



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



Desarrollo del gastrolito en langosta de tenaza roja, *Cherax
quadricarinatus* (von Martens, 1868).

Cristian Wladimir Bustos Vergara

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

Profesor(a) Guía: María Soledad Fernández G.

Proyecto FONDAP 11980002

Proyecto ECOS-CONICYT C07-B02

SANTIAGO, CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

Desarrollo del gastrolito en langosta de tenaza roja, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868).

Cristian Wladimir Bustos Vergara

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY
PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA CANALES
PROFESOR CONSEJERO: LAURA GRACIELA HUAQUÍN MORA

**SANTIAGO, CHILE
2010**

I. ÍNDICE.

I.	Índice	2
II.	Resumen	4
III.	Summary	6
IV.	Introducción	8
V.	Revisión Bibliográfica	10
	Características Generales.....	10
	Generalidades de Biomineralización.....	11
VI.	Hipótesis	17
	Objetivo General	17
	Objetivos Específicos	17
VII.	Material y Métodos	18
	1. Determinación Radiográfica de la etapa del ciclo de muda.....	18
	2. Sacrificio de individuos.....	19
	3. Obtención y preparación de muestras.....	19
	4. Técnicas de tinción y fluorescencia.....	20
	A. Hematoxilina y Eosina.....	20
	B. Alcian Blue a pH 2,5.....	20
	C. Autofluorescencia.....	21
	D. Inmunohistoquímica.....	21
	Tabla N°1 Anticuerpos monoclonales en combinación con su respectiva enzima para despejar al epítipo específico correspondiente.....	21
VIII.	Resultados	24
	Determinación Radiográfica de la etapa del ciclo de muda.....	24
	Grupo A: Animales en Intermuda.....	25
	A.1. Hematoxilina y Eosina.....	25
	A.2. Alcian Blue a pH 2,5.....	26
	A.3. Autofluorescencia.....	27
	A.4. Inmunohistoquímica.....	27
	Control Negativo Intermuda.....	28
	A.4.a Dermatán Sulfato y Condroitín-4-Sulfato.....	29

A.4.b	Condroitín-4-Sulfato	29
A.4.c	Condroitín-6-Sulfato	30
A.4.d	Queratán Sulfato	31
Grupo B:	Animales en Premuda	32
B.1.	Hematoxilina y Eosina	32
B.2.	Alcian Blue a pH 2,5	33
B.3.	Autofluorescencia	34
B.4.	Inmunohistoquímica	35
	Control Negativo Premuda	35
B.4.a	Dermatán Sulfato y Condroitín-4-Sulfato	35
B.4.b	Condroitín-4-Sulfato	36
B.4.c	Condroitín-6-Sulfato	36
B.4.d	Queratán Sulfato	37
Grupo C:	Animales en Postmuda	38
C.1.	Hematoxilina y Eosina	38
C.2.	Alcian Blue a pH 2,5	38
C.3.	Autofluorescencia	39
C.4.	Inmunohistoquímica	39
	Control Negativo Postmuda	39
C.4.a	Dermatán Sulfato y Condroitín-4-Sulfato	40
C.4.b	Condroitín-4-Sulfato	40
C.4.c	Condroitín-6-Sulfato	41
C.4.d	Queratán Sulfato	41
Tabla N°2	Presencia e intensidad de reacción inmunohistoquímica para los distintos estados del ciclo de muda de <i>Cherax quadricarinatus</i>	42
IX.	Discusión	43
X.	Conclusiones	48
XI.	Bibliografía	49

II. RESUMEN.

Gran variedad de seres vivos desarrollan sistemas capaces de crear estructuras mineralizadas, que se usan como protección, sostenimiento, alimentación, reservas de minerales, etc. La formación y degradación de estructuras minerales resulta ser un punto crítico en la fisiología de animales invertebrados como los crustáceos y en particular en el modelo animal utilizado en esta memoria de título, la langosta de tenaza roja, *Cherax quadricarinatus*, especie cuyo desarrollo está en íntima relación con la formación de una reserva mineral llamada gastrolito, que se fabrica en la parte anterior del estómago cardiaco, en una zona especializada de la pared estomacal, el disco del gastrolito, cuyo epitelio presenta distinta estructura según el momento del ciclo de muda y representa un excelente modelo para el estudio de la biomineralización.

La matriz extracelular del gastrolito está formada por moléculas cargadas negativamente, entre las que se destacan los proteoglicanos, que son depositados por el epitelio formador. Los proteoglicanos serían los responsables de entregar un orden definido al depósito de carbonato de calcio amorfo que compone al gastrolito.

La etapa del ciclo de muda se determinó por observación del exoesqueleto de los individuos, cuando éste era blando se clasificó en la etapa de postmuda y si estaba rígido en cualquiera de las otras dos etapas: intermuda o premuda. Para diferenciarlas se radiografiaron y en intermuda no se observó la imagen compatible con gastrolito y por el contrario, si fue posible observarlo en premuda.

