

Tesis de Posgrado

Transporte iónico en *Chasmagnathus granulatus*, Dana 1851 (Grapsidae): papel del branquiostegito y posibles vías de regulación neuroendócrina en branquias posteriores

Halperin, Julia

2003

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:

Halperin, Julia. (2003). Transporte iónico en *Chasmagnathus granulatus*, Dana 1851 (Grapsidae): papel del branquiostegito y posibles vías de regulación neuroendócrina en branquias posteriores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3573_Halperin.pdf

Cita tipo Chicago:

Halperin, Julia. "Transporte iónico en *Chasmagnathus granulatus*, Dana 1851 (Grapsidae): papel del branquiostegito y posibles vías de regulación neuroendócrina en branquias posteriores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3573_Halperin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Transporte iónico en
Chasmagnathus granulatus, Dana
1851 (Grapsidae): papel del
branquiostegito y posibles vías de
regulación neuroendócrina en
branquias posteriores”

Julia Halperin

Directores: Dres. Carlos M. Luquet y Dante A. Paz.

Laboratorio de Histología Animal.
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental.

*Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires*

Abril, 2003.

Nº 3 5 7

Resumen

El estudio comparado entre el branquiostegito y las branquias de *Chasmagnathus granulatus* muestra que el primero es capaz de cumplir una importante función en el intercambio gaseoso durante la exposición al aire, pero no es apto para las funciones de regulación iónica. No se encontraron en el branquiostegito los tipos celulares asociados a estos procesos ni alta actividad de enzimas como la anhidrasa carbónica, necesarias para el transporte iónico.

Se estudiaron algunas vías de regulación asociadas al transporte iónico en branquias posteriores sometidas a condiciones iso- e hipo-osmóticas. Se demostró que la dopamina tiene una función moduladora del transporte de Na^+ a través del epitelio branquial. En condiciones basales (osmolaridad hemolinfática normal), esta bioamina estimula transitoriamente el transporte de Na^+ por activación de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Por otro lado, luego de un shock hipo-osmótico donde el transporte iónico se ve activado, con aumento de la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa, la dopamina actúa como un modulador negativo, reduciendo la amplitud de la respuesta al estímulo hipo-osmótico.

En los estudios inmunohistoquímicos se observa que, cuando se transfieren individuos desde una condición hipo-osmótica a una iso- o hiper-osmótica, la vía del cAMP-PKA, es inhibida en las branquias posteriores a través del aumento en la expresión de proteína G_i (inhibidora de la adenilato ciclasa) en la membrana basolateral.

Summary

The inner integument of the branchiostegites of *Chasmagnathus granulatus* plays a complementary role in respiratory gas exchange during air exposure but it is not capable of performing ion transport functions. The epithelial tissue lining this organ lacks from the ultrastructural features of ion-transporting epithelia and also from the high activity rates of enzymes like carbonic anhydrase which are characteristic of this kind of tissue.

We investigated some regulatory pathways related to ion transport in isolated posterior gills, perfused under iso- and hypo-osmotic conditions. Dopamine showed a modulatory effect on Na^+ transport across the branchial epithelium. Under basal conditions (normal hemolymphatic osmolarity) dopamine increased the Na^+ influx by enhancing Na^+ , K^+ -ATPase activity. On the other hand, after a hypo-osmotic stress, when the ion transport mechanisms are activated (through increased Na^+ , K^+ -ATPase activity), dopamine modulates the autonomic increase of Na^+ influx, diminishing the amplitude of the response of the hypo-osmotic stimulus.

Histochemical studies showed an inhibition of cAMP-PKA pathway in posterior gills after transference of animals from hypo- to iso- or hyper-osmotic media, which is evidenced through an increase of Gi protein expression.

*A Gus,
que es el amor de mi vida.
A mis Viejos,
que se merecen todo y más.*

... Los pescadores dicen que los samurais Heike se pasean todavía por los fondos del mar Interior, en forma de cangrejos. Se pueden encontrar en este mar, cangrejos con curiosas señales en sus dorsos, formas e indentaciones que se parecen asombrosamente al rostro de un samurai. Cuando se pesca un cangrejo de éstos no se come sino que se le devuelve al mar...

Carl Sagan, *COSMOS*, 1980.



Un cangrejo Heike del mar Interior del Japón.

INDICE

<i>Introducción.</i>	6
<i>1. Regulación Osmótica e Iónica en Crustáceos.</i>	6
<i>1.1. Variaciones de la Salinidad Externa y Osmoregulación.</i>	8
<i>1.1.1. Conceptos Generales: Ósmosis, Difusión, Gradiente Electroquímico y Ecuación de Nernst.</i>	8
<i>1.1.2. Osmoconformadores vs. Osmoreguladores.</i>	10
<i>1.1.3. Estenohalinos vs. Eurihalinos.</i>	13
<i>1.2. Epitelios de Intercambio Iónico.</i>	17
<i>1.2.1. Morfo-Fisiología General del Epitelio de Transporte</i>	17
<i>1.2.2. Estructuras Relacionadas con el Intercambio Iónico en Crustáceos.</i>	19
<i>2. La Branquia como Órgano de Transporte Iónico.</i>	23
<i>2.1. Morfología General de las Branquias.</i>	23
<i>2.2. Diferencias Morfológicas entre Branquias Anteriores y Posteriores.</i>	26
<i>2.3. Diferencias Bioquímicas entre Branquias Anteriores y Posteriores.</i>	27
<i>2.3.1. La Enzima Na^+, K^+-ATPasa.</i>	29
<i>2.3.2. La Enzima Anhidrasa Carbónica.</i>	32
<i>3. El Branquiostegito como Órgano de Transporte Iónico.</i>	34
<i>3.1. Morfología General del Branquiostegito.</i>	34
<i>3.2. Branquiostegito como Órgano de Intercambio Gaseoso.</i>	34
<i>3.3. Branquiostegito como Órgano de Intercambio Iónico.</i>	37

<i>4. Regulación Hormonal de las Funciones de Intercambio Iónico.</i>	41
4.1. <i>Algunos Conceptos de Regulación Hormonal.</i>	41
4.2. <i>Vía del cAMP como Segundo Mensajero.</i>	42
4.3. <i>Modelo de Regulación Iónica en Vertebrados: Regulación de la Actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa.</i>	45
4.4. <i>Órgano Pericárdico, Dopamina y Regulación Hormonal de las Funciones de Intercambio Iónico en Branquias de Crustáceos.</i>	48
4.4.1. <i>Aminas Biogénicas y sus Efectos en Crustáceos.</i>	48
4.4.2. <i>Localización y Estructura del Órgano Pericárdico.</i>	51
4.4.3. <i>Regulación del Transporte Iónico por Dopamina en Crustáceos Decápodos.</i>	53
<i>5. Chasmagnathus granulatus.</i>	66
5.1. <i>Ubicación Taxonómica.</i>	66
5.2. <i>Ambiente.</i>	66
5.3. <i>Estructura y Función de las Branquias.</i>	69
5.4. <i>Respiración en Agua vs. Respiración en Aire.</i>	70
5.5. <i>Medio Iso-Osmótico vs. Medio Hipo-Osmótico.</i>	72
<i>Hipótesis.</i>	77
<i>Objetivos.</i>	78
<i>Materiales y Métodos.</i>	79
1. <i>Muestreo.</i>	79
2. <i>Estadística.</i>	79
3. <i>Estudio Morfológico y Funcional del Branquiostegito.</i>	80

3.1. Microscopía Óptica.	80
3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.	81
3.3. Inmunomarcación de Proteínas Involucradas en la Contracción Muscular.	81
3.4. Determinación de la Superficie Interna del Branquiestegito y del Volumen de las Cámaras Branquiales.	82
3.5. Estudio de la Distribución de Azúcares Mediante Uso de Lectinas.	83
3.6. Determinación de la Actividad Enzimática de Anhidrasa Carbónica en Branquiestegito.	84
4. Control Neuroendócrino de la Captación Activa de NaCl.	85
4.1. Preparaciones de Branquias Aisladas Perfundidas.	85
4.2. Efectos de Dopamina y Diferentes Compuestos que Estimulan la Vía del cAMP en Condiciones Iso-Osmóticas.	86
4.2.1. Perfusión con Dopamina. Curva Dosis-Repuesta.	87
4.2.2. Perfusión con cp-cAMP, IBMX y Forskolina.	88
4.2.3. Perfusión de Branquias con Dopamina en Baño Libre de Na ⁺	89
4.2.4. Determinación del Ingreso de Na ⁺ en Branquias Perfundidas con Dopamina usando ²² Na.	89
4.2.5. Perfusión con Dopamina en Branquias Estimuladas.	90
4.3. Efectos de Dopamina en Branquias Perfundidas en Condiciones Hipo-Osmóticas.	91
4.4. Ensayos Bioquímicos.	91
4.4.1. Determinación de la Concentración Branquial de cAMP en Branquias pre-Incubadas con Dopamina.	91

4.4.2. Efecto de la Transferencia a Baja Salinidad sobre la Concentración Branquial de cAMP.	92
4.4.3. Determinación de la Actividad Enzimática de Na^+ , K^+ - ATPasa en Branquias pre-Incubadas con Dopamina.	93
4.4.4. Determinación de la Actividad Enzimática de Na^+ , K^+ - ATPasa en Branquias Incubadas con cp-cAMP, Pki y Forskolina.	94
4.5. Ensayos Histológicos e Inmunomarcaciones.	95
4.5.1. Inmunomarcación de Proteína G en Branquias.	95
4.5.2. Caracterización Histológica del Órgano Pericárdico.	95
4.5.3. Identificación de Terminales Nerviosas.	96
4.5.4. Inmunomarcación de Células Dopaminérgicas en Órgano Pericárdico.	96
Resultados.	98
1. Estudio Morfológico y Funcional del Branquiostegito.	98
1.1. Microscopía Óptica e Inmunohistoquímica.	98
1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.	104
1.3. Determinación de la Superficie Interna del Branquiostegito y del Volumen de las Cámaras Branquiales.	109
1.4. Determinación de la Actividad Enzimática de Anhidrasa Carbónica.	110
1.5. Estudio Comparativo de la Distribución de Azúcares Mediante Uso de Lectinas.	111
2. Control Neuroendócrino de la Captación Activa de NaCl.	112

2.1. Preparaciones de Branquias Aisladas Perfundidas en Condiciones Iso-Osmóticas.	112
2.1.1. Efecto de la Dopamina sobre la Diferencia de Potencial Transepitelial.	112
2.1.2. Efecto del cAMP y otros Compuestos Estimuladores de la misma Vía de Señalización sobre la Diferencia de Potencial Transepitelial.	118
2.2. Ensayos Bioquímicos.	124
2.2.1. Determinación de la Actividad Enzimática de Na^+ , K^+ - ATPasa Branquial.	124
2.2.2. Ensayo de Contenido de cAMP Intracelular.	136
2.3. Perfusión con Dopamina en Branquias Estimuladas.	139
2.4. Ensayos Histológicos e Inmunohistoquímicos.	144
2.4.1. Inmunomarcación de Proteína G en Branquias.	144
2.4.2. Identificación del Órgano Pericárdico.	151
2.4.2.1. Caracterización Histológica.	151
2.4.2.2. Identificación de Terminales Nerviosas.	155
Discusión.	157
1. Función del Branquiostegito de <i>C. granulatus</i>	157
2. Regulación del Transporte Iónico en Branquias Posteriores de <i>C. granulatus</i>	164
3. Conclusiones.	176
Bibliografía.	179

Introducción

1. Regulación Osmótica e Iónica en Crustáceos

Los crustáceos, así como otros grupos de animales, han desarrollado la capacidad de sobrevivir en un medio osmótico desfavorable, manteniendo un medio interno estable, que actúa amortiguando los efectos adversos y rigores del medio externo sobre los tejidos internos. Desde un punto de vista evolutivo, la capacidad de estos animales de mantener, frente a un estrés osmótico, un medio interno apropiado les ha permitido invadir ambientes, que ancestralmente les fueron desfavorables (como el dulceacuícola y/o el terrestre) ya que la naturaleza osmótica del medio ambiente es uno de los factores que determina la distribución geográfica de las especies.

En los procesos de regulación iónica que ocurren principalmente a través de las branquias, son varios los actores que juegan un papel importante: por un lado se encuentran involucrados diversos canales y proteínas transportadoras de iones y enzimas que generan gradientes electroquímicos o catalizan la formación de contraiones y por otro, el control hormonal y una compleja vía de señalización celular que permite que estos mecanismos se activen o desactiven ante una señal apropiada.

Es mucho lo que se ha escrito sobre este tema y se han hecho valiosísimos aportes en los últimos años. Por lo tanto, el objetivo de esta sección será explicar los principales conceptos relacionados con el flujo de iones y/o agua, así como posibles mecanismos de regulación hormonal que ocurren en los crustáceos, como consecuencia de las diferencias

osmóticas e iónicas surgidas entre el medio interno y el ambiente acuático que habitan, teniendo en cuenta los antecedentes y los avances mas importantes en el tema al día de hoy.

1.1. Variaciones de la Salinidad Externa y Osmoregulación.

1.1.1. Conceptos Generales: Ósmosis, Difusión, Gradiente Electroquímico y Ecuación de Nernst.

Cuando un organismo con una dada concentración osmótica interna, se expone a un medio externo de concentración osmótica más baja, hay una tendencia a la pérdida de sales y ganancia de agua por parte de dicho organismo, como consecuencia del gradiente de concentración creado entre el medio interno y el medio externo. En una situación inversa (concentración osmótica interna menor a la externa) se invierte el sentido de los flujos de agua y sales del ejemplo anterior. El movimiento de agua a favor de su gradiente de concentración se denomina *ósmosis* mientras que el movimiento de solutos siguiendo un gradiente de concentración se denomina *difusión*.

Tanto en el medio interno de los crustáceos como en el medio ambiente acuático que habitan, los iones más abundantes y la vez, más importantes involucrados en los procesos de osmoregulación son el sodio (Na^+) y el cloruro (Cl^-). Para comprender y predecir la dirección y la magnitud del flujo de cada ión involucrado en dichos procesos, se debe tener en cuenta ciertos importantes aspectos:

- la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática
- el gradiente de concentración de cada especie iónica establecido a ambos lados de la membrana plasmática.
- El campo eléctrico al que está sometida cada especie iónica que atraviesa la membrana plasmática.

Teniendo en cuenta estos puntos, se dice que sobre cada especie iónica actuarán dos fuerzas para producir difusión pasiva neta: el gradiente químico derivado de las diferencias en la concentración del ión y la diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana. La suma de fuerzas combinadas del gradiente de concentración y el gradiente eléctrico determinan un gradiente *electroquímico*. Se asume que la naturaleza de estas fuerzas es aditiva y que el gradiente químico es balanceado por el gradiente eléctrico, cuando el sistema está en equilibrio pasivo. Este equilibrio está expresado en la Ecuación de Nernst:

$$E_j = \frac{R * T}{z * F} * \ln \left(\frac{C_j^1}{C_j^2} \right)$$

donde E_j es la diferencia de potencial eléctrico en V (volts) a través de la membrana en el punto de equilibrio del ión j

z es la carga del ión

F es la constante de Faraday (96 500 coulombs mol⁻¹)

R es la constante de los gases (8.31 joules grados⁻¹)

T es la temperatura absoluta

y C_j^1 y C_j^2 son las concentraciones del ión a ambos lados de la membrana.

En los crustáceos decápodos la branquia es el órgano de regulación iónica por excelencia. En la práctica, se han ensayado diferentes técnicas para estudiar la naturaleza del flujo de los iones así como las proteínas transportadoras y los canales de membrana involucrados a través del epitelio branquial. El uso de trazas radiactivas, preparaciones de branquias

aisladas perfundidas o hemi-laminillas montadas en micro-cámaras de Ussing combinados con el uso de diversos inhibidores específicos, han ayudado a hipotetizar sobre algunos modelos que explican la morfo-fisiología de estos epitelios de intercambio.

1.1.2. *Osmoconformadores vs. Osmoreguladores.*

Desde el punto de vista de la regulación osmótica e iónica, dentro de los crustáceos se definen diferentes patrones según la capacidad que tengan estos animales de controlar la permeabilidad pasiva al agua y a los iones en sus superficies expuestas al medio externo así como la captación y excreción activa de iones a través de esas mismas superficies. Según Mantel y Farmer (1983), la relación entre osmolaridad interna y externa, se expresa comúnmente en términos de osmoconformidad y osmoregulación. De esta forma, se denominan *osmoconformadores* a aquellos individuos cuya osmolaridad interna acompaña a las variaciones de la del medio externo, dentro de un cierto intervalo de tolerancia. Mientras que los *osmoreguladores* son capaces de mantener relativamente constante su osmolaridad interna independientemente de los cambios osmóticos del medio externo, también dentro de un intervalo de tolerancia.

Dentro del primer grupo se encuentran especies tales como *Panulirus longipes* (Mantel y Farmer, 1983), *Palinurus elephas*, *Maja crispata* y *Dormia personata* (Lucu *et al*, 2000), cuya concentración interna acompaña iso-ósmoticamente a las variaciones del medio externo.

La limitación que presentan las especies osmoconformadoras radica en que, al exponerse a un medio externo mas diluido, la concentración osmótica hemolinfática también disminuye lo cual a su vez provoca un flujo

de agua hacia los tejidos por la nueva diferencia de gradiente surgida entre los medios intra y extracelular. Entonces, el intervalo de tolerancia a la variación de la salinidad del medio externo de estas especies, está limitado por la capacidad que tienen los tejidos corporales para hacer los ajustes necesarios a fin de mantener su volumen y su concentración osmótica intracelulares controladas (Péqueux, 1995).

Dentro del grupo de los osmoreguladores, existen especies capaces de mantener la concentración osmótica de su medio interno más o menos constante cuando la del medio externo se torna hipo-osmótica. A estas especies se las define como hiperreguladoras. En estas condiciones, se dice que el animal tiende a “ganar” agua y/o “perder” sales. Lo primero, se puede minimizar si las superficies expuestas al medio externo se tornan relativamente impermeables al agua (Berlind y Kamemoto, 1977; Avenet y Lignon, 1985; para una reseña, ver Mantel, 1985). De esta manera, un animal que experimenta una dilución de salinidad del medio externo y enfrentado a la consecuente entrada osmótica de agua, podría reducir el stress osmótico, tornando la superficie corporal, y en particular las branquias, menos permeables al agua. En relación a este tema, se han realizado algunos estudios en los cuales se analizó la variación de la permeabilidad al agua aparente (AWP) en función de la salinidad de aclimatación y se observó que para algunas especies osmoreguladoras como *Carcinus maenas* y *Necora puber*, la AWP disminuye a medida que disminuye también la salinidad del medio. Por otra parte, en otras especies eurihalinas como *Eriocheir sinensis*, *Cherax destructor* y *Astacus astacus*, las cuales poseen una muy baja permeabilidad al agua y por lo tanto están bien adaptadas a la vida en ambientes estuariales o de aguas dulces, la

AWP permanece invariable ante los cambios de salinidad (Rasmussen y Bjerregaard, 1995; Rainbow y Black, 2001).

Para contrarrestar la pérdida pasiva de sales ante un shock hipo-osmótico, se requiere de un mecanismo de captación de sales desde el medio externo hacia el medio interno del animal, contra un gradiente de concentración, lo cual requiere gasto de energía. Se denominan especies *hiperreguladoras* a aquellas capaces de realizar este tipo de mecanismos cuando se exponen a un medio externo hipo-osmótico. Ejemplos de estas especies se encuentran en *Callinectes sapidus* (Copeland y Fitzjarrell, 1968; Neufeld *et al*, 1980; Piller *et al*, 1995), *Carcinus maenas* (Zanders, 1980; Lucu, 1990; Towle, 1990), *Eriocheir sinensis* (Péqueux y Gilles, 1988), *Goniopsis cruentata* (Martelo y Zanders, 1986) y varias especies del género *Uca* (Baldwin y Kirschner, 1976b; Holliday, 1985; Lin *et al*, 2002).

Otra situación a la que pueden exponerse ciertas especies es a enfrentar un medio externo hiper-osmótico con respecto a su propio medio interno en cuyo caso surge una tendencia a la pérdida de agua (deshidratación) y/o ganancia de iones. En este caso, los mecanismos desarrollados son opuestos ya que se eliminan iones hacia el medio externo contra un gradiente de concentración. Se denominan especies *hiporeguladoras* a aquellas capaces de realizar estos mecanismos en un medio externo hiper-osmótico. Ejemplos de estas especies se encuentran en *Artemia salina* (Mantel y Farmer, 1983), *Ucides cordatus* (Martinez *et al*, 1998) y algunas especies del género *Uca* (Baldwin y Kirschner, 1976a; Lin *et al*, 2002).

Una vez definidos estos términos, es importante aclarar que algunas especies poseen una capacidad reguladora que varía según el medio de aclimatación al que están expuestas. Por ejemplo, en el caso particular de *Macrobrachium rosenbergii*, la osmolaridad de la hemolinfa se mantiene cerca de los 450 mOsm kg⁻¹ tanto cuando el animal se encuentra en agua dulce (8 mOsm kg⁻¹) como cuando se encuentra en 1/3 de agua de mar (290 mOsm kg⁻¹). Cuando se somete a esta especie a una aclimatación en 2/3 de agua de mar (650 mOsm kg⁻¹) o agua de mar total (950 mOsm kg⁻¹) la concentración osmótica de su medio interno también aumenta alcanzando los 640 mOsm kg⁻¹ y 820 mOsm kg⁻¹ respectivamente (Wilder *et al*, 1998). Es decir, que *M. rosenbergii* tiene capacidad de hiporegular en agua dulce, pero una vez expuesto a salinidades mayores, se comporta como osmoconformador.

1.1.3. Estenohalinos vs. Eurihalinos.

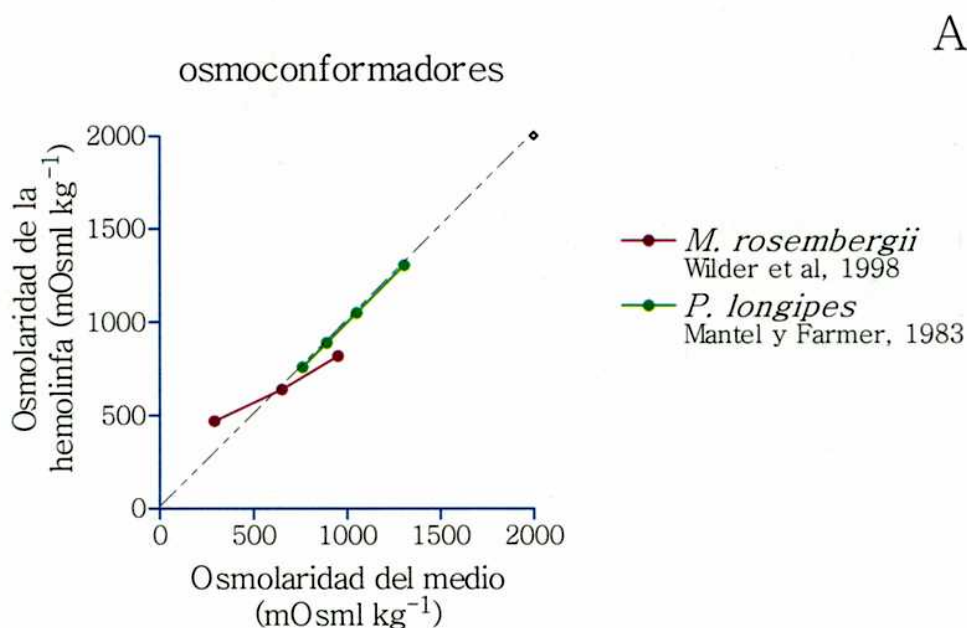
Otra forma que suele utilizarse en la literatura para clasificar a los crustáceos está relacionada con la tolerancia de las especies al rango de salinidad que el medio ambiente puede adoptar. Se denominan *estenohalinas* a aquellas especies que soportan un estrecho margen de salinidades mientras que las *eurihalinas* toleran amplias variaciones de salinidad.

Es de esperar que las especies osmoconformadoras habiten entonces, ambientes con poca variabilidad en su salinidad como por ejemplo, las aguas marinas, puesto que dichas especies carecen de los mecanismos de captación/excreción activa de iones. Por lo tanto, es

común que las especies estenohalinas sean a su vez osmoconformadoras como de hecho ocurre con la mayoría de los crustáceos decápodos.

Por el contrario, las especies eurihalinas, puesto que se hallan expuestas a cambios drásticos de salinidad del medio ambiente, es de esperar que cuenten con los mecanismos activos necesarios para evitar el desbalance iónico interno. Por ello, en general las especies eurihalinas son, a la vez, osmoreguladoras y habitan ambientes de salinidad variable como por ejemplo, lagunas, estuarios, ambientes costeros, o bien, migran entre diferentes hábitats.

Una vez definidos todos los términos correspondientes, cabe aclarar que dentro de los crustáceos, existe una amplia gama de capacidades cuyos ejemplos pueden apreciarse en los siguientes gráficos:



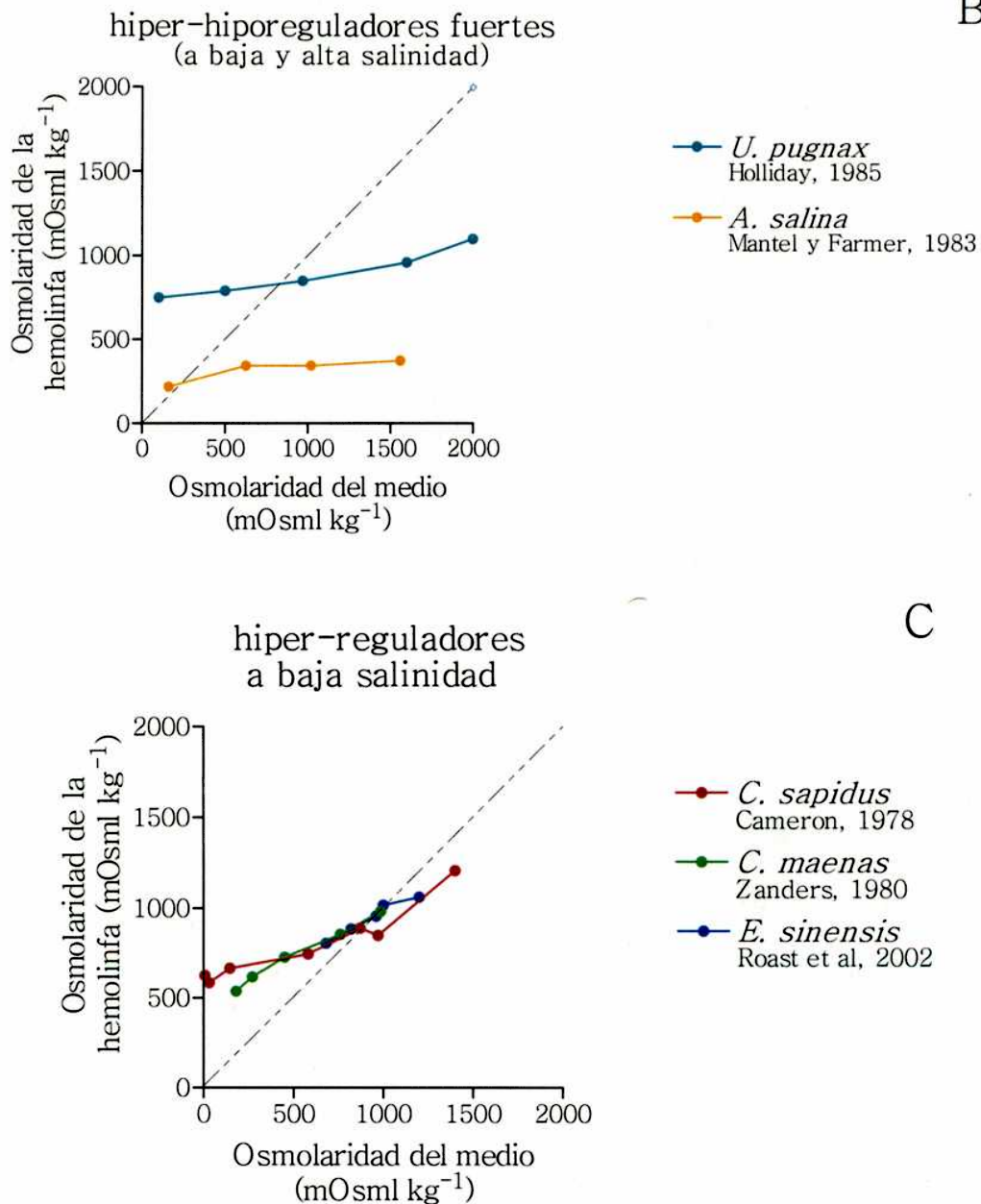


Figura 1: Perfiles de osmoregulación de cangrejos de agua dulce, salobre y marina. La línea diagonal punteada indica la relación iso-osmótica entre la hemolinfa y el medio externo. A) Representa especies osmoconformadoras fuertes. B) Representa especies que mantienen relativamente constante la osmolaridad interna a alta (hipo-regulan) y a baja salinidad (hiper-regulan). C) Representa especies capaces de hiper-regular a baja salinidad, pero no tan eficientemente a salinidades más altas que su osmolaridad interna.

Puesto que a lo largo de este trabajo se hará mención reiteradas veces de otras especies a fin de comparar su comportamiento a nivel fisiológico con nuestra especie en estudio, la siguiente es una tabla en la que se expone a las especies mas citadas a la izquierda y el tipo de capacidad osmoregulatoria que poseen a la derecha:

<i>Eriocheir sinensis</i>	Eurihalino e hiperregulador fuerte.
<i>Carcinus maenas</i>	Eurihalino e hiperregulador débil (Lucu, 1990).
<i>Callinectes sapidus</i>	Eurihalino e hiperregulador fuerte.
<i>Uca</i> sp	Eurihalinos e hiper-hiporreguladores fuertes (Baldwin y Kirschner, 1976a,b; Holliday, 1985).
<i>Leptograpsus variegatus</i>	Eurihalino e hiper-hiporegulador (Cooper y Morris, 1997).
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Eurihalino y hiper-hiporeguladores fuerte (Warburg <i>et al</i> , 1987)
<i>Goniopsis cruentata</i>	Eurihalino y hiper-hiporegulador fuerte (Martelo y Zanders, 1986).
<i>Homarus gammarus</i>	Estenohalino con baja capacidad de hiper regulación (Thuet <i>et al</i> , 1988; Charmantier <i>et al</i> , 2001).

Tabla 1: Perfiles osmoregulatorios de especies utilizadas como modelos de estudio del transporte iónico.

1.2. Epitelios de Intercambio Iónico.

1.2.1. Morfo-Fisiología General del Epitelio de Transporte.

Un epitelio con función de transporte activo de sustancias en general está formado por una única capa de células de espesor (epitelio simple) en general de tipo columnar que descansa sobre una lámina basal. Las células epiteliales se caracterizan por estar polarizadas estructural y funcionalmente. Esto le permite al epitelio realizar funciones vectoriales de secreción y/o absorción y regular el tráfico transepitelial de iones y solutos necesarios para mantener un gradiente de concentración entre el medio externo y los fluidos corporales o entre compartimientos dentro del cuerpo (Fawcett, 1994).

La polaridad del epitelio se manifiesta en las especializaciones que amplifican el área de la superficie. A nivel ultra-estructural, la polaridad se expresa en las uniones intercelulares localizadas alrededor de las células cerca de la superficie libre y en otras especializaciones para la unión o comunicación entre células, que están confinadas a las superficies laterales. En vertebrados, es el caso de las *zónulas occludens* y *adherens* que son uniones en formas de banda que abarcan todo el perímetro de la célula brindando soporte mecánico y de los *desmosomas* o *macula adherens* que son uniones en formas de placa y se encuentran por lo general, por debajo de la *zónula adherens*. En el caso de invertebrados, particularmente para crustáceos se ha descrito la existencia de *uniones septadas*. Este tipo de uniones intercelulares es el que, en última instancia, determina o regula el movimiento de sustancias por la *vía paracelular*.

En un epitelio de transporte, se definen dos dominios morfo-funcionales: el *apical* que se encuentra orientado hacia el lado “externo” (ya sea el exterior propiamente dicho o un espacio que comunique al exterior), y el *basal* que se orienta hacia el compartimiento interno que contiene el líquido extracelular. Cada uno de estos compartimientos posee una composición osmótica particular y es función del epitelio mantener dichas composiciones osmóticas en estado estacionario.

La membrana plasmática de células no polarizadas se presenta con una composición bioquímica uniforme a lo largo de toda su superficie. Sin embargo, en las células epiteliales la polaridad se expresa a nivel sub-microscópico, en la segregación de ciertas proteínas de membrana y lípidos en los distintos dominios funcionales: el apical y el basolateral.

El dominio apical es especialmente rico en glicolípidos, colesterol, y contiene enzimas hidrolíticas, canales iónicos, proteínas específicas de transporte de nutrientes. Y es también el sitio de liberación de productos de una vía secretora regulada.

El dominio basolateral contiene Na^+ , K^+ -ATPasa, canales aniónicos y catiónicos, receptores para hormonas y neurotransmisores y es el principal sitio de secreción constitutiva (Fawcett, 1994).

Las sustancias que son transportadas activamente a través del epitelio deben seguir las *vías trans-celulares* en las que participa la membrana celular. Estas sustancias deben cruzar la membrana celular, primero de un lado (apical o basal) y después del otro, a través de los transportadores mencionados, siguiendo un gradiente de membrana o, en caso contrario, con gasto de energía (transporte activo).

1.2.2. Estructuras Relacionadas con el Intercambio Iónico en Crustáceos.

En general, las células epiteliales de las *glándulas antenales*, del *intestino* (hepatopáncreas), del *tegumento* (branquiostegito) y de las *branquias* de los crustáceos han sido extensamente estudiadas en relación a su participación en la regulación del movimiento de iones a través de sus superficies y la influencia que tienen en la concentración iónica de la hemolinfa.

Puesto que la glándula antenal es uno de los órganos primarios en la formación y excreción de orina, se ha estudiado su participación en la procesos fisiológicos asociados con la regulación del volumen corporal y de iones u otros solutos. En algunos crustáceos de agua dulce, no solamente las branquias están involucradas en la regulación iónica y osmótica. También la glándula antenal participa en este proceso produciendo una orina hipotónica. Se ha demostrado en algunas especies que la glándula antenal es rica en las enzimas anhidrasa carbónica y Na^+ , K^+ -ATPasa, las cuales participan en la reabsorción de iones desde la orina (para una reseña, ver Morris, 2001).

En muchas especies eurihalinas, se demostró que las variaciones en la cantidad de orina producida juegan un papel importante en la regulación del volumen y la presión internos (Mantel y Farmer, 1983). En un reciente trabajo hecho en el camarón hiper-hipo-regulador *Penaeus monodon* (Lin *et al*, 2000), se demostró la importancia de la glándula antenal en la regulación del volumen corporal a través del tipo de orina que produce luego de una aclimatación aguda a baja salinidad (de 45 a 15‰). En las primeras dos horas de aclimatación aguda, la producción de orina (iso-

osmótica con la hemolinfa) aumenta drásticamente puesto que, de esa forma, contrarresta la ganancia de agua que sufre el animal al pasar a un medio hipo-osmótico con respecto a su medio interno.

También se ha estudiado extensamente, la relación entre la orina producida por la glándula antenal y los cambios osmóticos e iónicos que ocurren durante la intermuda, como el aumento en la concentración hemolinfática previa a la ecdisis y la ganancia de agua en el momento de la ecdisis. En estudios realizados en *Cherax destructor*, se mostró la importancia de la glándula antenal y de las branquias en dichos procesos. Se determinó que durante el periodo ecdisial aumenta la cantidad de sodio reabsorbida desde la orina y además, se registra una “entrada” de agua importante, la cual resulta en una caída del 11% en las concentraciones de sodio y cloruro (Zare y Greenaway, 1997; 1998).

En cuanto a la relación entre el epitelio intestinal de los crustáceos y el movimiento de iones a través del mismo, se sabe que el hepatopáncreas expresa una variedad de transportadores (Ahearn *et al*, 1992) pero no es mucha la evidencia que involucra éste órgano con la osmoregulación de especies eurihalinas. En un trabajo realizado en *Callinectes sapidus* a fin de determinar el papel que juega el intestino en los procesos osmoregulatorios, se comprobó, a través de estudios de perfusión, que si bien existe un flujo neto de Na^+ a través de dicho órgano, el mismo no varía con la salinidad de aclimatación (Chu, 1987). Por lo tanto, la absorción activa de Na^+ a través del intestino tendría una importancia muy limitada en la hiperregulación de dicho ión, cuando el animal se expone a un medio de salinidad baja.

En la literatura sí abundan los estudios en hepatopáncreas de crustáceos mostrando su importante función en el secuestro y detoxificación de metales pesados. Se demostró mediante estudios de microscopía electrónica y rayos-X que en determinadas células del hepatopáncreas se acumulan iones Pb, Cu⁺⁺, Zn y Cd (Prosi y Dallinger, 1988a,b). En trabajos previos, se comprobó la presencia de ciertas proteínas específicas de transporte de iones asociadas a las membranas celulares apical y basolateral del epitelio en los tejidos nombrados, indicando la existencia de una polaridad, lo cual es condición necesaria para el transporte de iones a través de un epitelio (Ahearn y Franco, 1990; Ahearn *et al*, 1992, 1999).

Se sabe que en estadios larvales de algunas especies como *Penaeus aztecus* el revestimiento interno del branquiostegito posee células ionotransportadoras involucradas en mecanismos de osmoregulación. A través de estudios de microscopía electrónica realizados en *Callinassa jamaicense* se detectó tejido osmoregulador con similar ubicación. En el caso de *Penaeus japonicus*, el epitelio ionotransportador se desarrolla progresivamente en el revestimiento interno del branquiostegito desde el estadio de zoea 2-3 hasta estadios postlarvales tempranos. Sin embargo, este epitelio desaparece de esas localizaciones y es encontrado en epipoditos y branquias en juveniles y adultos. Estos estudios indican que en los decápodos, el revestimiento interno de las cámaras branquiales de las larvas osmoregula antes que ésta función se traslade a sitios ulteriores como las branquias y los epipoditos (para una reseña, ver Charmantier, 1998).

Recientemente, se han realizado algunos estudios en la langosta de mar, *Homarus gammarus*, a fin de investigar el papel del branquiostegito en el intercambio iónico cuando la especie se enfrenta a un medio ambiente hipo-osmótico con respecto a su medio interno. Aparentemente, en el estadio adulto de esta especie, el branquiostegito tiene mayor importancia en la regulación y mantenimiento del equilibrio iónico que las branquias posteriores (ver para una reseña, Charmantier, 1998; Charmantier *et al*, 2001).

Sin embargo, para la gran mayoría de los crustáceos eurihalinos, la literatura demuestra que la regulación del equilibrio iónico y osmótico del medio interno se hace principalmente a través de las branquias posteriores (para una reseña, ver Mantel y Farmer, 1983; Towle, 1990, Lucu, 1990, Péqueux, 1995). Y es en estas últimas dos estructuras de intercambio, donde el presente estudio hará su enfoque.

2. La Branquia como Órgano Regulador del Transporte Iónico.

2.1. Morfología General de las Branquias.

La branquia de los crustáceos decápodos es un complejo órgano que cumple funciones en el control iónico, el equilibrio ácido-base, la respiración y excreción y probablemente en el almacenamiento de material de desecho. Estas delicadas estructuras son órganos pares y se encuentran alojadas dentro de las cámaras branquiales. Ontogénicamente, los crustáceos decápodos poseen 10 pares de branquias aunque no siempre conservan en el estadio adulto a todos ellos. En algunas especies, como es el caso del cangrejo azul, *Callinectes sapidus*, son 8 los pares de branquias en el estadio adulto, siendo los dos primeros muy reducidos.

Como se dijo anteriormente, las branquias se encuentran alojadas dentro de las cámaras branquiales y cada una posee un eje central que sostiene a una serie de laminillas, las cuales se asemejan a sacos aplanados (Johnson, 1980). Cada laminilla branquial se conecta por su parte proximal a un canal aferente mientras que la parte distal lo hace a un canal eferente. En una sección longitudinal de la branquia, se observan los pares de laminillas a cada lado del eje central que se van acortando hacia la parte apical (ver figura 2).

Cada laminilla branquial está revestida externamente por una delgada cutícula cuyo grosor varía entre las diferentes branquias (depende si su función es respiratoria o ionoreguladora) y entre las especies. Por debajo de ésta cutícula existe un epitelio simple que tiene varios tipos de células: unas que son planas y se encargan del intercambio de gases respiratorios; otras que son altas, denominadas ionocitos, con función ionoreguladora y un tercer tipo, las células en pilar que mantienen la

integridad de la branquia frente a los cambios de presión de perfusión (Johnson, 1980; Taylor y Taylor, 1992).

Mientras la superficie apical del epitelio se encuentra separada del medio externo (es decir, el agua contenida en las cámaras branquiales) solamente por la cutícula, la superficie basal se encuentra en contacto directo con el espacio hemolinfático.

La circulación principal en la branquia se da a través de un sistema semi-cerrado. El flujo se dirige en forma apical a través del canal aferente y lateralmente, en la laminilla, a través de los canales marginales o semi-circulares incompletamente definidos, delimitados por células en pilar o trabéculas. La sangre retorna luego por el canal eferente en la base de las branquias (Johnson, 1980).

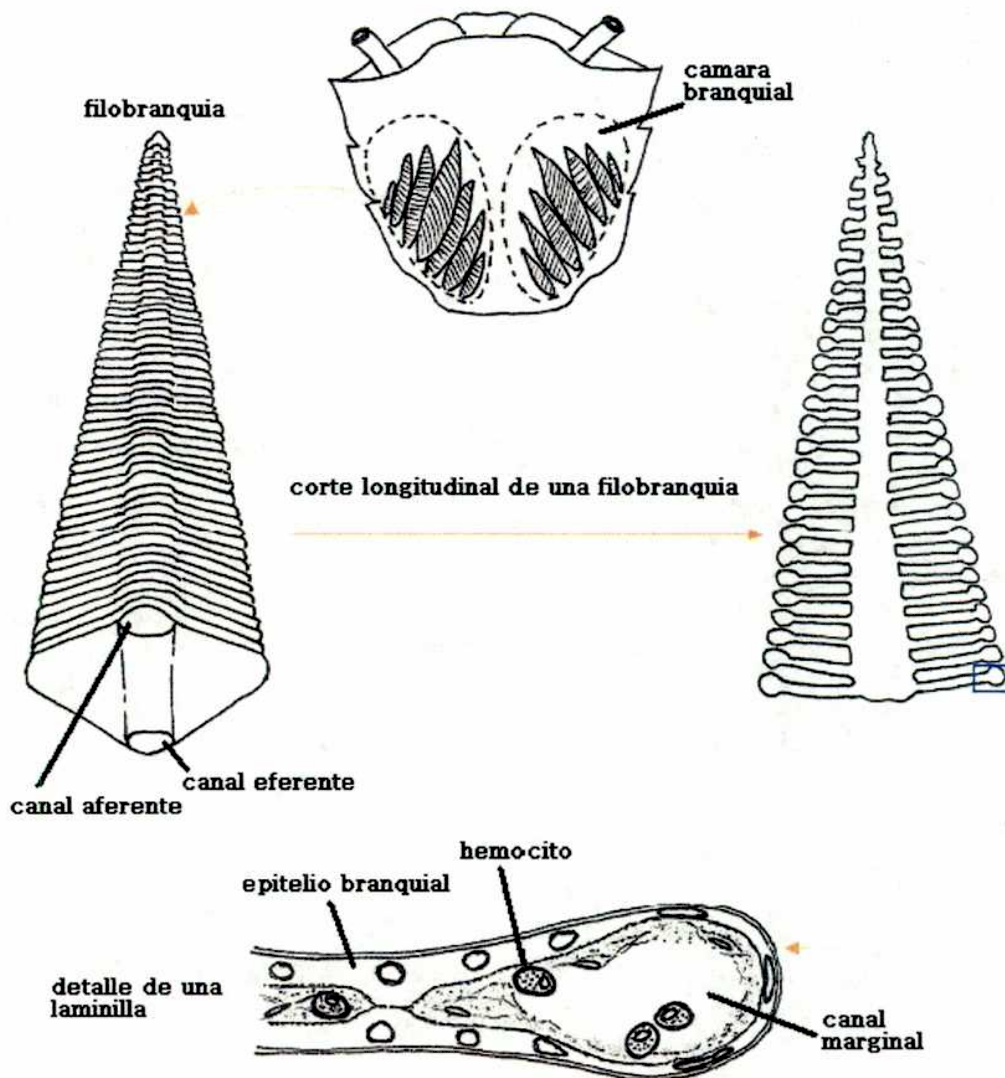


Figura 2: Esquema de una filobranquia de cangrejo. En la parte superior de la figura se pueden apreciar las cámaras branquiales conteniendo los diferentes pares de branquias. A la izquierda se observa el esquema de la branquia formada por las laminillas. A la derecha se esquematiza la vista de un corte histológico en sentido longitudinal a la branquia. Se pueden observar la laminillas conectadas a un eje central. La parte inferior de la figura esquematiza un detalle del extremo de la laminilla como se lo observa al microscópio óptico: el epitelio branquial que tapiza las laminillas cubierto por una delgada cutícula, espacios hemolinfáticos con hemocitos y el canal marginal.

