comp. Biochem. Physiol., **47 A**: 779-787.
- Welinder, B. S. 1975a. The crustacean cuticle. II. Deposition of organic and inorganic material in the cuticle of *Astacus fluviatilis* in the period after moulting.

- Comp. Biochem. Physiol., **51 B**: 409-416.
- Welinder, B. S. 1975b. The crustacean cuticle. III. Composition of the individual layers in *Cancer pagurus* cuticle. Comp. Biochem. Physiol., **52 A**: 659-663.
- Welinder, B. S. ; Roepstorff, P. & S. O. Andersen 1976. The crustacean cuticle. IV. Isolation and identification of cross-links from *Cancer pagurus* cuticle. Comp. Biochem. Physiol., **53 B**: 529-533.
- Wenner, A. M.; Fusaro, C. & A. Oaten 1974. Size at onset of sexual maturity and growth rate in crustacean populations. Can. J. Zool. **52**: 1095-1106.
- Weymouth F. W. & D. C. G. MacKay 1936. Analysis of the relative growth of the pacific edible crab *Cancer magister*. Proc. zool. Soc. Lond., **106**: 257-280.
- Wittig, K. P. & J. R. Stevenson 1975. DNA synthesis in the crayfish epidermis and its modification by ecdysterone. J. Comp. Physiol., **99**: 279-286.