Se extrajeron estómagos de las langostas clasificadas, se procesaron de manera rutinaria para realizar cortes histológicos, los que fueron teñidos con las técnicas de hematoxilina-eosina y azul de alciano a pH 2,5; para describir zonas de interés y

reconocer la presencia de glicosaminoglicanos, respectivamente. Además se utilizaron reacciones inmunohistoquímicas con el propósito de identificar temporal, espacial y específicamente algunos proteoglicanos presentes en la matriz orgánica del gastrolito.

Se logró establecer un orden espacial y temporal para proteoglicanos específicos:

Dermatán sulfato y condroitín-4-sulfato están presentes en los tres estados del ciclo de muda, observándose una mayor intensidad de reacción en las etapas de intermuda y premuda principalmente, lo que sugiere, al igual que en otros estudios similares, que serían necesarios para mantener el orden en el tipo de acumulación de carbonato de calcio en la formación de esta biocerámica.

Condroitín-6-sulfato se muestra con una reacción más intensa en intermuda y premuda, disminuyendo su intensidad en postmuda, lo que sugiere una participación más activa durante la formación, luego en postmuda está ausente tanto en el epitelio formador como en el gastrolito en degradación y sólo se observa en el tejido conectivo subyacente al lugar de formación del gastrolito.

Queratán sulfato presenta una mayor intensidad de reacción en intermuda y premuda principalmente, sugiriendo un rol en el inicio de la calcificación. En el periodo de postmuda se encuentra en el gastrolito principalmente y en el epitelio formador con menor intensidad.

Esta distribución temporal de los proteoglicanos sugiere la influencia en el desarrollo de los gastrolitos de la langosta de tenaza roja.

III. SUMMARY.

Living organisms exhibit systems able to create mineralized structures with remarkable properties and functions such as protection, supporting structure, feeding, mineral storage, etc. The formation and degradation of mineral structures seem to be a critical step in the physiology of invertebrate animals such as crustaceans, particularly in the animal model studied in this work. The development of red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) is related with a mineral reserve known as gastrolith, which is formed in the anterior area of cardiac stomach, specifically in a specialized zone of the stomach wall or gastrolith disc. The epithelium of this structure exhibit different configurations according to the moment of the molt cycle, and represent an excellent anatomical site for studying the biomineralization process.

The extracellular matrix of the gastrolith is composed, between others, by proteoglycans, negatively charged molecular complexes, deposited by the stomach epithelium. The proteoglycans would modulate an ordered deposition of the amorphous calcium carbonate that forms the gastrolith.

The molt cycle stage was determined by observation of the exoskeleton of the specimens, when it was soft was ranked as postmolt stage and if it was rigid as any of the other two stages: intermolt or premolt. Using x-ray it was possible to differentiate between intermolt, where the gastrolith is absent, and premolt stage where the gastrolith was present.

Stomachs were removed from the classified crayfishes and processed routinely for histological sections, which were stained with hematoxylin-eosin techniques and alcian blue at pH 2.5, to describe areas of interest and recognize the presence of

glycosaminoglycans respectively. Immunohistochemical procedures were used also in order to identify temporal, spatial and specifically some proteoglycans present in the organic matrix of gastrolith.

Spatial and temporal deposition of specific proteoglycans were determined:

Dermatan sulphate and chondroitin-4-sulphate are present in the three stages of the molt cycle, with strong intensity of reaction mainly in the intermolt and premolt stages, this result are in agreement with similar studies, suggesting that these anionic organic macromolecules can be necessary to maintain an ordered deposition of calcium carbonate during the formation of this bioceramic.

Chondroitin-6-sulphate shows an intense reaction in intermolt and premolt, decreasing its intensity in postmolt, which suggests a more important rol during gastrolith formation. In postmolt chondroitin-6-sulphate is absent in the epithelium and in gastrolith in degradation, and is observed only in the connective tissue subyacent to the epithelium.

Keratan sulphate present a strong reaction mainly in intermolt and premolt stages suggesting a rol at the begining of calcification. In the postmolt period keratan sulphate is observed mainly in the gastrolith and with less intensity in the epithelium.

This temporal distribution suggest the influence of proteoglycans in the development of gastroliths of red claw crayfish.

IV. INTRODUCCIÓN.

La biomineralización es un proceso ampliamente distribuido en la naturaleza. Es así, que a través de la extensa variedad de seres vivos se hallan distintos ejemplos de mineralizaciones biológicamente controladas (Arias y Fernández, 2003). Fue descrita por primera vez en bacterias (Lowenstam, 1981), y abarca hasta animales con complejos sistemas de regulación, siendo un proceso fundamental en el desarrollo, reproducción, alimentación, protección, etc. Es parte importante de la fisiología de los distintos exponentes de la vida en nuestro entorno y provee de verdaderas herramientas, que han favorecido la integración y adaptación al medio en el que se desenvuelven los animales que presentan este proceso.