2.2. Diferencias Morfológicas entre Branquias Anteriores y Posteriores.

Como se comentó en la sección anterior, en la mayoría de los crustáceos osmoreguladores las branquias cumplen un papel fundamental en los procesos de recuperación y mantenimiento del equilibrio iónico, además de su participación en el proceso de intercambio gaseoso. En la presente sección, se intentará explicar la estructura, desde el punto de vista morfológico y bioquímico, a través de la cual se realizan dichos mecanismos.

Con respecto a la histología de las branquias, en los braquiuros en general, se observa una notable diferencia entre las branquias anteriores y las branquias posteriores. En relación al epitelio que tapiza las laminillas, se puede apreciar que la altura del mismo depende de la localización. Las laminillas de las branquias anteriores están tapizadas por un epitelio plano en el cual, si bien se encuentran células en pilar, predominan las células aplanadas, con escasas organelas y pocos repliegues de la membrana basolateral. Estas células cumplen funciones de intercambio gaseoso.

Las laminillas de las branquias posteriores tienen un epitelio más alto, con predominancia de células columnares, las cuales presentan abundantes interdigitaciones de membrana basolateral asociadas a gran cantidad de mitocondrias asociadas a dichos pliegues y también repliegues de la membrana apical que determinan importantes espacios subcuticulares (Copeland, 1968; Copeland y Fitzjarrell; 1968; Barra *et al*, 1983; Martelo y Zanders, 1986; Towle y Kays, 1986; Compère *et al*, 1989; Luquet *et al*, 1997, 2002a). A estas células también se las conoce

como *ionocitos*. En general se observa que el epitelio de absorción de sales se encuentra cerca del canal aferente y se hace mas prominente cuando el animal está aclimatado a baja salinidad (Neufeld, 1980). En el cangrejo eurihalino e hiper-regulador, *Eriocheir sinensis*, el epitelio transportador de sales se encuentra esencialmente restringido en los tres últimos pares de branquias (Barra *et al*, 1983) lo mismo que en *Chasmagnathus granulatus* (Luquet *et al*, 2000; Genovese *et al* 2000a).

Estas extensivas elaboraciones de membrana en forma de criptas, túbulos e interdigitaciones orientadas hacia el espacio extracelular y en estrecha asociación con mitocondrias son comunes en los epitelios con función de transporte de sales. Además de estar presente en las branquias de crustáceos osmoreguladores, también se encuentran en branquias de peces (Evans *et al*, 1982), en los túbulos de Malpighi, recto y papila anal de larvas de insectos (Garrett y Bradley, 1984), en glándula rectal de peces cartilaginosos (Lagios y Stasko-Concannon, 1979, Valentich *et al*, 1996) y glándula de la sal de aves (Merchant *et al*, 1985; Lowy *et al*, 1985).

2.3. Diferencias Bioquímicas entre Branquias Anteriores y Posteriores.

Las diferencias entre branquias anteriores y posteriores no se limitan al plano estructural. Desde el punto de vista bioquímico, las branquias posteriores presentan una serie de proteínas de membrana, entre las que se cuentan: enzimas, canales y transportadores de iones. Dichas proteínas se encuentran tanto en el dominio apical y el basolateral e intervienen en el transporte de iones a través de la membrana

plasmática del epitelio cuando el animal sufre algún tipo de stress osmótico (shock hipo o hipertónico). Las branquias anteriores expresan información para las mismas proteínas pero en mucha menor proporción

No hay un modelo único que explique los mecanismos de transporte iónico para todas las especies osmoreguladoras. Al día de hoy, se han elaborado varios modelos tentativos que explican los mecanismos involucrados principalmente para condiciones ambientales en las que los individuos hiperregulan. Se sabe que existen divergencias entre las distintas especies y que esto se encuentra relacionado con el medio en que las mismas habitan y con el tipo de estrés osmótico al que se ven expuestas periódicamente. En todos los casos, parece haber consenso en los transportadores ubicados en la membrana basolateral del epitelio branquial que intervienen en los mecanismos de intercambio: la enzima de membrana, Na^+ , K^+ -ATPasa, canales de Cl^- y canales de K^+ .

Para el dominio apical, a través del cual ingresan los iones Na^+ y Cl^- desde el medio externo a la célula, surgen divergencias entre las distintas especies. El modelo propuesto para *Carcinus maenas* (estuarial) muestra que la absorción electrogénica de Cl^- está acoplada a la de Na^+ y dicho transporte se produce a través de el co-transportador apical $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ y está energizado por la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral (Riestenpatt *et al*, 1996; Onken y Riestenpatt, 1998). Este modelo se completa con canales de K^+ apicales y de K^+ y Cl^- basolaterales.

Para los crustáceos eurihalinos que alcanzan el agua dulce como *Eriocheir sinensis*, la absorción de Na^+ es independiente de la de Cl^- y se produce a través de canales apicales de Na^+ (Onken y Riestenpatt, 1998) a

favor de un gradiente creado por la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral. El pasaje de Cl^- a través del epitelio se da a través de un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical y de canales de Cl^- basolaterales y este transporte está energizado por una V-H^+ -ATPasa apical (Onken y Putzenlechner, 1995; Weihrauch *et al*, 2001). Esta ATPasa apical bombea H^+ desde el citoplasma al medio externo mientras que la enzima anhidrasa carbónica citoplasmática cataliza la formación de iones H^+ y HCO_3^- . Estos últimos se intercambian por iones Cl^- a través del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

2.3.1. La Enzima Na^+ , K^+ -ATPasa.

En un trabajo publicado en el año 1957, Jens C. Skou describió por primera vez la relación directa entre el transporte de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática y la actividad de la adenosintrifosfatasa activada por Na^+ y K^+ o Na^+ , K^+ -ATPasa. Se trata de una enzima de membrana altamente conservada desde el punto de vista evolutivo, cuyo función esencial es el de mantener un gradiente de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. Más específicamente, manteniendo una baja concentración de Na^+ y alta de K^+ en el medio intracelular lo cual es crucial para la preservación del potencial de membrana. Cuando esta enzima se activa, intercambia 3 iones Na^+ citoplasmáticos por 2 iones K^+ extracelulares por cada molécula de ATP citosólico que hidroliza (para una reseña, ver Ewart y Klip, 1995; Therien y Blostein, 2000).

La presencia de la enzima de membrana Na^+ , K^+ -ATPasa en las branquias de crustáceos decápodos ha sido extensamente documentada en los últimos años. En un reporte de Towle y Kays (1986) se demostró

mediante localización ultracitoquímica la ubicación preferencial de la enzima sobre la cara citoplasmática de la membrana basolateral más que sobre la membrana apical del epitelio, tanto para branquias posteriores de *Eriocheir sinensis* como *Carcinus maenas*. Estos resultados se condicen con la alta densidad de repliegues basolaterales de membrana en estrecha asociación con mitocondrias. Además de la evidencia ultraestructural, se realizaron gran cantidad de trabajos de electrofisiología en preparaciones de branquias aisladas perfundidas y en hemi-laminillas branquiales montadas en Cámaras de Ussing (Schwarz y Graszynsky, 1989), en los cuales se midieron diferencias de potencial eléctrico transepiteliales, corrientes de corto-circuito y/o flujo de iones utilizando trazadores que confirmaron la importancia de esta enzima entre otros varios transportadores y canales. En muchos de estos trabajos se aplicó ouabaína (inhibidor específico de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa) sobre el lado basal del epitelio lo que fue seguido de una inhibición del flujo de Na^+ (Siebers *et al*, 1985; Péqueux y Gilles, 1988; Gilles *et al*, 1988; Pierrot *et al*, 1995; Riestenpatt *et al*, 1996; Luquet *et al*, 2002b; Onken *et al*, 2003). Estas contribuciones sumaron más evidencias que confirman la ubicación de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en la membrana basolateral del epitelio de branquias posteriores, y cuya actividad aumenta a medida que disminuye la salinidad (para una reseña del tema, ver Towle, 1990, Lucu, 1990; Péqueux, 1995).

En los crustáceos hiper-reguladores, la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial aumenta proporcionalmente al número de “células de cloruro” o “células ricas en mitocondrias” a medida que disminuye la salinidad del medio ambiente (Neufeld *et al*, 1980). Esta activación es un

requerimiento imprescindible puesto que genera la fuerza motriz necesaria para regular la actividad de otros transportadores que intervienen en la regulación iónica como el Na^+/H^+ (Towle *et al*, 1997) y el co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (Riestempatt *et al*, 1996) ubicados en la membrana apical, así como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana basolateral (Flik *et al*, 1994). Por otra parte, esta enzima también resulta fundamental en los procesos de excreción de amonio hemolinfático (NH_4^+) a través del epitelio branquial de *Carcinus maenas* (Weihrauch *et al*, 2002).

Por otra parte, en crustáceos osmoconformadores marinos como *Calappa hepatica* (Spencer *et al*, 1979), *Cancer pagurus* y *Nephrops norvegicus* (Harris y Bayliss, 1988) la hemolinfa es iso-osmótica con el agua de mar circundante y la actividad específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial se encuentra en los límites de detección. En un reciente estudio realizado sobre algunos crustáceos estenohalinos marinos como *Maja crispata* y *Dromia personata* y en la langosta osmoconformadora, *Palinurus elephas*, se muestra que los mismos no modifican la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa cuando se exponen a un medio diluido (Lucu *et al*, 2000). De acuerdo a esto, la actividad específica de la enzima en crustáceos marinos es menor que en aquellos de aguas salobres y dulces y el gradiente de sodio establecido entre la hemolinfa y el medio están en una correlación positiva con la Na^+ , K^+ -ATPasa branquial (Harris y Bayliss, 1988; Lucu *et al*, 2000).

2.3.2. La Enzima Anhidrasa Carbónica.

La enzima anhidrasa carbónica (CA) cataliza la reacción reversible de hidratación/deshidratación del CO₂ acelerando el equilibrio entre las especies químicas involucradas en la reacción.



Esta enzima se encuentra asociada a tejidos y órganos con función de excreción de CO₂ como músculos, glóbulos rojos y órganos de intercambio gaseoso como pulmones y branquias (Henry y Swenson, 2000).

En el caso particular de los crustáceos, se determinó que la CA se encuentra principalmente concentrada en las branquias (Henry y Cameron, 1982). Trabajos tempranos que se hicieron estudiando la actividad de esta enzima en crustáceos, apuntaron a dilucidar su papel en el mecanismo de excreción de CO₂ a través de las branquias. La CA respiratoria se encontró asociada a la superficie luminal de la membrana basal catalizando la deshidratación del bicarbonato hemolinfático a CO₂ el cual difunde fácilmente a través de la célula. Estos resultados confirmaron que la CA asociada a membrana plasmática jugaba un papel fundamental en el flujo de salida del CO₂ desde la hemolinfa hacia el medio ambiente (Burnett y McMahon, 1985; Henry, 1987).

Posteriormente, se estudió el papel fisiológico de la CA, no solo en relación a los mecanismos de intercambio de gases respiratorios sino también a los de regulación iónica, que se producen en las branquias de cangrejos eurihalinos. En un trabajo realizado en branquias de *Callinectes sapidus* (Henry, 1988a), se determinó mediante centrifugación diferencial y gradientes de densidad, que la CA se encuentra representada tanto en la

fracción de membrana como en la fracción citoplasmática. La AC de membrana se encuentra uniformemente distribuida entre branquias anteriores y posteriores y su función más importante sería facilitar la excreción de CO_2 . La presencia de CA citoplasmática es más importante en las posteriores y además es sensible a los cambios de salinidad, particularmente cuando el medio se torna hipo-osmótico. En estas condiciones se registró un aumento significativo en la actividad de esta enzima. Resultados similares se vieron en un reciente estudio realizado en *Carcinus maenas* (Henry *et al*, 2002). El aumento significativo en la actividad de la CA citoplasmática se debe a que esta enzima se encuentra indirectamente involucrada en los procesos de transporte iónico consecuentes a los cambios de salinidad. La CA citoplasmática cataliza la reacción en sentido inverso a la CA respiratoria, es decir, genera H^+ y HCO_3^- que sirven luego como contra-iones para los intercambiadores apicales Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

Estudios fisiológicos realizados con un inhibidor específico de CA (acetazolamida) mostraron que este compuesto afectaba directamente el flujo de Na^+ y Cl^- , inhabilitando al animal de mantener en niveles normales su concentración hemolinfática osmótica e iónica (ver para una reseña, Henry, 1988b; Henry, 2001).

3. El Branquiostegito como Órgano de Transporte Iónico.

3.1. Morfología General del Branquiostegito.

El branquiostegito es una proyección lateral de la pared del cuerpo que encierra dos cavidades denominadas cámaras branquiales, las cuales alojan a las branquias. Esta estructura se encuentra delimitada por dos cutículas: una externa, gruesa y calcificada que forma parte del caparazón visible del animal y una interna, mucho más delgada orientada hacia el interior de las cámaras branquiales. Por debajo de esta cutícula delgada existe un epitelio simple y en cangrejos terrestres o bimodales es muy delgado y cumple funciones respiratorias. Entre los epitelios que subyacen a ambas cutículas (externa e interna) existe un tejido conectivo esponjoso surcado de vasos y lagunas hemolinfáticas. En dicho tejido, existen diferentes tipos celulares como células pigmentarias o cromatóforos, células de reserva y hemocitos (Taylor y Greenaway, 1979, Halperin *et al*, 2000).

3.2. Branquiostegito como Órgano de Intercambio Gaseoso.

Los crustáceos que viven la mayor parte de su vida adulta fuera del agua están adaptados para respirar en un medio que difiere profundamente del acuático. Estas especies desarrollaron una serie de estrategias que les permiten realizar un intercambio de gases eficiente directamente con el medio aéreo. Estas adaptaciones incluyen una tendencia a la reducción de la superficie de las branquias y un incremento de la superficie del revestimiento interno del branquiostegito, acompañado de una disminución del espesor del tegumento (epitelio + cutícula) que facilita la difusión de

gases respiratorios. En general, en las especies más terrestres, las cámaras branquiales contienen muy poca agua restringida a las branquias, las que mantienen sólo sus funciones ionoreguladoras y excretoras, con lo cual el revestimiento interno del branquiostegito está en contacto directo con el aire (Henry, 1994) y es a través del tegumento que se realiza el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. Por ejemplo, en el caso del anomuro *Birgus latro*, las branquias son estructuras rígidas que se ubican en la parte inferior de la cámara branquial y tienen función en la regulación iónica (Cameron, 1981; Greenaway *et al*, 1988). En la parte superior de la cámara branquial, esta especie ha desarrollado un pulmón evaginado a partir de expansiones laterales del branquiostegito acompañadas de una amplificación del revestimiento interno del mismo por medio de arborizaciones lobuladas (Taylor y Taylor, 1992).

El cangrejo soldado, *Mictyris longicarpus*, constituye un ejemplo de pulmón invaginado donde el revestimiento interno del branquiostegito tiene numerosas aperturas de diámetro variable que comunican a canales de aire perpendiculares que se ramifican pero no se conectan entre sí (Farrelly y Greenaway, 1987; Maitland, 1987). Otras especies terrestres como *Gecarcinus lateralis*, *Cardisoma guanhumi* (Díaz y Rodríguez, 1977) *Cardisoma hirtipes*, *Gecarcoidea natalis* (Farrelly y Greenaway, 1993), *Holthuisana transversa* (Greenaway y Taylor, 1976; Taylor y Greenaway, 1979) y *Heloecius cordiformis* (Maitland 1990), poseen pulmones lisos o “cutáneos”, muy vascularizados, que carecen de elaboraciones complejas de su superficie. Sin embargo, estas especies aumentan la superficie de intercambio de gases respiratorios expandiendo el volumen de sus cámaras branquiales (Díaz y Rodríguez, 1977).

Dentro de los respiradores aéreos, existe un grupo de especies anfibias, llamadas bimodales, las cuales presentan una serie de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y comportamentales que les permiten realizar un intercambio respiratorio eficiente tanto en agua como en aire, motivo por el cual se las ubica en un grupo diferente de aquellas especies totalmente acuáticas o totalmente terrestres (Henry, 1994). El revestimiento interior del branquiostegito de los cangrejos bimodales presenta una reducción en el espesor de la barrera de difusión (cutícula + epitelio) acompañado de una importante irrigación del tejido subyacente (vasos y senos hemolinfáticos). De esta manera se logra reducir la distancia de difusión de los gases respiratorios y asegurar la perfusión del tejido. Sin embargo, los crustáceos bimodales, tienen compartimentalizado el intercambio de gases respiratorios. Cuando el animal se encuentra expuesto al aire, la captación de oxígeno ocurre preferentemente en el revestimiento interior del branquiostegito y la excreción de dióxido de carbono en las branquias ya que las mismas poseen abundante AC de membrana, mientras que solo en los cangrejos terrestres esta enzima es abundante en el branquiostegito. Para cumplir esta función, es necesario que las branquias se encuentren en contacto con agua bien ventilada. Esto se puede lograr de dos formas distintas: la primera consiste en retener y recircular un volumen importante de agua a través de las cámaras branquiales, cuando el animal se encuentra expuesto al aire (Hawkins y Jones, 1982; Felgenhauer y Abele, 1983; Burnett y McMahon, 1987; Santos *et al*, 1987; Maitland, 1990); la segunda consiste en guardar un volumen pequeño de agua dentro de las cámaras branquiales, el cual es ventilado por el pasaje de aire a través de dichas cámaras.

3.3. Branquiostegito como Órgano de Intercambio Iónico.

Hasta hace muy pocos años, prevaleció la idea de que el revestimiento interno del branquiostegito no cumplía ninguna función de intercambio en especies acuáticas, mientras que, en especies terrestres y bimodales cumplía funciones de intercambio de gases respiratorios, ya sea, intercambiando O₂ y CO₂ en las primeras o solamente captando de O₂ en las últimas. Sin embargo, en un riguroso estudio de microscopía electrónica de transmisión y de barrido utilizando una técnica de coloración específica para localizar células “ricas en mitocondrias” se demostró la presencia de un epitelio de transporte de sales en epipoditos y branquiostegito de la langosta *Homarus gammarus* (Haond *et al*, 1998). En agua de mar, el epitelio que reviste el lado interno del branquiostegito tiene aproximadamente 10 µm de altura y presenta gran cantidad de mitocondrias en forma de bastones orientadas perpendicularmente a la superficie del epitelio y asociadas con profundos repliegues de membrana plasmática basolateral. La superficie apical del epitelio presenta numerosas microvellosidades y microvesículas del lado citoplasmático. Por otra parte, todas las branquias de *H. gammarus* presentan un epitelio similar, de no mas de 2 µm de altura, con pocos repliegues de membrana basolateral y pocas microvellosidades y vesículas apicales, similar a los epitelios respiratorios ya descriptos para cangrejos osmoreguladores como *Callinectes sapidus* (Copeland y Fitzjarrell, 1968), *Eriocheir sinensis* (Barra *et al*, 1983), *Carcinus maenas* (Compère *et al*, 1989) y *Chasmagnathus granulatus* (Genovese, 2000a). En otro estudio en el cual se comparaba actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa entre branquias (pleurobranquias, artrobranquias y podobranquias) y epipoditos de *H.*

gammarus aclimatados a baja salinidad (20‰), se determinó que eran los epipoditos los que mostraban un aumento significativo de la actividad específica tanto en los homogenatos como en las vesículas de membrana (Lucu y Devesconi, 1999).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía electrónica con precipitación de partículas de oro contra la subunidad α de la Na^+ , K^+ -ATPasa, se determinó la presencia de ésta enzima asociada a un sistema de repliegues de la membrana basolateral de los ionocitos del branquiostegito y no a las branquias de *H. gammarus* cuando la especie es mantenida en un medio diluido (Lignot *et al*, 1999). Recientemente, se determinó que a partir de la metamorfosis, el revestimiento interno del branquiostegito cobra una importancia mayor como sitio de localización de la Na^+ , K^+ -ATPasa cuando la especie es aclimatada en un medio diluido (Lignot y Charmantier, 2001)

Cuando esta especie se enfrenta a agua de mar diluida, las branquias no presentan cambios ultraestructurales significativos. Sin embargo, en estas condiciones, el epitelio que reviste el lado interno del branquiostegito presenta importantes cambios morfológicos y ultraestructurales: aumenta su altura a 20-40 μm , así como la densidad de microvellosidades y vesículas apicales y también la cantidad de mitocondrias y repliegues de membrana basolateral. En un trabajo de Flik y Haond (2000) realizado en homogenatos crudos y preparaciones de vesículas de membrana en *H. gammarus*, se describió la presencia significativa de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en el epitelio que recubre internamente al branquiostegito. En agua de mar, las cantidades presentes en branquias y epipoditos suman un 80% del total de enzima Na^+ , K^+ -

ATPasa total (aproximadamente 40% cada tejido) y el branquiostegito un 20%. En agua de mar diluida, el porcentaje de actividad asociado al branquiostegito se incrementa hasta un 35% del total de enzima Na^+ , K^+ -ATPasa mientras que las branquias sólo representan el 25% de la actividad total.

En las branquias de crustáceos hiper-osmoreguladores, además de la Na^+ , K^+ -ATPasa, la anhidrasa carbónica (CA) también es una enzima clave relacionada con la adaptación a un medio diluido (Henry, 2001). En un estudio realizado en branquias, epipoditos y branquiostegito de *H. gammarus*, se determinó la actividad específica de CA citosólica y de membrana en animales aclimatados a agua de mar y animales aclimatados a un medio diluido. Luego de la transferencia de agua de mar a un medio diluido, la actividad de CA de membrana aumenta casi 6 veces tanto en epipoditos como en branquiostegito. En el caso de la CA citosólica, la misma aumenta 8 veces en epipoditos y casi 7 veces en branquiostegito. Para las mediciones realizadas en branquias bajo las mismas condiciones, no se registraron cambios significativos en la actividad enzimática de la misma magnitud a los medidos en epipoditos y branquiostegito (Pavičić-Hamer *et al*, 2003). Esto muestra una relación directa entre la CA y los mecanismos de transporte iónico que se producen en los epipoditos y en el branquiostegito cuando estas langostas son aclimatadas a un medio de baja salinidad.

Todos estos novedosos resultados indican claramente que en el estadio adulto de la langosta *Homarus gammarus*, las branquias cumplen funciones de intercambio gaseoso mientras que el branquiostegito y los epipoditos recubiertos por un epitelio de transporte altamente

especializado, tienen una importancia vital en los procesos de hiperregulación en medio diluido, en una analogía con las branquias posteriores de cangrejos hiperreguladores en las mismas condiciones de salinidad (Copeland y Fitzjarrell, 1968; Barra *et al*, 1983; Compère *et al*, 1989; para una reseña, ver Charmantier *et al*, 2001). Sería interesante determinar la posible participación del branquiestegito en los mecanismos de transporte iónico de cangrejos hiperreguladores, ya que en la literatura no abundan los estudios de este tipo.

4. Regulación Hormonal de las Funciones de Intercambio Iónico.

4.1. Algunos Conceptos de Regulación Hormonal.

La regulación química de los procesos celulares se encuentra tanto en las especies de plantas y animales más primitivos como en los organismos más complejos. Se puede decir que la regulación de dichos procesos está gatillada por la unión de una hormona a su receptor celular, sea éste de membrana (si la hormona es lipofóbica) o intracelular (si es lipofílica). Se denomina *hormona* a toda sustancia que ante un estímulo externo o interno, es liberada al espacio extracelular y al unirse específicamente a su receptor, dispara una cascada enzimática (hormona peptídica) o modula la transcripción de genes (hormonas esteroideas) dentro de la célula blanco, lo que a su vez modula el metabolismo y la fisiología de dicha célula. Las hormonas actúan en muy bajas concentraciones. La alta afinidad y especificidad de los receptores y la cascada enzimática hacen que el efecto de la hormona se amplifique enormemente, de manera tal que unas pocas moléculas de hormona, puedan influir en miles o millones de reacciones moleculares (Eckert *et al*, 1990).

En esta cadena de propagación de señales, la hormona cumple la función de *primer mensajero*. En el caso de las hormonas peptídicas, una vez unida a su receptor, la cascada enzimática se continúa intracelularmente a través de la acción de un *segundo mensajero*. Las vías de segundos mensajeros más estudiadas son la vía del nucleótido cíclico, cAMP, la vía del inositol trifosfato, IP₃, y la vía de Ca⁺⁺/calmodulina.

4.2. Vía del cAMP como Segundo Mensajero.

La figura 3 esquematiza la activación de la cascada enzimática que se inicia con la unión específica hormona/receptor de membrana. El *receptor* es una proteína transmembrana que, al momento de la unión a la hormona, sufre un cambio conformacional que, en muchos casos, lleva a la activación de una molécula transductora de la señal, denominada *proteína G*. Esta proteína se encuentra en contacto con la porción del receptor que protruye hacia el interior de la célula. Se trata de un trímero con un componente α (α) que es la porción o dominio activador, un componente β (β) y otro γ (γ) que unen la proteína G al lado interno de la membrana plasmática celular adyacente al receptor. La proteína G permanece activada mientras persiste su unión con una molécula de guanosina tri-fosfato (GTP) y se desactiva cuando el GTP es hidrolizado a guanosina difosfato (GDP). Un importante aspecto a tener en cuenta de este mecanismo, es que existen diferentes clases de proteínas transductoras de la señal como las G_s que estimulan la enzima adenilato ciclasa y las G_i que la inhiben. Es claro que estas dos proteínas se activan a través de diferentes primeros mensajeros extracelulares, es decir, que los receptores asociados a cada una de ellas, unen específicamente a agonistas distintos. Por lo tanto, la adenilato ciclasa será activada por un receptor que interactúe con una proteína G_s o inhibida por otro receptor que interactúe con una proteína G_i .

La proteína G_s o G_i activada modula la actividad de la enzima de membrana, *adenilato ciclasa*. Esta enzima se encuentra unida a la cara citosólica de la membrana plasmática y una vez activada, cataliza la formación de adenosín 3', 5'- monofosfato cíclico, *cAMP*, a partir de la

hidrólisis del sustrato ATP. Cada unidad enzimática activada cataliza la formación de muchas moléculas de cAMP (primera etapa de la amplificación de la señal). El cAMP actúa sobre un efector interno, en general *proteínas quinasas cAMP-dependientes (proteínas quinasas-A)*, produciendo la segunda etapa de amplificación. La concentración intracelular de cAMP va a depender no solo de la velocidad de síntesis de la adenilato ciclasa sino también, de la velocidad a la que es inactivado por degradación a adenosina 5'-monofosfato (AMP), reacción catalizada por la enzima *fosfodiesterasa*.

Las proteínas quinasas-A usan moléculas de ATP como fuente de grupos fosfato de alta energía para fosforilar otras proteínas celulares, entre las cuales se cuentan: canales de membrana, ATPasas, fosforilasas-quinasa, etc. La clave para determinar la diversidad de efectos que potencialmente desencadena el cAMP reside en la diversidad de proteínas efectoras que pueden ser fosforiladas directamente o a través de proteínas quinasas cAMP-dependientes (Eckert *et al*, 1990; Guyton y Hall, 1996).

En resumen, la modulación de la adenilato ciclasa altera los niveles intracelulares de cAMP, lo cual, dependiendo del tejido blanco y del agonista actuante, puede llevar a la activación o inhibición de proteínas quinasas y/o fosfatasas.

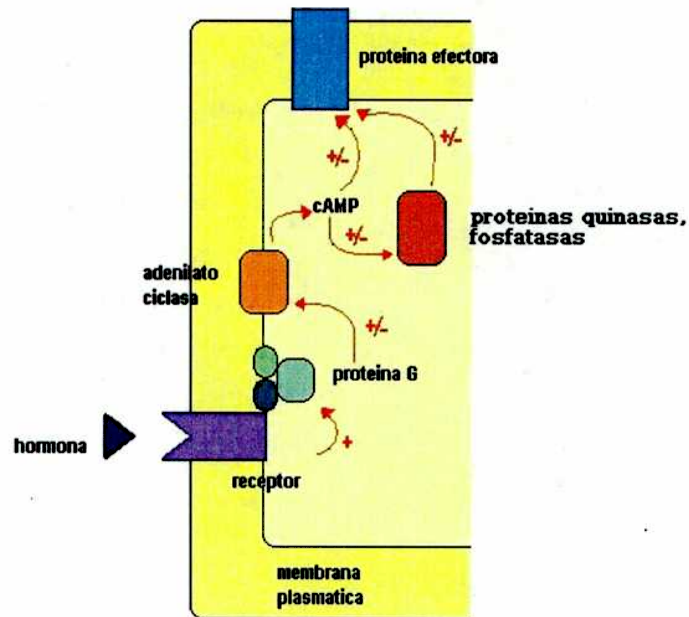


Figura 3: Esquema de la vía de señalización que sigue a la unión de la hormona a un receptor de membrana. El receptor interactúa con una proteína G y si la misma es del tipo inductor de la enzima adenilato ciclasa, se produce un aumento la producción del nucleótido cíclico cAMP (primer etapa de amplificación). Esta molécula tiene la capacidad de fosforilar otras proteínas quinasas (que también adquieren capacidad fosforiladora) u otras proteínas efectoras como por ejemplo, transportadores de membrana (segunda etapa de amplificación). Si en cambio, la interacción del receptor es con una proteína G inhibidora de la adenilato ciclasa, se inhibe entonces la vía de señalización recién mencionada.

4.3. Modelo de Regulación Iónica en Vertebrados: Regulación de la Actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa.

Durante estos últimos años, el estudio de la regulación iónica en epitelios de transporte como el renal o el intestinal ha capturado la atención de muchos investigadores. En particular la regulación de la actividad de la enzima activada por Na^+ y K^+ adenosín-trifosfatasa (Na^+ , K^+ -ATPasa o bomba Na^+ - K^+) (Skou, 1957), la cual cataliza la hidrólisis del ATP y utiliza la energía derivada de este proceso para contra-transportar Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. El gradiente electroquímico generado a partir de la captación de K^+ y extrusión de Na^+ es esencial para el movimiento secundario de otros iones y nutrientes. Se dice que la Na^+ , K^+ -ATPasa es la fuerza motriz en el transporte vectorial del epitelio (Bertorello y Katz, 1995).

La actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa está regulada por una variedad de hormonas (catecolaminas, hormonas peptídicas y hormonas esteroideas) y dicha regulación puede ocurrir a dos niveles: por un lado, existe una regulación a *largo plazo* que involucra síntesis *de novo* de la enzima. Este caso se da en general, cuando el primer mensajero es una hormona esteroidea, en particular, corticoesteroides, que aumentan la expresión de los genes que codifican para las subunidades α y β de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa.

Por otro lado, también existe una regulación a *corto plazo* que involucra efectos directos en la cinética enzimática y translocación de unidades enzimáticas entre compartimentos intracelulares de almacenamiento y la membrana plasmática. Este tipo de mecanismos se ha

estudiado extensivamente en el caso de ciertas catecolaminas como primeros mensajeros, típicamente adrenalina y dopamina.

La dopamina (DA), además de su función de neurotransmisor, es un factor natriurético sintetizado en los túbulos proximales renales y actúa tanto de manera parácrina como autócrina. La DA inhibe la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en el túbulo contorneado proximal, rama gruesa ascendente del asa de Henle y túbulo colector cortical, así como en cultivo de células Madin-Darby (MDCK), neuronas, arterias, células retinales, músculo liso aórtico, intestino delgado y pulmón (para una reseña, ver Therien y Blostein, 2000). El consenso global es que es un *inhibidor específico de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa* lo cual representa un importante mecanismo fisiológico para la regulación de la reabsorción de sales. En el túbulo contorneado proximal, el efecto inhibitorio de la DA sobre la Na^+ , K^+ -ATPasa no involucra una fosforilación PKA dependiente sino que es mediado primariamente por PKC pero también requiere la activación de la enzima fosfolipasa A_2 y la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico (para una reseña, ver Féraille y Doucet, 2001).

El mecanismo por el cual la DA induce una disminución en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa fue estudiado en suspensiones de células del túbulo contorneado proximal. Se determinó que la DA induce una redistribución de las unidades de la Na^+ , K^+ -ATPasa desde la membrana basolateral hacia compartimentos intracelulares (vesículas revestidas de clatrina, endosomas tempranos y endosomas tardíos) (Féraille y Doucet, 2001). Chibalin *et al* (1997 y 1999) determinaron que la DA produce la endocitosis dependiente de clatrina de las unidades de Na^+ , K^+ -ATPasa y

que este proceso es mediado por una fosforilación PKC-dependiente de la subunidad α .

En el riñón, la inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa puede involucrar una vía PKC-dependiente o una vía asociada a PKA (la subunidad α tiene sitios de fosforilación para PKC y PKA). La primera podría involucrar inhibición a corto término mientras que la segunda, tendría un papel en la inhibición a largo plazo (para una reseña, ver Therien y Blostein, 2000, Féraille y Doucet, 2001).

Si bien se determinó que la acción de diversos efectores de la vía de la PKA (como PKA purificada, forskolina, teofilina, IBMX y cAMP o sus análogos) disminuyen la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa en la rama gruesa ascendente o en células de la corteza renal de ratas, son capaces de aumentarla en células de la glándula rectal de tiburón o de no modificar su actividad en el caso del riñón de cerdo. Lo mismo puede decirse de los efectores relacionados con la vía de la PKC (glicerol, forbole, PKC purificada): mientras que su acción inhibe la Na^+ , K^+ -ATPasa en corteza renal de rata, la estimula en glándula rectal de tiburón (para una reseña, ver Therien y Blostein, 2000; Féraille y Doucet, 2001). Pareciera ser que, si bien hay un consenso general sobre el tipo de efecto que tienen las vías de señalización cAMP/PKA ó IP_3 /PKC sobre la actividad la Na^+ , K^+ -ATPasa, el mismo puede variar según el tejido y la especie en estudio.

4.4. Órgano Pericárdico, Dopamina y Regulación Hormonal de las Funciones de Intercambio Iónico en Branquias de Crustáceos.

4.4.1. Aminas Biogénicas y sus Efectos en Crustáceos.

Las aminas biogénicas funcionan principalmente como neurotransmisores y neuromoduladores en crustáceos. Los neurotransmisores transfieren información desde una neurona a través de una sinapsis, produciendo la excitación o la inhibición de la neurona post-sináptica. Mientras que los neuromoduladores son liberados desde una neurona a la circulación general para amplificar la actividad en el tejido blanco. La actividad de un neuromodulador es generalmente, mas lenta y su efecto mas duradero, que los causados por un neurotransmisor.

En un trabajo realizado por Fingerman y colaboradores (1994) se hace una detallada reseña de importantes reportes sobre aminas biogénicas, su localización y su función en el metabolismo de diversos grupos de crustáceos. Diferentes trabajos muestran, haciendo uso de variadas técnicas (HPLC, RIA, microscopía de fluorescencia, inmunohistoquímica, etc), la presencia de serotonina (5-HT), dopamina (DA), octopamina (OA), histamina (HA), noradrenalina (NE), adrenalina (EPI), triptamina y tiramina en crustáceos y cómo las mismas afectan a diversos procesos metabólicos. Por ejemplo, los procesos relacionados con la muda se encuentran regulados por la hormona inhibidora de la muda (MIH) la cual se sintetiza en los pedúnculos oculares, y por el esteroide promotor de la muda, la ecdisona, que se sintetiza en el órgano Y. A su vez, se comprobó que para ciertas especies como *Cancer antennarius*, la

liberación de MIH se encuentra regulada positivamente por la 5-HT, mientras que otras aminas biogénicas como la DA, OA o la NE no la afectan significativamente (Mattson y Spaziani, 1985; Rudolph y Spaziani, 1991, Fingerman *et al*, 1994). En el caso de los procesos relacionados con la reproducción, se vio que para *Uca pugilator* y *Procambarus clarkii*, la 5-HT pero no la DA ni la OA, tiene un efecto positivo en el desarrollo del ovario, posiblemente por inducción en la liberación de la hormona gonado-estimulante (GSH) (Richardson *et al*, 1991; Kulkarni *et al*, 1992; Kulkarni and Fingerman, 1992). También se observó que la OA y la 5-HT pero no la DA, inhiben la síntesis de metil farnesoato (MF), hormona secretada por el órgano mandibular y relacionada con la reproducción en hembras (para una reseña, ver Fingerman *et al*, 1994).

Otro ejemplo es el movimiento de pigmentos de los cromatóforos y los pigmentos retinales los cuales también se encuentran hormonalmente regulados. Los pigmentos de los cromatóforos se encuentran en el integumento y son los responsables de los cambios de coloración mientras que los retinales, regulan la cantidad de luz que afecta a un rabadoma fotosensible. Se determinó que la 5-HT provoca dispersión de pigmentos en una gran variedad de crustáceos, ya que actúa como neurotransmisor estimulando la liberación de la hormona dispersante de pigmento rojo (RPDH). Por el contrario, la DA induce la concentración de pigmento rojo y en algunas especies la de pigmento negro, presumiblemente estimulando la liberación de la hormona concentradora de pigmento negro. La HA y la OA inhiben la liberación de la hormona dispersante de pigmento negro (BPDH) cuando *Uca pugilator* es transferido desde un fondo blanco a uno

oscuro, pero no afectan a la dinámica de dispersión del pigmento rojo (para una reseña, ver Fingerman *et al*, 1994; 1997).

En un trabajo realizado por Kulkarni y Fingerman (1986) en *Uca pugilator* se comprobó que la migración del pigmento retinal distal se encuentra modulado indirectamente por NE y DA. La primera induce la liberación de la hormona de adaptación a la luz (LAH) mientras que la última produce el efecto contrario por inducción de la liberación de la hormona de adaptación a la oscuridad (DAH).

Algunas aminos biogénicas también afectan el latido cardíaco, la tasa de perfusión y la frecuencia del batido de escafognatito. Se determinó que extractos de una variedad de tejidos como cerebro, pedúnculos oculares y órgano pericárdico (PO), contienen sustancias cardioactivas en crustáceos decápodos. En particular se considera que el PO se encuentra directamente involucrado en la cardioregulación (para una reseña, ver McMahon y Wilkens, 1983). En recientes trabajos realizados en *Carcinus maenas*, *Homarus americanus* y en *Panulirus japonicus*, se probó el efecto de 5-HT, DA, OA, proctolina (PR) y péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP), todos ellos neurohormonas del PO, en cultivo de neuronas del ganglio cardíaco y en preparaciones de corazón perfundido. Se determinó entonces que, a excepción de la OA, todos actúan como cardioexitadores muy fuertes incrementando variables tales como frecuencia cardíaca y tasa de impulsos nerviosos (Saver y Wilkens, 1998; Saver *et al*, 1998, 1999; Wilkens y Kuramoto, 1998).

Con respecto al efecto que produce el PO sobre el escafognatito, informes muy tempranos (Berlin, 1976) demostraron que una inyección del extracto de PO en cangrejos normales provocaba un aumento marcado en

la frecuencia de este apéndice ventilatorio, lo cual a su vez incrementaba el flujo de agua a través de las cámaras branquiales (para una reseña, ver Kamemoto, 1982).

Finalmente, se demostró que los procesos relacionados con la osmoregulación y el transporte iónico están modulados por diversas neurohormonas. Existen evidencias fuertes de que centros neuroendócrinos tales como pedúnculos oculares, cerebro, ganglio torácico y PO, producen y liberan factores que afectan el movimiento de agua y solutos a través de las branquias de crustáceos. En particular, el homogenato de PO aumenta la captación activa de sodio en branquias aisladas perfundidas de *Callinectes sapidus* y también aumenta los niveles de cAMP branquial. De las hormonas del PO probadas, solamente DA y OA fueron capaces de causar un incremento en el contenido de cAMP branquial (Kamemoto y Oyama, 1985). Se sugirió entonces, que el PO participa de una función osmoregulatoria integrada que involucra, además del transporte de sodio, el control del flujo hemolinfático a través de las branquias por modulación de la frecuencia cardíaca y de la tasa de flujo de agua externa sobre las branquias por modulación del movimiento de los escafognatitos (Berlind, 1976, 1977).

4.4.2 Localización y Estructura del Órgano Pericárdico.

El *órgano pericárdico* (PO) de los crustáceos se compone de nervios segmentales anastomosados en la cavidad pericárdica. Junto al *órgano X-glándula del seno*, son los dos órganos neuroendócrinos más importantes presentes en los crustáceos. Se definen como órganos neuroendócrinos a aquellas estructuras formadas por células neurosecretoras o terminales

nerviosas de células neurosecretoras cuyos productos se liberan al sistema circulatorio.

Este plexo nervioso que conforma al PO proviene de un sistema par, de fibras provenientes de nervios dorsales, llamados nervios superiores. Estos nervios contienen los axones de somas neurosecretoras localizados central y periféricamente, los cuales se ramifican en la cavidad pericárdica. Se sabe que este órgano contiene y libera hormonas a la circulación general, entre las que se incluyen diversas aminas biogénicas y uno o más péptidos cardio-excitadores (para una reseña, ver Cooke y Sullivan, 1982).

Dentro de los braquiuros, se sabe que los somas neurosecretoras que contribuyen con sus ramificaciones a la formación del PO, se localizan principalmente en el ganglio torácico. Otro *input* al órgano pericárdico, proviene de células dopaminérgicas del ganglio comisural (para una reseña, ver Cooke y Sullivan, 1982).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión muestran que cada rama del PO en sección transversal se compone de una *médula* de fibras nerviosas rodeadas por una *corteza* de terminales secretoras. Los axones que conforman esta médula generalmente se encuentran rodeados de glía. Un epineuro acelular, producto de células gliales especializadas, rodea y separa cada rama del PO del espacio hemolinfático. Hay indicaciones morfológicas de sitios de liberación de vesículas o sitios de reciclado de vesículas en áreas donde se une al epineuro (ver para una reseña, Cooke y Sullivan, 1982).

El PO puede ser considerado como un órgano neuroendócrino que se especializa en la síntesis y almacenamiento de catecolaminas,

fenilaminas, y ciertos péptidos que se liberan a la circulación general como neurohormonas. Monoaminas tales como serotonina (5-HT), dopamina (DA) y octopamina (OA) son compuestos químicamente muy relacionados que se encuentran contenidos en las vesículas de terminales nerviosas del PO de crustáceos. La síntesis y almacenamiento de DA y OA se encuentran localizadas predominantemente en áreas donde las fibras neurosecretoras se ramifican y forman la corteza, es decir, el PO y sus sitios pericárdicos de liberación. Las terminales tipo III sintetizan y contienen OA. El PO está reconocido como el principal sitio de almacenamiento y distribución de 5-HT, sin embargo su ubicación está dada en otras terminales nerviosas diferentes a las que contienen DA y OA, específicamente en aquellas descritas como terminales tipo IV (para una reseña, ver Cooke y Sullivan, 1982).

4.4.3. Regulación del Transporte Iónico por Dopamina en Crustáceos Decápodos.

Como se comentó a lo largo de esta introducción teórica, algunos crustáceos realizan procesos hiper-osmoreguladores cuando se exponen a un medio ambiente diluido. Dichos procesos consisten básicamente en la captación activa de iones (típicamente Na^+ y Cl^-) y ocurren principalmente a través de las branquias posteriores. A partir de los resultados de algunos trabajos (para una reseña, ver Kamemoto, 1991; Eckhardt *et al*, 1995), surgieron indicios que indicaban que los mecanismos de osmoregulación de especies hiperreguladoras podrían estar controlados de alguna manera por factores peptídicos y aminas que se secretaban de

órganos neurohemales como el órgano pericárdico (PO), el ganglio torácico (ThG) y la glándula del seno.