Los artrópodos son un grupo en el que se ha estudiado la formación y degradación de estructuras minerales, y en especial los crustáceos que por poseer una cubierta dura (caparazón, carcaza, cutícula), que necesariamente debe cambiarse a medida que crecen, se ha determinado la existencia de una fisiología condicionada al proceso denominado ciclo de muda, en el cual se deben coordinar distintos eventos, antes, durante y posterior a la ecdisis o recambio de carcaza (muda propiamente tal). Es como parte de esta etapa crítica del ciclo de muda que estos animales han desarrollado unas estructuras con funciones específicas para este período, denominados gastrolitos. Estos se presentan generalmente en un par, a veces dos pares, de estructuras discoidales formadas en la parte anterior del estómago de crustáceos como una forma de almacenamiento de calcio (Luquet y Marin, 2004; Shechter *et al.*, 2008). La formación de los gastrolitos es cíclica, por lo tanto el tamaño y el estado en el que se encuentre depende del período del ciclo de muda del animal. Estas estructuras aportan este mineral al individuo gracias a su

digestión en el estómago, ya que en el período posterior a la ecdisis, en que el artrópodo se desprende de su cutícula o exoesqueleto antiguo, los gastrolitos se hallan en su máximo tamaño y son degradados en el lumen estomacal, dando paso luego a la absorción de los minerales obtenidos hacia la hemolinfa y posteriormente al rápido depósito de éstos en la nueva cutícula (Travis, 1963).

Es importante mencionar, que el material utilizado en el proceso de remineralización del exoesqueleto en esta especie, y en general en otras especies de crustáceos con ciclos de vida similares, no es exclusivamente dependiente de la reabsorción mineral que ocurre al degradarse sus gastrolitos, sino que el mayor aporte de calcio es obtenido del contenido presente en el agua donde habitan y de la dieta. Por lo tanto, existen distintas estrategias de acumulación de minerales según el hábitat en que se desarrolle la especie (Luquet y Marin, 2004).

Los procesos de acumulación y degradación cíclica de minerales en *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) o langosta de tenaza roja, perteneciente a la familia Parastacidae (Huxley, 1880) que habita en agua dulce, representan un excelente ejemplo para comprender y describir las estructuras involucradas en el proceso de biomineralización en crustáceos, que son los objetivos de esta memoria de título que se enmarca en las actividades del programa de Materiales Biocerámicos del Centro de Investigación Interdisciplinario Avanzado en Ciencias de los Materiales (CIMAT) de la Universidad de Chile.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características generales:

La langosta de tenaza roja (*Cherax quadricarinatus*) es un crustáceo perteneciente a la clase malacostraca, de gran importancia médico veterinaria, por su alto valor comercial. La clase malacostraca incluye a los crustáceos más conocidos, como las langostas, jaibas, chanchitos de tierra y pulgas de mar. Difieren de las otras clases de crustáceos en tener apéndices en el abdomen. Hay típicamente 19 pares de apéndices, los 13 primeros están en el cefalotórax y los otros 6 en el abdomen.

Cherax quadricarinatus, pertenece al orden Decápoda, que es el grupo más grande y mejor reconocido de crustáceos. El animal completo está cubierto por un caparazón; tiene 5 pares de apéndices locomotores en el cefalotórax, en el primer par lleva una gran pinza, que en el caso de los machos de esta especie posee un borde no calcificado de color rojo. Presenta además un abdomen bien desarrollado, al igual que el telson (Barnes *et al.*, 1993).

El cangrejo de río (“*crayfish*”) de tenaza roja, *C. quadricarinatus* es un *crayfish* de agua dulce que habita naturalmente en muchos ríos y charcos en el Golfo de Carpentaria.

Las langostas de tenaza roja han sido cultivadas en Queensland por más de 20 años, y su industria ha tenido una lenta expansión desde su comienzo. Son cultivadas semi-intensivamente en varios estados de Australia, incluyendo Queensland, y han sido exportadas para cultivar a América latina, África, Papúa Nueva Guinea, China y Taiwán (Bowater *et al.*, 2002).