Si bien son muchos los trabajos que se realizaron en este tema en los últimos años, es mucho lo que falta aportar todavía para tener un conocimiento pleno de cómo funcionan estos mecanismos hormonales. Se intentará entonces, hacer una breve reseña de los aportes que se hicieron desde estadios tempranos de la investigación en este tema, hasta el momento.

En el año 1983, Savage y Robinson realizaron un importante trabajo en la especie *Callinectes sapidus*, en el cual demostraban que para aquellos animales aclimatados a alta salinidad, la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial, aumentaba en forma significativa luego de una inyección *in vivo* de hemolinfa de animales aclimatados a baja salinidad. La importancia de este estudio radica en la idea de que en condiciones hiposmóticas, existe un factor “hemal” que causa un aumento en la captación de sales a través de la activación de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa.

En las últimas dos décadas se le ha prestado especial atención a los efectos del PO y particularmente de la DA, sobre el movimiento de sales y su relación con la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en branquias posteriores de especies hiper-reguladoras. Trabajos tempranos, probaron que la aplicación de un extractos de PO, DA y OA (siendo estas dos últimas, componentes conocidas del PO) en preparaciones de branquias aisladas perfundidas de *Callinectes sapidus* causaban un incremento en la captación de Na^+ y un aumento en el contenido de cAMP branquial (Kamemoto y Oyama, 1985). Lohrman y Kamemoto (1987) continuaron

este estudio en el mismo sistema de branquias perfundidas y mostraron que tanto la aplicación de hemolinfa de animales aclimatados a baja salinidad como la de un análogo de cAMP en el perfusato, aumentaban significativamente la captación activa de Na^+ a través de las branquias. Sugirieron entonces, que los factores del PO (DA, OA) involucrados en esta respuesta hiper-osmótica, se liberarían a la circulación y activarían la captación de sales en las branquias posteriores utilizando cAMP como segundo mensajero.

Aunque hasta el momento predominó fuertemente la idea de que en *Callinectes sapidus* la modulación seguía la secuencia: shock hipo-osmótico $\rightarrow$ PO (DA) $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ Na^+ , K^+ -ATPasa, de los 3 trabajos realizados en esta especie no surge claramente cómo se vehiculiza esa señal. Si bien es cierto que hay un factor hemal que se libera en condiciones hipo-osmóticas, nada indica que se trate de una amina del PO. Y además, no existe hasta ahora evidencia fuerte que indique que en esta especie, la DA afecta positiva y específicamente a la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa.

En el caso de *Carcinus maenas*, algunos trabajos realizados hasta ahora proponen la existencia del mismo camino modulador que el sugerido para *C. sapidus*, sin embargo en esta especie también se obtuvieron resultados contradictorios al respecto. Entre los primeros trabajos realizados en *C. maenas*, existe un aporte muy original realizado por Zatta (1987) quien mostró, haciendo uso de un método fluorimétrico, un aumento significativo en la DA circulante y en la DA branquial, luego de someter al animal a un shock hipo-osmótico. Asimismo, Sommer y Mantel (1988) trabajando con animales de la misma especie, mostraron que la

captación de Na^+ aumentaba significativamente luego de inyecciones *in vivo* de extracto de PO o de DA. También demostraron que después de dichas inyecciones aumentaba la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial en un 63% y en un 49% para el PO y la DA respectivamente. Además, la incubación de branquias *in vitro* con db-cAMP incrementaba la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa en un 43%, incremento similar al encontrado en esta especie cuando se la somete a un shock hiposmótico. Tres años después, los mismos autores completaron esta serie de experimentos mostrando que, pasadas 3 horas de una inyección *in vivo* de DA $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ se registraba un aumento en el contenido de cAMP cercano al 100% tanto en branquias anteriores como en posteriores. Además, también registraron un aumento en el contenido de cAMP de branquias posteriores 24 horas después de una transferencia a un medio diluido (Sommer y Mantel, 1991).

Estos resultados obtenidos en *C. maenas* parecerían apuntar a un mismo camino que aquellos encontrados por el grupo de Kamemoto para *C. sapidus*. Sin embargo, en un reciente trabajo realizado en *C. maenas* se determinó la existencia de una correlación negativa entre la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial y el contenido de cAMP branquial luego de la transferencia del animal a un medio diluido. Luego de 4 horas de transferencia se registró un aumento del 67 % en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa de branquias posteriores mientras que el contenido de cAMP medido en el mismo tejido disminuyó significativamente a partir de las 6 horas de transferencia (Lucu y Flik, 1999). Este último resultado resulta totalmente opuesto al encontrado por Sommer y Mantel (1991) quienes registraron un aumento de más de un 130% en el contenido de cAMP de

branquias posteriores luego de la transferencia de *Carcinus* a medio diluido. ¿Por qué surge esta discrepancia entre los resultados de experimentos de diseño muy similar realizados en la misma especie? Si efectivamente ante un shock hipo-osmótico se libera DA desde el PO hacia la circulación y ésta activa la captación de Na^+ por activación de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral usando al cAMP como segundo mensajero, ¿no deberían entonces medirse fácilmente un aumento de éste nucleótido después de una transferencia de *C. maenas* a un medio diluido? La segunda pregunta que surge de analizar la metodología empleada en ambos trabajos es la siguiente: ¿es válido analizar contenido de cAMP (suponiéndolo segundo mensajero de una vía de señalización) 24 horas o más, después de la aplicación del estímulo?

Un trabajo realizado con una metodología muy similar al de Sommer y Mantel (1988) pero en el cangrejo anfibio *Leptograpsus variegatus* mostró resultados similares a los encontrados para los experimentos *in vivo* en *Carcinus*, pero no así para los resultados de los ensayos *in vitro*. La inyección de DA o de db-cAMP en individuos intactos provocó un incremento en la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa branquial en un 67% y 63% respectivamente. Por el contrario, la incubación de branquias homogeneizadas con DA o con db-cAMP no afectó significativamente la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa aún en presencia de IMBX (inhibidor de la fosfodiesterasa) (Morris y Edwards, 1995). Aún tomando en cuenta solamente los resultados de los experimentos *in vivo*, no se podría establecer una relación directa entre la hormona DA y cAMP como segundo mensajero y menos aún, afirmar que las branquias sean el primer blanco de esta amina y que eso se traduzca en un incremento de la Na^+ ,

K^+ -ATPasa branquial. Los mismos autores del trabajo sugieren que para *Leptograpsus*, las branquias podrían no ser el principal sitio de absorción de sales y que habría que investigar mejor otros tejidos como el intestino medio que es rico en ATPasa potencialmente regulable y que probablemente juegue un papel importante en el balance de sales.

El caso de *Eriocheir sinensis* seguramente resulta en el caso mejor documentado en relación al estudio del control hormonal de los mecanismos de osmoregulación en branquias posteriores. Sin embargo, los resultados de los diversos trabajos relacionados con este tema también resultan dispares (figura 4). Bianchini y Gilles (1990) realizaron una serie de experimentos en preparaciones de branquias posteriores aisladas perfundidas en condiciones simétricas (composición iónica del perfusato = composición iónica del baño) y en condiciones asimétricas en las cuales el baño carecía de iones Na^+ o de iones Cl^- y midieron variaciones en el potencial transepitelial y flujo de sodio y cloruro. En estas condiciones experimentales demostraron que durante la perfusión de las branquias con drogas que elevan el contenido de cAMP branquial (db-cAMP, IBMX, forskolina) se producía un aumento significativo en la diferencia de potencial transepitelial así como un aumento en la captación de iones Na^+ y Cl^- . Puesto que la captación de Na^+ se estimulaba con dichas drogas aún en un baño salino que carecía de Cl^- y viceversa (se estimulaba captación activa de Cl^- en baño salino sin Na^+), demostraron que la captación de NaCl como consecuencia del estímulo aplicado, mostraba independencia para cada ión. En base a estos resultados, concluyen que de alguna manera el cAMP está implicado en la modulación del transporte transepitelial de NaCl en las branquias posteriores de *E. sinensis* a través

de la activación de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral (principal responsable de la captación activa de Na^+) y de los canales de Cl^- apicales (Bianchini and Gilles, 1990).

Con la idea de profundizar un poco más sobre los mecanismos hormonales que actúan en la captación activa de NaCl en *Eriocheir*, se realizó un trabajo en el cual se probó el efecto de bioaminas como 5-HT y DA en la fosforilación de proteínas de diferentes fracciones obtenidas luego de una centrifugación diferencial de branquias anteriores y posteriores (Trausch *et al*, 1989). Como primer resultado importante, vieron que la única fracción que contenía proteínas fosforilables por cAMP, era la fracción soluble, S_3 , correspondiente a la fracción de proteínas citoplasmáticas. Combinando ésta fracción soluble con la fracción microsomal (P_3) que contenía a la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa, observaron que el agregado de 5-HT era capaz de activar la fosforilación casi 4 veces sobre el valor del control (sin 5-HT). Y a su vez, probaron que era una respuesta específica utilizando inhibidores tanto de la 5-HT (ciproheptadina) como de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa (ouabaína). Cuando se repitieron estos mismos protocolos para determinar el efecto de la DA, se vio que esta amina también inducía un aumento en la fosforilación de la fracción que contenía la Na^+ , K^+ -ATPasa (en presencia de S_3) y que dicha fosforilación se inhibía con el agregado del antagonista de la DA, cloropromazina.

Finalmente, los autores de este trabajo concluyen que la fosforilación de la enzima de membrana basolateral Na^+ , K^+ -ATPasa presente en la fracción P_3 ocurre necesariamente en presencia de las proteínas citoplasmáticas-cAMP dependientes de la fracción soluble y que

dicha fosforilación se induce específicamente con 5-HT y DA. Sin embargo, puesto que no probaron si esa activación de la fosforilación producida por DA era específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral (no mostraron que se inhibiese con ouabaína), no se podría descartar que esta amina podría estar induciendo la fosforilación de otra proteína de membrana presente en la misma fracción microsomal.

Estos dos trabajos (Bianchini and Gilles, 1990; Trausch *et al*, 1989) parecerían indicar que *Eriocheir* presenta cierto grado de similitud con el camino hormonal sugerido por el grupo de Kamemoto para *C. sapidus*: una bioamina (en el caso de *E. sinensis*, pareciera ser más la 5-HT que la DA) capaz de inducir fosforilación de proteínas citoplasmáticas vía activación de adenilato ciclasa, luego de lo cual se produciría la fosforilación de la enzima de membrana Na^+ , K^+ -ATPasa y eso se traduciría en cambios en el potencial transepitelial y en el flujo de iones Na^+ y Cl^- .

En 1994, Riestenpatt y otros realizaron un prolijo estudio en *E. sinensis* utilizando preparaciones de hemi-laminillas branquiales montadas en una micro-cámara de Ussing. La ventaja de utilizar este tipo de preparación por sobre la branquia perfundida, es que en la primera se puede determinar si las variaciones registradas en la corriente de corto circuito, se deben a variaciones en la conductancia (canales de membrana) o en la fuerza electromotriz (bombas de membrana) (Schwarz and Graszynsky, 1989).

En este trabajo, se determinó que si bien la aplicación de teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa) o de db-cAMP del lado interno (hemolinfático), aumentaban la corriente de corto circuito dependiente de Na^+ , lo hacían por un aumento en la conductancia transepitelial

manteniendo la fuerza electromotriz sin variaciones. Estos resultados estarían indicando lo contrario de lo que Trausch *et al* (1989) concluyeron: en este caso estarían sugiriendo que la enzima de membrana Na^+ , K^+ -ATPasa no sería el blanco principal de la estimulación cAMP dependiente, sino los canales apicales de Na^+ .

En el caso de la corriente de corto circuito dependiente de cloruro, vieron que la aplicación de teofilina o de db-cAMP del lado interno, producían un aumento de la misma, acompañada de un aumento en la conductancia y en la fuerza electromotriz. Como ya se explicó anteriormente, en el modelo de *E. sinensis*, el Cl^- ingresa a la célula epitelial a través de un intercambiador apical ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) y la fuerza motriz para ese intercambio proviene de la actividad de una V-ATPasa que se ubica “en paralelo”. El Cl^- egresa luego de la célula hacia la circulación general por canales de Cl^- de ubicación basolateral. La estimulación de la V-ATPasa por cAMP podría explicar el aumento en la corriente de cloruro y sería consistente con el aumento de la fuerza electromotriz registrado durante el experimento.

En resumen, los resultados de este trabajo indicarían que la estimulación en la captación de Na^+ a través de las branquias posteriores, está dada por un aumento en el cAMP intracelular que induce un aumento de los canales apicales de Na^+ y no por estimulación de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral. El mismo aumento del cAMP intracelular induciría una mayor captación de cloruro por activación de la V-ATPasa apical, aunque no descartan que también pueda existir una activación adicional de los canales de Cl^- basolaterales.

Recientemente, se han aportado nuevas evidencias a partir de experimentos realizados en preparaciones de branquias aisladas perfundidas con DA y db-cAMP en las cuales se midieron flujo de Na^+ y posteriormente, actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa y contenido de cAMP (Mo *et al*, 1998). Los resultados mostraron que ambas drogas son capaces de incrementar significativamente la captación de Na^+ aún en baño libre de Cl^- (reemplazado por gluconato), algo similar a lo que ya habían mostrado Bianchini y Gilles (1990) para la perfusión de branquias de la misma especie con drogas que elevaban el contenido de cAMP. Pero además, en este trabajo también mostraron que luego de 1 hora de perfusión con DA, el contenido de cAMP intracelular y la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa aumentaban significativamente. Al contrario de los trabajos que realizan inyecciones de DA *in vivo*, este aporte de Mo y otros (1998) demuestra un efecto directo de la DA sobre el epitelio branquial que consiste en un aumento del contenido de cAMP así como un aumento de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa que se traduce en un incremento de la captación de Na^+ . Sin embargo, no hay evidencia concluyente en este trabajo que indique que el incremento de cAMP causaría un aumento en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa. De nuevo, el aumento en la captación activa de Na^+ podría deberse a un incremento en el número de canales apicales de Na^+ tal como lo sugirieron Riestenpatt y otros (1994).

En el año 2002, Mo *et al* publicaron un trabajo donde demostraron que, para *E. sinensis*, la afinidad de la DA a los sitios de unión sobre la membrana plasmática es siempre más alta en branquias posteriores que en branquias anteriores independientemente de la salinidad de aclimatación y además, determinaron que la DA se une específicamente a un receptor de

subtipo D₁. Se sabe que los receptores de DA del tipo D₁ están acoplados a la adenilato ciclasa (AC) a través de la proteína G_{as} incrementando los niveles intracelulares de cAMP mientras que los del subtipo D₂ están acoplados a la inhibición de la AC vía G_{ai} (Friedman *et al*, 1993).

A continuación, la figura 4 esquematiza algunos pasos de la vía de señalización celular que sigue a un shock hipo-osmótico en branquias posteriores de *Eriocheir sinensis*:

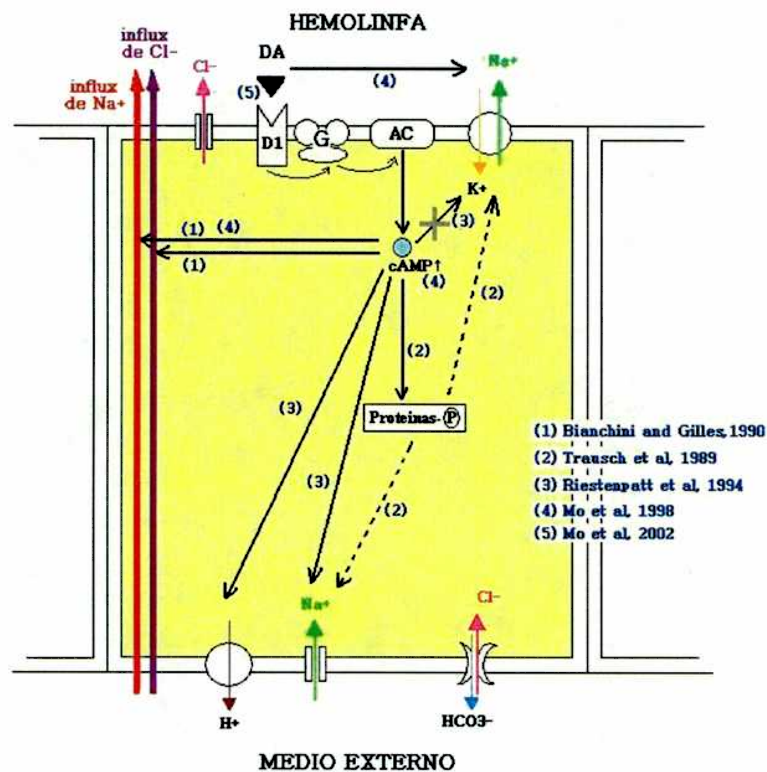


Figura 4: relaciones metabólicas causales sugeridas (líneas punteadas) y probadas (líneas llenas) en distintos trabajos realizados en *Eriocheir sinensis* en relación a la vía de señalización que se produce en las branquias posteriores en condiciones hipo-osmóticas.

Un caso con resultados diametralmente opuestos a los descriptos hasta el momento es el documentado por Morris y col. (2000) para el cangrejo anomuro terrestre *Birgus latro*. Puesto que se trata de un cangrejo de hábitos terrestres resulta complicada la comparación de mecanismos de transporte iónico con especies acuáticas hiperreguladoras. Sin embargo, se podría intentar una analogía con el proceso de regulación de la composición del producto de excreción final. En general, los cangrejos terrestres producen una orina primaria que se libera desde las glándulas antenales, y que resulta iso-osmótica a su hemolinfa lo cual representa una potencial ruta para la pérdida de sales. La dieta es la principal fuente de captación de sales para animales terrestres y *B. latro* normalmente tiene acceso a fuentes de agua dulce. La manera de mantener el equilibrio salino resulta de los procesos de reabsorción de sales que se dan cuando el cangrejo “re-ingiere” la orina pasándola a través de las branquias.

Morris y col. (2000) perfundieron las cámaras branquiales con solución salina que simulaba la orina, y vieron que aquellos animales perfundidos con solución salina diluida (FW) presentaban una tasa de captación de Na^+ y Cl^- cuatro veces mayor que aquellos perfundidos con solución salina concentrada (SW). Animales que bebían FW y que eran inyectados *in vivo* con DA o db-cAMP sufrían una inhibición en la captación de Na^+ y Cl^- y se reducía significativamente la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa branquial. Sin embargo, también registraron que esas mismas inyecciones causaban un incremento en el contenido de cAMP branquial. Es decir, que el aumento en el nivel de cAMP, promovería una marcada disminución en la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa

branquial y no una estimulación como se sugiere para las especies acuáticas. Aquí también surge una correlación negativa entre el contenido de cAMP y la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa, pero de naturaleza inversa a la encontrada para *Carcinus maenas* (Lucu y Flik, 1999). Los autores sugieren el incremento de cAMP-dopamina dependiente, seguramente se produce vía activación de la adenilato ciclasa, la cual lleva normalmente a la fosforilación de proteínas y que, en *Birgus latro*, esto deprime la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa branquial.

Si bien, todas las evidencias aportadas en el transcurso de éste capítulo provienen de especies cuyos hábitats son diferentes y que los mecanismos de transporte iónico propuestos para cada una de ellas también lo son, es evidente que todavía quedan muchos interrogantes por contestar en el tema de la regulación hormonal de estos procesos.

5. Chasmagnathus granulatus.

5.1. Ubicación Taxónomica.

Orden Decapoda

Suborden Pleocyemata

Infraorden Brachyura

Sección Brachyrhyncha

Familia Varunidae, *Chasmagnathus granulatus*.

5.2. Ambiente.

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo intermareal que ocupa ambientes estuariales y se distribuye a lo largo de extensas zonas litorales de Brasil, Uruguay y Argentina, desde Río de Janeiro hasta el Golfo de San Matías (Boschi, 1964).

El presente trabajo se realizó con individuos extraídos de una población que habita en Punta Rasa, extremo sur de la Bahía de Samborombón (figura 5). Junto a *Uca uruguayensis* son de los macroinvertebrados bentónicos más abundantes del litoral de la Bahía de Samborombón, Provincia de Buenos Aires (Boschi, 1964, Iribarne *et al*, 1997; Bortolus and Iribarne, 1999). Esta extensa región se encuentra surcada por afluentes del estuario del Río de la Plata y por numerosos canales de marea. Debido a la acción de las mareas, la zona costera se ve periódicamente anegada (Rossi, 1982). Estos cangrejos se caracterizan por ser muy activos desplazándose por debajo de la línea de marea baja y por encima de la de marea alta. Dadas estas condiciones, los individuos de

esta especie pueden ser observados sumergidos o expuestos al aire independientemente de la altura de la marea.

Chasmagnathus granulatus habita la zona intermareal de la costa, desde el sedimento blando hasta las áreas pobladas con *Spartina densiflora* y alcanza una densidad promedio de 20 cangrejos m^{-2} pero que puede llegar hasta 60 cangrejos m^{-2} (Boschi, 1964; Iribarne *et al* 1997; Botto and Iribarne, 1999). Este cangrejo cavador construye grandes cuevas de alrededor de 20 cm de diámetro y mas de 1 m de profundidad en el suelo limo-arcilloso, a las cuales mantiene abiertas de forma semi-permanente (Iribarne *et al*, 2000). El total de sedimento removido está por encima de los 5 $\text{kg m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ con lo que esta especie juega un papel fundamental en la composición del sedimento y la estructura del hábitat, ya que con esta actividad afecta directa y significativamente la densidad de algunos organismos bentónicos como poliquetos y Nematodos (Iribarne *et al* 1997; Botto and Iribarne, 1999; Botto and Iribarne, 2000)

La especie en estudio mantiene una dieta omnívora-detritívora a la que se suma un comportamiento oportunista; se alimenta de materia vegetal fresca o en descomposición, invertebrados pequeños y peces muertos (Botto e Irigoyen, 1979). La fauna asociada a esta región se compone de una gran variedad de peces de importancia económica, algunos de los cuales son carcinófagos, representada por: pejerrey (*Odontestes argentinensis*), corvina negra (*Pogonias chromis*), corvina rubia (*Micropogonias opercularis*), lisa (*Mugil liza*) y lenguado (*Paralichthys brasiliensis*), entre otros (Olivier *et al*, 1972). En esta zona también es de gran importancia la presencia de ciertas aves como flamencos (*Phoenicopterus andinus*), chorlos (*Charadrius semipalmatus*) y

otras especies carcinófagas tales como garzas (*Egretta alba* y *E. thula*), gaviota cangrejera (*Larus belcheri*), ostrero pardo (*Haematopus palliatus*), ostrero común (*Haematopus ostralegus*) y el playero trinador (*Numenius phaeopus*) (Bachmann y Martínez, 1994; Iribarne y Martínez, 1996). En este ambiente, además de *C. granulatus*, también se encuentran representantes de las especies *Uca uruguayensis* y de *Cyrtograpsus angulatus*. Mientras que *U. uruguayensis* se distribuye cerca de la línea de marea alta, *C. angulatus* lo hace habitualmente cerca de la línea de marea baja (Boschi, 1964). Las plantas características de esta comunidad son las espartinas (*Spartina alterniflora* y *Spartina densiflora*) y los pastos salados (*Salicornia ambigua* y *Distichlis spicata*) (Botto e Irigoyen 1979; Rossi 1982).



Figura 5: Izquierda: Provincia de Buenos Aires. Derecha: Fotografía satelital de la zona de la Bahía de Samborombón, Pcia. De Buenos Aires.

5.3. Estructura y Función de las Branquias.

Como se comentó anteriormente, debido a las características ambientales de la Bahía de Samborombón, *C. granulatus* debe hacer frente a permanentes cambios del medio externo de distinta naturaleza. Por un lado, debido a la acción de las mareas se ve periódicamente expuesto al aire durante periodos variables de tiempo. Por otra parte, si bien esta zona esta bañada por aguas del Océano Atlántico, en ella también convergen aguas de canales y arroyos de la Cuenca del Salado y afluentes del Río de la Plata y por lo tanto, la salinidad de medio varía continuamente.

Como la gran mayoría de los crustáceos decápodos, *C. granulatus* posee branquias como órganos esenciales de intercambio gaseoso e iónico, las cuales se hallan dentro de las cámaras branquiales. En el caso de *C. granulatus*, los 2 primeros pares de filobranquias (1 y 2) están muy reducidas, los tres pares que le siguen (3-5) presentan características estructurales y fisiológicas de un órgano de intercambio gaseoso, mientras que los últimos tres pares de filobranquias (6-8) son características de un órgano de intercambio iónico (Luquet *et al*, 2000).

El epitelio que tapiza las laminillas branquiales respiratorias es simple plano, formado por células respiratorias con núcleos aplanados y citoplasma homogéneo con pocas organelas. Las células en pilar se encuentran presentes a intervalos espaciados y brindan soporte al epitelio. La altura del epitelio y cutícula en branquias respiratorias se encuentra dentro del intervalo de 1.27 a 2.46 μm y 0.78 a 1.79 μm respectivamente, y dicha altura no varía significativamente con la salinidad de aclimatación (Genovese *et al*, 2000a).

Por otra parte, el epitelio branquial de los últimos tres pares de filobranquias (6-8), es más alto (cuboide) y, al igual que en otras especies hiper-reguladoras como *Eriocheir sinensis*, *Carcinus maenas* o *Callinectes sapidus*, está caracterizado por la presencia de ionocitos, células especializadas en el intercambio iónico (ver página 26). En trabajos previos se comprobó que para *C. granulatus* la altura del epitelio de las branquias posteriores aumenta tanto en un medio de aclimatación hipo-osmótico (12‰) como en un hiper-osmótico (44‰) (Genovese *et al*, 2000a).

Se sabe además, que *Chasmagnathus granulatus* mantiene su concentración iónica interna similar a la del agua de mar y que es capaz de hiper-regular activamente cuando se expone a baja salinidad e hipo-regular cuando se expone a alta. Se ha demostrado en diversos trabajos que las branquias posteriores son el principal sitio a través del cual se realizan esos procesos de intercambio iónico (Luquet *et al*, 1992, 2002b; Mougabure Cueto, 1998).

5.4. Respiración en Agua vs. Respiración en Aire.

Mientras se encuentra sumergido, *C. granulatus* utiliza las branquias para captar oxígeno y eliminar dióxido de carbono al igual que cualquier cangrejo respirador acuático como *Callinectes sapidus*, *Libinia dubia*, *Chaceon quinquedens*, *Carcinus maenas* o *Eurytium albidigitum* (Gray, 1957; Burnett y McMahon, 1987; Henry *et al*, 1990): el oxígeno del medio externo atraviesa el epitelio branquial hacia el espacio hemolinfático siguiendo un gradiente de presión parcial, mientras que el bicarbonato circulante, abandona la branquia como CO₂ luego de sufrir una

deshidratación catalizada por la enzima anhidrasa carbónica respiratoria, asociada a la superficie de la membrana basolateral del epitelio branquial, puesto que dicha reacción facilita la excreción de este producto de desecho hacia el medio externo.

Cuando *C. granulatus* se encuentra expuesto al aire, se ha observado que permanece activo (Boschi, 1964) y es capaz de mantener una alta tasa metabólica sin que se produzcan cambios significativos en la presión venosa de oxígeno (Dezi *et al*, 1987; Santos *et al*, 1987; Luquet y Ansaldo, 1997), a diferencia de otros cangrejos intermareales que, al no poder obtener oxígeno eficientemente del aire, agotan la reserva hemolinfática de este gas (reserva venosa) durante periodos de exposición al aire (Taylor y Wheatly, 1980; Depledge, 1984; deFur, 1988).

C. granulatus al igual que diversos cangrejos grápsidos y ocypodidos, recircula un volumen de agua que reserva dentro de sus cámaras branquiales a través del caparazón, de forma tal que las branquias, aún en esas condiciones de exposición, pueden seguir en contacto con un medio ventilado con el cual intercambiar gases respiratorios (Maitland, 1990; Santos *et al*, 1987). Sin embargo, si la exposición al aire es prolongada, durante el proceso de recirculación se presenta el problema de evaporación de parte de ese volumen de agua, es decir, que después de cierto tiempo, la cantidad de agua que recircula no es suficiente para ventilar las branquias.

Durante un estudio en el cual se privaba a *C. granulatus* del agua que recircula durante los periodos de exposición al aire, se determinó que aún en esas condiciones ésta especie mantenía una elevada presión venosa de oxígeno. Teniendo en cuenta que dichas condiciones

experimentales afectaban significativamente la funcionalidad de las branquias puesto que las mismas resultaban colapsadas, se realizó un estudio de microscopía óptica sobre el branquiostegito para determinar si su estructura era compatible con una función de intercambio gaseoso. Los resultados mostraron que el revestimiento interno del branquiostegito cumplía las condiciones de un epitelio respiratorio. La barrera de difusión medida en el branquiostegito de *C. granulatus* se encuentra en el mismo orden que la de “pulmones” de otros decápodos terrestres o bimodales (Henry, 1994) y sensiblemente menor que la de las branquias respiratorias de esta misma especie (Luquet *et al*, 2000; Genovese, 2000a). Sin embargo, esta estructura de intercambio gaseoso extra-branquial, parece ser eficiente solo en la captación de oxígeno y no en la eliminación de dióxido de carbono puesto que para aquellos animales privados de la reserva de agua branquial, la presión de CO₂ en hemolinfa aumentó significativamente con el tiempo de exposición al aire. *C. granulatus* utiliza eficazmente el revestimiento interno del branquiostegito para complementar la captación de oxígeno por parte de las branquias mientras que la eliminación de CO₂ queda restringida a estas últimas (Halperin *et al*, 2000).

5.5. Medio Iso-Osmótico vs. Medio Hipo-Osmótico.

Chasmagnathus granulatus ha sido descrito en diversos trabajos como un cangrejo hiper-hiporegulador fuerte. En un reciente estudio realizado en esta especie, se ha demostrado la presencia de la enzima Na⁺, K⁺-ATPasa la cual es responsable de la mayor parte de la actividad de ATPasas branquiales (aproximadamente del 80% del total). Además, se

determinó un aumento significativo de la actividad de esta enzima en branquias posteriores luego de la transferencia de animales a un medio diluido, confirmando su importancia en el transporte iónico en condiciones hipo-osmóticas (Castillo *et al*, 2001).

Se encontraron resultados similares en otro trabajo realizado en *C. granulatus* pero en relación a la actividad de la anhidrasa carbónica (CA). En dicho trabajo se determinó que la actividad de CA es dependiente de la salinidad de aclimatación. Y que mientras que la distribución de la CA es uniforme entre las branquias en agua de mar, la misma aumenta significativamente en las posteriores luego de la transferencia a baja salinidad (López Mañanes *et al*, 2000).

En un primer intento por determinar los mecanismos generales involucrados en la captación activa de iones a través de las branquias de *C. granulatus*, se realizó un estudio en preparaciones de branquias aisladas perfundidas, en el cual se midieron diferencias de potencial transepitelial y flujo de Na^+ en presencia de inhibidores específicos de diferentes transportadores de membrana. Como primer resultado importante, se demostró que las mayores diferencias en el potencial transepitelial se registraban en las branquias posteriores (6-8) cuando se perfundían en condiciones hipo-osmóticas. Por otra parte, de los resultados de la captación activa de Na^+ en presencia de ouabaína, concluyen que Na^+ , K^+ - ATPasa localizada en la membrana basolateral es la principal fuerza motriz puesto que la ouabaína inhibe la diferencia de potencial transepitelial (TEPD) y la captación de Na^+ en la misma proporción. (Luquet *et al*, 2002b). Las perfusiones con BaCl_2 (inhibidor específico de canales de K^+) demostraron también la importancia de los canales

basolaterales de K^+ en la generación del potencial transepitelial (Luquet *et al*, 2002b).

Se sabe a partir de los resultados de experimentos realizados en laminillas montadas en micro cámara de Ussing, que la absorción de NaCl se realiza en forma acoplada principalmente por medio de un mecanismo electrogénico y en menor grado por un mecanismo electroneutro presumiblemente vía los transportadores Na^+/H^+ y HCO_3^-/Cl^- . Los autores proponen que, al igual que *Carcinus maenas*, los canales apicales de K^+ y el transportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ son la base del transporte electrogénico acoplado de NaCl (Onken *et al*, 2003). Al igual que Luquet *et al* (2002b), coinciden en la presencia de la Na^+ , K^+ -ATPasa, canales de K^+ y canales de Cl^- basolaterales. A su vez, también se determinó que la actividad de la enzima anhidrasa carbónica (CA) de branquias posteriores de *C. granulatus* es sensible a la salinidad de aclimatación siendo 2 veces y media mas alta a baja que a alta salinidad (Genovese *et al*, 2000b). Como ya se comentó anteriormente, la actividad de la CA citosólica es fundamental para proveer los H^+ y HCO_3^- como contra iones para la captación electrogénica de Na^+ y Cl^- .

El modelo que explicaría el transporte en *Chasmagnathus granulatus* aclimatado a baja salinidad propuesto por Onken *et al* (2003) se muestra a continuación:

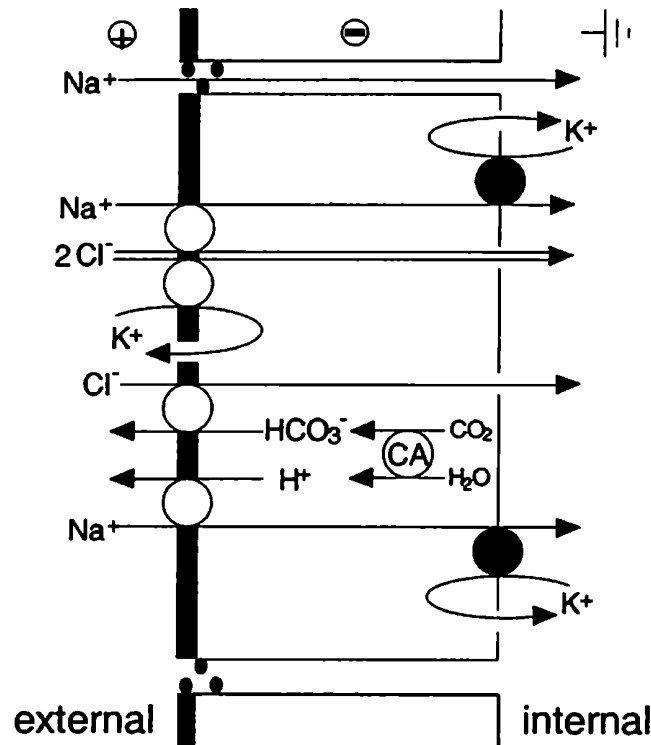


Figura 6: Esquema de los mecanismos de transporte iónico a través del epitelio de las branquias posteriores de *Chasmagnathus granulatus* aclimatado a baja salinidad (Onken *et al*, 2003)

En el estudio de Luquet *et al* (2002b), los autores sugieren fuertemente la posibilidad de una autorregulación del transporte en condiciones hipo-osmóticas, ya que en las preparaciones de branquias perfundidas no existe ninguna influencia hormonal porque las perfusiones se realizan con soluciones salinas artificiales. Lo mismo podría aplicarse para los trabajos realizados en laminillas de *C. granulatus* montadas en cámaras de Ussing (Onken *et al*, 2003). En otro estudio realizado en la misma especie en preparaciones de branquias perfundidas y en cámara de Ussing, se determinó que la osmolaridad hemolinfática puede regular la

absorción de NaCl transbranquial, modulando la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral y cambiando la conductancia apical, y que esa modulación usaría al cAMP como segundo mensajero. (Tresguerres *et al*, 2003).

Con el fin de profundizar el conocimiento sobre los mecanismos de regulación iónica de *C. granulatus*, en este trabajo de tesis se propone estudiar las posibles funciones del branquiostegito de esta especie como órgano accesorio de transporte iónico. Así como el estudio de la regulación neurohormonal de los procesos de transporte iónico en condiciones iso- e hipo-osmóticas, en particular el papel de la dopamina y la vía de transducción dependiente de cAMP.

Hipótesis

- El branquiostegito de *Chasmagnathus granulatus*, además de participar en la respiración aérea, también participa en los procesos de intercambio iónico complementando la función de las branquias ionoreguladoras.
- Existe un mecanismo hormonal en las branquias ionoreguladoras de *Chasmagnathus granulatus* que interviene durante la aclimatación a baja salinidad a fin de mantener el balance de sales interno relativamente constante.
- La dopamina tiene una acción moduladora sobre los procesos de transporte iónico de branquias posteriores de *Chasmagnathus granulatus*.

Objetivos

- 1- Realizar estudios de microscopía electrónica, morfométricos y lectinohistoquímicos a fin de determinar si la estructura del branquiestegito presenta algún tipo de semejanzas con el epitelio de las branquias ionoreguladoras de *Chasmagnathus granulatus*.
- 2- Medir la actividad de la enzima anhidrasa carbónica en el revestimiento interno del branquiestegito de *Chasmagnathus granulatus* puesto que la misma es importante en los procesos de intercambio iónico.
- 3- Determinar el efecto de la dopamina e inductores de la vía del la adenilato ciclasa sobre el potencial transepitelial y sobre la captación activa de sodio en preparaciones de branquias posteriores aisladas perfundidas de *Chasmagnathus granulatus* en condiciones iso e hipo-osmóticas.

Materiales y Métodos.

1. Muestreo.

La colección de ejemplares macho adultos, del estadio C de intermuda (Drach y Tchernigovtzeff, 1967) de la especie *Chasmagnathus granulatus* se realizó mediante campañas (3 a 4 anuales) en la costa de Punta Rasa - San Clemente del Tuyú, provincia de Buenos Aires (36° 02' S, 56° 20' W, ver figura 5).

Los animales fueron aclimatados en peceras plásticas, con agua de mar de salinidad determinada, preparada con sales comerciales, aireación constante y libre acceso al medio aéreo. La alimentación fue realizada dos veces por semana con alimento balanceado para conejos y fue suspendida 48 horas antes de realizar cada experimento. Los individuos fueron mantenidos a una temperatura ambiente de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de 12L:12O. La alimentación de los individuos fue suspendida 48 horas antes de realizar cada experimento.

2. Estadística.

Las comparaciones estadísticas entre medias de diferentes tratamientos se realizaron mediante tests t de Student para muestras pareadas (2 tratamientos) o análisis de varianza de 1 factor (más de 2 tratamientos). En el caso de determinar el efecto de distintas drogas a los largo del tiempo o en la actividad enzimática de un mismo tejido, se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas (Sokal y Rohlf, 1981). Se consideraron como significativas las diferencias con un $p < 0.05$. Las medias se graficaron siempre con el error estándar.

3. Estudio Morfológico y Funcional del Branquiostegito.

3.1. Microscopía Óptica.

La porción dorsal del caparazón de 4 individuos de *Chasmagnathus granulatus* previamente sacrificados, fue fijada en mezcla fijadora de Bouin durante 24 hs. Se utilizó como método de descalcificación, la inclusión de las muestras en una solución de ácido nítrico al 5% durante 20 hs. (hasta comprobar que el tejido estuviese blando). Luego de esto, las piezas fueron lavadas con alumbre de hierro al 5% durante 24 horas para evitar el hinchamiento del tejido. Las piezas fueron enjuagadas en agua corriente, deshidratadas utilizando una serie de alcoholes de gradación creciente y finalmente incluidas en Paraplast.

Se realizaron cortes histológicos seriados de 7 μm de espesor en dirección dorsal-ventral y en dirección anterior-posterior al caparazón del animal. Los cortes fueron montados en porta objetos de vidrio con albúmina, se colorearon con hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson modificado por De Carlo (com. pers.) y se observaron en un microscopio con cámara clara adosada las diferentes estructuras (pliegues de la pared interna, bandas musculares, glándulas tegumentales, etc.) a fin de determinar, mediante dibujos, la estructura tridimensional del órgano.

Se utilizaron las siguientes técnicas especiales de coloración: Fränkel para fibras elásticas, coloración de Cain, técnica histoquímica de PAS (ácido periódico y reactivo de Schiff), Alcian Blue pH 3.5 (para identificar mucopolisacáridos ácidos), coloración de Mowry (PAS + Alcian Blue).

Las observaciones y micrografías se realizaron en un fotomicroscopio Zeiss Axioplan o en un Zeiss Axiostar con cámara digital. El cálculo de las distancias de difusión a través de la pared interna del

branquiostegito se hizo en un microscopio binocular conectado a un sistema de análisis de imágenes Leica Quantimet 50.

3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.

Se fijaron secciones de la pared lateral y dorsal del branquiostegito en glutaraldehído 2.5% en buffer cacodilato de sodio 0.4 M a pH 7.4, ajustado a 650 mOsm l^{-1} con sacarosa. Se postfijó en tetróxido de osmio al 1% a 4°C durante 60 minutos. Luego de esto, las piezas fueron enjuagadas en buffer, deshidratadas en una serie de alcoholes de gradación creciente y acetona e incluidas en resina Spurr. Se realizaron cortes de 750–900 Å de espesor con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B y se contrastaron con una doble coloración con acetato de uranilo 45 minutos a temperatura ambiente y citrato de plomo por 3 minutos a temperatura ambiente. Las micrografías fueron realizadas en un microscopio electrónico Zeiss EM T109 operado a 80 kV. Los cortes semifinos (1µm) se colorearon con azul de toluidina 1% en Na₂CO₃ 1%. Las fotografías se realizaron en un microscopio con cámara M35 Reichert Polivar III.

3.3. Inmunomarcación de Proteínas Involucradas en la Contracción Muscular.

Se utilizaron cortes de branquiostegito de 7 µm de espesor fijados en Bouin. Los cortes se desparafinaron en xilol y se hidrataron a través de una serie de alcoholes de gradación decreciente, partiendo desde alcohol 100° hasta llegar a buffer fosfato salino (PBS). El bloqueo de las enzimas peroxidadas endógenas se realizó con H₂O₂ 3% en metanol durante 20 minutos. Los cortes fueron lavados con PBS y se practicó otro bloqueo

con suero normal durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con el primer anticuerpo diluido en PBS (1:40) durante 24 horas a 5°C (anti-actina levantado en conejo ó anti-desmina levantado en conejo, Sigma Immuno Chemicals-USA), se lavaron con PBS y se bloquearon otra vez con suero normal durante 1 hora. Se incubaron con el segundo anticuerpo biotinilado diluido en PBS (1:100) durante 45 minutos a temperatura ambiente (anti-conejo IgG (H+L) biotinilado, Vector Laboratories-USA) y se incubaron con el complejo avidina-biotina durante 1 hora. Los preparados fueron revelados con diaminobencidina (DAB), deshidratados y montados con DPX.

3.4. Determinación de la Superficie Interna del Branquiostegito y del Volumen de las Cámaras Branquiales.

Se determinó la superficie interna de las cámaras branquiales de 10 individuos de *C. granulatus* utilizando moldes de látex natural prevulcanizado y líquido coagulante (100:5). Los individuos fueron sacrificados y previamente a la inyección del látex, se procedió a una cuidadosa extracción de las branquias a través de los orificios de Milne-Edwards y secado de las cámaras branquiales aplicando un papel absorbente sobre los orificios exhalantes. Una vez concluido el tiempo de coagulación (2 horas) se extrajo la parte superior del caparazón de cada individuo quedando a la vista la superficie interna la cual fue copiada sobre papel milimetrado. Estos valores de superficie fueron comparados con los valores calculados para branquias respiratorias de la misma especie (Luquet *et al*, 2000).

El volumen de las cámaras branquiales se determinó sumergiendo los moldes de látex en una probeta graduada y midiendo el volumen de agua desplazado.

3.5. Estudio de la Distribución de Azúcares Mediante Uso de Lectinas.

Se fijaron branquias respiratorias, branquias ionorreguladoras y secciones de branquiestegito de *C. granulatus* en HgCl₂ 6%, glutaraldehído 0.1%, CH₃COO⁻Na⁺ durante 6 horas y se lavaron en PBS a 4°C durante 24 horas. Se deshidrataron en alcoholes de gradación creciente, se pasaron por xilol y se incluyeron en Paraplast. Se realizaron cortes histológicos de 7µm de espesor, los cuales fueron tratados con las lectinas listadas en la tabla 2, reveladas por fluorescencia o con Diaminobencidina (DAB).