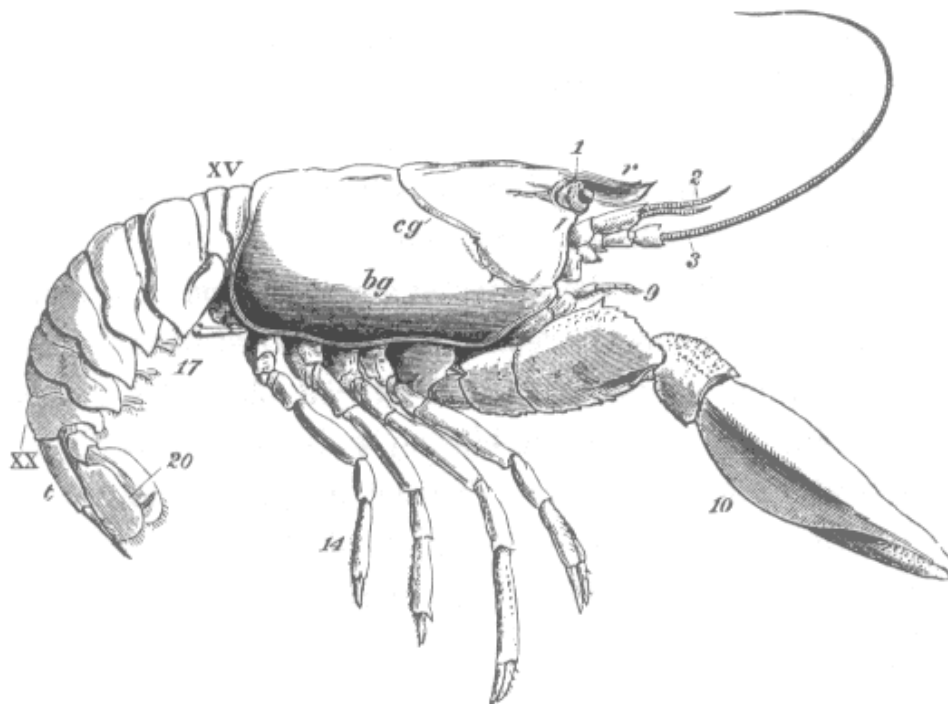


Figura 1: Vista lateral de un espécimen macho adulto *crayfish*, *Astacus fluviatilis*: *bg*: branqueostegito; *cg*: cisura cervical; *r*: rostro; *t*: telsón. 1: Pedúnculo ocular; 2: anténula; 3: antena; 9: maxilípodo externo; 10: forceps; 14: última pata caminadora; 17: tercer apéndice abdominal; 20: lóbulo lateral de la aleta dorsal o sexto apéndice abdominal; XV: el primero; y XX: el último somito abdominal (Huxley, 1880).

Generalidades de biomineralización:

La fabricación de estructuras mineralizadas es un fenómeno ampliamente distribuido en los seres vivos; conchas, caparazones, espinas, espículas, huesos y dientes, son ejemplos de biomineralizaciones. Estos biocompuestos cerámicos están constituidos por ensamblaje de capas de material orgánico con fases inorgánicas bien ordenadas, ricas en calcio, las que culminan en la formación de productos con morfologías y propiedades únicas. La caracterización de los mecanismos que controlan los procesos de biomineralización es crucial para el desarrollo de nuevos materiales con propiedades de forma y textura deseable (Arias y Fernández, 2003).

La biomineralización se presenta en la naturaleza de dos maneras distintas:

1) La más antigua, que ha sido encontrada en bacterias y algas verdes o rojas, consiste en la elaboración de biominerales biológicamente inducidos en ausencia de matriz orgánica (Lowenstam, 1981).

2) Se describe como la más abundante y diversificada, en ella se incluye la matriz orgánica de manera activa participando en el inicio de la precipitación del material de depósito, el crecimiento, la inhibición del mismo proceso, la forma del biomineral e incluso en la selección del polimorfo cristalino y/o amorfo del mineral considerado (Mann, 1983).

Los minerales de origen biológico, actualmente exceden los sesenta y aproximadamente, un 25% son amorfos. Los más numerosos son: carbonatos, fosfatos y luego óxidos. Los polimorfos de carbonato de calcio (CaCO_3) tales como aragonita y calcita son los de mayor distribución (Simkiss y Wilbur, 1989).

Los crustáceos, al igual que muchos otros invertebrados, poseen un esqueleto rígido: la cutícula, también llamada caparazón, generalmente calcificada. El exoesqueleto de los crustáceos provee soporte, rigidez y protección, consiste en una matriz orgánica quitinosa en la que se deposita calcita o carbonato de calcio amorfo (CCA) (Lowenstam y Weiner, 1989). La fisiología de estos animales, por ejemplo: su crecimiento, reproducción y metabolismo de calcio, se relaciona estrechamente con el ciclo de muda y el breve periodo de ecdisis, que consiste en el despojo por completo del antiguo exoesqueleto (Hecker *et al.*, 2003).