Lectina	Residuo
CON A	α-D-manosa > α-glucosa
JACALINA	α-galactosa
PNA	galactosa terminal, β 1,3N-acetilgalactosamina
RCA	β-galactosa; β-N-acetilgalactosamina
SBA	α-N-acetilgalactosamina
SUC CON A	α-D-manosa
UEA I	α-fucosa
WGA	N-acetilglucosamina; quitobiosa

Tabla 2: residuos de azúcares de unión preferencial de lectinas.

3.6. Determinación de la Actividad Enzimática de Anhidrasa Carbónica en Branquiostegito.

Se determinó la actividad enzimática en homogenatos de branquiostegitos, branquias respiratorias (como control positivo) y tejido muscular de individuos aclimatados a 10%. El tejido se homogeneizó en 10 volúmenes de buffer Tris (225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 10 mM Tris), ajustado a un pH de 7.4 con ácido fosfórico al 10%. Cada muestra de 100 μ l de homogenato se sembró en un recipiente que contenía 2.5 ml de buffer Tris a 4°C, al que se agregaron 200 μ l de solución saturada de CO₂. Inmediatamente después se registró el descenso de pH de la solución del recipiente usando un electrodo específico. La tasa de hidratación del CO₂ está representada por el cambio de pH en el tiempo.

La concentración de proteína en la muestra se determinó con el método de Bradford (1976). La actividad enzimática se expresa en mg⁻¹ y fue calculada por la siguiente fórmula (Burnett *et al*, 1981):

$$actividad = \frac{\left\{ \left(\frac{TC}{TNC} \right) - 1 \right\}}{mg}$$

donde TC es la tasa catalizada

TNC es la tasa no catalizada

y mg son los miligramos de proteínas en la muestra.

4. Control Neuroendócrino de la Captación Activa de NaCl.

4.1. Preparaciones de Branquias Aisladas Perfundidas.

Los individuos fueron sacrificados mediante la destrucción del ganglio nervioso ventral, utilizando un elemento punzante sobre la superficie ventral. Luego de abrir al animal, se extrajeron cuidadosamente las branquias posteriores (6, 7 y 8) cortándolas desde su base y las mismas fueron colocadas en una caja de Petri con solución la salina de concentración iónica similar a la hemolinfa. Cada branquia fue canulada utilizando un tubo de polietileno de 0.5 mm de diámetro a través del canal aferente, mientras que el otro extremo del tubo se conectó a una bomba peristáltica, encargada de propulsar el líquido de perfusión. Al canal eferente de la branquia, se conectó una cánula similar cuyo contenido fue colectado en un pequeño vaso de precipitado (1), tal como se indica en la figura 8. El flujo de la bomba se mantuvo constante durante los experimentos y fue de 0.1 ml min^{-1} .

Esta preparación se mantuvo con ayuda de un broche de acrílico dentro de un pequeño vaso de precipitado (2) que contenía una solución salina adecuada (baño) y constante aireación. Las perfusiones se hicieron siempre en condiciones simétricas, es decir, que el perfusato y baño fueron de igual composición salvo que el primero contenía además, 2 mmol l^{-1} de glucosa. Las soluciones salinas fueron ajustadas a pH fisiológico (7.75) utilizando Tris Base (Luquet y Ansaldi, 1997). La diferencia de potencial entre el interior de la branquia y el medio externo se registró por medio de dos electrodos de Ag/AgCl que estaban en contacto con los recipientes (1) y (2) a través de puentes de agar (figura 7).

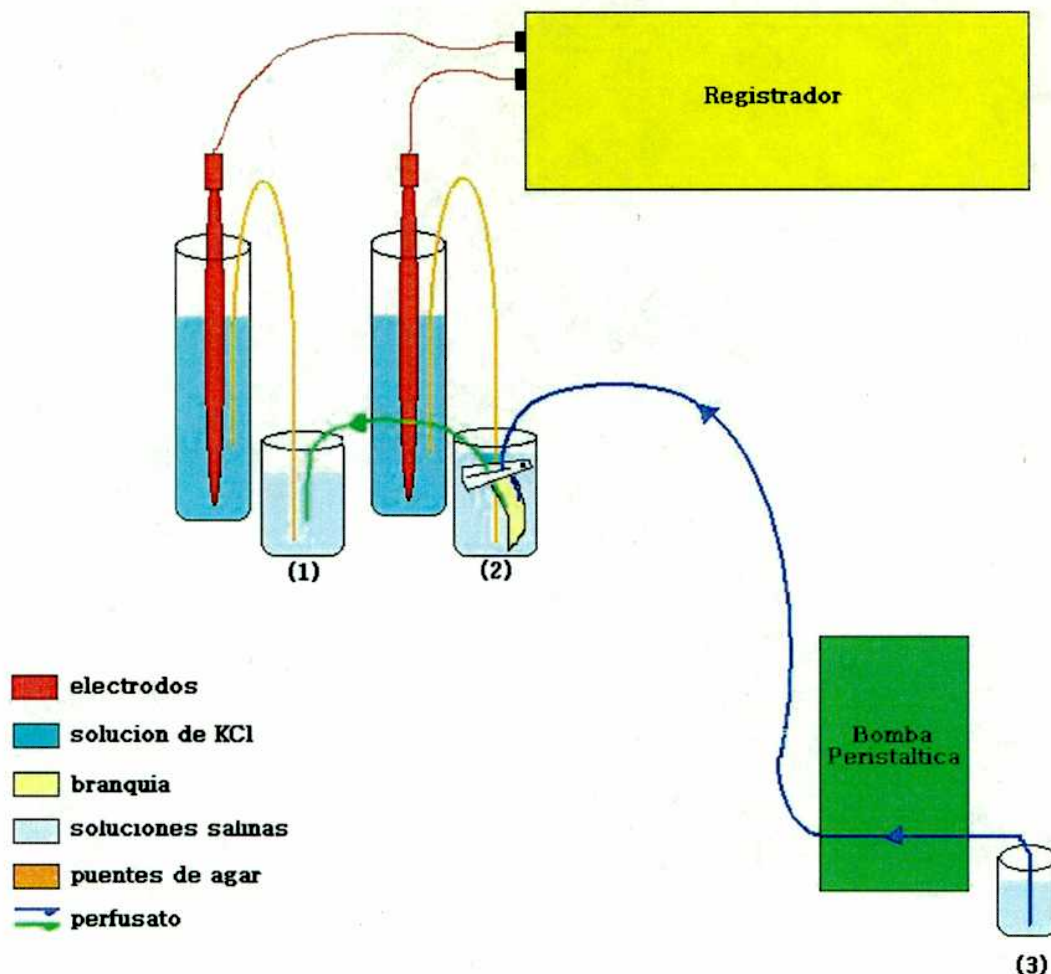


Figura 7: Equipo utilizado para las perfusiones de branquias de *Chasmagnathus granulatus*. El vaso de precipitado (1) contiene el perfusato colectado luego de su paso por la branquia y representa la continuidad eléctrica del lado interno del epitelio branquial; el vaso (2) es el baño salino y representa el medio externo y en el vaso (3) que contiene el perfusato se agregan las sustancias cuyo efecto se quiere probar.

4.2. Efectos de Dopamina y Diferentes Compuestos que Estimulan la vía del cAMP en Condiciones Iso-Osmóticas.

Se perfundieron en condiciones simétricas con solución salina 30%, branquias posteriores de individuos aclimatados a 10%. Estas salinidades (de aclimatación y perfusión) fueron cuidadosamente elegidas de modo tal

que el animal tuviera sus branquias estructuralmente y bioquímicamente adaptadas a procesos de hiper-regulación iónica (por ello la baja salinidad de aclimatación), pero que al momento del experimento no interfiriera ningún estímulo externo que no fuese el agregado artificialmente al perfusato (tabla 3). Por ello se perfundieron con solución salina iso-iónica (30‰) con respecto al medio interno del animal. En este perfusato, se agregaron diferentes compuestos y se registraron sus efectos sobre la diferencia de potencial transepitelial (TEPD) de las branquias. Antes de la perfusión con el compuesto a probar, se esperó a que la branquia alcanzara una TEPD estable, lo cual requirió al menos 30 minutos.

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Hepes	NaHCO ₃
Soluciones salinas	(mmol l ⁻¹)					
10 ‰	156	3.15	2.50	4.17	5.00	2.50
20 ‰	312	6.30	4.66	8.35	5.00	2.50
30 ‰	468	9.46	7.50	12.53	5.00	2.50
40 ‰	625	12.59	10.00	16.71	5.00	2.50

Tabla 3: Composición de las soluciones salinas utilizadas en los experimentos. El perfusato siempre contiene también 2 mmol l⁻¹ de glucosa.

4.2.1. Perfusión con Dopamina. Curva Dosis-Respuesta.

Se probó el efecto de la 3-hidroxitiramina, o dopamina (DA), en una dosis de 5×10^{-4} mol l⁻¹, sobre la TEPD de las branquias posteriores. Cada branquia fue su propio control, tomando como control al valor del TEPD después de los 30 minutos de estabilización y previo a la llegada de la DA a la branquia. Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en

función del tiempo de perfusión. Se registraron 5 branquias y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de medidas repetidas y se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$.

Una vez registrado el efecto hiperpolarizante de la DA sobre la TEPD de las branquias posteriores, se probó sobre 5 grupos de branquias el efecto de 5 dosis de DA (una dosis para cada grupo) y se registró la respuesta sobre la TEPD de la branquia. Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en función del tiempo de perfusión. Se analizaron como mínimo 5 branquias y como máximo 16 para cada dosis probada y se analizaron los resultados mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$.

4.2.2. Perfusión con cp-cAMP, IBMX y Forskolina.

A fin de determinar si estos compuestos imitaban a la DA en su efecto sobre la TEPD de las branquias posteriores, se perfundieron branquias con solución salina 30% + 10^{-5} mol l^{-1} del análogo de cAMP permeable a la membrana, cp-cAMP; solución salina 30% + 10^{-6} mol l^{-1} del inductor de la adenilato ciclasa, forskolina (Seamon *et al*, 1981), solución salina 30% + 5×10^{-6} mol l^{-1} del inhibidor de la fosfodiesterasa, IBMX (Chasin y Harris, 1976). Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en función del tiempo de perfusión. Se registraron como mínimo 5 branquias y para cada compuesto probado y se analizaron los resultados mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$.

4.2.3. Perfusión con Dopamina en Baño Libre de Na⁺.

Estas fueron las únicas perfusiones que no se hicieron en condiciones simétricas. En este caso, se registró el cambio en la TEPD luego de perfundir branquias con DA pero estando las mismas, en un baño de solución salina 30% preparada con cloruro de colina y KHCO₃ (solución salina libre de Na⁺), a fin de determinar si la DA seguía teniendo un efecto hiperpolarizante sobre el TEPD en ausencia de Na⁺. Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en función del tiempo de perfusión. Se registraron 6 branquias y se analizaron los resultados mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$.

4.2.4. Determinación del Ingreso de Na⁺ en Branquias Perfundidas con Dopamina usando ²²Na.

Se perfundieron branquias posteriores con una solución salina 30% en condiciones simétricas. Una vez estabilizado el TEPD, se reemplazó el baño por otro de igual composición iónica que contenía 0.25 μCi de ²²Na (Amersham Pharmacia Biotech) e inmediatamente después se procedió a la colección de muestras de perfusato cada 10 minutos. Se tomaron entre 4 y 5 muestras.

Una vez colectada la última muestra, se reemplazó el perfusato por otro de igual composición iónica pero conteniendo $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de DA y se procedió a la colección de 9 a 10 muestras más de perfusato cada 10 minutos. La radiactividad de las muestras se midió con un equipo Canberra Series 35 con contador de centelleo γ . La captación activa de Na⁺, expresado en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, se calculó según la siguiente fórmula:

$$J_{in} = \frac{\{cpm * S\}}{\{SRA * g\}}$$

donde:

cpm es la radiactividad de la muestra en cuentas/min⁻¹.

S es el número de muestras colectadas en 1 hora.

SRA es la radiactividad específica del baño en cpm / μ equiv⁻¹.

g son los gramos de branquia.

Se graficaron los resultados como flujo de Na⁺ en función del tiempo de perfusión y como cuentas acumuladas en función del tiempo de perfusión.

Todos los experimentos con ²²Na se realizaron en los laboratorios activos del INQUIMAE de la FCEyN de la UBA.

4.2.5. Perfusión con Dopamina en Branquias Estimuladas.

Se realizó una serie de 8 perfusiones en branquias de animales aclimatados a baja salinidad, usando como perfusato inicial una solución salina de concentración iónica similar a la hemolinfa (30‰). Luego de alcanzar la estabilización del TEPD, se reemplazó el perfusato por otro de 30‰ más forskolina 10⁻⁶ mol l⁻¹, cuyo efecto activador sobre el TEPD se comprobó en el experimento del punto 4.2.2. En esta condición de “branquia activada” (hiperpolarización de TEPD), se cambió el perfusato por otro igual con el agregado de DA 10⁻⁵ mol l⁻¹. Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en función del tiempo de perfusión. Se registraron 8 branquias y se analizaron los resultados mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos los resultados con p < 0.05.

4.3. Efectos de Dopamina en Branquias Perfundidas en Condiciones Hipo-osmóticas.

Se realizó una serie de perfusiones en branquias de animales aclimatados a baja salinidad, usando como perfusato inicial una solución salina iso-osmótica a la hemolinfa (30%). Luego de alcanzar la estabilización del TEPD, se reemplazaron simétricamente el perfusato y el baño por otros con solución hipo-osmótica (20%). Luego de 30 minutos, se reemplazó el perfusato por otro de 20% mas DA 10^{-5} mol l⁻¹. Los resultados se registraron en gráficos de TEPD en función del tiempo de perfusión. Se registraron 6 branquias y se analizaron los resultados mediante análisis de varianza de medidas repetidas. Se consideraron significativos los resultados con $p < 0.05$.

4.4. Ensayos Bioquímicos.

4.4.1. Determinación de la Concentración Branquial de cAMP en Branquias pre-Incubadas con Dopamina.

Se incubaron branquias posteriores de individuos aclimatados a 10‰ en tubos plásticos con 0.5 ml de una solución salina 30‰ + 10^{-5} mol l⁻¹ de DA (experimentales) o en solución salina 30‰ (control) durante 10 minutos. Para la incubación, las branquias fueron cortadas en pequeñas piezas a fin de facilitar el acceso de la DA a las células. Se midió el contenido de cAMP utilizando un kit de ensayo de cAMP [³H] (DPC Diagnostic Products Corporation, USA) que se basa en el principio de competencia entre ³HcAMP y cAMP libre por la proteína de unión. Si se mantienen las cantidades de la proteína y del ³HcAMP constantes, mientras se agregan cantidades crecientes de cAMP sin marcar, se produce un incremento en el desplazamiento del ³HcAMP por el cAMP sin

marcar. Se obtienen las cuentas de la proteína como una función de la concentración de cAMP y son graficadas entonces como una curva de calibración donde las muestras incógnitas pueden ser leídas.

Luego de los 10 minutos de incubación con DA (experimental) o solución salina común (control), el medio fue cuidadosamente extraído de cada tubo plástico con una pipeta Pasteur e inmediatamente se congelaron las muestras de tejido usando N₂ líquido. Se homogeneizó el tejido de cada tubo en 4 volúmenes de ácido perclórico y se llevó a pH 5.5–6.0 con una solución de bicarbonato de potasio 30% (P/V). Se realizó luego una centrifugación a 4°C en una centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5415D) durante 5 minutos a 15000 x g y se utilizaron muestras de los sobrenadantes (cada muestra por duplicado) para la determinación del contenido de cAMP.

Las medias de las branquias controles y branquias experimentales, fueron estadísticamente comparadas con un test t de Student y se consideraron significativas las diferencias con $p < 0.05$.

4.4.2. Efecto de la Transferencia a Baja Salinidad sobre la Concentración Branquial de cAMP.

Se midió el contenido de cAMP en las branquias de individuos aclimatados a 30‰ y transferidos a baja salinidad (10‰). La homogenización se realizó a distintos tiempos de transferencia a baja salinidad: 0, 10, 20, 30 y 60 minutos. El protocolo que se siguió es el mismo al descrito en el punto anterior.

Para cada tiempo de transferencia se usaron muestras independientes (n=5). Las medias de los distintos tiempos fueron comparadas estadísticamente con un análisis de varianza de 1 factor

(tiempo de transferencia) y se consideraron significativas las diferencias con $p < 0.05$.

4.4.3. Determinación de la Actividad Enzimática de Na^+ , K^+ - ATPasa en Branquias pre-Incubadas con Dopamina.

Se preincubaron branquias (previamente cortadas en pequeños fragmentos para facilitar el acceso de la amina) de individuos aclimatados a 10‰ en una solución salina con 10^{-5} mol l^{-1} de DA. Se probaron 2 tiempos de incubación: 10 y 20 minutos. Luego, las branquias se homogeneizaron en 20 volúmenes de buffer de ensayo (12.5 mmol l^{-1} NaCl; 1 mmol l^{-1} Hepes; 0.5 mmol l^{-1} EDTA; 0.5 mol l^{-1} PMSF y se ajustó el pH a 7.6 con NaOH 5%). Se realizó una centrifugación a 11000xg a 4°C durante 20 min. Se resuspendieron los pellets en 350 μl de buffer de ensayo y se conservaron en frío. La actividad de la enzima Na^+ , K^+ - ATPasa se determinó en (A) 500 μl de una solución que contenía 100 mmol l^{-1} NaCl; 15 mmol l^{-1} Imidazol; 3 mmol l^{-1} Na_2ATP ; 5 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.1 mmol l^{-1} EDTA y 12.5 mmol l^{-1} KCl y en (B) la misma solución pero con 1 mmol l^{-1} de ouabaina (inhibidor específico de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa) y sin KCl. Se agregaron alícuotas de 10 μl de cada muestra a las soluciones de incubación (A y B) y se incubaron en un baño termostático a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo por adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 8.6% frío. El fósforo liberado fue cuantificado colorimétricamente por adición de 1 ml de una solución de sulfato ferroso (Fe_2SO_4) 9.2%; heptamolibdato de amonio (MoO_3) 1.14% en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3.63%. Se midió absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro Jasco 7850 UV/VIS. La diferencia entre ambas determinaciones (A y B) da como resultado la actividad de la enzima Na^+ ,

K⁺-ATPasa. La determinación de la concentración de proteínas según el método de Lowry *et al*, 1951. Los resultados se expresaron en P_i h⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Para los tratamientos control (pre-incubación en solución salina) y experimental (pre-incubación en solución salina + DA) de cada tiempo de incubación (10 y 20 min), se utilizaron muestras de branquias pareadas. Las medias fueron comparadas estadísticamente con un análisis de varianza de 2 factores (tiempo y tratamiento) y se consideraron significativas las diferencias cuyo p<0.05.

4.4.4. Determinación de la Actividad Enzimática de Na⁺, K⁺-ATPasa en Branquias Incubadas con cp-cAMP, Pki y Forskolina.

A fin de corroborar si la Na⁺, K⁺-ATPasa tiene una activación dependiente de cAMP se determinó la actividad específica de esta enzima (siguiendo el mismo protocolo que se describe más arriba) en branquias de animales aclimatados a 10‰. Las branquias fueron previamente incubadas con forskolina (inductor de la adenilato ciclasa) 10⁻⁴ mol l⁻¹ en solución salina 30‰ durante 10 minutos. En el mismo experimento, se determinó si la actividad enzimática era afectada por la presencia de teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa) 2.5 mmol l⁻¹.

Se realizó otra serie de experimentos con el objeto de comprobar si la activación de la Na⁺, K⁺-ATPasa se produce por la vía de una proteína quinasa A, PKA. Para ello se midió la actividad específica de la enzima Na⁺, K⁺-ATPasa en muestras de branquias de individuos aclimatados a 10‰. Al momento de la incubación en el baño termostático, se ensayaron 3 tratamientos diferentes: se agregaron al medio de incubación 5 µl de

buffer (control); 10^{-5} mol l⁻¹ de cp-cAMP (experimental) y 10^{-5} mol l⁻¹ de cp-cAMP + 2×10^{-6} mol l⁻¹ del inhibidor de la actividad de la proteína quinasa A, PKi, (experimental).

4.5. Ensayos Histológicos e Inmunomarcaciones.

4.5.1. Inmunomarcación de Proteína G en Branquias.

Se determinó la presencia de proteína G₀ y G_i en cortes histológicos de 7µm de espesor de branquiostegito, branquias respiratorias e ionoreguladoras de animales aclimatados a 10‰, 30‰ ó 45‰. El material utilizado se fijó en Bouin y se procesó siguiendo los mismos protocolos que los descritos para branquiostegito y branquias (ver página 80). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: policlonal levantado en conejo anti-G_{ai-2} (T-19) y policlonal levantado en conejo anti-G_{α0} (K-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.-USA). Para todos los casos se utilizó un segundo anticuerpo biotinilado IgG levantado en conejo (Vector laboratories-USA), se incubó con el complejo ABC (Avidin-Biotin Complex) y se reveló con diaminobencidina (DAB).

4.5.2. Caracterización Histológica del Órgano Pericárdico.

Como ya se comentó en la Introducción de este trabajo, el órgano pericárdico esta descrito como en la literatura como una delicada red de terminales nerviosas de neuronas cuyos somas se encuentran en ganglios de la cadena ventral (ganglio supraesofágico). Esta red de terminaciones nerviosas se encuentra rodeando a los sacos pericárdicos del animal.

Puesto que *C. granulatus* es una especie de tamaño relativamente pequeño, si se la compara con otras especies hiper-reguladoras comúnmente estudiadas como *Carcinus maenas* o *Eriocheir sinensis*,

resulta muy dificultoso poder identificar y fijar el órgano pericárdico. Por este motivo, se decidió fijar todo el corazón y sacos pericárdicos para su posterior identificación y descripción.

Se sacrificaron 6 individuos aclimatados a 10‰, 30‰ y 45‰ y se fijó a cada uno de los individuos en mezcla de fijador Bouin, durante al menos 24 horas. Pasado el tiempo de fijación, se procedió a una cuidadosa disección a fin de separar corazón y sacos pericárdicos. Una vez identificado, el tejido cardíaco fue deshidratado en una serie de alcoholes de gradación creciente e incluido en Paraplast.

La descripción histológica general se realizó sobre cortes de 7 µm utilizando como técnicas de coloración, hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson modificado. Las micrografías se realizaron en un fotomicroscopio (Zeiss Axiostar con cámara digital).

4.5.3. Identificación de Terminaciones Nerviosas.

Sobre cortes de 7 µm de espesor de tejido cardíaco fijado en Bouin proveniente de animales aclimatados a baja salinidad (10‰), se practicó una técnica específica para reconocimiento de terminaciones nerviosas y neurofibrillas, denominada Técnica de Savier-Munger. Esta técnica se basa en el principio de precipitación de plata sobre el tejido nervioso. Las micrografías se realizaron en un fotomicroscopio (Zeiss Axiostar con cámara digital).

4.5.4. Inmunomarcación de Células Dopaminérgicas en Órgano Pericárdico.

Se realizarán estudios inmunocitoquímicos con el objeto de determinar la presencia y distribución de fibras nerviosas que expresan

DA en órgano pericárdico de *C. granulatus*. Para ello, se fijaron corazones de animales aclimatados a 10, 30, 45‰ en Bouin y se sometieron a una técnica inmunocitoquímica que utiliza como marcador, un anticuerpo contra tirosina hidroxilasa, enzima clave en la síntesis de DA y que está evolutivamente muy conservada.

Los preparados fueron desparafinados e hidratados hasta buffer PBS. Se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% en PBS durante 10 minutos y se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra tirosina hidroxilasa durante 48 horas a 5 °C. Luego se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado diluido en PBS (1:100) (anti-rabbit Vector) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de un enjuague en PBS, se incubaron con el complejo ABC durante 1 hora a temperatura ambiente y se revelaron con DAB.

Resultados

1. Estudio Morfológico y Funcional del Branquiestegito.

1.1. Microscopía Óptica e Inmunohistoquímica.

El estudio histológico revela que el branquiestegito de *Chasmagnathus granulatus* se compone de un tejido conectivo esponjoso delimitado por una cutícula quitinosa muy gruesa correspondiente a la pared externa del cuerpo del animal y una cutícula delgada, correspondiente a la pared interna (orientada hacia la cámara branquial) (figuras 8, 9, 10, 11 y 12). La cutícula externa es secretada por un epitelio cúbico simple, debajo del cual pueden observarse abundantes células pigmentarias o cromatóforos. La pared orientada hacia la cámara branquial es delgada y está formada por un epitelio plano que secreta una cutícula muy delgada, y juntos separan el lumen de la cámara branquial de la circulación del branquiestegito. La superficie de intercambio gaseoso se encuentra aumentada debido a la existencia de pliegues de la pared interna.

Subyacente a la pared interna se encuentra un tejido conectivo esponjoso con abundantes células polimórficas con núcleo periférico y con probable función de reserva (figuras 10 y 11). Los cortes histológicos tratados con la técnica de Caín mostraron abundantes células cuyo citoplasma contenía sustancias cromolipoides, mientras que otros, tratados con PAS, determinaron la presencia de células con glicoconjugados neutros (PAS positivas). También se observan numerosos senos o lagunas hemolinfáticas cercanas a la pared de intercambio que contienen diferentes hemocitos (figuras 8, 9, 10 y 12). Las lagunas están delimitadas

por fibras de tipo colágenas que determinan particiones delicadas de la circulación del branquiestegito.

Los cortes histológicos seriados revelaron un branquiestegito delgado con poco tejido conectivo esponjoso salvo en el ángulo donde se unen las zonas dorsal y lateral del caparazón y también en la zona ventral, más precisamente en la entrada a las cámaras branquiales.

Se observaron, a intervalos regulares, bandas musculares que unen la pared externa (pared del cuerpo) con la pared interna (que da a la cámara branquial), tanto en la zona lateral como en la dorsal (figuras 10 y 12). Si bien los resultados del análisis estructural y ultraestructural del branquiestegito determinaron la presencia de éstas fibras musculares, la inmunomarcación realizada para determinar presencia de actina y desmina en dichas fibras, dio resultados negativos. Tampoco se observaron las estriaciones típicas. Los cortes histológicos tratados con orceína nítrica (técnica de Fränkel) revelaron la presencia de fibras elásticas asociadas a las bandas musculares presentes en el branquiestegito.

En la zona ventral, luego de la entrada a la cámara branquial, la pared interna se adelgaza abruptamente y se pliega aumentando la superficie de intercambio (figura 10). Por debajo de esta pared (constituida por una delgada capa de cutícula y un epitelio plano subyacente) se encuentra un sistema de numerosas lagunas hemolinfáticas.

Los primeros cortes histológicos del estudio seriado realizado desde la zona dorsal hacia la ventral del caparazón del animal, mostraron lógicamente, una composición casi exclusiva de cutícula en la cual se diferencia la epicutícula del resto por su tinción basófila. A medida que se avanza en dirección ventral, empieza a hacerse evidente la luz de la cámara branquial, limitada por la cutícula interna más el epitelio plano

subyacente (revestimiento interno). Los cortes presentan, por debajo de la cutícula externa, una importante capa de tejido esponjoso con abundantes células de reserva. Hacia la zona en la cual se unen pared dorsal y lateral del caparazón, el revestimiento interno se pliega, aumentando la superficie. Asociadas al tejido esponjoso se observan diferentes tipos de glándulas tegumentales (figura 12). En los cortes también se observó la presencia de importantes bandas de músculo estriado, la mayoría cortadas transversalmente, lo cual indica que estos músculos son de orientación dorso-ventral (figura 13).

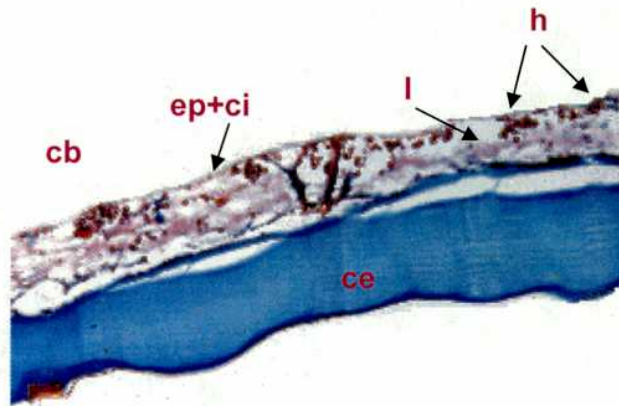


Figura 8: Corte transversal de la zonal lateral anterior del branquiostegito de *C. granulatus* coloreado con Tricrómico de Masson modificado por De Carlo (A: 300X).

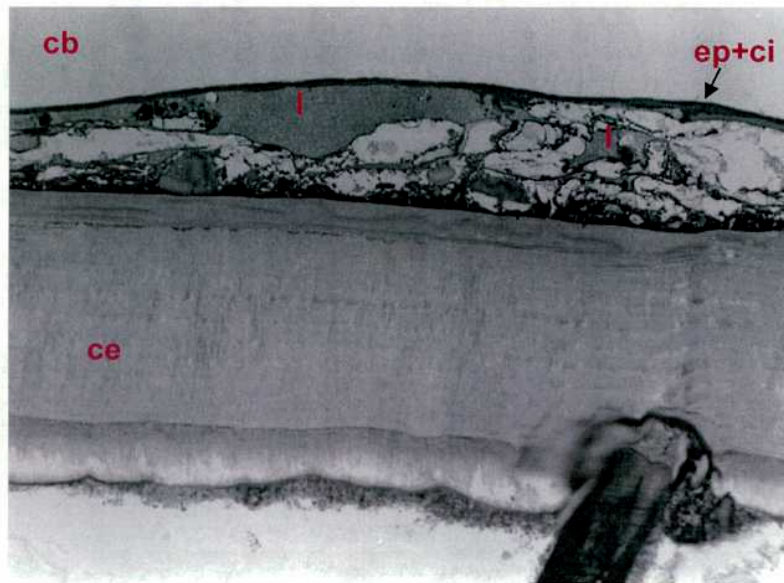


Figura 9: Corte semifino del branquiostegito de *C. granulatus* coloreado con azul de toluidina (A:125X). Nótese el sistema de lagunas hemolinfáticas por debajo del revestimiento interno.

Abreviaturas: cb: cámara branquial; ce: cutícula externa; ci: cutícula interna; ep: epitelio; l: lagunas hemolinfáticas; h: hemocitos.

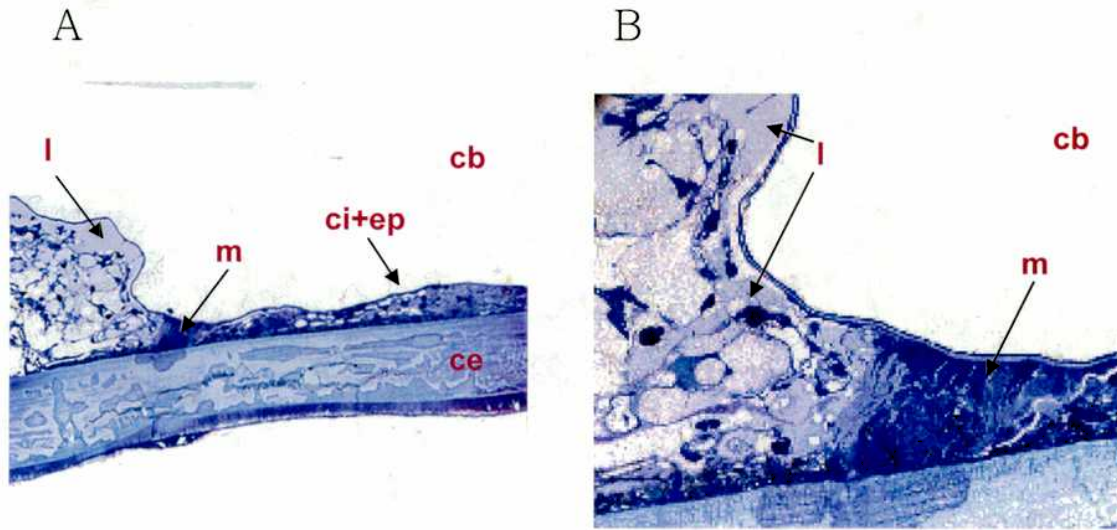


Figura 10: Cortes semifinos del branquiostegito de *C. granulatus* coloreados con azul de toluidina. A) Nótese como se pliega el tejido aumentando la superficie de intercambio (A:50X). B) Detalle de bandas musculares que unen la pared interna con la externa (A:125X).

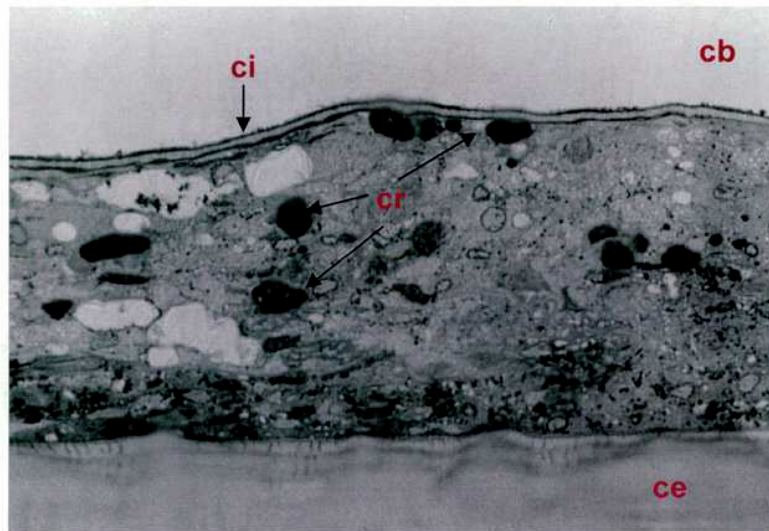


Figura 11: Corte semifino del branquiostegito de *C. granulatus* coloreado con azul de toluidina (A:125X). Obsérvese células de reserva y cromatóforos en el tejido conectivo esponjoso.

Abreviaturas: cb: cámara branquial; ce: cutícula externa; ci: cutícula interna; cr: células de reserva; ep: epitelio; l: lagunas hemolinfáticas; m: músculo.

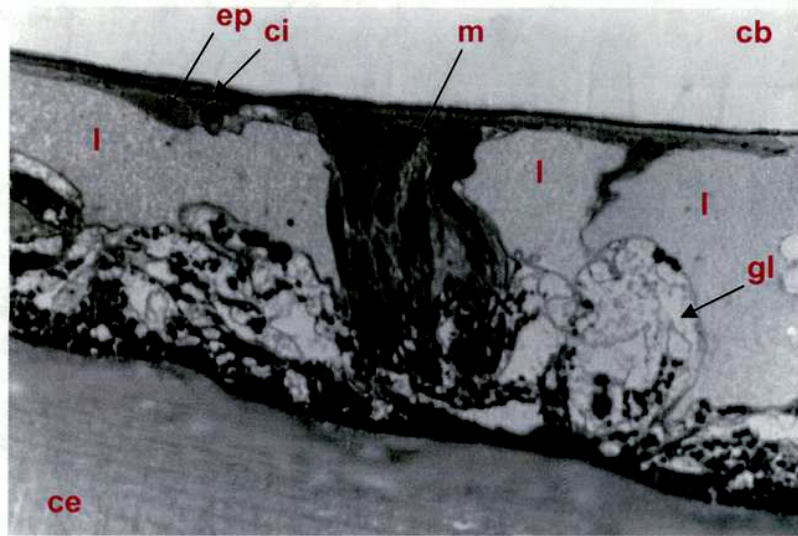


Figura 12: Corte semifino del branquiestegito de *C. granulatus* coloreado con azul de toluidina (A:125X). Obsérvese las bandas musculares que van desde la pared interna hasta la externa.

Abreviaturas: cb: cámara branquial; ce: cutícula externa; ci: cutícula interna; ep: epitelio; gl: glándula tegumental; l: lagunas hemolinfáticas; m: músculo.

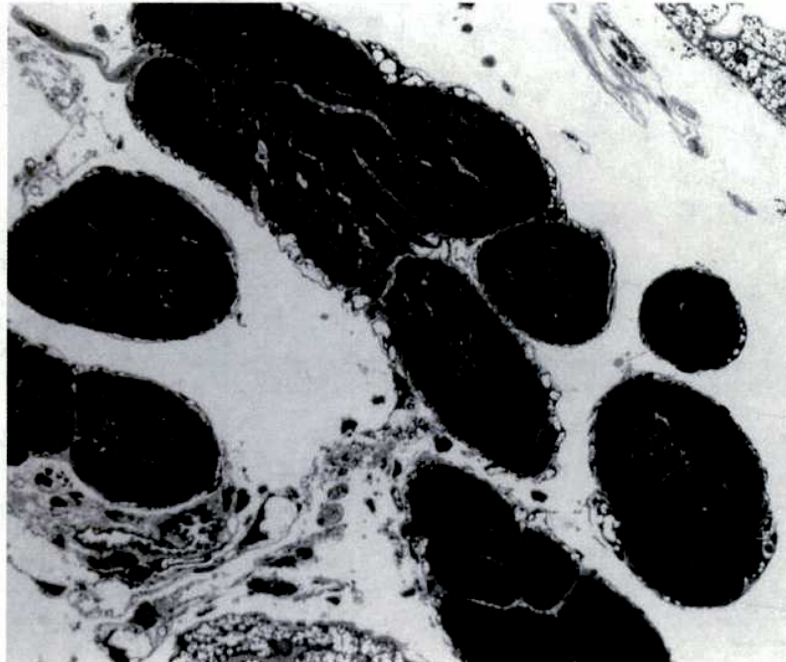


Figura 13: Corte semifino del branquiestegito de *C. granulatus* coloreado con azul de toluidina (A:125X). Obsérvese las bandas músculo estriado de orientación dorso-ventral.

1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.

Como se mencionó más arriba, las cámaras branquiales de *Chasmagnathus granulatus* están delimitadas por un tegumento interno constituido por un epitelio simple plano y una cutícula delgada. El tegumento interno disminuye su altura en sentido dorso-lateral. El epitelio está compuesto por células aplanadas de aproximadamente 0.57 μm de espesor y la cutícula (de 0.78 μm de espesor) está compuesta por la epicutícula, exocutícula y endocutícula las cuales se encuentran bien diferenciadas (figura 14). El epitelio descansa sobre una lámina basal gruesa de apariencia fibrilar que también se adelgaza en sentido dorso-lateral. Las células epiteliales adyacentes se encuentran unidas por uniones del tipo zonula adherens, desmosomas septados y uniones interdigitadas. La membrana plasmática de algunas células epiteliales presenta pocas pero a la vez profundas interdigitaciones y algunos pliegues apicales (figura 15). Los núcleos de las células epiteliales, son planos y de contorno irregular, con heterocromatina periférica y ocupan gran parte del volumen celular (figura 16). Las células prácticamente no presentan organelas en el citoplasma, salvo algunos cuerpos electro-densos y unas pocas mitocondrias polimórficas electro-densas con numerosas crestas. Algunas células epiteliales que presentan prolongaciones citoplasmáticas así como pliegues e interdigitaciones de la membrana basal también muestran particulares arreglos de microtúbulos, que ocupan gran parte de sus citoplasmas.

A intervalos periódicos se presentan bandas de tejido muscular asociado a abundantes fibras de tipo colágenas, las cuales se unen a células epiteliales modificadas a través de uniones del tipo zigzag, y se extienden hasta la cutícula externa (figura 16). Éste músculo difiere

ultraestructuralmente de las fibras estriadas de los músculos dorso-ventrales, ya que las estriaciones resultan difícilmente evidentes.

Láminas delgadas de tejido conectivo delimitan numerosas lagunas hemolinfáticas. Las más aplanadas se encuentran localizadas por debajo del epitelio respiratorio y constituyen lagunas respiratorias. Dichas lagunas se encuentran limitadas por una lámina basal que se continúa con la lámina basal del epitelio respiratorio (figuras 15 y 16).

Pequeñas arterias (de 6µm de diámetro) que presentan aspecto estrellado en corte transversal aparecen libres en el hemocoele, solamente soportadas por láminas delgadas de tejido conectivo (figura 17). La pared de las mismas está compuesta, desde el lado luminal, por una íntima con un glicocálix, un endotelio con numerosas interdigitaciones de membrana y una lámina basal externa.

La hemolinfa contiene hemocitos granulares (granulocitos) y hemocitos hialinos siendo los primeros los más abundantes (figura 18). Los granulocitos tienen una relación núcleo:citoplasma alta y presentan un núcleo irregular y central con cromatina condensada alrededor de la envoltura nuclear. El citoplasma contiene abundantes gránulos de tamaño variable, y emite prolongaciones características que entran en contacto con las prolongaciones citoplasmáticas de hemocitos vecinos u otros componentes de la matriz extracelular.

En el tejido conectivo esponjoso también se observan células grandes con delgados procesos citoplasmáticos e inclusiones lipídicas que son PAS y Alcian Blue (pH 3.5) positivas y abundantes cromatóforos cerca del epitelio que tapiza la pared externa del cuerpo.

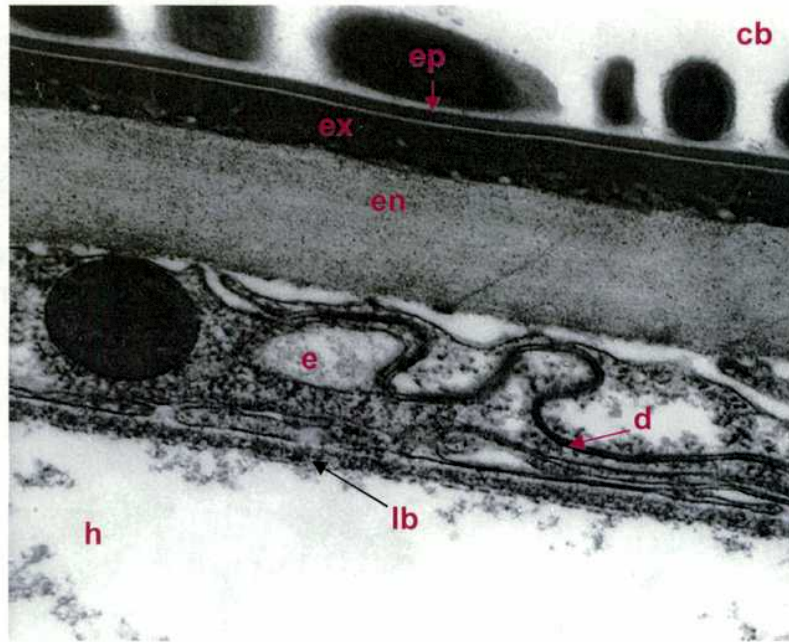


Figura 14: Micrografía electrónica del branquiostegito de *C. granulatus*. Detalle del epitelio plano orientado hacia la cámara branquial (30000X).

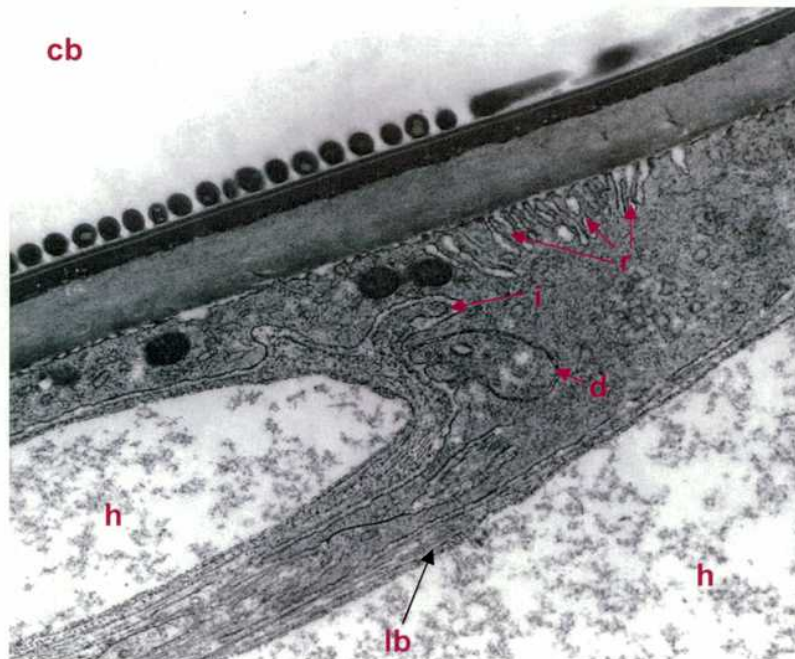


Figura 15: Micrografía electrónica del branquiostegito de *C. granulatus*. Célula epitelial con algunos repliegues apicales e interdigitaciones (12000X).

Abreviaturas: cb: cámara branquial; d: desmosomas septados; e: epitelio; en: endocutícula; ep: epicutícula; ex: exocutícula; h: hemolinfa; i: interdigitaciones de membrana; lb: lámina basal; r: repliegues de membrana apical.

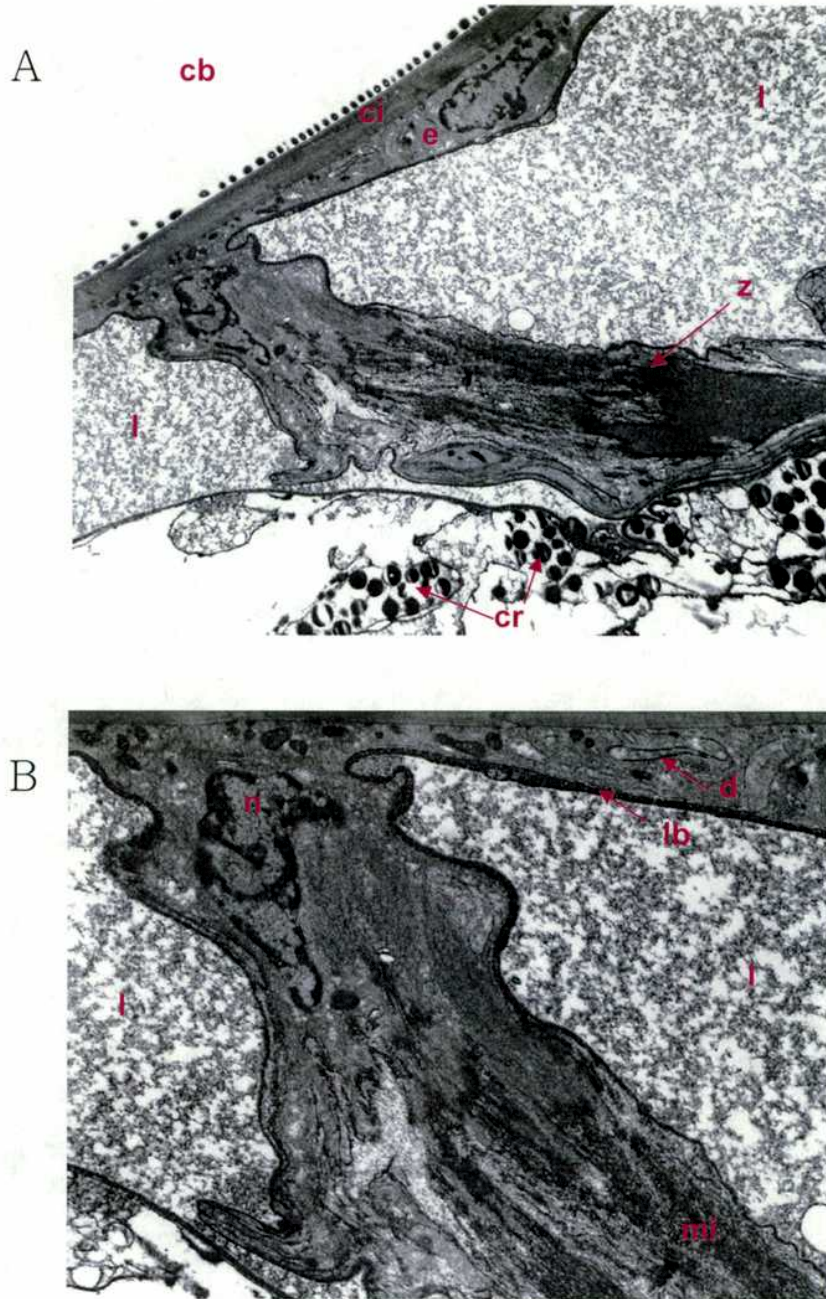


Figura 16: Micrografías electrónicas del branquiostegito de *C. granulatus*. A) Célula epitelial modificada (4500X). B) Detalle de los microtúbulos que conectan la célula a bandas musculares a través de uniones zig-zag (10000X).

Abreviaturas: cb: cámara branquial; ci: cutícula interna; cr: cromatóforos; e: epitelio; d: desmosoma septado; l: lagunas hemolinfáticas; lb: lámina basal; mi: microtúbulos; n: núcleo; z: uniones zig-zag.

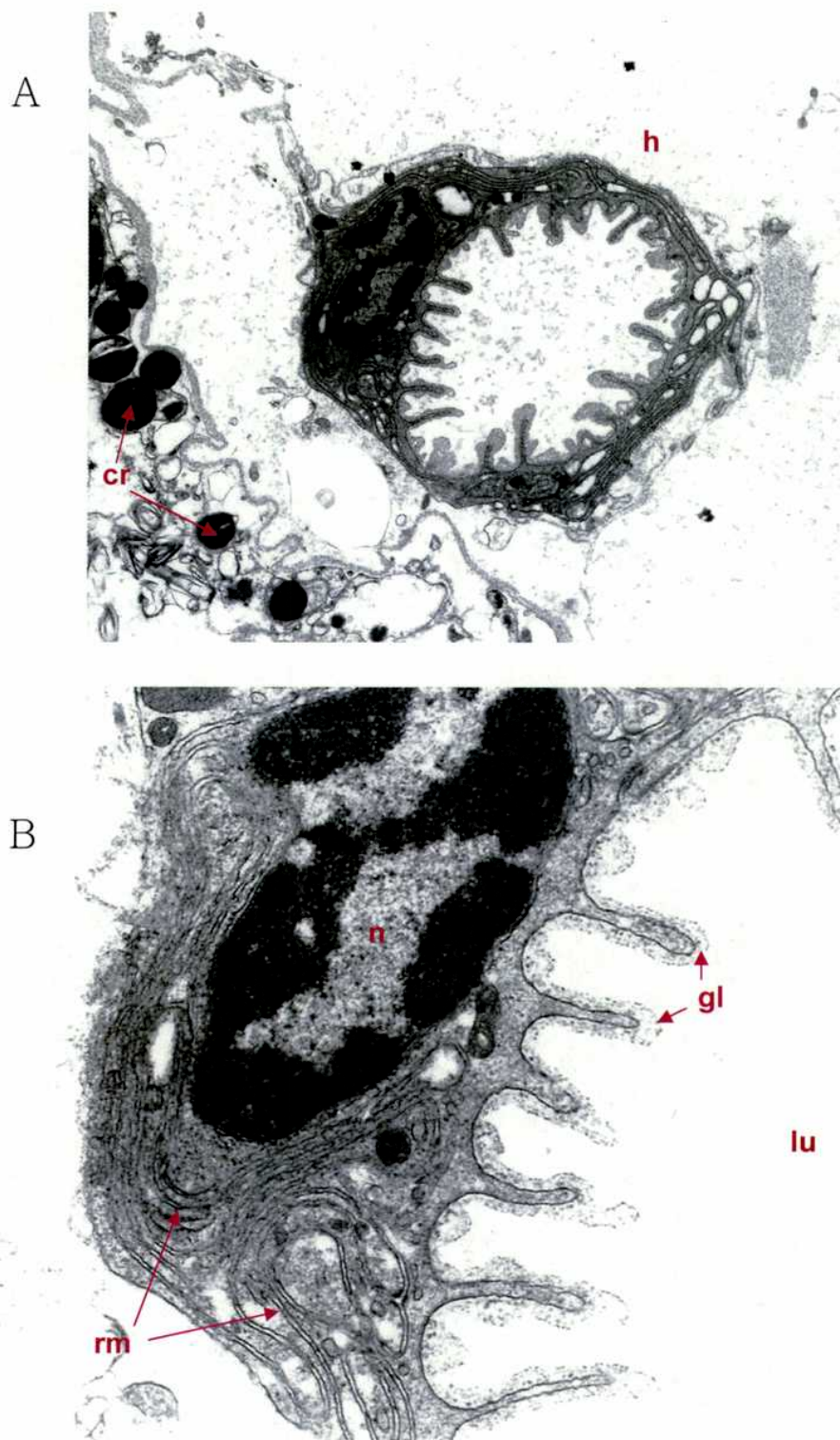


Figura 17: Micrografías electrónicas del branquiostegito de *C. granulatus*. A) Arteriola (4600X). B) Detalle de la célula endotelial (19000X).

Abreviaturas: cr: cromatóforos; gl: glucocálix; h: hemolinfa; lu: lumen del arteria; n: núcleo; rm: repliegues de membrana.

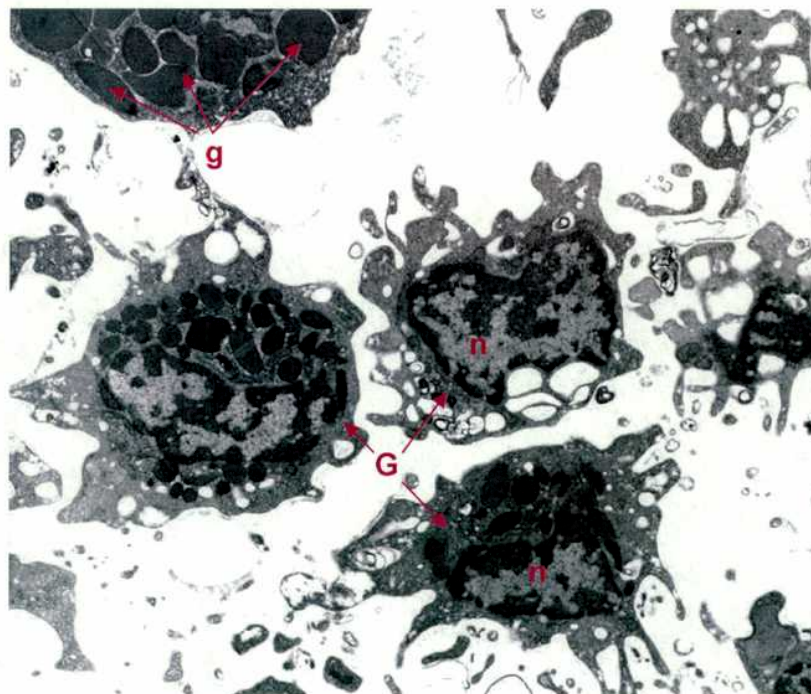


Figura 18: Micrografía electrónica del branquiestegito de *C. granulatus*. Hemocitos granulares o granulocitos (4300X).

Abreviaturas: cr: cromatóforos; g: gránulos; G: granulocitos (hemocitos); h: hemolinfa; n: núcleo.

1.3. Determinación de la Superficie Interna del Branquiestegito y del Volumen de las Cámaras Branquiales.

La determinación de la superficie libre del tegumento interno disponible para el intercambio de gases respiratorios arrojó un valor promedio de $11.4 \pm 0.3 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1}$ mientras que el volumen de las cámaras branquiales calculado fue de $48 \pm 3 \text{ } \mu\text{l g}^{-1}$.

En cuanto a la forma del revestimiento interno del branquiestegito, éste método no resultó apropiado ya que el látex que se utilizó resultó un material muy denso y por lo tanto incapaz de copiar estructuras tan delicadas como los pliegues de la pared interna.

1.4. Determinación de la Actividad Enzimática de Anhidrasa Carbónica.

El análisis de varianza realizado para la determinación de la actividad de anhidrasa carbónica mostró diferencias significativas entre las medias de los 3 tejidos probados ($p < 0.005$) (figura 19). La actividad de la enzima anhidrasa carbónica calculada en homogenatos de branquiostegito, si bien fue más alta que la registrada en tejido muscular, resultó significativamente menor que el valor promedio obtenido para las branquias respiratorias (consideradas como control positivo) de la misma especie aclimatada en las mismas condiciones hipo-osmóticas (figura 19):

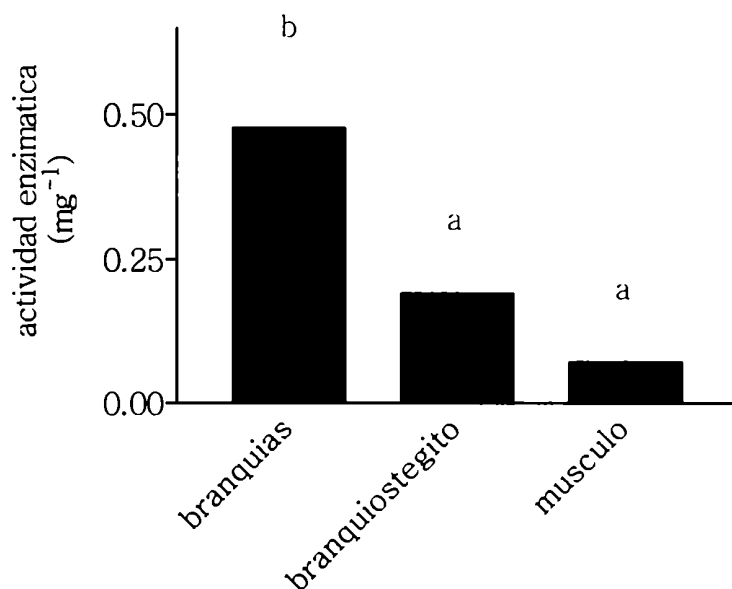


Figura 19: Actividad de la enzima anhidrasa carbónica en homogenatos de branquiostegito, branquias respiratorias y músculo de *C. granulatus* aclimatado a baja salinidad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$. Las barras graficadas simbolizan la media $\pm$ error estándar.

1.5. Estudio Comparativo de la Distribución de Azúcares Mediante Uso de Lectinas.

El objetivo de este estudio fue determinar si existía alguna similitud en la distribución de azúcares en el epitelio que reviste los órganos analizados (branquias anteriores, posteriores y branquiestegito). La comparación mediante el uso de lectinas específicas no fue lo suficientemente resolutoria para responder a dicho interrogante. Si bien fue posible diferenciar azúcares específicos entre las branquias respiratorias e ionoreguladoras, la presencia de abundantes células pigmentarias en el branquiestegito hizo que el mismo resultara positivo para la totalidad de las lectinas utilizadas.

A continuación se muestra la tabla 4 con los resultados de las marcaciones:

Lectina	branquia respiratoria	branquia ionorreguladora	branquiestegito
UEA Y			+++
WGA		+	+++
RCA	+	+	+++
CON A	+++	+++	+++
SUC CON A	+	+++	+++
SBA	+	+++	+++
JACALINA		-	+++

Tabla 4: Resultados cualitativos de la lectinohistoquímica: “-” indica ausencia de marcación; “+” indica escasa marcación; “++” indica moderada marcación y “+++” indica mucha marcación.

2. Control Neuroendócrino de la Captación Activa de NaCl.

2.1. Preparaciones de Branquias Aisladas Perfundidas en Condiciones Iso-Osmóticas.

2.1.1. Efecto de la Dopamina sobre la Diferencia de Potencial Transepitelial.

Cuando se perfundieron branquias posteriores (6 o 7) de *Chasmagnathus granulatus* con una solución salina isosmótica a la hemolinfa del animal (30‰), la diferencia de potencial transepitelial (TEPD) se estabilizó alrededor -1.5 mV.

Cuando se agregó al perfusato dopamina (DA) en una concentración de $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, se registró una hiperpolarización. Esto indicaría un efecto positivo de la amina sobre actividad eléctrica del epitelio o sobre su resistencia. La acción de la DA hace que potencial del interior de la branquia se vuelva aún más negativo con respecto al del medio externo (puesto que lleva el TEPD desde un valor de $-1.4 \pm 0.3 \text{ mV}$ a $-2.4 \pm 0.1 \text{ mV}$). Esto indica que la DA estaría estimulando el flujo de iones a través del epitelio branquial y dicho efecto es casi inmediato puesto que la hiperpolarización se inicia al momento que la droga llega a la branquia. Si se comparan los valores de TEPD al momento de perfusión con solución salina 30‰ (control) contra el momento de máxima estimulación causada por la perfusión con DA (experimental), se evidencia que el porcentaje de estimulación es superior al 70% para esta concentración ($n = 5$; $p < 0.05$) (figura 20).

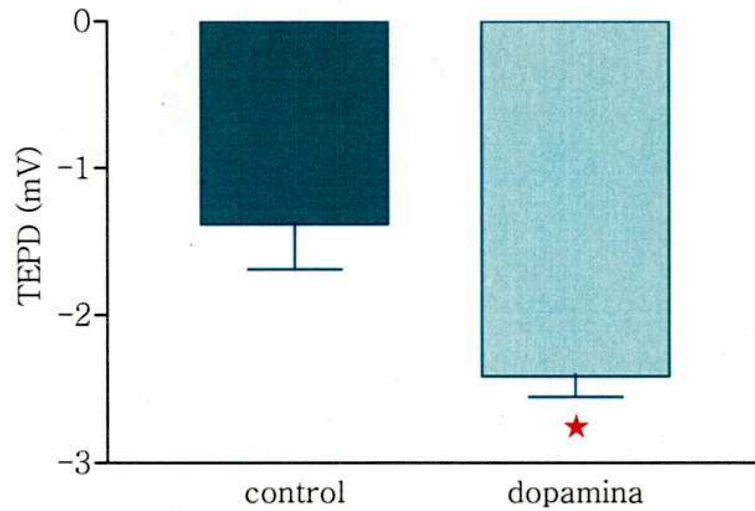


Figura 20: TEPD en 2 grupos de branquias perfundidas con solución salina 30‰ (control) o con solución salina 30‰ + dopamina $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (experimental). Las barras indican la media $\pm$ error estándar. ★ indica diferencias significativas ($p < 0.05$, $n = 5$).

Una vez que se corroboró el efecto inductor de la DA sobre el TEPD, se probaron diferentes concentraciones registrando su efecto a lo largo del tiempo. El análisis de medidas repetidas mostró que todas las dosis probadas, a excepción la más baja, afectaron significativamente el TEPD (tabla 5).

Dosis de DA en el perfusato (mol l^{-1})	n	p	Valor del TEPD antes (izq) y después (der) del la aplicación de DA (en mV).	
5×10^{-4}	5	0.009868	-1.4	-2.4
5×10^{-5}	4	0.027379	-1.9	-5.7
1×10^{-5}	7	0.000053	-3.2	-8.6
5×10^{-6}	10	0.000447	-3.1	-5.7
1×10^{-6}	6	0.060773	-1.15	-1.5

Tabla 5: Efecto de las distintas dosis de DA probadas en perfusiones de branquias posteriores de *C. granulatus*.

En la figura 21 se grafican las diferentes dosis de DA probadas en función del tiempo. La flecha indica el momento del cambio de perfusato control (solución salina 30‰) a perfusato experimental (solución salina 30‰ + DA). La dosis de $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ es la que produce mayor cambio en el TEPD y la que perdura por más tiempo. Sin embargo, es importante notar que para todas las dosis probadas, el efecto producido sobre el TEPD fue transitorio. Esto quiere decir que, aún en presencia de una perfusión continua con DA, la respuesta no se mantuvo a lo largo del tiempo. En la branquia perfundida con la dosis de $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ se observa claramente el afecto transitorio sobre el TEPD el cual demora alrededor de 90 minutos en retornar a valores basales.

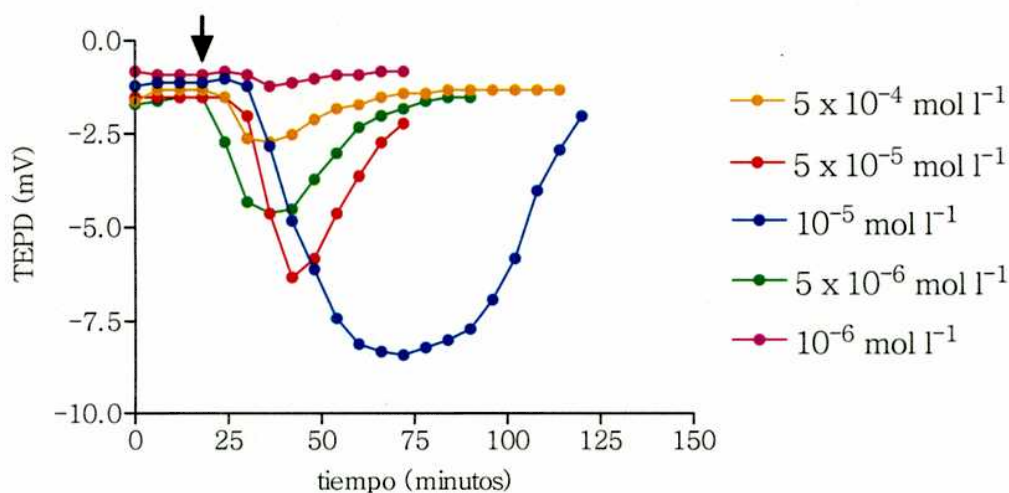


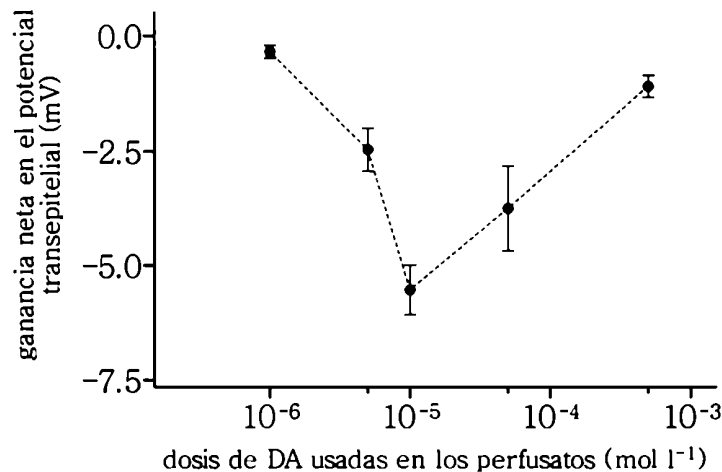
Figura 21: Perfusión de branquias posteriores de *C. granulatus* con dosis crecientes de DA. Cada curva representa una branquia individual perfundida con una dosis de DA diferente. El gráfico muestra la evolución del TEPD a lo largo del tiempo para cada dosis utilizada. La flecha indica el cambio de perfusato control (30‰) a perfusato con DA (30‰ + DA).

Si se grafica la ganancia neta en el TEPD (expresando dicha ganancia como la diferencia entre el valor medio del control y valor medio del momento de máxima estimulación con DA) para cada una de las dosis probadas, se obtiene una curva dosis-respuesta con un perfil bifásico cuya máxima estimulación se encuentra en la dosis de 10^{-5} mol l⁻¹ tal como se puede observar en la figura 22A.

Si se grafican los porcentajes de estimulación promedio en función de las dosis probadas, se obtiene un gráfico como el que se muestra en la figura 22B cuyo perfil, en valores absolutos coincide con el de la figura 22A. La dosis a la cual se alcanza máximo porcentaje de estimulación (10^{-5} mol l⁻¹) coincide con la de máxima ganancia neta.

A

Curva Dosis-Respuesta



B

Curva Dosis-Respuesta

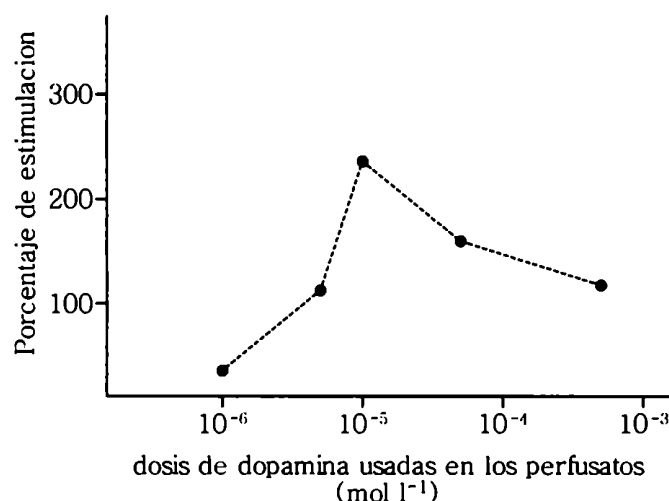


Figura 22: Curvas dosis-respuestas de DA en branquias perfundidas de *C. granulatus*. A) Se mide la respuesta como la ganancia promedio (en mV) que la DA induce sobre el valor del TEPD en condiciones control. Cada punto del gráfico representa la media $\pm$ el error estándar. B) Se mide respuesta como porcentaje de estimulación de la DA sobre el valor control del TEPD.

Puesto que el efecto transitorio podría deberse a que la oxidación espontánea de la DA a pH fisiológico afecta la estabilidad de la membrana basolateral del epitelio branquial, se realizaron algunas perfusiones con la dosis de máxima estimulación de DA, agregando glutathion reducido 10^{-3} mol l⁻¹ o ácido ascórbico 10^{-3} mol l⁻¹ como agentes antioxidantes. Sin embargo, la perfusión de branquias posteriores con DA y cualquiera de los agentes antioxidantes mostró perfiles transitorios de respuesta en el tiempo (figura 23A y B). Esto indicaría que, el hecho de que no se mantenga el TEPD durante una perfusión con DA, no se debe a que la misma afecte la estabilidad de la membrana plasmática sino que estaría

relacionada con el tipo de respuesta que desencadena esta amina sobre la branquia.

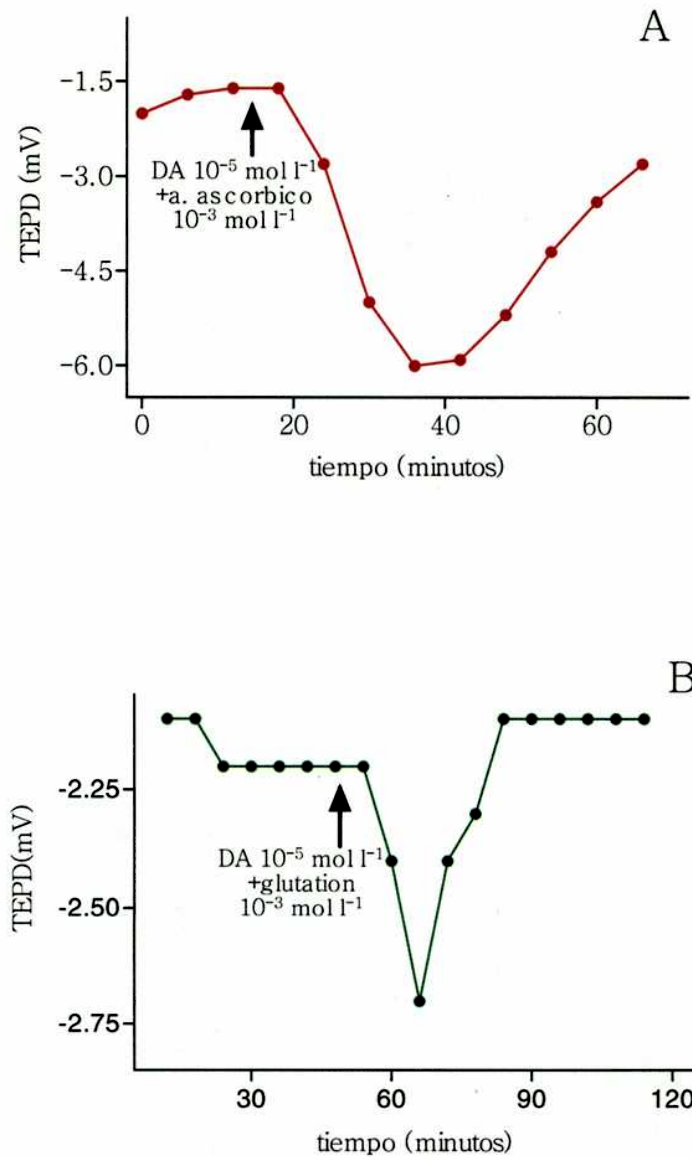


Figura 23: Evolución del TEPD de branquias posteriores de *C. granulatus* perfundidas con agentes antioxidantes. (A) ácido ascórbico. B) glutatión. La flecha indica el cambio de perfusato control (salina 30%) por experimental (salina 30% + agente reductor + DA).

2.1.2. Efecto del cAMP y otros Compuestos Estimuladores de la misma Vía de Señalización sobre la Diferencia de Potencial Transepitelial.

Para determinar qué tipo de efecto produce el aumento de la concentración de cAMP intracelular sobre el TEPD, se realizaron varias series de experimentos en preparaciones de branquias posteriores perfundidas con un análogo del cAMP permeable a la membrana (cp-cAMP) y con otros compuestos que estimulan la misma vía de señalización intracelular.

En primer lugar, se probaron diferentes dosis de cp-cAMP (figura 24) y se determinó que, al igual que la DA, el efecto producido fue una hiperpolarización. Las dosis de 10^{-6} y 5×10^{-6} mol l⁻¹ no tuvieron efectos significativos sobre el TEPD ($p > 0.05$), mientras que la dosis de 10^{-5} mol l⁻¹ lo afectó significativamente incrementando el voltaje desde un valor de -2.1 ± 0.3 mV a -20 ± 1 mV ($p < 0.0001$, $n = 8$), lo cual implica un incremento de casi 10 veces el valor control. Para dosis superiores a 10^{-5} mol l⁻¹ la respuesta también fue significativa y alcanzó su valor de saturación a partir de los 20 minutos del cambio de perfusato control (solución salina 30%) a perfusato experimental (solución salina 30% + cp-cAMP) alrededor de los -20 mV.

A diferencia de las perfusiones con DA, en las dosis de cp-cAMP que causaron efectos significativos, las mismas lo hicieron en forma sostenida a lo largo del tiempo. En la figura 25 se ve el efecto del análogo de cAMP en una branquia posterior y en la misma puede apreciarse que el efecto activador se sostiene por más de 1 hora a partir del cambio de perfusato control a perfusato experimental.

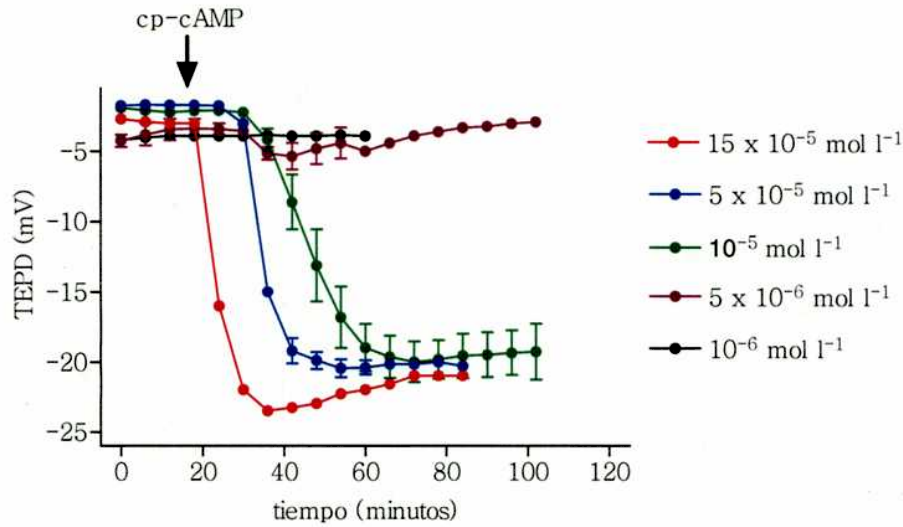


Figura 24: Perfusión de branquias posteriores de *C. granulatus* con dosis crecientes de cp-cAMP. El gráfico muestra la evolución del TEPD a lo largo del tiempo para cada dosis utilizada. Cada punto simboliza la media $\pm$ el error estándar del grupo de branquias probado. La flecha indica el cambio de perfusato control (30%) a perfusato con experimental (30% + cp-cAMP).

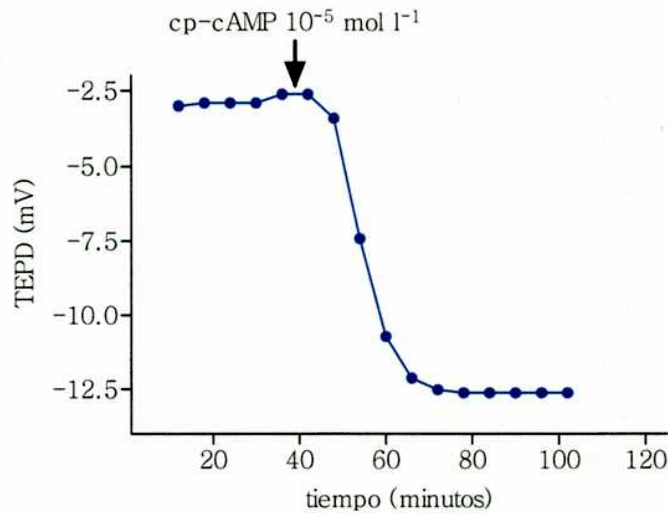
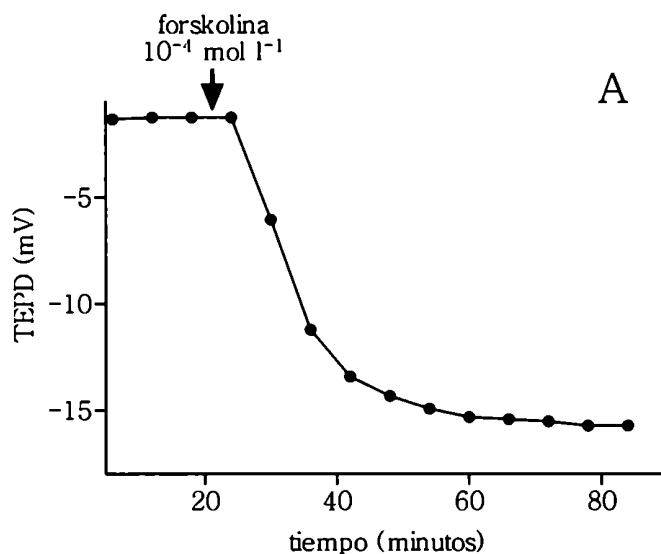


Figura 25: TEPD de una branquia de *C. granulatus* perfundida con $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de cp-cAMP en función del tiempo. Nótese que el efecto del análogo sobre el TEPD se mantiene mientras perdura la perfusión. La flecha indica el cambio de perfusato control (sol. salina 30%) a experimental (sol. salina 30% + cp-cAMP).

Se realizó otra serie de perfusiones (n=5) para verificar si la activación de la adenilato ciclasa (enzima que sintetiza cAMP) afectaba al TEPD de la misma manera que lo había hecho la perfusión con cp-cAMP. Para ello se agregó al perfusato de solución salina 30%, un inductor específico de la adenilato ciclasa, forskolina, en una concentración de 10^{-4} mol l⁻¹. El resultado mostró que la aplicación de este compuesto produjo una hiperpolarización significativa que llevó el TEPD desde un valor de -2.5 ± 0.7 mV a -15 ± 1.5 mV ($p < 0.0005$) (figura 26A).

La figura 26B muestra que el IBMX, inhibidor específico de la fosfodiesterasa (enzima que degrada el cAMP a AMP) utilizado en la perfusión de branquias posteriores, causó una hiperpolarización menor que la producida por el análogo del cAMP (cp-cAMP) y a la de la forskolina, pero aún así, significativa ($p < 0.05$, n=6), llevando el TEPD desde -2 ± 0.2 mV a -2.7 ± 0.1 mV. Tanto la forskolina como el IBMX utilizados en las perfusiones sostuvieron el efecto sobre el TEPD durante más de 1 hora, luego del cambio de perfusato control a experimental.



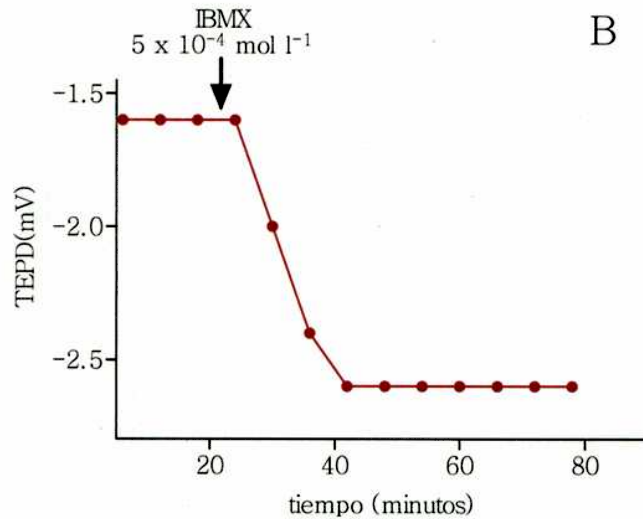


Figura 26: TEPD de branquias de *C. granulatus* perfundidas con inductores de la vía del cAMP en función del tiempo. A) Perfusión con forskolina. B) Perfusión con IBMX.

Si se compara el efecto (como porcentaje de estimulación) de todos los compuestos usados en las distintas series de perfusiones en condiciones iso-osmóticas en branquias posteriores sobre el TEPD, se obtiene el gráfico de barras de la figura 27:

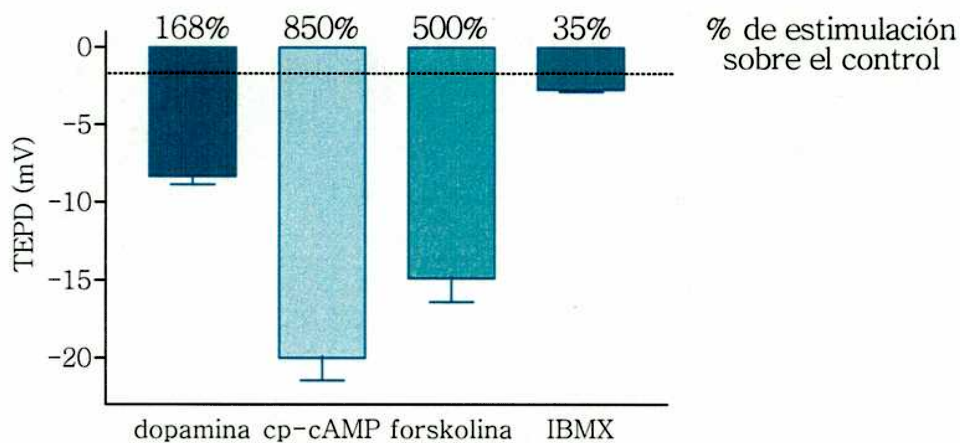


Figura 27: Porcentaje de estimulación de diferentes drogas sobre el TEPD de branquias posteriores de *C. granulatus*. La línea punteada indica el valor del TEPD al momento de la perfusión con solución salina 30‰ (control).

Como se comentó en la Introducción de este trabajo, el TEPD que se registra en branquias posteriores de *C. granulatus*, se debe en gran parte a la actividad de la enzima de membrana basolateral, Na^+ , K^+ -ATPasa que intercambia 3 iones Na^+ intracelulares por 2 K^+ extracelulares y además, brinda la fuerza motriz necesaria para el movimiento del resto de los iones a través del epitelio (Luquet *et al*, 2002b).

A fin de determinar si la DA afectaba directamente el flujo de Na^+ transepitelial, se realizó una serie de perfusiones utilizando un baño de solución salina 30% libre de Na^+ (reemplazando el cloruro de sodio de la solución por cloruro de colina) y un perfusato de solución salina 30% normal (control). Una vez estabilizado el TEPD, el perfusato control fue reemplazado por otro igual con el agregado de DA $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. El resultado de este experimento se esquematiza en la figura 28. Se puede observar que en ausencia de Na^+ en el baño, la DA no tiene un efecto significativo sobre el TEPD.

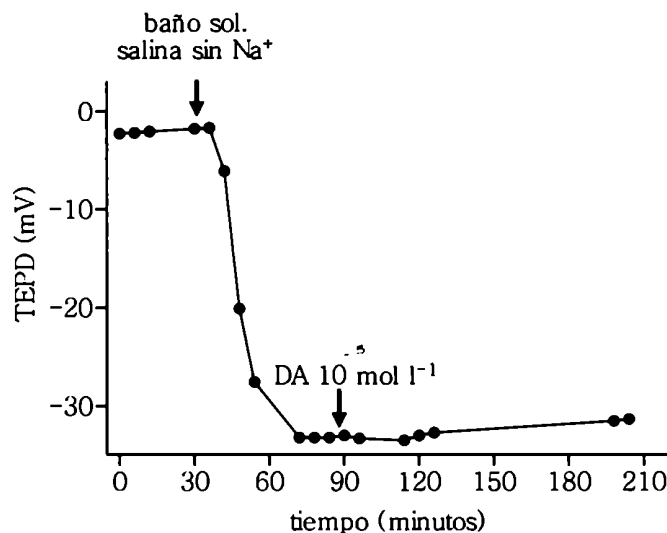


Figura 28: TEPD de una branquia posterior de *C. granulatus* luego de un cambio del baño salino control por otro de cloruro de colina (libre de Na^+).

El problema que surgió durante el desarrollo de este experimento fue que, para la mayoría de las branquias utilizadas, resultó muy difícil registrar TEPDs estables con el baño de cloruro de colina, debido a que, durante el desarrollo del mismo, se producía “fuga” paracelular de iones Na^+ desde el perfusato hacia el baño. A diferencia del epitelio branquial de los peces o de cangrejos de agua dulce (Onken, 1999), el de *C. granulatus* tiene baja resistencia al flujo paracelular. Por este motivo, este experimento carece de un n suficiente para hacer un análisis estadístico y determinar la significación de esta respuesta. Aún así, puede observarse una tendencia que muestra que, el efecto hiperpolarizante de la DA sobre el TEPD de membrana está directamente relacionado con el captación activa de Na^+ desde el baño (figura 28). De todas maneras, estos resultados deben considerarse con cautela porque los altos valores de TEPD registrados podrían deberse en gran parte a flujos difusivos.

Con la misma idea de contestar la pregunta acerca de que si la DA afecta o no al flujo de Na^+ en las branquias de *C. granulatus*, se realizó otra serie de perfusiones agregando al baño salino ^{22}Na . Se midió entonces flujo de Na^+ antes y después de la aplicación de $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de DA al perfusato. El análisis de varianza demostró que la DA aumenta significativamente el flujo (captación) de Na^+ ($n=5$, $p < 0.05$) desde un valor de 398 ± 73 hasta $534 \pm 119 \mu\text{eq h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (figura 29).

Al igual que sobre el TEPD, el efecto producido por la DA sobre el flujo de Na^+ fue transitorio y el máximo aumento (34%) se registró a los 30 minutos del cambio de perfusato control por perfusato experimental. La figura 29 esquematiza el flujo en una branquia posterior perfundida en las condiciones mencionadas.

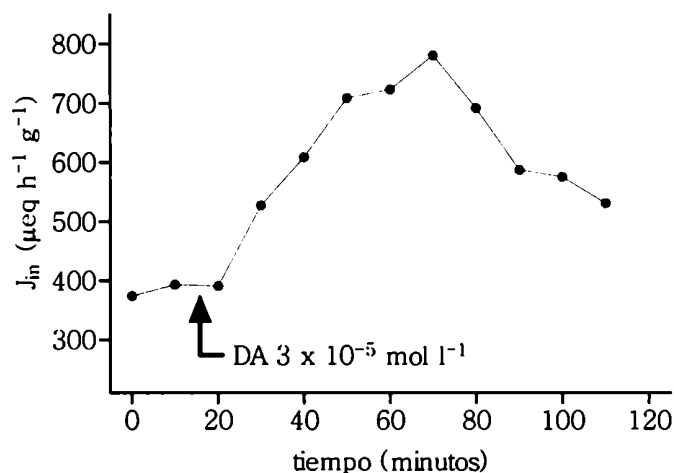


Figura 29: Captación de Na^+ de una branquia posterior de *C. granulatus* antes y después del cambio de perfusato control a perfusato experimental (con DA).