El ciclo de muda se divide en tres estados basados primariamente en rasgos morfológicos del exoesqueleto: postmuda, intermuda y premuda. Estos estados delimitan cuatro etapas mayores A, B, C, D; los que a su vez se dividen en un número de subetapas. El estado de postmuda, incluye las etapas A y B, temprana y media C. Está caracterizada por un endurecimiento progresivo de las capas preexuviales; formación, engrosamiento y endurecimiento progresivo de la endocutícula; el inicio de la alimentación; la formación y progresivo engrosamiento de la capa membranosa.

El estado de intermuda (etapa C4 o etapa C tardía) se caracteriza por la culminación de la formación de todos los componentes del exoesqueleto: la epicutícula, exocutícula, endocutícula, y capa membranosa. Esta etapa es comparable con una condición de “descanso” o “estabilidad” (Travis, 1960; Chung y Webster, 2003).

El estado de premuda está constituido por temprana, media y tardía etapa D, es caracterizado por una serie de transformaciones intertegumentarias que ocurren preparando la sucesiva muda. Las mayores porciones del antiguo exoesqueleto, la matriz orgánica y sales minerales, son reabsorbidas; las nuevas capas preexuviales, compuestas por epicutícula y exocutícula, son depositados bajo la antigua; los animales dejan de comer; y la finalización del período está marcado por la muda (Travis, 1960).

La etapa D temprana (D0), es un período en el ciclo de muda del cangrejo de río que no puede ser diferenciada de la etapa C tardía (C4) por características externas del exoesqueleto. La capa membranosa con la epidermis adherida puede ser desprendida desde el exoesqueleto en ambas etapas, pero es en la etapa D0 en que comienza el depósito mineral en el gastrolito, que en este caso se ven como estructuras delgadas como plato (Travis, 1960; Chung y Webster, 2003).

Se ha utilizado un método radiográfico, para clasificar las etapas del ciclo de muda del cangrejo de río *Procambarus clarkii*, mediante él ha sido posible observar el tamaño y forma de los gastrolitos en las distintas etapas de la muda (Nakatsuji *et al.*, 2000).

La formación y el desarrollo del gastrolito se realizan en una zona modificada del epitelio gástrico, llamada disco del gastrolito, que está compuesta por el recubrimiento cuticular del estómago, la gruesa capa de epidermis gástrica, y el subyacente tejido conectivo subepidérmico (Travis, 1960). El gastrolito se forma en una cavidad entre el epitelio columnar del disco del gastrolito y el recubrimiento cuticular del estómago, la principal función de este epitelio es transportar el calcio de la hemolinfa al gastrolito y la síntesis de la matriz orgánica de éste (Shechter *et al.*, 2008).

Los discos de gastrolitos están localizados en la pared anterior del estómago cardíaco del cangrejo de río. Esta zona es un sitio útil para el estudio de la actividad de procesos celulares involucrados en la síntesis y calcificación de matrices orgánicas, lo que queda en evidencia, por la participación de la epidermis de estas porciones modificadas de la pared estomacal en la formación de gastrolitos, la cual sintetiza y calcifica la matriz del gastrolito antes de la muda. Esta actividad culmina al final del período de premuda con la formación del disco gastrolito duro calcificado formado en un saco o bolsa formada entre la epidermis y el recubrimiento cuticular del estómago. Al mismo tiempo que la formación del gastrolito ocurre, la epidermis del exoesqueleto está participando en la resorción de constituyentes orgánicos y minerales. En la muda los gastrolitos totalmente formados son vertidos con el antiguo recubrimiento estomacal dentro del estómago. Posterior a la muda, estos gastrolitos son gradualmente triturados y

reabsorbidos. Algunos de sus constituyentes minerales son reabsorbidos por la epidermis del estómago y el epitelio hepatopancreático. Estos constituyentes minerales son transportados por la hemolinfa a través de la epidermis subyacente al exoesqueleto de otras áreas y reutilizado en la síntesis y recalcificación de sus matrices orgánicas (Travis, 1960).

El componente inorgánico del gastrolito de la langosta de tenaza roja (*C. quadricarinatus*), fue caracterizado en un estudio previo (Navarrete, 2004) en el cual a través de análisis realizados por: difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja (FTIR) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) se obtuvieron los datos necesarios para caracterizar los componentes inorgánicos del gastrolito. En el gastrolito se comprobó la presencia de carbonato de calcio, principalmente en estado de carbonato de calcio amorfo (CCA) que por su relativa alta solubilidad, le permitiría disolverse rápidamente y estar disponible para el transporte cíclico desde los depósitos de almacenamiento temporal hacia la nueva cutícula del exoesqueleto (Luquet y Marin, 2004; Navarrete, 2004). El carbonato de calcio, también se describe como el tipo predominante en el exoesqueleto de *C. quadricarinatus* (Shechter *et al.*, 2008).

Por otra parte en el estudio de Navarrete (2004), se demostró la presencia de los siguientes proteoglicanos (PG): dermatán sulfato, queratán sulfato y condroitín-6-sulfato, en la matriz orgánica del gastrolito.