2.2. Ensayos Bioquímicos.

2.2.1. Medición de Actividad Enzimática de Na^+ , K^+ -ATPasa Branquial.

Teniendo en cuenta el efecto inductor de la DA sobre el flujo de Na^+ durante la perfusión de branquias posteriores de *C. granulatus* en condiciones iso-osmóticas, se realizaron una serie de ensayos enzimáticos para determinar su efecto, sobre la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa. La primer serie de experimentos se diseñó de forma tal de probar, si el efecto de esta amina variaba con el tiempo de pre-incubación con las branquias. Con este objetivo, se probaron 2 tiempos de pre-incubación: 10 y 20 minutos. El resultado de este experimento se puede observar en la figura 30:

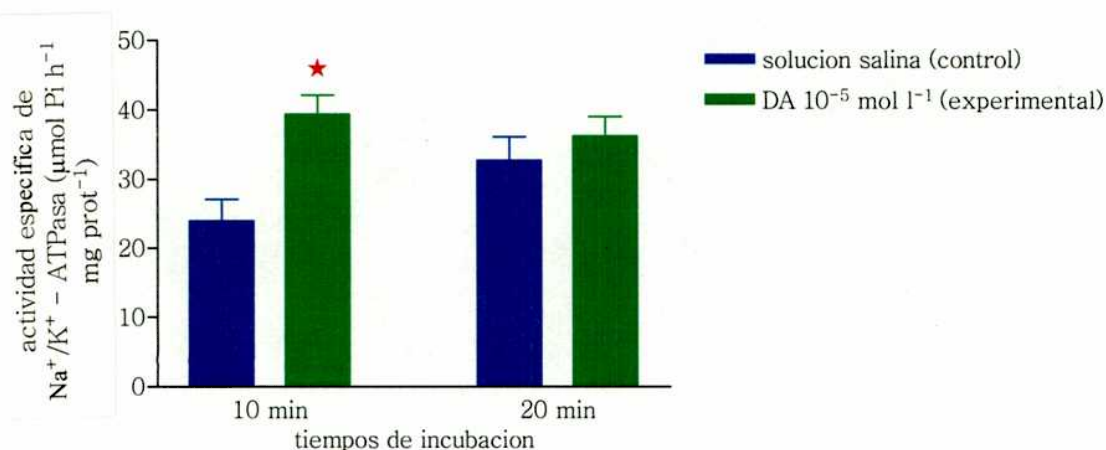


Figura 30: Actividad de la enzima Na^+K^+ -ATPasa en branquias posteriores de *C. granulatus* incubadas con DA. Las barras simbolizan las actividades medias $\pm$ el error estándar. ★ indica diferencias significativas ($p < 0.01$; $n = 5$).

El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$) y del test de Bonferroni, surge que dicha diferencia ocurre con el tiempo de pre-incubación de 10 minutos ($p < 0.01$, $n = 5$). La actividad enzimática de las branquias pre-incubadas con DA durante 10 minutos aumentó un 64% con respecto a su control. No surgen diferencias significativas entre ambos controles, así como tampoco, entre el tratamiento de pre-incubación de 20 minutos con DA y 20 minutos con solución salina (control) ($p > 0.05$, $n = 5$).

A partir de este resultado positivo de la DA y teniendo en cuenta la capacidad del análogo de cAMP y de los compuestos que estimulan la vía del cAMP utilizados (forskolina e IBMX) para modificar el TEPD en el mismo sentido que la DA, se planearon ensayos bioquímicos para saber si dichos compuestos actuaban también a través de un cambio en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa. El diseño de dichos ensayos estuvo orientado a poner a prueba la hipótesis de que el efecto de la DA sobre la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa se produce a través de la vía del cAMP y de la PKA.

De esta manera, se realizó el siguiente ensayo de actividad enzimática en tres tratamientos diferentes: un tratamiento control (a), un tratamiento experimental con 10^{-5} mol l^{-1} cp-cAMP en el medio de incubación (b) y otro experimental con 10^{-5} mol l^{-1} cp-cAMP + 10^{-6} mol l^{-1} de pki (inhibidor de la actividad de PKA) en el medio de incubación (c). La concentración del análogo de cAMP elegida para este ensayo fue la mínima capaz de causar un efecto estadísticamente significativo en los experimentos de electrofisiología. La figura 31 muestra que, en este ensayo de actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa, tanto la presencia de cp-cAMP como de pki no afectaron significativamente a la actividad de la enzima ($p > 0.05$, $n=6$). La media de la actividad enzimática de las branquias incubadas con cp-cAMP es prácticamente idéntica a la media control, y la media de las branquias incubadas con cp-cAMP + pki es menor a las otras, aunque esa diferencia no es estadísticamente significativa.

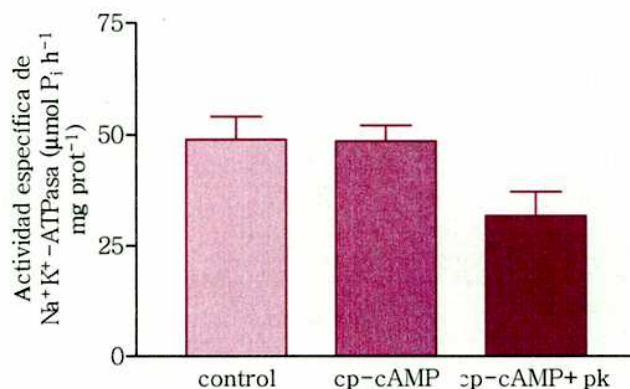


Figura 31: Actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en branquias posteriores de *C. granulatus* incubadas con cp-cAMP o cp-cAMP + pki. El ensayo se realizó sobre la fracción de membrana obtenida a partir de una centrifugación a $11000 \times g$ y usando 5×10^{-6} mol l^{-1} de $MgCl_2$ en el medio de incubación. Las barras indican las actividades medias $\pm$ el error estándar. No se registran diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$, $n=6$)

Puesto que, la ausencia de efecto del cp-cAMP podría deberse a que la concentración de MgCl_2 del medio de incubación no fuese la óptima para la activación de la PKA, se repitió el ensayo, esta vez con $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de MgCl_2 . El resultado de este experimento mostró que, aún en esas condiciones de incubación, no se producía una respuesta diferencial entre los tratamientos, tal como se puede observar en la figura 32. Ninguno de los tratamientos experimentales mostró una actividad significativamente diferente al control. Sí se registró un aumento en la actividad de la enzima para todos los tratamientos respecto al ensayo anterior. Sin embargo, persistió la tendencia a medias de actividad enzimática casi idénticas entre el tratamiento control y tratamiento con cp-cAMP.

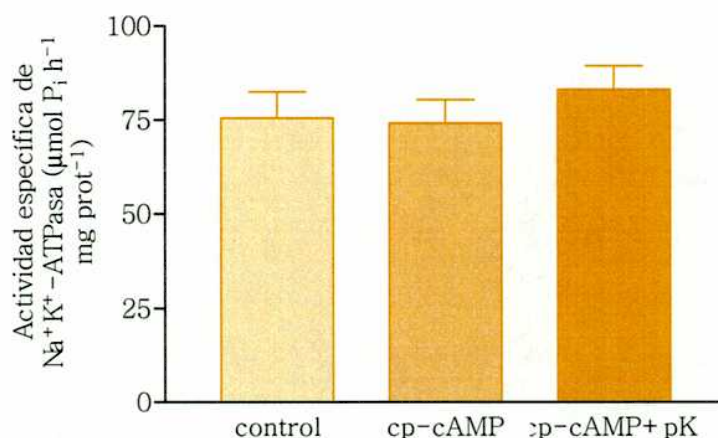


Figura 32: Actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en branquias posteriores de *C. granulatus* incubadas con cp-cAMP o cp-cAMP + pki. El ensayo se realizó sobre la fracción de membrana obtenida a partir de una centrifugación a $11000 \times g$ y usando $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de MgCl_2 en el medio de incubación. Las barras indican las actividades medias $\pm$ el error estándar. No se registran diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$, $n=7$).

Existe una gran diferencia entre el primer ensayo de actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa realizado con DA y los últimos 2

ensayos realizados con cp-cAMP y pki. En el primero, se pre-incubaron pequeñas secciones de la branquia con DA y, al momento de la activación todo el sistema de señalización intracelular estuvo intacto puesto que se trataba de células enteras. En cambio, en los últimos 2 ensayos, se agregaron agonistas e inhibidores de PKA al medio de incubación del ensayo, en el cual, sólo se contaba con fracciones de membrana provenientes de la centrifugación diferencial. Se realizó un tercer ensayo de actividad específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa, esta vez sembrando como muestra en el medio de incubación, 10 μl del homogenato branquial diluido 1/20. La idea de este experimento fue probar la posibilidad de que se necesitan tanto elementos citoplasmáticos como de membrana para una activación por cp-cAMP, de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa. El resultado de este experimento, se esquematiza en la figura 33:

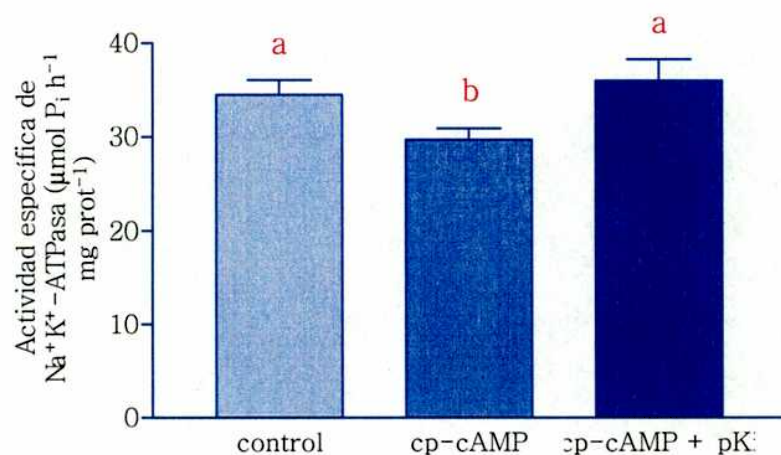


Figura 37: Actividad de la enzima Na^+K^+ -ATPasa en branquias posteriores de *C. granulatus* incubadas con cp-cAMP o cp-cAMP + pki. El ensayo se realizó sobre una muestra de homogenato diluido 1/20 y usando $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de MgCl_2 en el medio de incubación. Las barras indican las actividades medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.01$, $n=8$).

El análisis de varianza mostró esta vez, que sí son significativas las diferencias entre los distintos tratamientos ($p < 0.01$, $n=8$). Las comparaciones *a posteriori* demostraron que la actividad específica en el tratamiento con el análogo del cAMP es significativamente menor a la de los otros 2 tratamientos.

Estos resultados resultaron difíciles de interpretar. Tanto el cp-cAMP como otros agonistas fueron capaces de imitar el efecto de la DA sobre el TEPD de branquias posteriores. Puesto que el TEPD responde en gran medida a la misma actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral (Luquet *et al*, 2002b), se podía esperar que tanto la DA como el cAMP fuesen capaces de inducir un aumento en su actividad específica durante los ensayos realizados.

Para descartar la posibilidad de que el cp-cAMP no estuviera funcionando efectivamente en estos ensayos *in vitro* o que durante la homogenización de las branquias se estuviese perdiendo algún elemento fundamental para la propagación de la señal, se realizó una última serie de ensayos de actividad específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral. La idea de este nuevo ensayo fue medir actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa luego de haber inducido un aumento del cAMP intracelular a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa. Para ello, las condiciones experimentales fueron las siguientes: una pre-incubación de branquias (células enteras) en solución salina 30‰ más una alícuota del inductor de la adenilato ciclasa, forskolina 10^{-4} mol l^{-1} durante 10 minutos. Luego se homogeneizaron las branquias y se midió actividad enzimática sobre una muestra de homogenato crudo diluido 1/20. Se probó también, agregar al medio de incubación de la muestra, una alícuota de teofilina, la cual evita que se degrade el cAMP formado durante la pre-incubación, por inhibición

de la actividad de fosfodiesterasa (Johnsen y Nielsen, 1978). El resultado de este ensayo se muestra en la figura 34.

El análisis de varianza de medidas repetidas mostró que las medias entre tratamientos son significativamente diferentes ($p < 0.05$, $n=5$). Las comparaciones *a posteriori* mostraron que las muestras de branquias pre-incubadas con forskolina presentaron una actividad específica significativamente mayor que las muestras control ($p < 0.05$, $n=5$). La presencia de teofilina en el medio de incubación no resultó relevante para la conservación del cAMP formado en el sistema de ensayo (figura 34).

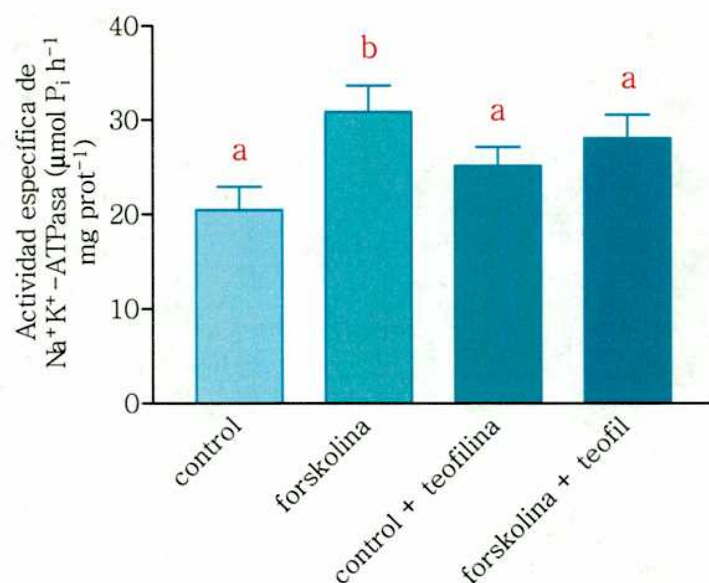


Figura 34: Determinación de la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa en branquias posteriores de *C. granulatus* pre-incubadas con forskolina e incubadas con teofilina. El ensayo se realizó sobre una muestra de homogenato diluido 1/20 y usando 10^{-5} mol l^{-1} de $MgCl_2$ en el medio de incubación. Las barras indican las actividades medias $\pm$ el error estándar. Letras diferentes implican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$, $n=5$).

Es posible que el análogo del cAMP utilizado, no sea el adecuado para este tipo de ensayo *in vitro* o que no sea posible inducir la actividad de la PKA en homogenatos de branquias de esta especie. Los resultados del último experimento mostraron que un aumento en el contenido de cAMP intracelular (inducido en este caso por forskolina) causa un aumento significativo en la actividad específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa incrementando los valores en más de un 50%.

En la tabla 6 se muestra un resumen de los resultados de los ensayos de actividad específica de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral de branquias posteriores de *C. granulatus*:

Resultados: Control Neuroendócrino de la
Captación Activa de NaCl

Tratamientos	Condiciones del ensayo	p	n	Media $\pm$ error estándar ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Contrastes o comparaciones <i>a posteriori</i>	% de activación sobre el control
pre-incubación con solución salina 10 minutos (control)	Medio de incubación con 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.	ANOVA de 2 factores 0.0086 entre tratamien tos	13	24 $\pm$ 3	control 10 minutos vs. DA 10 minutos $p < 0.05$	
pre-incubación con solución salina + DA 10 minutos (experimental)	Medio de incubación con 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			39 $\pm$ 3		64%
pre-incubación con solución salina 20 minutos (control)	Medio de incubación con 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.		4	33 $\pm$ 3		
pre-incubación con solución salina + DA 20 minutos (experimental)	Medio de incubación con 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			36 $\pm$ 3		10%

Tratamientos	Condiciones del ensayo	p	n	Media $\pm$ error estándar ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Contrastes o comparaciones a posteriori	% de activación sobre el control
Incubación con sol. salina (control)	Medio de incubación con 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.	0.0521 ANOVA de medidas repetidas	6	49 $\pm$ 5		
Incubación con sol. salina + cp-cAMP (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP y 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			49 $\pm$ 4		0%
Incubación con sol. salina + cp-cAMP + pki (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP, 1 μM de pki y 5 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			32 $\pm$ 5		-34%
Incubación con sol. salina (control)	Medio de incubación con 10 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.	0.3527 ANOVA de medidas repetidas	7	75 $\pm$ 7		
Incubación con sol. salina + cp-cAMP (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP y 10 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			74 $\pm$ 6		-1%
Incubación con sol. salina + cp-cAMP + pki (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP, 1 μM de pki y 10 μM de MgCl_2 . Fracción de membrana.			83 $\pm$ 6		11%

Tratamientos	Condiciones del ensayo	p	n	Media $\pm$ error estándar ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Contrastes o comparaciones a posteriori	% de activación sobre el control
Incubación con sol. salina (control)	Medio de incubación con 10 μM de MgCl_2 . Homogenato diluido 1/20.	0.0099 ANOVA de medidas repetidas	8	35 $\pm$ 2	control vs. cp-cAMP $p < 0.05$ cp-cAMP vs. cp-cAMP + pki $p < 0.05$	
Incubación con sol. salina + cp-cAMP (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP y 10 μM de MgCl_2 . Homogenato diluido 1/20.			30 $\pm$ 1		-15%
Incubación con sol. salina + cp-cAMP + pki (experimental)	Medio de incubación con 10 μM de cp-cAMP, 1 μM de pki y 10 μM de MgCl_2 . Homogenato diluido 1/20.			36 $\pm$ 2		3%
pre-incubación con solución salina (control)	Medio de incubación con sol. salina y 10 μM de MgCl_2 . Homogenato diluido 1/20.	0.0198 ANOVA de medidas repetidas	5	20 $\pm$ 2	control vs forskolina $p < 0.05$	
pre-incubación con forskolina 10 minutos (experimental)	Medio de incubación con forskolina 1 mM y 10 μM de MgCl_2 . Homogenato diluido 1/20.			31 $\pm$ 3		52%

pre-incubación con solución salina + teofilina en el medio de incubación (experimental)	Medio de incubación con teofilina 2.5 mM y 10 μ M de MgCl ₂ . Homogenato diluido 1/20.			25 $\pm$ 2		25%
pre-incubación con forskolina + teofilina en el medio de incubación (experimental)	Medio de incubación con teofilina 2.5 mM y 10 μ M de MgCl ₂ . Homogenato diluido 1/20.			28 $\pm$ 3		40%

Tabla 6: Actividad específica de la enzima Na⁺, K⁺-ATPasa de membrana basolateral de branquias posteriores de *C. granulatus* medida en diferentes condiciones experimentales.

2.2.2. Ensayo de Contenido de cAMP Intracelular.

A partir los datos colectados de los experimentos descritos previamente, se pudo inferir que tanto la DA como el cAMP y compuestos inductores de la misma vía, inducen la actividad de la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral de las branquias posteriores de *C. granulatus* bajo condiciones iso-osmóticas de ensayo. Una consecuencia directa de dicho proceso fue el registro del aumento del TEPD y el aumento de la captación de ^{22}Na , durante las perfusiones de branquias posteriores con dichos compuestos.

Sin embargo, hasta este momento y por la forma en que fueron diseñados los experimentos previos, no hubo indicios de un enlace directo entre la unión de DA a la célula del epitelio branquial y un consecuente aumento en la concentración intracelular de cAMP. Por lo tanto, y con la idea de contestar este interrogante, se diseñó el experimento a continuación. Se pre-incubaron pequeñas secciones de branquias posteriores con solución salina (control) o con $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de DA durante 10 minutos luego de los cuales, el tejido fue homogeneizado y se determinó el contenido de cAMP intracelular. Este ensayo se realizó en muestras de tejido branquial de cangrejos aclimatados a 10‰, 30‰ y 45‰, y su resultado se puede observar en la figura 35. El test t de Student realizado para cada una de las salinidades indicó que la media entre el tratamiento control y el experimental no difirió significativamente para ninguna de las salinidades de aclimatación probadas ($p > 0.05$, $n=5$).

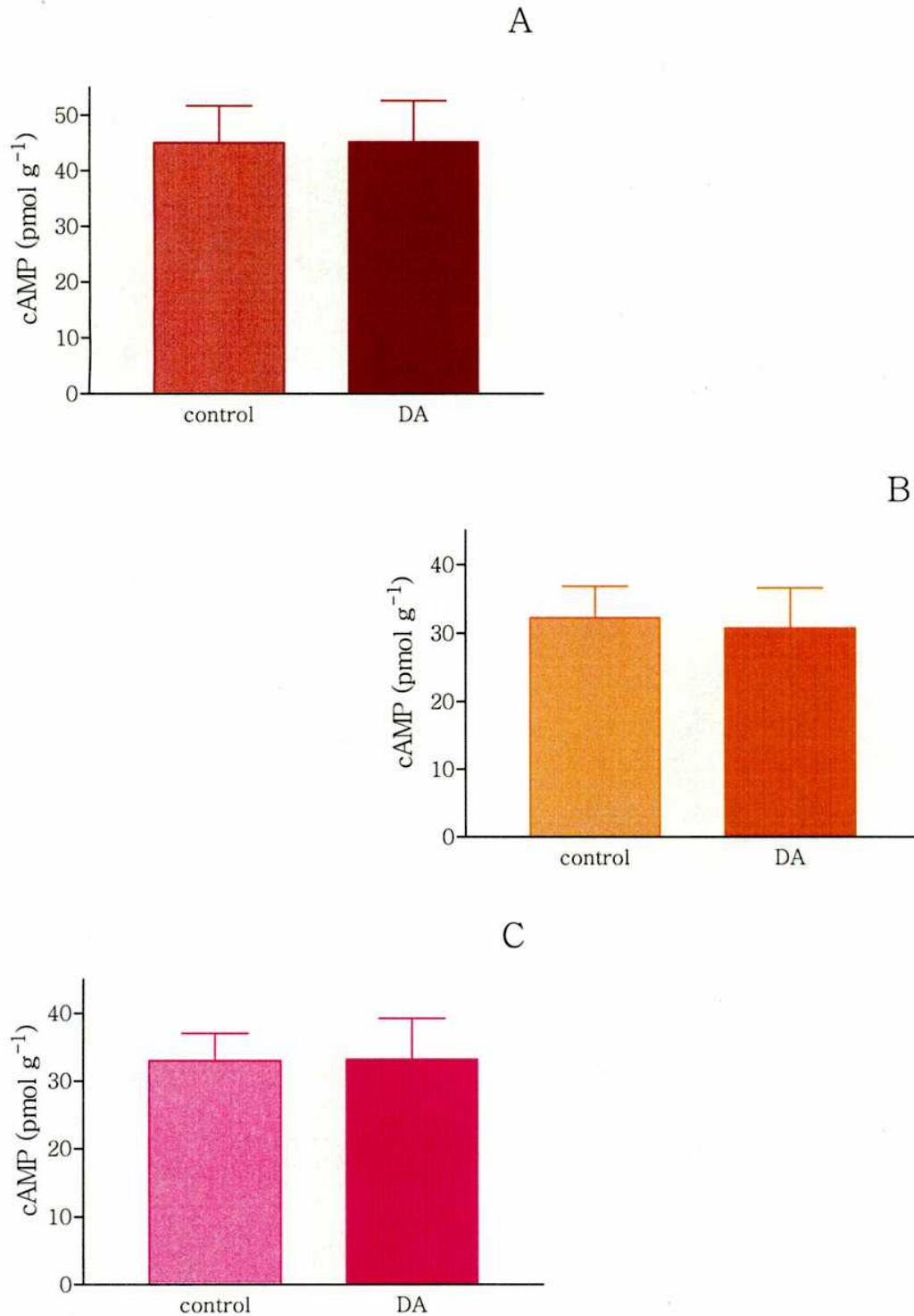


Figura 35: Contenido de cAMP de branquias posteriores de *C. granulatus* incubadas con solución salina (control) o con DA 10^{-5} mol l⁻¹. A) Aclimatación 10%. B) Aclimatación

30‰. C) Aclimatación 45‰. Las barras indican la actividad enzimática media $\pm$ el error estándar. No se registraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$, $n=5$).

Se realizó una segunda serie de experimentos con animales enteros (*in vivo*). El tratamiento experimental consistió en una transferencia desde un medio iso-osmótico (30‰) a otro de baja salinidad (10‰), con el objeto de determinar si un shock hipo-osmótico era capaz de inducir un aumento del cAMP intracelular. A distintos tiempos de transferencia, los animales fueron sacrificados y se midió el contenido de cAMP branquial. El resultado de este ensayo puede observarse en la figura 36:

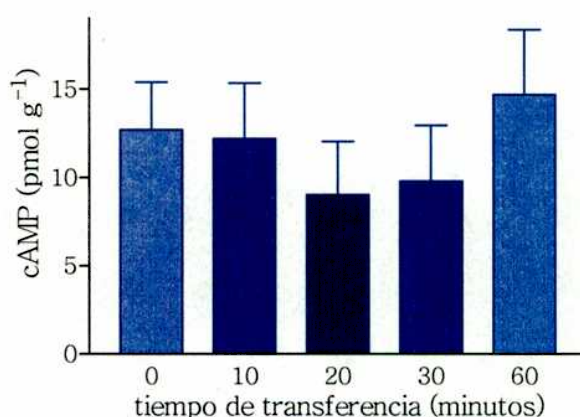


Figura 36: Variación en el contenido de cAMP branquial de *C. granulatus* luego de la transferencia de individuos desde un medio iso-osmótico (30‰) a uno hipo-osmótico (10‰). Las barras indican la actividad enzimática media $\pm$ el error estándar. No se registraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de transferencia ($p > 0.05$, $n=6$).

Si bien hay una tendencia a una disminución en el contenido intracelular de cAMP a los 20 minutos, el análisis de varianza no midió diferencias significativas entre ninguno de los tiempos de transferencia probados.

2.3. Perfusión con Dopamina en Branquias Estimuladas.

Se probó el efecto de la DA cambiando las condiciones de salinidad del perfusato, de modo tal que la branquia se encontrase en un estado de osmoregulación activa al momento de recibir el estímulo de DA. Para ello, se perfundieron branquias de animales (n=7) aclimatados a baja salinidad, con una solución iso-osmótica a la hemolinfa (30‰) durante 30 minutos, luego de los cuales el perfusato y el baño fueron reemplazados por soluciones hipo-osmóticas (20‰).

La solución salina 20‰ produjo una esperada hiperpolarización y una vez que se estabilizó el TEPD se agregó al perfusato DA en una concentración de 10^{-5} mol l⁻¹. El efecto producido por la DA en el TEPD bajo estas nuevas condiciones se puede observar en la figura 37 y 38 en las cuales se lo compara con el efecto de cada uno de los perfusatos probados en este experimento. Claramente puede observarse que cuando la branquia se encuentra en una situación de osmoregulación activada por un shock hipo-osmótico, la aplicación de DA disminuye el TEPD en más de un 40% (desde -6.4 ± 1.2 a -3.7 ± 0.8 mV).

Este efecto sobre el TEPD es opuesto al registrado en experimentos anteriores en los cuales la DA llegaba a una branquia perfundida en condiciones iso-osmóticas. En aquellas condiciones de ausencia de estímulo osmótico, la DA incrementaba el voltaje en forma significativa.

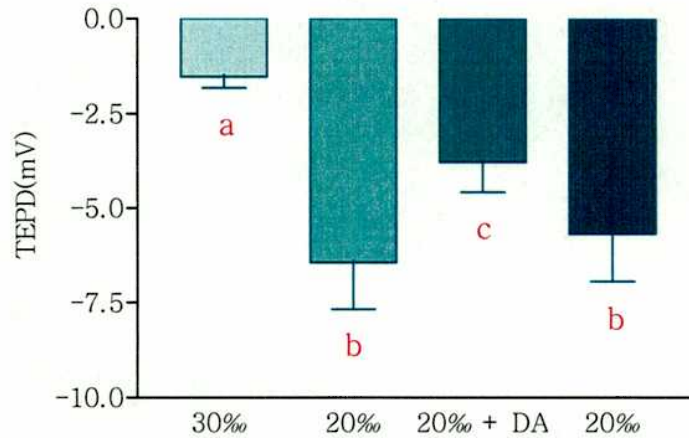


Figura 37: TEPD en función de los diferentes perfusatos probados en un mismo experimento en branquias de *C. granulatus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los perfusatos ($p < 0.05$, $n = 7$). Las barras indican media $\pm$ error estándar.

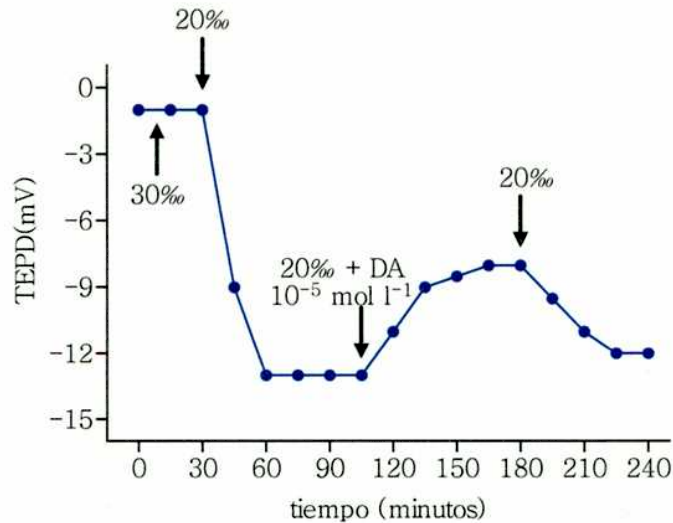


Figura 38: TEPD a lo largo del tiempo en una branquia posterior de *C. granulatus* perfundida con diferentes condiciones. Las flechas indican cambios de perfusatos.

También se probó el efecto de DA en branquias cuyo TEPD hubiese sido previamente estimulado a través de la vía del cAMP usando forskolina. A este fin, se perfundieron branquias de animales ($n = 6$) aclimatados a baja salinidad con solución salina 30‰ durante 30 minutos,

luego de los cuales se agregó al perfusato 10^{-4} mol l^{-1} de forskolina. Este inductor de la adenilato ciclasa provocó una esperada hiperpolarización similar a la registrada en experimentos anteriores (figura 26A). Una vez que se estabilizó el TEPD se agregó DA al perfusato en una concentración de 10^{-5} mol l^{-1} . El efecto producido por la DA en el TEPD bajo estas nuevas condiciones se puede observar en las figuras 39 y 40 en las cuales se lo compara con el efecto de cada una de las soluciones de perfusión probadas en este experimento. Puede apreciarse nuevamente que cuando la branquia se encuentra en una situación de osmoregulación activada (en este caso por la perfusión con forskolina), la aplicación de DA disminuye significativamente el TEPD en casi un 40% (desde -9.8 ± 1.4 a -6.1 ± 1.6 mV):

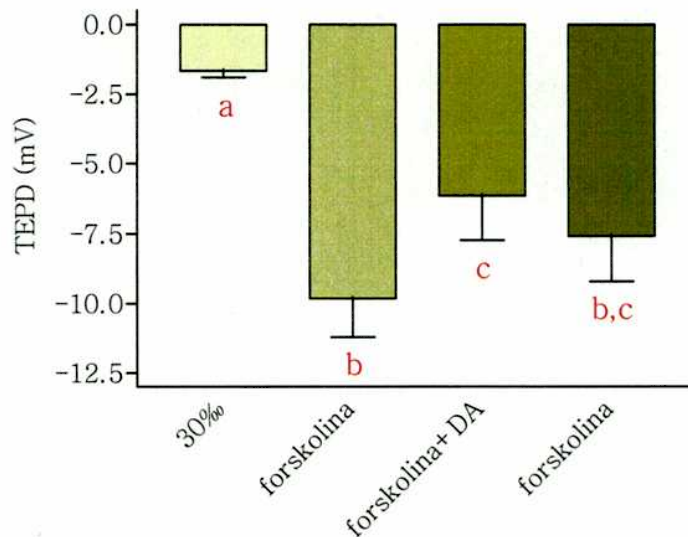


Figura 39: TEPD en función de las diferentes soluciones de perfusión probadas en un mismo experimento en branquias de *C. granulatus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los perfusatos ($p < 0.05$, $n = 6$). Las barras indican media $\pm$ error estándar.

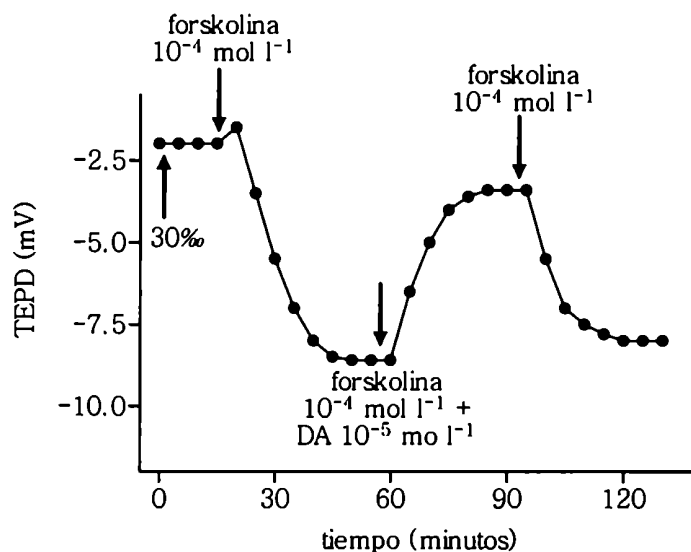


Figura 40: TEPD a lo largo del tiempo en una branquia posterior de *C. granulatus* perfundida en diferentes condiciones. Las flechas indican cambios de perfusato.

Si bien la DA induce un incremento en el valor de TEPD respecto a la perfusión con solución salina 30%, es evidente que en condiciones bajo las cuales la branquia se encuentra estimulada (sea por perfusión con solución hipo-osmótica o con forskolina), esta amina provoca un efecto opuesto, es decir, un decremento de ese estado estimulado.

En resumen: si bien se comprobó que, en condiciones experimentales iso-osmóticas, tanto la DA como el cAMP aumentan significativamente los valores de TEPD, del flujo (captación) de Na^{+} y de la actividad de la Na^{+} , K^{+} -ATPasa basolateral de branquias posteriores, no se pudo encontrar evidencia que indique que la DA cause un aumento en el contenido de cAMP branquial.

Aunque en condiciones experimentales hipo-osmóticas, esta especie haya mostrado activación de mecanismos de captación activa de iones (figura 38 de este trabajo; Luquet *et al*, 2002b), de los ensayos aquí

realizados se puede afirmar que dichos mecanismos no solo no son inducidos por DA sino que la misma produce un decremento significativo del TEPD.

2.4. Ensayos Histológicos e Inmunohistoquímicos.

2.4.1. Inmunomarcación de Proteína G en Branquias.

Mediante uso de anticuerpos específicos, se determinó la presencia de proteína G_0 y G_i en epitelio, tejido conectivo y hemocitos de branquias sometidas a diferentes tratamientos de aclimatación.

Se realizó un análisis cualitativo sobre preparados histológicos de branquias 3 (representativa de respiratorias) y branquias 7 (representativa de ionoreguladoras) de animales aclimatados crónicamente a salinidades de 10‰, 30‰ y 45‰. El mismo tipo de análisis se realizó sobre branquias de animales sacrificados 24 horas después de la transferencia desde 10‰ a 30‰ o desde 10‰ a 45‰ (aclimatación aguda). El resultado se muestra en la tabla 7.

La inmuno-reactividad de la proteína G_0 resultó evidente en los preparados de branquias 7 de animales aclimatados crónicamente a baja salinidad (figura 41). Se detectó mucha marcación específicamente sobre la membrana basolateral del epitelio branquial y moderada a escasa marcación en el tejido conectivo del septo central. En las células respiratorias de la branquia 3 de animales aclimatados crónicamente a baja salinidad, la marcación resultó poco visible o ausente (figura 42).

La reactividad de G_0 observada en branquia 7 de animales aclimatados a 10‰ decrece luego de una transferencia de 24 horas a salinidades de 30 y 40‰ (figura 43). Para la branquia 3 en cambio, la baja reactividad registrada a 10‰ no cambia luego de la misma transferencia.

Con respecto a la expresión de G_i , se pudo observar que la misma fue escasa tanto para branquia 3 (figura 44) como para branquia 7 (figura 45) de animales aclimatados crónicamente a baja salinidad. Sin embargo, la

branquia 7 mostró un aumento de la expresión de G_i después de 24 horas de transferencia a las salinidades de 30‰ y 40‰ (figura 46).

branquia	tipo de aclimatación	salinidad	G_0				G_i			
			epiteliales	en pilar	conectivo	hemocitos	epiteliales	en pilar	conectivo	hemocitos
3	crón	10‰	+	-	+	++++	+	-	-	++++
3	crón	30‰	+	-	-	++++	+	-	-	++++
3	crón	40‰	-	-	-	++++	+	-	-	++++
3	agud	30‰	+	-	-	++++	+	-	-	++++
3	agud	40‰	+	-	-	++++	-	-	-	++++
7	crón	10‰	+++		-	++++	+	-	-	++++
7	crón	30‰	++	-	-	++++	-	-	-	++++
7	crón	40‰	++	-	-	++++	-	-	-	++++
7	agud	30‰	++	-	-	++++	+++	-	-	++++
7	agud	40‰	+	-	-	++++	+++	-	-	++++

Tabla 7: Diferencia cualitativa en la expresión de proteínas G_0 y G_i en branquia 3 (representativa de las branquias respiratorias) y branquia 7 (representativa de las branquias ionoreguladoras) de *C. granulatus*. Los tratamientos de aclimatación crónica se realizaron a 3 salinidades diferentes. La aclimatación aguda consistió en una transferencia desde 10‰ a 30 o 40‰ durante 24 horas. La convención adoptada fue la siguiente:

- = ausencia de marcación

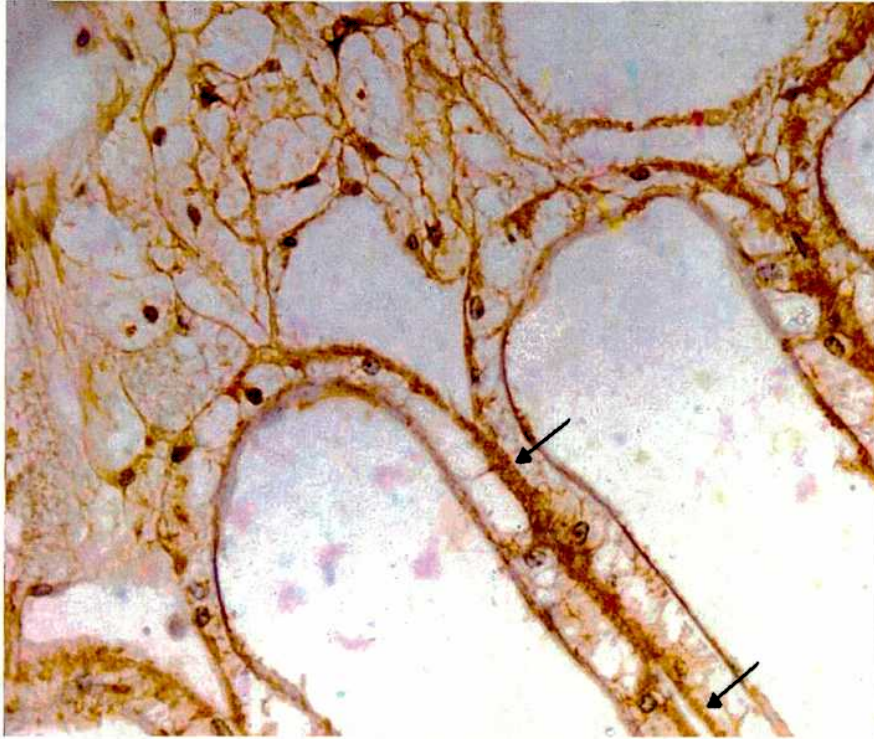
+ = poca marcación

++ = moderada marcación

+++ = mucha marcación

++++ = marcación inespecífica.

A



B

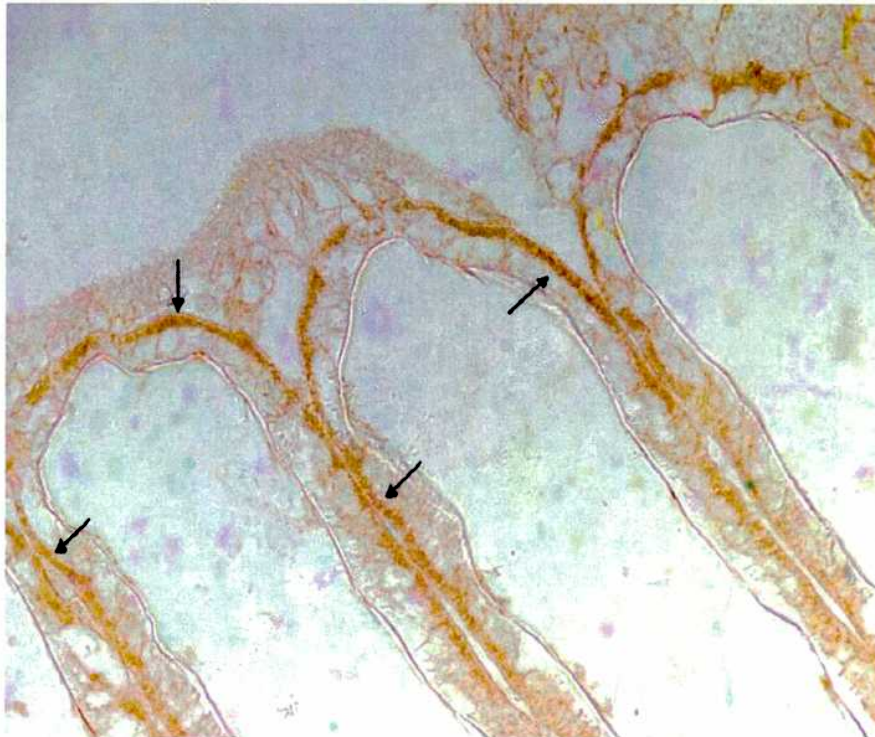


Figura 41: corte longitudinal de branquia 7 de un animal aclimatado crónicamente a baja salinidad coloreado con inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_0 (detección positiva indicada con las flechas). Figura A presenta una contra-coloración con hematoxilina (A: 400 X). Figura B, sin contra-coloración (A: 400 X).



Figura 42: corte longitudinal de una branquia 3 de un animal aclimatado crónicamente a baja salinidad con inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_0 (A: 400 X).



Figura 43: corte longitudinal de 7 μm de espesor de una branquia 7 de baja salinidad con inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_0 antes (A) y después (B) de una transferencia a 30‰; A: 1250X y 800 X respectivamente. Nótese como la intensidad de la marca (indicada por las flechas) disminuye luego de la transferencia.

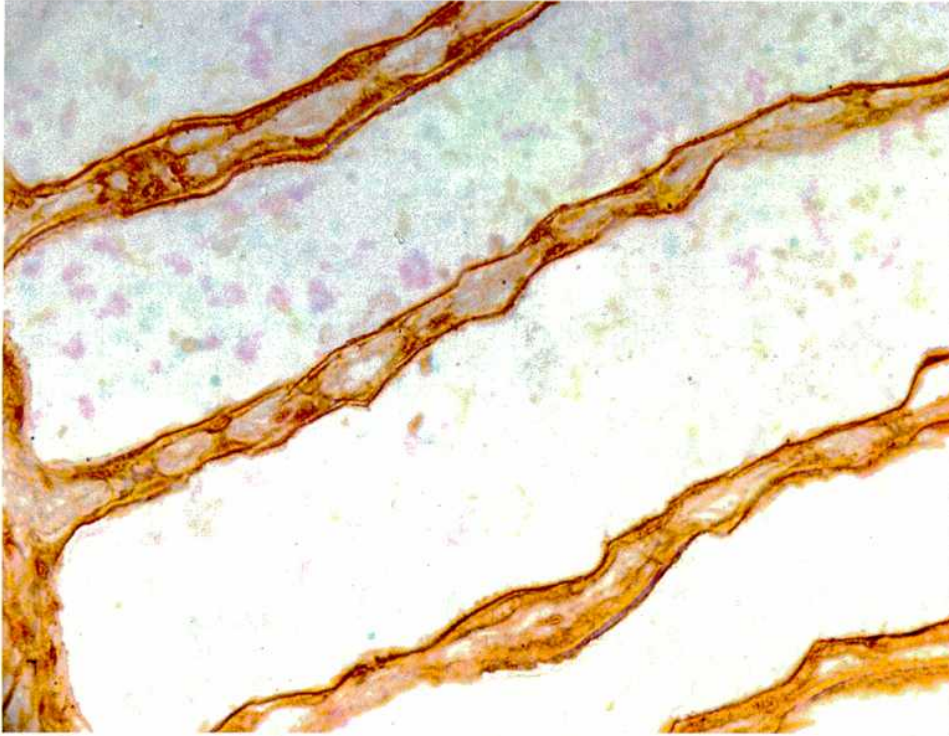


Figura 44: corte longitudinal de 7 μm de espesor de una branquia 3 de baja salinidad con técnica inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_i (A: 400 X).