Los proteoglicanos son macromoléculas formadas por una proteína central o core proteico, a lo largo del cual se asocian, por su extremo terminal, numerosas moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). Las moléculas sulfatadas que poseen tendrían una gran participación en el proceso de formación de estructuras biominerales

compuestas por carbonato de calcio (Arias *et al.*, 2004), fenómeno que estaría explicado por el carácter polianiónico que presentan los GAGs y su elevada densidad de carga negativa, por lo que presenta una alta afinidad a cationes, lo que explicaría su posible participación en la atracción de iones Ca y así en el proceso de mineralización. Conocer la distribución de los proteoglicanos identificados en el gastrolito de la langosta de tenaza roja (*C. quadricarinatus*), directamente en su sitio de formación, representa un interesante desafío, para poder establecer el rol que juegan los PG en las distintas etapas de desarrollo del gastrolito durante el ciclo de muda.

Esta ha sido la razón por la que se ha propuesto en la presente memoria de título evaluar la presencia y distribución de algunos PG en el epitelio gástrico durante la formación del gastrolito en langosta de tenaza roja, *C. quadricarinatus*.

VI. HIPÓTESIS.

Si los proteoglicanos están relacionados con la formación del gastrolito, entonces el análisis de su formación en distintos períodos del ciclo de muda de la langosta de tenaza roja, *C. quadricarinatus*, podría poner en evidencia el rol de algunos de estos PG en su formación.

VII. OBJETIVOS.

GENERAL

Evaluar la presencia y distribución de algunos PG en el epitelio gástrico durante la formación del gastrolito en langosta de tenaza roja, *C. quadricarinatus*.

ESPECÍFICOS

- Describir histológicamente la formación del gastrolito en distintos periodos del ciclo de muda de la langosta de tenaza roja, *C. quadricarinatus*.
- Identificar la distribución tisular, temporal y espacial de algunos PG en el epitelio responsable de la formación del gastrolito en la langosta de tenaza roja, *C. quadricarinatus*.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de esta memoria de título se utilizaron estómagos extraídos de langosta australiana de tenaza roja, *C. quadricarinatus* (von Martens, 1868), en distintas etapas del ciclo de muda, donados por el Proyecto FIA, código: C00-1-DA.113, que se encuentra en desarrollo en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se recolectaron ejemplares mediante manipulación directa, desde las piscinas artificiales creadas para la mantención de langostas, las que contienen agua de pozo calefaccionada hasta una temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH $7,5 \pm 0,5$ y sobre 5 mg de oxígeno disuelto por mL.

Selección de los animales:

1. Determinación radiográfica de la etapa del ciclo de muda.

Se seleccionaron ejemplares con exoesqueleto duro, en estado de intermuda y premuda, el que no pudo ser determinado mediante observación directa. Se seleccionaron otros animales en estado de postmuda, los cuales presentaban un exoesqueleto blando. Estos grupos fueron radiografiados (Nakatsuji *et al.*, 2000), utilizando un equipo marca Philips® con una potencia de 44 kilovolts en 0,1 milisegundos. Para esto fue necesario inmovilizar mecánicamente a cada animal sobre los chasis radiográficos (figura 2A).

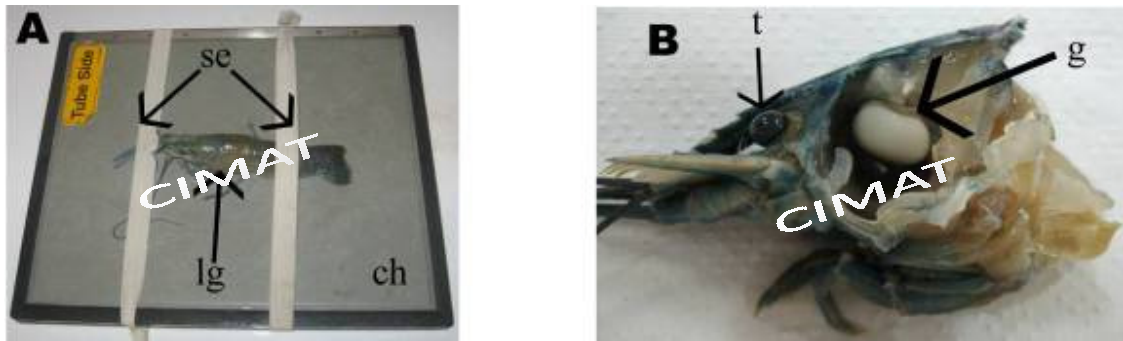


Figura 2: **A:** ejemplar de *Cherax quadricarinatus*, inmovilizado sobre chasis radiográfico. lg: Langosta de tenaza roja en postmuda de aproximadamente 80 gramos de peso; ch: chasis radiográfico de 30 x 24 centímetros; se: elásticos de sujeción. **B:** sección de cabeza de *Cherax quadricarinatus*; t: pedúnculo ocular, g: gastrolito al interior de estómago.