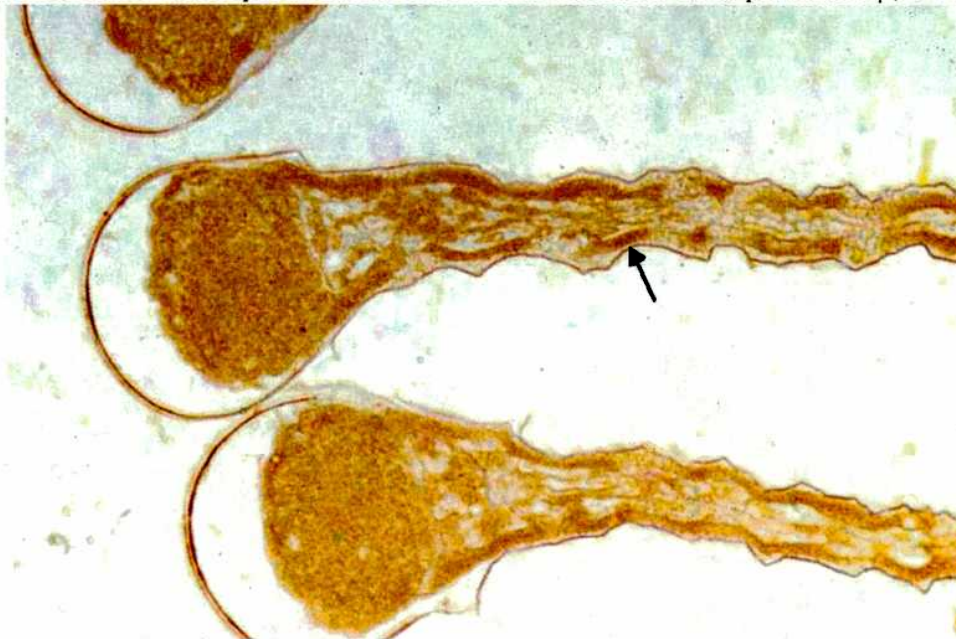


Figura 45: corte longitudinal de 7 μm de espesor de una branquia 7 de baja salinidad con inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_i (detección indicada con las flechas) (A: 400 X).

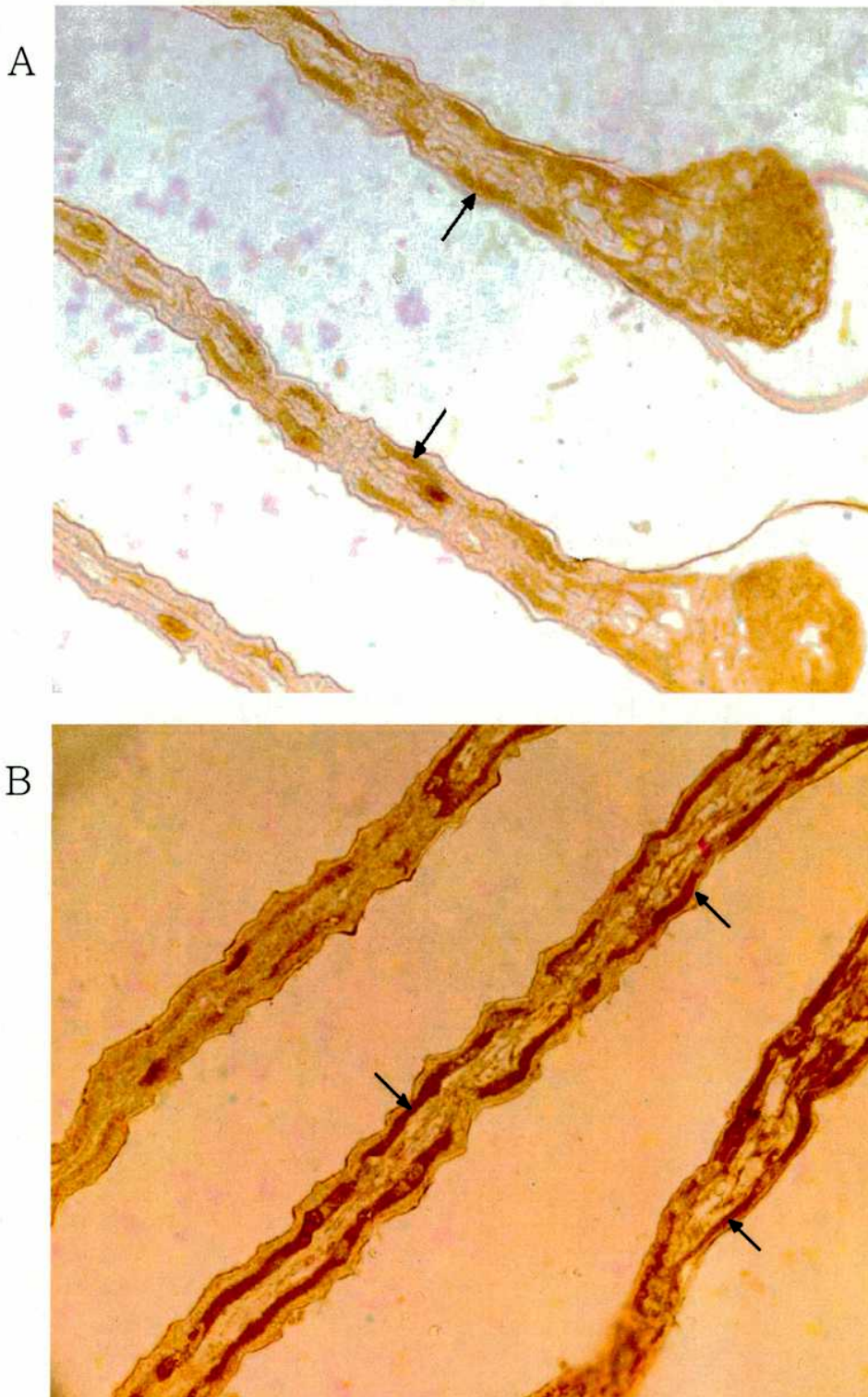


Figura 46: corte longitudinal de 7 μm de espesor de una branquia 7 de baja salinidad con inmunomarcación para detección de la sub-unidad α de la proteína G_i antes (A) y después (B) de la transferencia a 30‰; A: 400 X. Nótese como la intensidad de la marca (indicada por las flechas) aumenta luego de la transferencia.

2.4.2. Identificación del Órgano Pericárdico.

2.4.2.1. Caracterización Histológica.

En diversos reportes previos, se ha descrito al PO como un importante órgano de síntesis, almacenamiento y liberación de ciertas aminas biogénicas entre las que se cuenta la DA (para una reseña, ver Cooke y Sullivan, 1982).

Con el objeto de caracterizar al PO en *C. granulatus* y determinar la presencia de células nerviosas involucradas en la síntesis de DA, se realizaron preparaciones con diversas técnicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas cuyos resultados se describen a continuación. Como primera medida, se procedió a la disección, identificación, extracción y fijación del corazón y tejidos adyacentes en mezcla fijadora de Bouin. Se realizaron cortes histológicos de 7 μ m de espesor y se colorearon con Tricrómico de Masson, para un primer reconocimiento del órgano. La figura 47 muestra una vista general de un corte sagital en el cual pueden observarse los sacos pericárdicos ubicados lateralmente. En esta vista general también pueden apreciarse importantes paquetes musculares rodeados de tejido conectivo esponjoso.

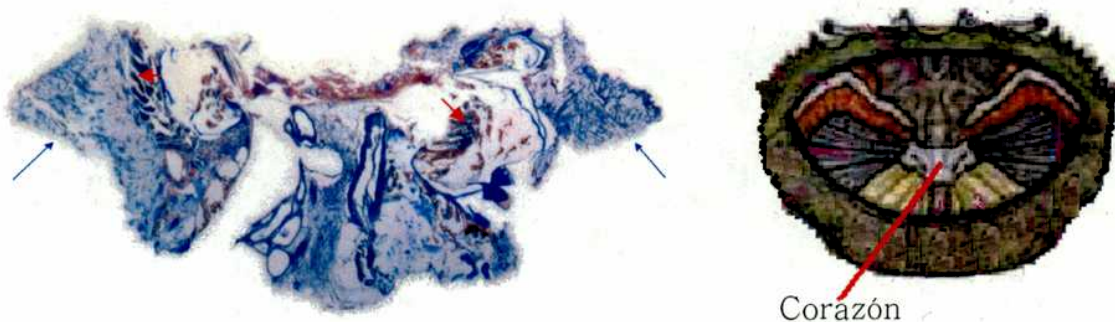


Figura 47: Izquierda) Vista general de un corte sagital de corazón de *C. granulatus*. (A: 6X). Los sacos pericárdicos están ubicados lateralmente (flechas azules). Nótese las bandas musculares (flechas rojas) rodeadas de tejido conectivo. Derecha) Esquema de la ubicación anatómica del corazón de un cangrejo.

Un detalle de los sacos pericárdicos muestra que los mismos presentan una estructura sacular delimitada por un epitelio simple plano el cual forma gran cantidad de pliegues. En el interior de los sacos, se observa un tejido conectivo vacuolado, con diversas lagunas hemolinfáticas y abundantes células de reserva (figura 48), similar al tejido conectivo esponjoso descrito en el branquioestegito de esta misma especie (Halperin *et al*, 2000). También se observan haces de fibras musculares asociadas a este tejido conectivo. Una observación detallada de las mismas muestra que se trata de fibras musculares estriadas (figura 49).

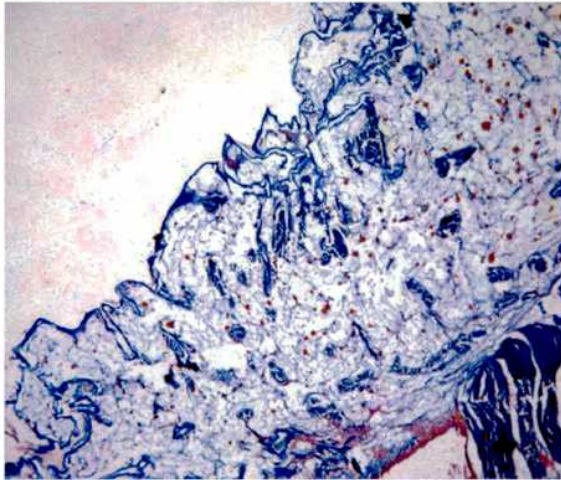
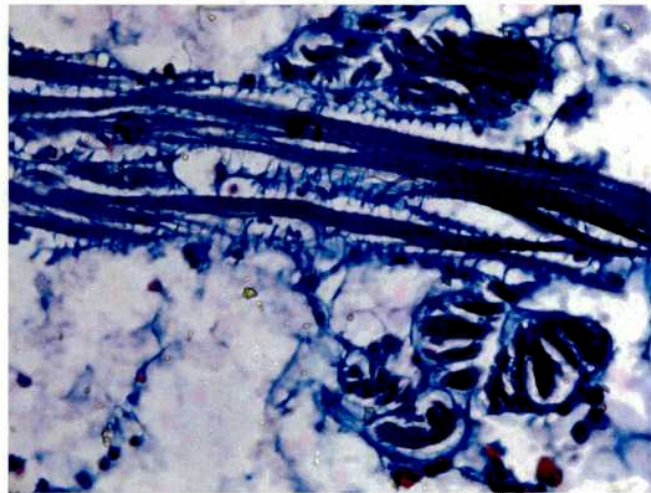


Figura 48: Detalle de los sacos pericárdicos de *C. granulatus*. Se observa la estructura sacular, con tejido conectivo esponjoso y células de reserva. (A: 50X).

Figura 49: Detalle de las fibras musculares estriadas que se encuentran asociadas al tejido conectivo esponjoso en los sacos pericárdicos de *C. granulatus*. (A: 400X).



El corazón propiamente dicho, está formado por importantes paquetes de fibras musculares estriadas (figura 50) y por tejido conectivo con abundantes lagunas hemolinfáticas (figura 51).

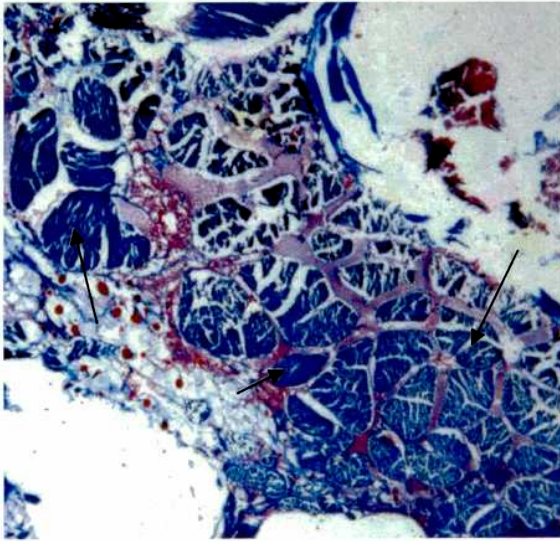


Figura 50: Paquetes de fibras estriadas (flechas) que conforman la parte muscular del corazón de *C. granulatus*. (A: 50X).

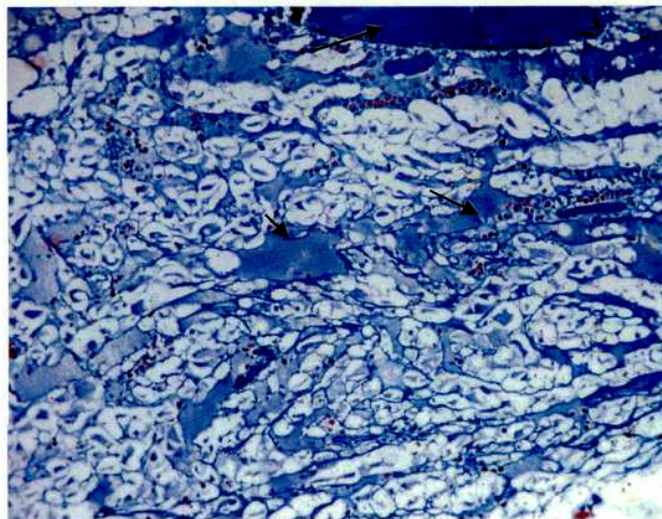


Figura 51: Tejido conectivo esponjoso irrigado por lagunas (flechas) hemolinfáticas en corazón de *C. granulatus*. (A: 100X).

En la figura 52 que ilustra una vista general del corazón, se observa en la parte anterior (líneas punteadas) un tejido de apariencia fibrilar.

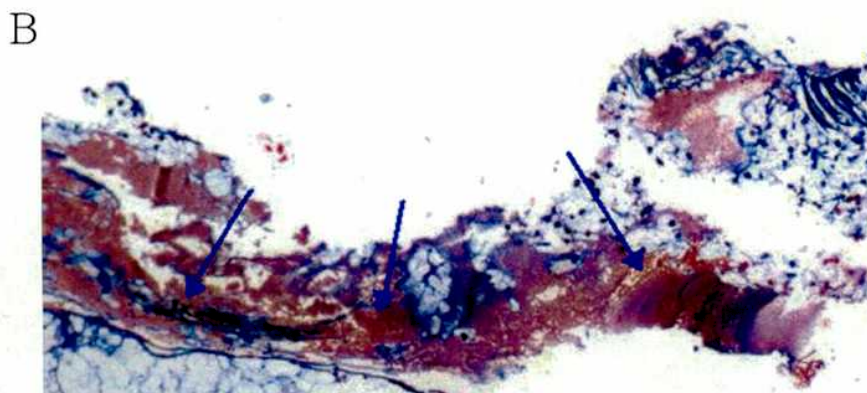
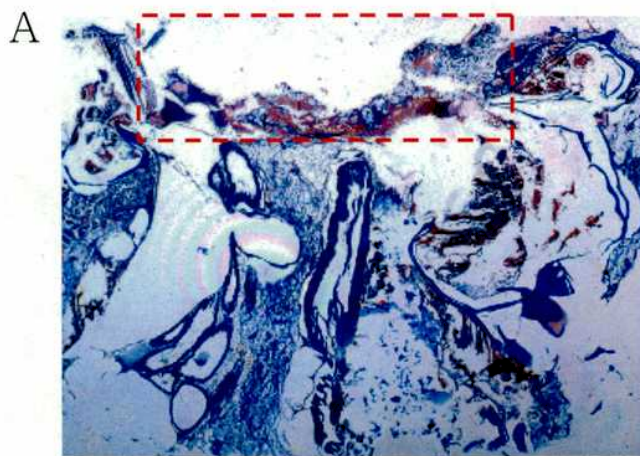


Figura 52: A) Vista general del corazón de *C. granulatus*, A: 12.5X. B) Detalle del tejido fibrilar (flechas) ubicado en la región anterior del corazón, A: 35X.

2.4.2.2. Identificación de Terminales Nerviosas.

Puesto que el PO está compuesto por una delicada red de fibras nerviosas (Cooke y Sullivan, 1982), se procedió a la identificación del mismo utilizando la técnica de Savier-Munger (S-M) sobre cortes de corazón de *C. granulatus*. Esta técnica identifica terminaciones nerviosas y neurofibrillas por la formación de un precipitado de plata sobre las mismas.

En la siguiente fotografía (figura 53) puede apreciarse un precipitado de plata sobre el mismo tejido de apariencia fibrilar que se identificó anteriormente con la coloración tricrómica de Masson.



Figura 53: Vista general de un corte sagital de corazón de *C. granulatus*. Las flechas indican la presencia de fibras o terminales nerviosas en la región anterior del corazón. Corte coloreado con la técnica de Savier-Munger (A: 6X)

Para identificar terminaciones nerviosas en las cuales hubiese almacenamiento de DA, se realizó una inmunomarcación, utilizando un anticuerpo monoclonal que identifica la enzima tirosina hidroxilasa. Esta enzima, cataliza la formación de DOPA (precursor de la DA), a partir de la

hidroxilación de tirosina tal como se observa en el camino metabólico de la figura 54.

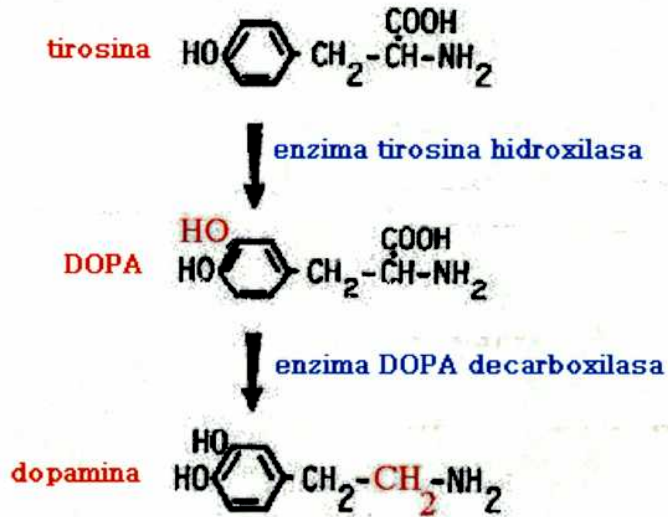


Figura 54: Enzimas que interviene en la formación de DA.

Luego de la incubación con el anticuerpo, se pudo observar marcación específica en el tejido nervioso identificado previamente con la técnica de Savier-Munger (figura 55).

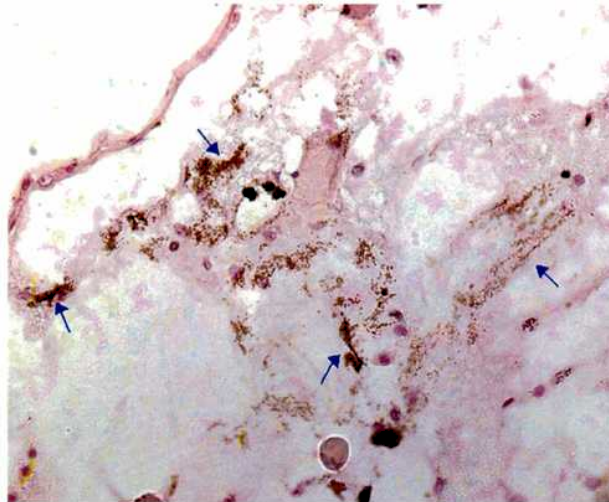


Figura 55: Inmunomarcación positiva (indicada por las flechas) para detección de terminales nerviosas dopaminérgicas, en corazón de *C. granulatus*. (A: 400X).

Discusión

1. Función del Branquiostegito de *C. granulatus*.

Los ejemplares de *Chasmagnathus granulatus* estudiados en este trabajo fueron colectados en Punta Rasa, Provincia de Buenos Aires. Como se comentó en la Introducción, esta zona se caracteriza por presentar una salinidad variable producto del aporte de las aguas de la cuenca del Salado y del Océano Atlántico. Se sabe que esta especie tiene la capacidad de hipo e hiper-regular su concentración osmótica frente a los cambios de salinidad del ambiente en que habita, de forma tal de mantener la osmolaridad de su medio interno alrededor de 900 mOsm kg^{-1} (aproximadamente 30‰) (Mougabure Cueto, 1998; Luquet *et al*, 2002b). Se sabe también, que en el estadio adulto estas funciones se llevan a cabo principalmente en las branquias posteriores al igual que en la mayoría de los cangrejos que presentan capacidad osmoregulatoria.

Recientemente, algunos estudios realizados en *Homarus gammarus* mostraron que cuando esta langosta se expone a un medio diluido, hiperregula a través del epitelio del branquiostegito y de los epipoditos. Lo novedoso de este aporte es que determinó por primera vez que en el estadio adulto de un crustáceo hiper-osmoregulador, los mecanismos de captación activa de iones se localizan en una estructura descripta hasta el momento como osmoreguladora solamente para estadios larvales.

Uno de los objetivos de esta tesis fue investigar si la estructura del branquiostegito de *C. granulatus* era compatible, desde un punto de vista morfológico y enzimático, con un órgano accesorio de transporte iónico. La evidencia existente al día de hoy, muestra que en esta especie los mecanismos de transporte iónico se localizan en las branquias posteriores y que el branquiostegito complementa a las branquias anteriores en el

intercambio de gases respiratorios. Puesto que *C. granulatus* habita la zona intermareal, periódicamente se ve expuesto al aire y es durante esos periodos de emersión cuando capta O₂ directamente desde el aire a través del revestimiento del branquiostegito. La excreción de CO₂ se realiza principalmente a través de las branquias independientemente del medio en que se encuentre el animal (Halperin *et al*, 2000).

Con respecto a las funciones de intercambio iónico en *C. granulatus*, existen diversos trabajos realizados sobre las branquias que muestran ampliamente su capacidad regulatoria y demuestran que son los órganos de transporte iónico por excelencia (Genovese *et al*, 2000a; López-Mañanes *et al*, 2000; Castillo *et al*, 2001; Luquet *et al*, 2002a, b; Onken *et al*, 2003; Tresguerres *et al*, 2003). Sin embargo, no existe hasta ahora ningún trabajo que haya investigado si el branquiostegito conserva en el estadio adulto parte de la capacidad de osmoregular que tuvo durante los estadios larvales o si su función se limita simplemente a complementar el intercambio gaseoso durante la exposición al aire.

El análisis de los moldes de látex y el estudio seriado de microscopía óptica mostraron que el revestimiento de las cámaras branquiales de *C. granulatus* está constituido por un tegumento delgado, excepto en la zona del ángulo dorsolateral donde se observan pliegues y proyecciones lobuladas. Los resultados de la morfometría y de la observación de microscopía electrónica de transmisión indican que la superficie respiratoria se restringe a las zonas dorsal y lateral de la región anterior del branquiostegito. Se sabe que ésta zona es ventilada con aire cuando los individuos de esta especie enfrentan prolongados periodos de emersión con la consecuente evaporación de parte de la reserva de agua que mantienen en las cámaras branquiales y que recirculan sobre su caparazón.

Desde el punto de vista ultraestructural, se podría decir que el branquiostegito de *C. granulatus*, especialmente la región anterior, es apto como órgano de intercambio gaseoso. El estrecho contacto entre el epitelio plano y el sistema de lagunas hemolinfáticas es un requisito indispensable para la difusión de gases respiratorios. Las pequeñas arterias observadas en las preparaciones de branquiostegito están tapizadas por células endoteliales con numerosas interdigitaciones de membrana plasmática. Esto sugiere que dichos vasos poseen la capacidad de cambiar su diámetro a fin de regular la perfusión del órgano en respuesta a los cambios en las condiciones respiratorias. Se podría especular que cuando el animal se encuentra sumergido, se contraen las arteriolas aumentando la resistencia del flujo hemolinfático hacia el branquiostegito y favoreciendo la perfusión de las branquias mientras que durante la exposición al aire, disminuye la resistencia de estos vasos y se favorece así la perfusión del branquiostegito. Esto último sólo ocurriría cuando el animal respira aire. Un mecanismo similar fue descrito en otra especie bimodal utilizando técnicas de marcación radioactiva (Taylor y Greenaway, 1984). La existencia de células epiteliales modificadas, con gran densidad de microtúbulos y conectadas a bandas musculares a través de uniones zig-zag, probablemente se encuentre relacionada con la regulación del flujo hemolinfático a través de las lagunas respiratorias, pero también con una función de soporte y fuerza, previniendo la separación del tegumento interno del externo causada por cambios drásticos en la presión de perfusión. Podría hacerse una analogía entre estas células epiteliales modificadas con las células epidérmicas que se conectan a células fimbriadas del tejido conectivo del branquiostegito en *Holthuisana transversa*, *Geograpsus grayi*, *Geograpsus crinipes* y en *Gecarcoidea natalis* (Taylor y Greenaway, 1979; Farrelly y Greenaway,

1993). Estos autores también describen arreglos particulares de microtúbulos y componentes filamentosos en el citoplasma de éstas células.

El área del tegumento del branquiostegito de *C. granulatus* ($11.4 \pm 0.3 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1}$) es sensiblemente menor que la superficie respiratoria branquial calculada para la misma especie ($278.5 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1}$) (Luquet *et al*, 2000). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en la medición hecha a partir de los moldes de látex probablemente se haya subestimado el valor de la superficie porque dichos moldes no pudieron copiar con rigurosidad el sistema de pliegues del branquiostegito. Por otra parte, la distancia de difusión calculada por Luquet *et al* (2000) para las branquias respiratorias de *C. granulatus* ($3.74 \mu\text{m}$) casi triplica al valor promedio calculado en este trabajo para el tegumento interno del branquiostegito ($1.35 \mu\text{m}$).

Teniendo en cuenta que la velocidad de transferencia de los gases respiratorios a través de un epitelio depende en forma directa de la relación entre la superficie respiratoria y la distancia de la barrera de difusión, parecería ser que las branquias de *C. granulatus* son casi 9 veces más eficientes para el intercambio de gases (captación de oxígeno) que el branquiostegito. Sin embargo, la diferencia de concentración del gas a ambos lados del epitelio también es un factor determinante en la velocidad de transferencia y se sabe que la solubilidad y la difusibilidad del oxígeno son mucho más altas en aire que en agua. La densidad y la viscosidad del agua son 1000 veces más altas que las del aire, aproximadamente, y el agua contiene tan sólo la trigésima parte del oxígeno molecular que se encuentra en el aire. Más aún, las moléculas de gas difunden 10000 veces más rápidamente en el aire que en el agua (Eckert *et al*, 1990). Por lo tanto, y aún careciendo de una gran superficie de intercambio, se puede afirmar que el tegumento interno del branquiostegito de *C. granulatus* está

bien adaptado morfológicamente para la captación de oxígeno durante los periodos de emersión y que esta capacidad se encuentra directamente favorecida por la ventilación de su superficie con aire.

La enzima anhidrasa carbónica (CA), la cual es ubicua en las branquias de cangrejos, cataliza la conversión de HCO_3^- hemolinfático a CO_2 gaseoso manteniendo un gradiente adecuado de presión de CO_2 a través de la superficie respiratoria lo que facilita la excreción. Los cangrejos bimodales al carecer de una cantidad significativa de esta enzima de membrana en el branquiostegito, dependen de sus branquias para excretar el CO_2 hacia el agua de las cámaras branquiales. La presencia de la CA es un requisito esencial en los cangrejos respiradores aéreos (para una reseña, ver Henry, 1994). En el caso particular de *Birgus latro*, se demostró que tanto la CA de membrana como la citoplasmática están presentes en sus pulmones y que le permiten a esta especie de hábito terrestre, excretar cantidades apreciables de CO_2 al medio (Morris y Greenaway, 1990). Henry (1991) demostró una relación directa entre el incremento de la actividad de la CA pulmonar de 4 especies de cangrejos y su grado de “terrestrialidad” concluyendo que el cambio de excreción branquial a pulmonar de CO_2 constituye un paso crucial en la transición al medio terrestre (Henry, 1994; Morris, 2002).

Resultados presentados recientemente, confirmaron que para *C. granulatus* el tegumento interno del branquiostegito no resulta eficiente en la excreción de CO_2 durante los periodos de emersión, siendo esta función casi exclusiva de las branquias (Halperin *et al*, 2000). Los bajos niveles de actividad de CA registrados en el presente trabajo para el branquiostegito de *C. granulatus* (en comparación con el de las branquias respiratorias), corroboran la capacidad limitada que tiene esta especie para excretar CO_2

directamente al aire. Esto constituye un factor limitante para la invasión del hábitat terrestre, comparado con aquellos cangrejos respiradores aéreos obligados.

Teniendo en cuenta que la actividad enzimática medida en el branquiestegito corresponde a la suma del *pool* citoplasmático y el de membrana, también se demuestra que la participación de esta enzima en procesos de captación de Na^+ y Cl^- (aportando los contraiones H^+ y HCO_3^-) es prácticamente irrelevante frente a las branquias posteriores. Si la actividad de la CA pulmonar medida fue significativamente menor a la de las branquias respiratorias, implica que es mas baja aún que la registrada para las branquias osmoreguladoras de esta especie, las cuales casi cuadruplican al valor de actividad enzimática de las branquias respiratorias (Genovese *et al*, 2000b). Este resultado indica que el branquiestegito de *C. granulatus* tiene un papel muy limitado en los mecanismos de captación activa de Na^+ y Cl^- durante periodos de exposición a un medio de baja salinidad.

La observación a nivel óptico y electrónico de las preparaciones de branquiestegito no mostró que este órgano presentase la morfología necesaria para el intercambio de iones a través del tegumento interno. Si bien se encontraron algunas células epiteliales con repliegues de membrana las mismas no mostraron la estructura típica de los epitelio de transporte (repliegues basolaterales de membrana asociados a mitocondrias en forma de bastones, vesículas apicales, etc) como la descrita para el tegumento interno del branquiestegito de la langosta *Homarus gammarus* (Haond *et al*, 1998) o para los epitelios de branquias posteriores (iono-reguladoras) de otros cangrejos osmoreguladores como *Callinectes sapidus* (Copeland y Fitzjarrell, 1968; Towle y Kays, 1986), *Eriocheir sinensis* (Barra *et al*, 1983), *Carcinus maenas* (Compère *et al*,

1989), *Goniopsis cruentata* (Martelo and Zanders, 1986) o del mismo *C. granulatus* (Luquet *et al*, 2000; Genovese, 2000a). De los resultados de las técnicas de lectinohistoquímica aplicadas en este trabajo a branquias y branquiostegito de *C. granulatus*, no se desprende ningún tipo de similitud entre ambos órganos en cuanto al patrón de distribución de azúcares.

En vista de estos resultados, se podría afirmar que el tegumento interno del branquiostegito de *C. granulatus* no cumple un papel importante en el transporte iónico y que esta función queda principalmente restringida a las branquias posteriores, aún en condiciones de emersión. En esas condiciones de exposición al aire, si bien se produce evaporación de parte de la reserva de agua que el animal recircula, la misma afecta más a la funcionalidad de las branquias anteriores (respiratorias) que a las posteriores (osmoreguladoras). Esto se debería a que la parte anterior-superior de las cámaras es la que sufre primero la evaporación parcial de la reserva de agua y consecuentemente se inicia el colapso de las branquias anteriores mientras que la parte posterior-inferior de las cámaras branquiales siempre contiene algo de agua y por lo tanto, la funcionalidad de las branquias posteriores no es afectada.

2. Regulación del Transporte Iónico en Branquias Posteriores de C. granulatus.

El presente estudio pretende describir algunos factores involucrados en el control de los procesos de osmoregulación branquiales de *C. granulatus* aclimatado a baja salinidad. Al día de hoy, existe cierto consenso sobre el papel que juega la dopamina (DA) en respuesta a la transferencia de cangrejos eurihalinos desde agua de mar a un medio de salinidad más baja. Como ha sido comentado en la Introducción de este trabajo, se sabe que por ejemplo, en el caso de *Carcinus maenas*, esta bioamina se libera a la circulación ante un estrés hipo-osmótico aumentando significativamente su concentración en hemolinfa y en branquias (Zatta, 1987). Por otra parte, Sommer y Mantel (1988, 1991) trabajaron en la misma especie y pudieron demostrar que una inyección *in vivo* de DA incrementa la captación de Na^+ , la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa y en el contenido branquial de cAMP.

En otro cangrejo hiperregulador, *Eriocheir sinensis*, Trausch *et al* (1989) mostraron que tanto la serotonina (5-HT) como la DA son capaces de inducir una fosforilación significativa de proteínas citosólicas y de membrana, que atribuyen a la unión de estas bioaminas a receptores específicos en el epitelio branquial. En el caso particular de la 5-HT, esta fosforilación de proteínas de membrana pudo ser inhibida luego del agregado de ouabaína, (inhibidor específico de la Na^+ , K^+ -ATPasa), lo cual prueba que dicha enzima sería uno de los principales efectores de esta hormona. En otra serie de experimentos, estos autores mostraron que la adición de cAMP también induce fosforilación de la fracción que contiene las proteínas de membrana.

En resumen, la idea que prevalece en la literatura es que los

mecanismos de transporte iónico de branquias posteriores de cangrejos hiperreguladores sometidos a un estrés hipo-osmótico se inducen por la unión específica de DA a receptores de membrana basolaterales (Mo *et al*, 2002). Esta unión sería seguida por la activación de proteínas quinasas dependientes de cAMP las cuales finalmente activarían también por fosforilación a la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa. Las evidencias fisiológicas de estos mecanismos son el aumento en la captación de Na^+ y el subsiguiente aumento de la diferencia de potencial transepitelial (TEPD) (para una reseña, ver Kamemoto 1991 y Morris, 2001).

Los resultados del presente trabajo corroboran apenas parcialmente esta hipótesis. Si bien durante las perfusiones con solución salina 30‰ + DA se registró aumento de la captación de Na^+ , cuando las branquias fueron sometidas a un shock hipo-osmótico, esta amina produjo un efecto si no contrario, al menos muy diferente al anterior. Más aún, en ninguna de las condiciones probadas (iso o hipo-osmóticas), se pudo establecer un nexo que indicase que la DA y el cAMP son parte una misma vía de señalización. A continuación se analizarán con más detalle cada uno de estos puntos.

- Condiciones experimentales “basales”:

Durante las perfusiones de branquias posteriores de *C. granulatus* con una solución salina 30‰ (iso-osmótica a la hemolinfa) se registró un valor medio de TEPD de -1.5 mV. Este valor corresponde a un flujo basal de iones a través del epitelio ya que en esas condiciones de salinidad no hay un compromiso osmótico. Luego de agregar DA al perfusato, se registraron aumentos significativos tanto en el TEPD como en la captación activa de Na^+ . Además, la pre-incubación de las branquias con DA 10^{-5}

mol l⁻¹ provocó un incremento del 46% en la actividad Na⁺, K⁺-ATPasa. Estos resultados estarían indicando que en condiciones de perfusión con una solución salina iso-osmótica a la hemolinfa (lo que equivale a un estado “basal” del transporte iónico en la branquia), la DA es capaz de incrementar la captación de Na⁺ probablemente por un estímulo sobre la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa.

Por otra parte, la adición de ciertos compuestos conocidos por su capacidad de estimular la vía del cAMP (cp-cAMP, forskolina, IBMX) también fue capaz de aumentar el TEPD y la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa. Sin embargo, estos compuestos provocaron diferentes perfiles de respuesta con respecto a la DA: mientras que la DA produjo un efecto inductor transitorio sobre la captación de Na⁺, el TEPD y la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa, los otros compuestos (cp-cAMP, forskolina, IBMX) ejercieron un efecto sostenido en el tiempo para las mismas variables (figuras 25 y 26). Existen muy pocos aportes en la literatura sobre los efectos de DA y cAMP sobre el TEPD, el flujo de Na⁺ ó la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa en branquias a lo largo del tiempo. Los resultados presentados por Sommer y Mantel (1988) parecen sugerir que la inyección *in vivo* de DA o de extracto de órgano pericárdico (PO) produce un efecto menos sostenido que el del análogo del cAMP, db-cAMP, en la captación activa de Na⁺ de branquias de *Carcinus maenas*.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas de las perfusiones con DA en branquias posteriores de *C. granulatus* muestran un perfil bifásico lo cual podría explicarse por la presencia de dos tipos de receptores de membrana con diferentes constantes de afinidad. Suele ocurrir en estos casos que ambos receptores activan mecanismos de transducción opuestos (en este caso, uno que activaría la captación de Na⁺ y el otro la inhibiría). Se podría especular en este caso, que la activación de cada uno

de estos mecanismos dependerá de la concentración de la amina circulante la cual estaría relacionada con el estímulo osmótico al que se ve sometido el animal.

Como se comentó más arriba, en condiciones iso-osmóticas de perfusión, el agregado de cp-cAMP, forskolina o IBMX produjeron un incremento significativo en el TEPD en branquias de *C. granulatus*. Además, la pre-incubación de branquias con forskolina (que activa la adenilato ciclasa) produjo un aumento de más del 50% en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Esto indica que en condiciones iso-osmóticas (que se corresponden con un estado “basal” del transporte iónico en la branquia) la estimulación de la vía del cAMP produce un incremento en el flujo de Na^+ por inducción de la Na^+ , K^+ -ATPasa.

En el ensayo realizado con el objeto de determinar si la DA actúa sobre el transporte de Na^+ a través a un incremento del cAMP, no se registraron variaciones significativas en la concentración branquial de ese nucleótido luego de la incubación con DA. Este resultado indica que no habría un vínculo directo entre la DA y la vía del cAMP en branquias de *C. granulatus*. Si a esto se le suman los diferentes perfiles de respuesta en el tiempo obtenidos para las drogas probadas (transitorio para la DA y sostenido para el cAMP) se puede sugerir que la DA y el cAMP actúan sobre el transporte iónico de Na^+ por vías de señalización diferentes. Y que en condiciones iso-osmóticas, ambas vías de señalización convergen en la activación de la Na^+ , K^+ -ATPasa o en algún paso enzimático previo. Pero ciertamente puede interpretarse que la vía del cAMP no responde al estímulo que resulta de la unión de la DA a su receptor de membrana sino a otro tipo de estímulo que aún debe ser identificado.

- Condiciones experimentales de branquia “activada”:

La perfusión de branquias posteriores de *C. granulatus* con una solución salina 20‰ (o sea, hipo-osmótica con respecto a la hemolinfa) produjo un previsible incremento en el TEPD que refleja la activación de mecanismos de transporte iónico. Bajo estas condiciones hipo-osmóticas el agregado de DA al perfusato causó una disminución significativa del TEPD y si bien no lo llevó hasta los valores basales (perfusión con salina 30‰), fue capaz de inhibirlo en más de un 40%. En el experimento siguiente, cuando se agregó DA al perfusato de branquias previamente estimuladas por forskolina, se registró una disminución del TEPD de la misma magnitud que en el experimento anterior. Esto implica que cuando el transporte iónico branquial se encuentra activado (sea por un shock hipo-osmótico o por forskolina) la DA actúa como un modulador negativo del transporte a través del epitelio.

Por trabajos previos de nuestro laboratorio, se sabe que cuando las branquias posteriores de *C. granulatus* son perfundidas con solución salina hipo-osmótica, se produce un incremento en el TEPD y en la captación activa de Na^+ que obedecen, en gran medida, a una activación de la Na^+ , K^+ -ATPasa (Luquet *et al*, 2002b, Tresguerres *et al*, 2003). Se determinó que esa activación respondía a un mecanismo de autorregulación branquial puesto en marcha por una disminución en la osmolaridad hemolinfática, puesto que dichos autores trabajaron con preparaciones de branquias o hemilaminillas aisladas y sin otro estímulo que el cambio de concentración del perfusato. Sin embargo, no se puede descartar que, sometido el animal a esas condiciones osmóticas, además de existir mecanismos autoregulatorios, también entren en juego mecanismos neuroendócrinos.

Savage y Robinson (1983) probaron que existe un factor que aparece en la hemolinfa luego de transferir animales a un medio de baja

salinidad y que ese factor es capaz de incrementar la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa branquial. Además, Zatta (1987) pudo demostrar que la DA incrementa significativamente su concentración en hemolinfa y branquias luego de la transferencia de animales a baja salinidad. En una reciente reseña sobre los procesos osmorregulatorios de *E. sinensis* se reconoce que además de un mecanismo autoregulatorio branquial, existe otro que es hormona-dependiente (Onken y Riestenpatt, 1998).

Uno de los interrogantes que se intenta responder en el presente trabajo es si ese “factor” que se libera a la hemolinfa bajo estrés hipo-osmótico afecta la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa a través de la vía de la adenilato ciclasa-cAMP. Cuando se cuantificó la concentración intracelular de cAMP de branquias de cangrejos transferidos desde un medio iso-osmótico (salinidad 30‰) a uno hipo-osmótico (salinidad 10‰) no se registraron variaciones significativas a distintos tiempos de transferencia. Aparentemente, según estos resultados, en condiciones de estrés hipo-osmótico, el estímulo que produce un incremento en la captación de Na^+ no seguiría una vía de señalización cAMP dependiente. Sin embargo, Tresguerres *et al* (2003) obtuvieron resultados diferentes respecto a este interrogante. Estos autores registraron un aumento significativo del TEPD en branquias de *C. granulatus*, luego de la perfusión con solución salina hipo-osmótica y teofilina (inhibidor específico de la fosfodiesterasa). Aunque dicho incremento lo revierten casi un 43%, luego del cambio del perfusato por otro con solución salina iso-osmótica y teofilina, los valores de TEPD siguen siendo aún significativamente más altos que los basales (solución salina iso-osmótica solamente). Es decir, que la presencia de teofilina en el perfusato iso-osmótico ayuda a preservar el cAMP que se generó luego del shock hipo-osmótico. Esto sugiere fuertemente, una relación entre el estímulo hipo-osmótico y un incremento en la

concentración de cAMP branquial (Tresguerres *et al*, 2003). En la figura 35 del presente trabajo, se puede observar que, si bien no existen diferencias significativas en el contenido de cAMP entre branquias incubadas con y sin DA para ninguna de las salinidades de aclimatación crónica probadas (10, 30 y 40‰), el contenido de ese nucleótido es un 40% más alto en aquellos animales aclimatados a baja salinidad (10‰). Tal vez, durante el ensayo *in vivo* de transferencia de animales a baja salinidad (figura 36), la variabilidad de los resultados en un número bajo de animales (n=5) sumada a la rápida degradación que sufre el cAMP, no permitieron apreciar las variaciones de dicho nucleótido luego del *shock* hipo-osmótico. Es muy probable, que la transferencia a baja salinidad sea un estímulo para la activación de una vía de cAMP-PKA que active, a su vez, ciertas proteínas de transporte iónico, (como por ejemplo, la Na⁺, K⁺-ATPasa). De los resultados provenientes de experimentos en condiciones de “branquia activada” se desprende que la DA no sería la hormona que induce la activación de la vía del cAMP-PKA, ya que la misma actúa como un modulador negativo de esa activación.

En las inmunomarcaciones de proteína G en *C. granulatus* se observa poca diferencia en la cantidad de marcación de G_i entre branquias posteriores de animales aclimatados crónicamente a diferentes salinidades. Se observa poca marcación en branquias de baja salinidad mientras que en aquellas de salinidad media y alta la marcación es inexistente. La marcación de proteína G_i se hace más evidente luego de la transferencia de animales desde baja salinidad hacia salinidades media y alta. La proteína G_i se caracteriza por estar libre en la membrana plasmática hasta el momento en que la hormona se une al receptor. La interacción con el complejo hormona-receptor hace que la proteína G_i se desprenda de la molécula de GDP y que una GTP citoplasmático a su

subunidad α . Este cambio provoca la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la consecuente disminución en la concentración de cAMP intracelular.