2. Sacrificio de los individuos

Una vez seleccionados los ejemplares, se aislaron en jaulas separadas y se ubicaron dentro de bateas con agua, en donde se realizó una disminución gradual de temperatura (2°C por hora) hasta llegar a alrededor de 7°C, temperatura en la que los animales se encontraban en letargo, facilitando de esta forma la manipulación. Luego fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (éter).

3. Obtención y preparación de muestras

Se les aplicaron 6mL de solución fijadora: paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,2% en amortiguador de pH fosfato de sodio 200mM pH 7,4 a través de la cavidad oral mediante el uso de una jeringa estéril.

Transcurridos 20 minutos, se procedió a la disección de las langostas, separando inicialmente cefalotórax de abdomen, luego se realizó una incisión en su caparazón desde la parte dorsal posterior del tórax hasta el surco cervical. Posteriormente se procedió a

disecar la cabeza (Figura 2B) siguiendo el surco cervical, se expuso por posterior el estómago y se les extirpó.

La preparación de las muestras se realizó en los siguientes pasos:

- A. Fijación: se sumergieron los estómagos en solución fijadora por 48 horas.
- B. Lavado: tampón fosfato salino (PBS), sobre un agitador marca Arthur Thomas® a 60 revoluciones por minuto (RPM) por un periodo de 36 horas.
- C. Descalcificación: solución que contiene Citrato de Sodio al 5% más Ácido Fórmico al 10% en proporción 1:1 (solución Anna Morse) (Morse, 1945), más una parte igual de solución fijadora. Por cuatro periodos sucesivos de 48 horas, en concentraciones crecientes de solución Anna Morse sobre solución fijadora 1:1; 1,5:1; 2:1; 4:1.
- D. Lavado: PBS, en dos periodos sucesivos de 24 horas.
- E. Deshidratación e inclusión en bloques de parafina, para estudios histológicos de rutina.
- F. Se realizaron cortes seriados de 5µm de espesor en un micrótomos marca Leitz®

4. Técnicas de tinción y Autofluorescencia:

- A. Hematoxilina-Eosina (H-E):

Se usó con el fin de observar el epitelio que participa en el proceso de formación del gastrolito, también para determinar con mayor precisión la zona de la muestra en que se realizaron cortes histológicos que fueron sometidos a la técnica de tinción de Azul de alciano (alcian blue) a pH 2,5.

- B. Alcian Blue a pH 2,5:

Se utilizó con el fin de detectar la presencia de proteoglicanos.

C. Autofluorescencia:

Se observó con microscopio de fluorescencia marca Nikon®, las muestras de distintas etapas de formación del gastrolito, aprovechando la propiedad de autofluorescencia de la quitina que lo compone.

D. Inmunohistoquímica:

Se empleó para el reconocimiento específico de proteoglicanos. Se utilizaron cortes obtenidos por micrótopo, adheridos a portaobjetos silanizados y la técnica de inmunoperoxidasa (kit Mouse/Rabbit Polyscan™ HRP/DAB Detection System CELL MARQUE®), debido a que la autofluorescencia de los gastrolitos dificultaría la utilización de la técnica de inmunofluorescencia. El protocolo de la técnica seleccionada indicaba que en caso de la utilización de algunos anticuerpos era necesario realizar una técnica enzimática, de acuerdo al proteoglicano buscado y el anticuerpo utilizado, según se muestra en la tabla N°1.

Tabla N°1: Anticuerpos monoclonales en combinación con su respectiva enzima para exponer al epítipo específico correspondiente.

ANTICUERPO	ENZIMA	PROTEOGLICANO
2B6	+ Chondroitinasa ABC	Dermatán sulfato Chondroitín-4-sulfato
2B6	+ Chondroitinasa ACII	Chondroitín-4-sulfato
3B3	+ Chondroitinasa ABC	Chondroitín-6-sulfato

(Willen *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 2001.)