Existe por lo tanto, cierto consenso entre los resultados cualitativos de la inmunomarcación de G_i y los cuantitativos obtenidos a partir de la medición del contenido de cAMP branquial. Como ya se comentó, en el ensayo *in vitro* de cAMP, se midió una concentración de ese nucleótido 40% más alta en branquias incubadas con solución salina hipo-osmótica (10‰) respecto a las incubadas con soluciones salinas iso- e hiper-osmóticas (30 y 40‰). Es decir, que en salinidades iguales o mayores a 30‰, existiría una menor actividad de la enzima adenilato ciclasa. El aumento de expresión de proteína G_i (inhibidora de la adenilato ciclasa) luego de la transferencia a 30 y 40‰ es coincidente con la baja concentración de cAMP medida en branquias posteriores de *C. granulatus*.

Los resultados de la relación entre DA y cAMP del presente trabajo contrastan con los encontrados por Sommer y Mantel (1991) en el cangrejo estuarial, *Carcinus maenas*, en los que sí fue posible registrar un significativo aumento de la concentración de cAMP branquial no sólo luego de una inyección *in vivo* de DA 10^{-5} mol l^{-1} sino también luego de una transferencia a un medio de baja salinidad. Sin embargo, los resultados de dicho trabajo deben considerarse con cautela ya que en el mismo la determinación del cAMP fue realizada 24 horas después de la transferencia al medio de baja salinidad y el número de cangrejos utilizados es muy bajo ($n=3$). Teniendo en cuenta que la vida media de la molécula de cAMP es muy corta (Rosen *et al*, 1970; Van Sande *et al*, 1977), ese pico medido 24 horas después de la transferencia (es decir, a 24 horas del estímulo osmótico) podría obedecer a cualquier otro tipo

estímulo. En el caso del experimento con DA, analizaron la variación en la concentración de cAMP luego de 3 horas de la inyección *in vivo*. Si bien en este caso el tiempo del ensayo no es tan largo, no es resolutivo en cuanto al órgano blanco de la DA. En dicho ensayo *in vivo*, no es posible asegurar cuál es el órgano blanco sobre el que actúa la droga inyectada. Con lo cual, no hay evidencia que indique que la DA es el factor hemal descrito por Savage y Robinson (1983) ni que actúe directamente en las branquias posteriores a través de un incremento del contenido de cAMP branquial.

En otro trabajo realizado también en *C. maenas*, se registró un incremento en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa y una disminución en la concentración del cAMP branquial luego de la transferencia de animales a un medio de baja salinidad (Lucu y Flik, 1999). Nuevamente, las mediciones del contenido de cAMP branquial se realizaron a tiempos de transferencia muy largos (3, 6 y 336 horas). Sin embargo, si se compara el valor de la concentración de cAMP a las 3 horas de transferencia con respecto al valor control se ve que, al igual que en el caso de *C. granulatus*, no hay variación en la concentración del nucleótido. En este trabajo, Lucu y Flik, midieron una activación muy significativa ($p < 0.01$) de la Na^+ , K^+ -ATPasa (casi 67%) a las 4 horas de transferencia. Si esta activación estuviese directamente relacionada con una inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto, una disminución del cAMP, dicha disminución tendría que haberse podido registrar a las 3 horas de transferencia lo cual no se hizo.

Si se analiza el caso de *Eriocheir sinensis* en relación a la vía de señalización que sigue la DA, también se encuentran algunas discrepancias entre los distintos grupos que estudian la regulación del transporte iónico en esta especie. Mo *et al* (1998) determinaron que luego de la perfusión

de branquias con DA se producía un incremento significativo en el contenido de cAMP y en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa y sugieren que todo responde a una misma vía de señalización (DA $\rightarrow$ aumento del cAMP branquial $\rightarrow$ aumento de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa $\rightarrow$ aumento en la captación de Na^+). Anteriormente, Detaille *et al* (1992) probaron que cuando las branquias posteriores de esta especie son perfundidas con DA o con db-cAMP, se incrementan el TEPD y el contenido de fructosa difosfato (Fru 2,6-dP) la que actúa como metabolito control para la coordinación de la glucólisis y gluconeogénesis.

Sin embargo, Riestenpatt *et al* (1994) trabajando en la misma especie en preparaciones de hemi-laminillas montadas en una microcámara de Ussing, demostraron que el cAMP efectivamente incrementa la captación de Na^+ pero debido a un aumento en la conductancia de este ión (canales de membrana apical) y no por activación de la Na^+ , K^+ -ATPasa a la cual le atribuyen una relevancia casi inexistente como efector de esa vía de señalización.

Seguramente las diferencias en la vía de señalización propuestas para la regulación de la captación sales en condiciones de estrés hipo-osmótico entre distintas especies hiperreguladoras están directamente relacionadas con los modelos propuestos para estas funciones de transporte en cada una de ellas. La Na^+ , K^+ -ATPasa basolateral es fundamental para el transporte de NaCl en *E. sinensis* o en *C. granulatus*. En *E. sinensis* esta enzima es mayormente responsable de la captación activa de Na^+ , mientras que la de Cl^- es directamente dependiente de una bomba de protones apical (V H^+ -ATPasa) (Onken y Putzenlechner, 1995). Sin embargo, tanto *C. granulatus* como *C. maenas* presentan un modelo en el cual el transporte de NaCl se encuentra mayoritariamente acoplado y la Na^+ , K^+ -ATPasa es la principal fuerza motriz para la entrada de ambos

iones (Riestenpatt *et al*, 1996; Luquet *et al*, 2002b, Onken *et al*, 2003). Estos modelos sugieren que la estimulación de la Na^+ , K^+ -ATPasa produciría diferentes efectos en cada especie.

Las inmunomarcaciones de proteína G_0 de *C. granulatus* fueron más evidentes en branquias de animales aclimatados a baja salinidad que en aquellos aclimatados a salinidad media y alta. Más aún, la cantidad de marcación disminuye luego de la transferencia de animales desde baja hacia una salinidad media o alta. La activación la proteína G_0 por la interacción con el complejo hormona-receptor produce un cambio conformacional que a su vez activa la enzima fosfolipasa C (PLC). La PLC a su vez, activa la proteína quinasa C (PKC) cuya función es la de fosforilar otras proteínas celulares. Se ha postulado que la proteína G_0 tiene un papel importante en el control de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Alberts *et al*, 1994). Si bien los resultados de las inmunomarcaciones de G_0 en *C. granulatus* son solamente cualitativos, los mismos indican la participación de otra vía de señalización intracelular para la modulación del transporte en condiciones hipo-osmóticas. En un trabajo realizado en branquias perfundidas de *E. sinensis*, se determinó que el agregado del análogo del diacilglicerol, OAG, o del éster de forbol, PMA, conocidos activadores de la PKC, disminuyen el TEPD e incrementan el flujo de Na^+ pero no el de Cl^- (Asselbourg *et al*, 1991). Esta aparente contradicción es entendible si se considera que en *E. sinensis* la captación de Na^+ es independiente de la de Cl^- y por lo tanto un aumento en la corriente de Na^+ implica una disminución del TEPD (negativo) en términos absolutos.

Evidentemente, el control de la regulación del transporte iónico de especies hiperreguladoras es más complejo de lo que se había descrito

hasta el momento. No solamente existe un mecanismo de autorregulación que responde a cambios en la osmolaridad hemolinfática sino también otro/s neuroendócrino/s que involucran bioaminas como la DA y la 5-HT o por ejemplo, la hormona hiperglicemiante (CHH) secretada desde los pedúnculos oculares y en el órgano pericárdico (Eckhardt *et al*, 1995; Pierrot *et al*, 1994; 2000). Además, no solamente la vía del cAMP está implicada en la regulación de los procesos de transporte iónico sino también la vía de la PKC (Asselbourg *et al*, 1991) y la de Ca^{2+} /calmodulina (Péqueux y Gilles, 1992). Teniendo en cuenta que no existe un solo modelo de transporte iónico que explique los mecanismos para todas las especies hiperreguladoras, seguramente tampoco habrá un único modelo que explique cómo se traduce el estímulo osmótico.

En relación al sitio de almacenamiento y liberación de DA, se sabe por la bibliografía disponible, que el órgano pericárdico (PO) se compone de las terminales de una red de neuronas que llega al corazón a través de dos ramas laterales provenientes de nervios dorsales (Cooke y Sullivan, 1982). En el presente estudio, la técnica de Savier-Munger para identificación de fibras nerviosas realizadas en cortes histológicos de corazón de *C. granulatus* no permitió la identificación de tales ramas nerviosas. Sin embargo, sí fue posible reconocer una red difusa de células nerviosas en la región anterior al corazón. Existe una alta probabilidad de que esta red nerviosa sea parte del PO, pero para una adecuada caracterización de la innervación de este órgano sería necesaria la aplicación de otras metodologías histoquímicas e inmunohistoquímicas. De la incubación de los cortes histológicos de corazón con el anticuerpo monoclonal que identifica la enzima tirosina hidroxilasa, resultó una inmunomarcación positiva en la zona previamente identificada con la

técnica S-M. La inmunomarcación resultó débil y en pocos casos se identificaron células inmunomarcadas. Es probable que el empleo de anticuerpos monoclonales de gran especificidad para tirosina hidroxilasa humana, no tengan la capacidad de identificar esta enzima en crustáceos. Sin embargo, los resultados aquí presentados son claros en cuanto a que demuestran la presencia de fibras inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa en el PO de *C. granulatus*. Lo que no se puede adelantar es si la DA sintetizada en el PO es la que viaja, vía hemolinfa, y actúa a nivel de branquias posteriores.

3. Conclusiones.

Para *C. granulatus*, puede concluirse que, a pesar de que el cAMP y la DA producen un efecto similar sobre el transporte de NaCl a través de las branquias posteriores bajo ciertas condiciones, ambos compuestos no forman parte de la misma vía de señalización.

La transferencia del animal a un medio de baja salinidad, provoca la activación de procesos de transporte iónico, no sólo por mecanismos autorregulatorios, sino también por la activación de una vía de señalización cAMP-PKA dependiente. El factor neuroendócrino que produce la activación de esta vía es un interrogante que aún queda por responder. Lo que sí se puede asegurar es que dicho factor no es DA, puesto que la misma tiene un papel modulador en la respuesta a estímulos osmóticos, más que una función activadora *per se*.

El efecto de esta bioamina parecería depender del *status* de la actividad celular, el cual está directamente relacionado con las condiciones de salinidad:

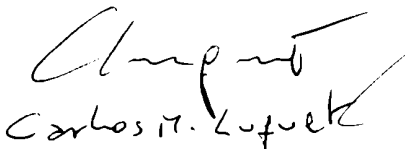
- En condiciones basales (osmolaridad hemolinfática normal), la DA

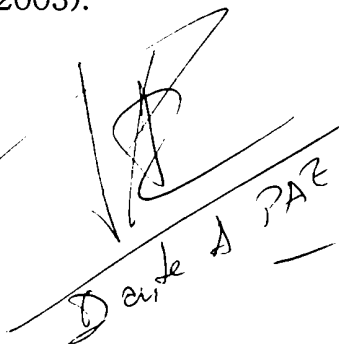
estimula transitoriamente el transporte de Na^+ por activación de la Na^+ , K^+ -ATPasa.

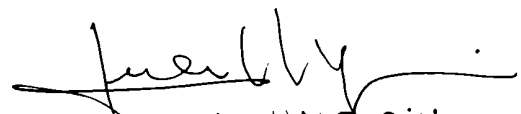
- Cuando el animal enfrenta un estrés hipo-osmótico, (disminución inicial de la osmolaridad hemolinfática), la DA actúa como un modulador del incremento autonómico del transporte iónico, disminuyendo su efecto, mientras que el cAMP es parte de la vía de transducción de esta respuesta autónoma. Es decir que, en condiciones hipo-osmóticas, el cAMP y la DA tienen efectos antagónicos sobre el transporte iónico, siendo el primer compuesto excitatorio y el segundo inhibitorio de dichos mecanismos.

Una hipótesis para estudiar a futuro, es si la DA actúa a través de una vía de proteína fosfatasa que remueven los grupos fosfatos derivados de la actividad de las proteína kinasas, A y C, responsables del incremento o la disminución de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa por fosforilación de la subunidad α , en distintos residuos aminoacídicos.

Cuando el animal pasa de un medio de baja salinidad, a otro de salinidad media ó alta, la vía de la adenilato ciclasa (excitatoria) que estaba activada para favorecer la captación de NaCl , se inhibe. Esto se puede observar en el aumento de expresión de proteína G_i que coincide con la escasa capacidad de responder a un estímulo hipoosmótico que presentan las branquias de animales aclimatados a un medio iso-osmótico (Tresguerres et al 2003).


Carlos M. Zúñiga


Dora A. Pae


JULIA HALPERIN

Agradecimientos.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Carlitos y Dante, por su apoyo incondicional y su dedicación a lo largo de todo este tiempo. Es un privilegio haber tenido directores que hayan seguido tan de cerca el desarrollo de mi trabajo y con los cuales tuve la libertad de discutir cualquier tipo de ideas relacionadas con esta tesis.

También quiero dar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio: Martín Tresguerres, Griselda Genovese, Analía Pérez, Carolina Luquetti y Martín Ansaldo, quienes me dieron una mano (o dos) en muchos de los experimentos que aquí se describen. Luisa Fiorito, Gladys Hermida y Alejandro Farías estuvieron siempre dispuestos a prestarme “un ojo” (o dos) en las observaciones histológicas.

Mi agradecimiento también, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por haberme dado el apoyo económico y el lugar de trabajo para poder desarrollar mis tareas de investigación. A la Facultad, en particular, quiero darle las gracias por haberme dado la oportunidad de conocer tanta gente, entre las que cuento con amigos que se que van a ser los mismos que tenga dentro de 50 años y significan para mí, uno de mis tesoros más preciados en la vida. A mis padres, Celia y Leopoldo, a quienes les dedico este trabajo, porque creyeron siempre en mí, y en todo momento me empujaron a seguir hacia delante. Por último, quiero agradecerle a mi esposo, Gustavo, a quien también le dedico esta tesis, porque su apoyo, paciencia y ternura constantes fueron piezas fundamentales para la realización de mi trabajo de tesis.

Gracias a todos ellos.

Bibliografía.

- Ahearn GA, Duerr JM, Zhuang Z, Brown RJ, Aslamkhan A and Killebrew DA. 1999. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol. Biochem. Zool.* 72 (1): 1-18.
- Ahearn GA, Gerencser GA, Thamotharan M, Behnke RD and Lemme TH. 1992. Invertebrate gut diverticula are nutrient absorptive organs. *Am. J. Physiol.* 263 (3) 2: R472-R481.
- Ahearn GA and Franco P. 1990. Sodium and calcium share the electrogenic 2 Na(+)-1H⁺ antiporter in crustacean antennal glands. *Am J. Physiol.* 259 (5) 2: F758-F767.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 1994. 3rd ed. *Cell signaling* in: Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York and London. pp: 721-785.
- Asselbourg V, Traush G, Gilles R and Devos P. 1991. Protein kinase C and ion transport in the posterior gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Mar. Bio.* 109: 115-119.
- Avenet P and Lignon JM. 1985. Ionic permeabilities of the gill lamina cuticle of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (E). *J. Physiol.* 363: 377-401.
- Bachmann SY and Martínez MM. 1994. Ecología alimentaria del ostrero pardo *Haematopus palliatus* en la albufera Mar Chiquita. 2º Taller sobre cangrejos y cangrejales. Mar del Plata. Argentina.
- Baldwin GF and Kirschner LB. 1976a. Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 175% sea water. *J. Exp. Zool.* 49: 158-171.
- Baldwin GF and Kirschner LB. 1976b. Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 10% sea water. *J. Exp. Zool.* 49: 172-180.

- Barra JA, Pequeux A and Humbert W. 1983. A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue and Cell* 15 (4): 583-596.
- Berlind A. 1977. Neurohumoral and reflex control of scaphognathite beating in the crab *Carcinus maenas*. *J. Comp. Physiol.* 116: 77-90.
- Berlind A. 1976. Neurohemal organ extracts affect the ventilation oscillator in crustaceans. *Exp. Zool.* 195: 165.
- Berlind A and Kamemoto FI. 1977. Rapid water permeability changes in eyestalkless euryhaline crabs and in isolated, perfused gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 58:383-385.
- Bertorello AM and Katz AI. 1995. Regulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump activity: pathways between receptors and effectors. *NIPS* 10: 253-259.
- Bianchini A and Gilles R. 1990. Cyclic AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the euryhaline chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Mar. Biol.* 104: 191-195.
- Bortolus A and Iribarne O. 1999. Effect of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a spartina saltmarsh. *Mar. Ecol. Progr. Series.* 178:79-88.
- Boschi, E.E. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense. *Boletín del Instituto de Biología Marina (Mar del Plata)* 164: 34 pp.
- Botto F and Iribarne O. 2000. Contrasting effects of two burrowing crabs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. *Estuarine Coastal Shelf Science.* 51: 141-151.
- Botto F and Iribarne O. 1999. Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* (Dana) on the benthic community of a SW Atlantic coastal lagoon. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 241: 263-284.

- Botto JL and Irigoyen HR 1979. Bioecología de la Comunidad del Cangrejal. I Contribución al conocimiento del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, Provincia de Buenos aires. En: Seminario sobre Ecología Bentónica y sedimentación de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. Unesco: 161-169.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. Ana. Biochem. 72: 248-254.
- Burnett, L E and McMahon BR. 1987. Gas exchange, hemolymph acid-base status and the role of branchial water stores during air exposure in three littoral crab species. Physiol. Zool. 60 (1): 27-36.
- Burnett LE and McMahon BR. 1985. Facilitation of CO₂ excretion by carbonic anhydrase located on the surface of the basal membrane of crab gill epithelium. Resp. Physiol. 62 (3): 341-348.
- Burnett LE, deFur PL and Jorgensos DD. 1981. Application of the thermal dilution technique for measuring cardiac output and assessing stroke volume in crabs. J. Exp. Zool. 218: 165-173.
- Cameron, J. 1981. Brief Introduction to the land crabs of the Palau Islands: Stages in the transition to air breathing. J. Exp. Zool. 218: 1-5.
- Cameron JN. 1978. NaCl balance in blue crabs, *Callinectes sapidus*, in fresh water. J. Comp. Physiol. 123: 137-141.
- Castillo PC, Martins IA and Bianchini A. 2001. Gill Na⁺, K⁺ - ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). Exp. Mar. Biol. Ecol. 256: 215-227.
- Charmantier G. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Invert. Reprod. Develop. 33 (2) 3: 177-190.

- Charmantier G, Haond C, Lignot JH and Charmantier-Daures M. 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in homarid lobsters. *J. Exp. Biol* 204: 967-977.
- Chasin M and Harris DN. 1976. Inhibitors and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. cyclic Nucleotide Res.* 7: 225-264.
- Chibalin AV, Ogimoto G, Pedemonte CH, Pressley TA, Katz AI, Fèraille E, Berggren P-O and Bertorello AM. 1999. Dopamine-induced endocytosis of Na^+, K^+ -ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat α subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274 (4): 1920-1927.
- Chibalin AV, Katz AI, Berggren P-O and Bertorello AM. 1997. Receptor-mediated inhibition of renal Na^+, K^+ -ATPase is associated with endocytosis of its α - and β -subunits. *Am. J. Physiol.* 273 (42): C1458-C1465.
- Chu KH. 1987. Sodium transport across the perfused midgut and hindgut of the blue crab, *Callinectes sapidus*: the possible role of the gut in crustacean osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 87 (A) 1: 21-25.
- Compère P, Wanson S, Péqueux A, Gilles R and Goffinet G. 1989. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to external salinity. *Tissue & Cell*, 21: 299-318.
- Cooke IM and Sullivan RE. 1982. Hormones and Neurosecretion. In: *The Biology of Crustacea*, Vol 3: "Neurobiology: structure and function" Atwood HL and Sandeman DC. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 205-290.
- Copeland DE. 1968. Fine structure of salt and water uptake in the land-crab *Gecarcinus lateralis*. *Am. Zool.* 8: 417-432.

- Copeland DE and Fitzsjarrell AT. 1968. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeits. Zellf.* 92: 1-22.
- Cooper AR and Morris S. 1997. Respiratory, blood-gas transport, and acid-base balance response of *Leptograpsus variegatus* to long-term immersion and hyposaline exposure. *Physiol. Zool.* 70 (2): 181-192.
- deFur PL. 1988. Systemic respiratory adaptations to air exposure in intertidal decapod crustaceans. *Amer. Zool.* 28: 115-124.
- Depledge, MH. 1984. The influence of aerial exposure on gas exchange and cardiac activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 79 (A): 339-344.
- Detaille D, Trausch G and Devos P. 1992. Dopamine as a modulator of ionic transport and glycolytic fluxes in the gills of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 (C) 3: 521-526.
- Dezi, RE, Rodriguez, EM and ME. Lenge. 1987. Estudio del metabolismo energético en especies del cangrejal de la Prov. e Buenos Aires. I. Tasa metabólica en *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Physis*, 109: 47-60.
- Díaz H and Rodriguez G. 1977. The branchial chamber in terrestrial crabs: A comparative study. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 153: 485-504.
- Drach P and Tchernigovtzeff C. 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 597-607.
- Eckhardt E, Pierrot C, Thuet P, Van Herp F, Charmantier-Daures M, Triller J and Charmantier G. 1995. Stimulation of osmoregulating processes in the

- perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea: Decapoda) by a sinus gland peptide. Gen. Comp. Endocrinol. 99: 169-177.
- Eckert R, Randall D and Augustine G. Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones. 1990. 3th edición. Interamericana, McGraw-Hill.
- Evans DH, Claiborne JB, Farmer L, Mallery C and Krasny EJ. 1982. Fish gill ion transport: methods and models. Biol. Bull. 163: 108-130.
- Ewart HS and Klip A. 1995. Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 269 (38): C295-C311.
- Farrelly C and Greenaway P. 1993. Land crabs with smooth lungs: Grapsidae, Gecarcinidae and Sundathelphusidae ultrastructure and vasculature. J. Morph. 215: 245-260.
- Farrelly C and Greenaway P. 1987. The morphology and vasculature of the lungs and gills of the soldier crab, *Mictyris longicarpus*. J. Morphol. 193: 285-304.
- Fawcett DW. 1994. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 20th edition. Chapman and Hall. New York.
- Felgenhauer BE and Abel LE. 1983. Branchial water movement in the grapsid crab, *Sesarma reticulatum* Say. J. Crust. Biol. 3: 187-195.
- Férraille E and Doucet A. 2001. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. Physiol. Rev. 81: 345-418.
- Fingerman M. 1997. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. Physiol. Zool. 70 (3): 257-269.

- Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarojini R and Reddy PS. 1994. Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *J. Crust. Biol.* 14 (3): 413-437.
- Flik G and Haond C. 2000. Na⁺ and Ca⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute sea water. *J. Exp. Biol.* 203: 213-220.
- Flik G, Verboost PM, Atsma W and Lucu Č. 1994. Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *J. Exp. Biol.* 195: 109-122.
- Friedman E, Butkerait P and Wang HY. 1993. Analysis of Receptor-Stimulated and Basal Guanine Nucleotide Binding to Membrane G Proteins by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 214(1): 171-178.
- Garret MA and Bradley TJ. 1984. Ultrastructure of osmoregulatory organs in larvae of the brackish-water, *Culiseta inornata* (Williston). *J. Morphol.* 182 (3): 257-277.
- Genovese G, Luquet CM, Paz DA, Rosa GA and Pellerano GN. 2000a. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. *J. Anat.* 197: 239-246.
- Genovese G, Ansaldo M and Luquet CM. 2000b. Alkaline phosphatase and carbonic anhydrase activities in the gills of a hyper-hyporegulating crab as a function of external salinity. *Comp. Biochem. Physiol* 126 (A): S57.
- Gilles R, Pequeux A and Bianchini A. 1988. Physiological aspects of NaCl movements in the gills of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*, acclimated to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.* 90 (A): 201-207.

- Gray, I. E. 1957. A comparative study of the gill area of crabs. Biol. Bull. (Woods Hole), 112: 34-42.
- Greenaway P, Morris S and McMahon B. 1988. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab *Birgus latro*: II. In vivo respiratory gas exchange and transport. J. Exp. Biol. 140: 493-509.
- Greenaway P and Taylor HH. 1976. Aerial gas exchange in Australian arid-zone *Parathelphusa transversa* Von Martens. Nature, 262: 711-713.
- Guyton AC and Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 1996. 9th edition. WB Saunders Company.
- Halperin J, Ansaldo M, Pellerano GN and Luquet CM. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851. Physiological and morphological studies. Comp. Biochem. Physiol. 126 (A): 341-349.
- Haond C, Flik G and Charmantier G. 1998. Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. J. Exp. Biol. 201: 1817-1833.
- Harris RR and Bayliss D. 1988. Gill ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na^+ regulation. Comp. Biochem. Physiol. 90 (A): 303-308.
- Hawkins, A and Jones M. 1982. Gill area and ventilation in two mud crabs *Helice crassa* Dana (Grapsidae) and *Macrophthalmus hirtipes* (Jacquinot) (Ocypodidae), in relation to habitat. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 60: 103-118.
- Henry RP. 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. J. Exp. Biol. 204: 991-1002.
- Henry RP. 1994. Morphological, behavioral, and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. Amer. Zool. 34: 205-215.

- Henry RP. 1991. Branchial and branchiostegite carbonic anhydrase in decapod crustaceans: the aquatic to terrestrial transition. *J. Exp. Zool.* 259: 294–303.
- Henry RP. 1988a. Subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 245: 1–8.
- Henry RP. 1988b. Multiple functions of carbonic anhydrase in the crustacean gill. *J. Exp. Zool.* 248: 19–24.
- Henry RP. 1987. Membrane-associated carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. J. Physiol.* 252: R966–R971.
- Henry RP, Garrelts EE, McCarty MM and Towle DW. 2002. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J. Exp. Zool.* 292: 595–603.
- Henry RP and Swenson ER. 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Resp. Physiol.* 121: 1–12.
- Henry RP, Perry HM, Trigg CB, Handley HL and Krarup A. 1990. Physiology of two species of deep-water crabs, *Chaceon fenneri* and *C. quinquedens*: Gill morphology and ionic and nitrogen concentrations. *J. Crust. Biol.* 10: 375–381.
- Henry RP and Cameron. 1982. The distribution and partial characterization of carbonic anhydrase in selected aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. Exp. Zool.* 221: 309–321.
- Holliday CW. 1985. Salinity-induced changes in gill Na, K-ATPases activity in the mud fiddler crab, *Uca Pugnax*. *J. Exp. Zool.* 233: 199–208.

- Iribarne O, Botto F, Martinetto P and Gutierrez JL. 2000. The role of burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping debris. Mar. Poll. Bull. 40(11): 1057-1062.
- Iribarne O, Bortolus A and Botto F. 1997. Between-habitat differences on burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. Mar. Ecol. Progr. Ser. 155: 137-145.
- Iribarne O and Martínez MM. 1996. Predación sobre *Uca uruguayensis* por aves playeras migratorias. III Encontro de especialistas em Decapoda Brachyura. Rio Grande do Sul. Brasil.
- Johnsen A and Nielsen R. 1978. Effects of antidiuretic hormone, arginine vasotocin, theophylline, fillipin and A 23187 on cyclic AMP in isolated frog skin epithelium (*R. temporaria*). Acta Physiol. Scand. 102: 281-289.
- Johnson, P.T. 1980. Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: A model for the Decapoda. New York: Praeger.
- Kamemoto FI. 1991. Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. Zool.Sci., 8: 827-833.
- Kamemoto FI. 1982. Crustacean Neuropeptides and osmoregulation. In: Neurosecretion: molecules, cells, systems. Farner DS and Lederis K (Eds.). Plenum, New York, pp: 329-335.
- Kamemoto FI and Oyama SN. 1985. Neuroendocrine influence on effector tissues of hydromineral balance in crustaceans. In: Current trends in comparative endocrinology, edited by Lofts B. and Holmes W.N., pp. 883-886. Hong Kong University Press, Hong Kong.

- Kulkarni GK and Fingerman M. 1992. Effects of 5- hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 101(C): 419-423.
- Kulkarni GK, Nagabhushanan R, Amaldoss G, Jaiswal RG and Fingerman M. 1992. *In vivo* stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5- hydroxytryptamine. Invert. Reprod. Develop. 21: 231-240.
- Kulkarni GK and Fingerman M. 1986. Distal retinal pigment of the fiddler crab, *Uca pugilator*: evidence for stimulation of release of light-adapting and dark-adapting hormones by neurotransmitters. Comp. Biochem. Physiol. 84 (C): 219-224.
- Lagios MD and Stasko-Concannon S. 1979. Ultrastructure and ATPase activity of the rectal gland of the chondrichthyeen fish *Hydrolagus colliei* (Holocephali). Cell and Tissue Research 198 (2): 287-294.
- Lin H, Su Y and Su S. 2002. A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: Uca). Zool. Sci. 19 (6): 643-650.
- Lin S-C, Liou C-H and Cheng J-H. 2000. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. Comp. Biochem. Physiol. 127 (A): 121-129.
- Lignot JH and Charmantier G. 2001. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). J. Histochem. Cytochem. 49 (8): 1013-1024.
- Lignot JH, Charmantier-Daures M and Charmantier G. 1999. Immunolocalization of Na⁺, K(+)-ATPase in the organs of the branchial cavity of the

- European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). Cell and Tissue Research 296 (2): 417–426.
- Lohrmann DM and Kamemoto FI. 1987. The effect of dibutyryl cAMP on sodium uptake by isolated perfused gills of *Callinectes sapidus*. Gen. Comp. Endocrinol. 65: 300–305.
- López Mañanes AA, Magnoni L.J. and Goldemberg AL. 2000. Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 127(B): 85–95.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- Lowy RJ, Schreiber JH, Dawson DC and Ernst SA. 1985. Primary culture of duck salt gland. I. Morphology of confluent cell layers. Am. J. Physiol. 249 (1) 1: C32–C40.
- Lucu Č. 1990. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. Comp. Biochem. Physiol. 97A: 297–306.
- Lucu Č, Devescovi M, Skaramuca B and Kozul V. 2000. Gill Na,K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers: adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 246 (2): 163–178.
- Lucu Č and Devesconi M. 1999. Osmoregulation and branchial Na⁺, K⁺-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to diluted seawater. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 234: 291–304.
- Lucu Č and Flik G. 1999. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. Am. J. Physiol. 276: R490–R499.
- Luquet CM, Genovese G, Rosa GA, and Pellerano GN. 2002a. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* Dana,

- 1851 (Decapoda Grapsidae) induced by acclimation to diluted and concentrated sea water. Mar. Biol. 141: 753-760.
- Luquet CM, Postel U, Halperin J, Urcola MR, Marques R and Siebers D. 2002b. Transepithelial potential differences and sodium flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-saline media. J.Exp.Biol. 205: 71-77.
- Luquet CM, Rosa GA, Ferrari CC, Genovese G and Pellerano GN. 2000. Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. Crustaceana 73(1): 53-67.
- Luquet CM and Ansaldo M. 1997. Acid-base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol.
- Luquet, CM, Pellerano G and Rosa G. 1997. Salinity-induced changes in the fine structure of the gills of the semiterrestrial estuarine crab, *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Decapoda, Ocypodidae). Tissue and Cell. 29 (4): 495-501.
- Luquet CM, Ford P, Rodriguez EM, Ansaldo M and Stella V. 1992. Ionic regulation patterns in two species of estuarine crabs. Comp. Biol. 10: 315-325.
- Maitland, D.P. 1990. Aerial respiration in the semaphore crab, *Heloecius cordiformis*, with or without branchial water. Comp. Biochem. Physiol. 95 (A): 267-274.
- Maitland, D. P. 1987. A highly complex invertebrate lung. The gill chamber of the soldier crab *Mictyris longicarpus*. Naturwissenschaften 74: 293-295.

- Mantel LH. 1985. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Amer.Zool.* 25: 253-263.
- Mantel LH and Farmer LL 1983. Osmotic and ionic regulation. In: The biology of Crustacea Vol 5: Internal anatomy and physiological regulation. Mantel LH (Ed.). Academic Press, New York, pp. 53-161.
- Martelo MJ and Zanders IP. 1986. Modifications of gill ultrastructure and ionic composition in the crab *Goniopsis cruentata* acclimated to various salinities. *Comp. Bioche. Physiol.* 84(A)2: 383-389.
- Martinez CBR, Harris RR and Santos MCF. 1998. Transepithelial potential differences and sodium fluxes in isolated perfused gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 (A): 227-236.
- Mattson MP and Spaziani E. 1985. 5-hidroxytryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. *Biol. Bull.* 169: 246-255.
- McMahon BR and Wilkens JL. 1983. Ventilation, perfusion, and oxygen uptake. In: The biology of Crustacea Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Ed. Mantel LH. Academic Press, New York, pp. 290-372.
- Merchant JL, Papermaster DS and Barnett RJ. 1985. Correlation of Na⁺,K⁺-ATPase content and plasma membrane surface area in adapted and de-adapted salt glands of ducklings. *J. Cell Sci.* 78: 233-246.
- Mo JL, Devos P, and Trausch G. 2002. Dopamine D1 receptors in the gills of chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131 (C): 433-438.
- Mo JL, Devos P, and Trausch G. 1998. Dopamine as a modulator of ionic transport and Na⁺/K⁺ - ATPase activity in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J. Crust. Biol.* 18: 442-448.

- Moughure Cueto GA. 1998. Interacción entre la regulación iónica y el equilibrio ácido-base en el cangrejo *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Decapoda, Grapsidae). Tesis de Licenciatura. pp: 1-55. Universidad de Buenos Aires.
- Morris S. 2002. The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. Comp. Biochem. Physiol. 131 (B): 559-570.
- Morris S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. J. Exp. Biol. 204:979-989.
- Morris S, Greenaway P, Adamczewska M and Ahern MD. 2000. Adaptations to a terrestrial existence in the robber crab *Birgus Latro* L. IX. Hormonal control of post-renal urine reprocessing and salt balance in the branchial chamber. J. Exp. Biol. 203: 389-396.
- Morris S and Edwards T. 1995. Control of osmoregulation via regulation of Na^+/K^+ -ATPase activity in the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegatus*. Comp. Biochem. Physiol. 112 (C): 129-136.
- Morris S and Greenaway P. 1990. Adaptations to a terrestrial existence in the robber crab *Birgus Latro* L. V. The activity of carbonic anhydrase in gills and lungs. J. Comp. Physiol. 160 (B): 217-221.
- Neufeld GJ, Holliday CW and Pritchard JB. 1980. Salinity adaptation of gill Na,K -ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211: 215-224.
- Olivier, SR, Escofet A, Penchaszadeh P and Orensanz JM. 1972. Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). II. Relaciones tróficas interespecíficas. Ann. Soc. Cient. Arg. 194, 89-104.

- Onken H. 1999. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of Chinese crabs (*Eriocheir sinensis*) adapted to different salinities. Comp. Biochem. Physiol. 123 (A) 4: 377–384.
- Onken H, Tresguerres M and Luquet CM. 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. J. Exp. Biol. 206: 1017–1023.
- Onken H and Riestenpatt S. 1998. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. Comp. Biochem. Physiol. 119: 883–893.
- Onken H and Putzenlechner M. 1995. A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. J. Exp. Biol. 198: 767–774.
- Pavičić-Hamer D, Devesconi M and Lucu Čedomil. 2003. Activation of carbonic anhydrase in branchial cavity tissues of lobsters (*Homarus gammarus*) by dilute seawater exposure. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 287: 79–92.
- Péqueux A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. 15 (1): 1–60.
- Péqueux A and Gilles R. 1992. Calmodulin as a modulator of NaCl transport in the posterior salt-transporting gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. Mar. Biol. 113: 65–69.
- Péqueux A and Gilles R. 1988. The transepithelial potential differences of isolated perfused gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water. Comp. Biochem. Physiol. 89 (A) 2: 163–172.
- Pierrot C, Soye D, Van Herp F, Gompel M, Skaret G, Grousset E and Charmantier G. 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 119: 340–350.

- Pierrot C, Péqueux A and Thuet P. 1995. Effects of ions substitutions and of inhibitors on transepithelial potential difference and sodium fluxes in perfused gills of the crab *Pachygrapsus marmoratus*. Arc. Physiol. Biochem. 103 (4): 466-475.
- Pierrot C, Eckhardt E, Van Herp F, Charmantier-Daures M, Charmantier G, Trilles J-P and Thuet P. 1994. Effet d'extraits de glandes du sinus sur la physiologie osmorégulatrice des branchies perfusées du crabe *Pachygrapsus marmoratus*. C. R. Acad. Sc. (Paris). 317: 411-418.
- Piller SC, Henry RP, Doeller J and Kraus DW. 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. J Exp. Biol. 198: 349-358.
- Prossi F and Dallinger R. 1988a. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. I. Histochemical and ultrastructural characterization of metal-containing lysosomes. Cell Biol. Toxicol. 4 (1): 81-96.
- Prossi F and Dallinger R. 1988b. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. II. Subcellular fractionation of metal-accumulating lysosomes from hepatopancreas. Cell Biol. Toxicol. 4 (1): 97-109.
- Rainbow PS and Black WH. 2001. Effects of changes in salinity on the apparent water permeability of three crab species: *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* and *Nacora puber*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 264: 1-13.
- Rasmussen AD and Bjerregaard. 1995. The effect of salinity and calcium concentration on the apparent water permeability of *Cherax destructor*, *Astacus astacus* and *Carcinus maenas* (Decapoda, Crustacea). Comp. Biochem. Physiol. 111 (A): 171-175.

- Richardson HG, Deecaraman M and Fingerman M. 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. 99 (C): 53-56.
- Riestenpatt S, Onken H and Siebers D. 1996. Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-flux studies. J. Exp. Biol. 199: 1545-1554.
- Riestempatt S, Zeiske W, and Onken H. 1994. Cyclic AMP stimulation of electrogenic uptake of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. J. Exp. Biol. 188: 159-174.
- Roast SD, Rainbow PS, Smith BD, Nimmo M and Jones MB. 2002. Trace metal uptake by the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: the role of osmoregulation. Mar. Envir. Res. 53:453-464.
- Rosen OM, Goren EN, Erlichman J and Rosen SM. 1970. Synthesis and degradation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in frog erythrocytes. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3: 31-50.
- Rossi JB. 1982. Aspectos hidrobiológicos del arroyo San Clemente (Bahía de Samborombón). Revista del Museo de La Plata, tomo XII, Sección, Sección Zoológica. 122: 29-38.
- Rudolph PH and Spaziani E. 1991. Neurons demonstrable by nickel-lysine backfilling of the optic peduncle in the crab *Cancer antennarius*. Comp. Biochem. Physiol. 99 (C): 179-184.
- Santos EA, Baldiseroto B, Bianchini A, Colares, EP, Nery LEM and Manzoni GC. 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol. 88 (A): 21-25.

- Saver MA, Wilkens JL and Syed NI. 1999. In situ and in vivo identification and characterization of cardiac ganglion neurons in the crab, *Carcinus maenas*. J. Neurophysiol. 81: 2964-2976.
- Saver MA and Wilkens JL. 1998. Comparison of the effects of five hormones on intact and open heart cardiac ganglionic output and myocardial contractility in the shore crab *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. 120 (A): 301-310.
- Saver MA, Wilkens JL and Airriess CN. 1998. Proctolin affects the activity of the cardiac ganglion, myocardium, and cardioarterial valves in *Carcinus maenas*. J. Comp. Physiol. 168 (B): 473-482.
- Skou JC. 1957. The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23: 394-401.
- Savage JP and Robinson GD. 1983. Inducement of increased gill Na/K-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. 75 (A): 65-69.
- Schwarz HJ and Graszynsky K. 1989. Ion transport in crab gills: a new method using isolated half platelets of *Eriocheir* gills in an Ussing-type chamber. Comp. Biochem. Physiol. 92 (A): 601-604.
- Seamon KB, Padgett W and Daly JW. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. Proc. Natn. Acad. Sci. USA. 78: 3363-3367.
- Siebers D, Winkler A, Thedens G and Weichart D. 1985. Na-K-ATPase generates an active transport potential in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. Mar. Biol. 87: 185-192.

- Sommer MJ and Mantel LH. 1991. Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab, *Carcinus maenas* (L). Gen. Comp. Endocrinol. 82: 364-368.
- Sommer MJ and Mantel LH. 1988. Effect of dopamine, cyclic AMP, and pericardial organs on sodium uptake and Na/K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* (L). J. Exp. Zool. 248: 272-277.
- Sokal RR and Rohlf FJ. 1981. Biometry, pp 1-859. New York: WH. Freeman.
- Spencer AM, Fielding AH and Kamemoto FI. 1979. The relationship between gill NaK-ATPase activity and osmoregulatory capacity in various crabs. Physiol. Zool. 52: 1-10.
- Taylor HH and Taylor EW. 1992. Gills and lungs: The exchange of gases and ions. In Microscopic Anatomy of Invertebrates (eds. F. W. Harrison and A. G. Humes), 10: 203-293. (Wiley - Liss, New York).
- Taylor HH and Greenaway P. 1984. The role of the gills and branchiostegites in gas exchange in a bimodally breathing crab, *Holthuisana transversa*: Evidence for a facultative change in the distribution of the respiratory circulation. J. Exp. Biol. 111:103-121.
- Taylor EW and Wheatly MG. 1980. Ventilation, heart rate and respiratory gas exchange in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) submerged in normoxic water and following 3hr. exposure in air at 15°C. J. Comp. Physiol. 138: 67-78.
- Taylor HH and Greenaway P. 1979. The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab *Holthuisana* (Austrothelphusa) *transversa* (Brachyura, Sundathelphusidae) including observations of arterial vessels within the gills. J. Zool. Lond. 189: 359-384.

- Therien AG and Blostein R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C541-C566.
- Thuet P, Charmantier-Daures M and Charmantier G. 1988. Relation entre osmorégulation et activités d'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et d'anhydrase carbonique chez larves et postlarves de *Homarus gammarus* (L.) (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Biol. Ecol.* 115: 249-261
- Towle D. 1990. Sodium transport systems in gills. In: Comparative aspects of sodium cotransport systems. Kinne RKH (ed). *Comp. Physiol.* Vol.7. pp: 241-263. Basel, Karger.
- Towle DW, Rushton ME, Heidysch D, Magnani JJ, Rose MJ, Amstutz A, Jordan MK, Shearer DW and Wu WS. 1997. Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. *J. Exp. Biol.* 200: 1003-1014.
- Towle D and Kays WT. 1986. Basolateral localization of $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* 239: 311-318.
- Trausch G, Forget M-C and Devos P. 1989. Bioamines-stimulated phosphorylation and $(\text{Na}^+, \text{K}^+) - \text{ATPase}$ in the gills of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94 (B): 487-492.
- Tresguerres M, Onken H and Luquet CM. 2003. Active and electrogenic NaCl absorption across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus*. Responses to osmotic variations. *J. Exp. Biol.* 206: 619-626.
- Valentich JD, Karnaky KJ and Ecay TW. 1996. Ultrastructural and cytochemical characterization of cultured dogfish shark rectal gland cells. *Am. J. Physiol.* 271(6)1: C1993-C2003.

- Van Sande J, Swillens S and Dumont JE. 1977. Adenosine 3':5'-monophosphate metabolism and turnover in dog thyroid slices. *Eur. J. Biochem.* 72 (2): 241-6.
- Warburg MR, Goldenberg S and Tudiver B. 1987. Osmotic and ionic regulation in two *Pachygrapsus* crabs, under varying salinities and dehydration. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 (A): 761-765.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D and Towle D. 2002. Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (β -subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* 204: 25-37.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D and Towle D. 2001. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na⁺/K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J. Exp. Biol.* 205: 2765-2775.
- Wilder MN, Ikuta K, Atmomarsono M, Hatta T and Komuro K. 1998. Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. *Comp. Biochem. Physiol.* 119 (A): 941-950.
- Wilkins JL and Kuramoto T. 1998. Comparison of the roles of neurohormones in the regulation of blood distribution from the hearts of american and japanese lobsters. *J. Comp. Physiol.* 168: 483-490.
- Zanders IP. 1980. Regulation of blood ions in *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 65 (A): 97-108.
- Zare S and Greenaway P. 1998. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺K⁺-ATPase, and V-ATPase in

the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae).
Comp. Bioche. Physiol. 119 (A) 3: 739-745.

Zare S and Greenaway P. 1997. Ion transport and the effects of moulting in the
freshwater crayfish *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). Austr. J.
Zool. 45: 539-551.

Zatta P. 1987. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic
stress of *Carcinus maenas*. Mar .Biol. 96: 479-481.