Como primer paso se procedió a desparafinar rutinariamente todas las muestras, luego a hidratar con PBS por 10 minutos, se trató con la enzima correspondiente para cada epítipo buscado, a 37°C por 1 hora, posteriormente 2 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno, seguido de bloqueo de la peroxidasa endógena de las muestras

utilizando agua oxigenada al 3% en metanol durante 15 minutos, luego se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS por 2 minutos cada uno y se bloquearon sitios inespecíficos usando albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS (BSA/PBS 3%) durante 30 minutos. Finalmente, se incubaron las muestras con el respectivo anticuerpo primario monoclonal, durante 16 horas a 4°C.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios monoclonales: 2B6 (IgG de ratón anti-dermatán sulfato y anti-condroitín-4-sulfato) en dilución de 1:100 en BSA/PBS 1%; 3B3 (IgM de ratón anti-condroitín-6-sulfato) en dilución de 1:100 en BSA/PBS 1%, y 5D4 (IgG de ratón antiqueratán sulfato) en dilución de 1:100 en BSA/PBS 1%, (ICN Biomedicals, Inc.), (Arias *et al.*, 1992). Según los epítomos buscados, en el caso de los anticuerpos 3B3 y 2B6, previo al bloqueo de la peroxidasa endógena, las muestras se incubaron por 1 hora a 37°C con 0,1UI/mL de enzima condroitinasa ABC (EC 4.2.2.4.); para el 3B3 (lo que permite reconocer la presencia de condroitín-6-sulfato) y con condroitinasa ABC (EC 4.2.2.4) ó ACII (EC 4.2.2.4.); para el 2B6 (lo que permite reconocer la presencia de dermatán sulfato y condroitín-4-sulfato ó exclusivamente condroitín-4-sulfato en el caso de la ACII) (tabla N°1).

Posteriormente, se hicieron 3 lavados sucesivos con PBS por 2 minutos cada uno, luego se expusieron al segundo anticuerpo de conejo anti-ratón, polímero marcado (PoliScan™-Hrp 956D-22), a temperatura ambiente durante 45 minutos, luego se hicieron 3 lavados con PBS de 2 minutos cada uno, para concluir se revelaron con cromógeno Diaminobencidina (PoliScan™-DAB 956D23+ 956D24) por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con agua destilada, las muestras se secaron y cubrieron con cubreobjetos.

Para cada experimento se realizaron controles negativos incubando muestras sólo con el segundo anticuerpo. Se observaron en microscopio óptico y se consideraron muestras positivas a los proteoglicanos específicos buscados, cuando se observó un color café en la preparación. (Fernández *et al.*, 2001; Rodríguez, 2002).

IX. RESULTADOS

Determinación radiográfica de la etapa del ciclo de muda.

Se observó la presencia o ausencia de gastrolito en los ejemplares radiografiados, además se pudo constatar la radiopacidad del exoesqueleto en los estados de intermuda y premuda, por el contrario, la radiolucidez en postmuda, hace muy dificultosa la diferenciación de sectores con ésta técnica. (Figura 3).

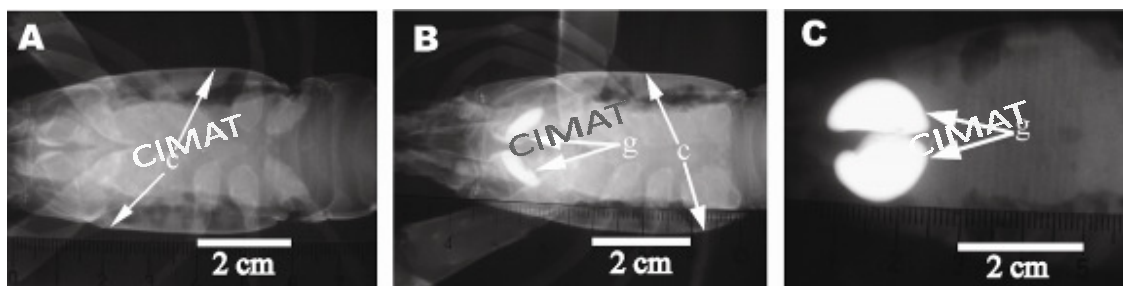


Figura 3: Vistas radiográficas dorsoventral de cefalotórax de *Cherax quadricarinatus*. c: borde cuticular; g: gastrolito. **A:** Intermuda; **B:** Premuda; **C:** Postmuda.

Según la forma, el tamaño y la posición del gastrolito en la imagen radiográfica, fue posible determinar el estado del ciclo de muda en que estaban las langostas. Se logró comparar los tres estados estudiados, no encontrando radiográficamente gastrolito en intermuda (Figura 3A). Se observaron gastrolitos en formación en premuda y en los ejemplares de postmuda, en este caso se observaron estructuras radiopacas discoidales compatibles con gastrolitos en su máximo desarrollo, o, por otra parte, dado su exoesqueleto blando este estado puede ser determinado a simple vista.

Con la información obtenida, se determinó el estado del ciclo de muda de los individuos, se seleccionaron y se clasificaron en tres grupos: intermuda, premuda y postmuda.

Luego del sacrificio se procedió a la obtención de las muestras.

En las muestras de premuda, gracias a la transparencia del tejido estomacal, fue posible observar los gastrolitos adheridos a la pared gástrica. En el caso de las de postmuda los gastrolitos se veían completamente formados en el lumen estomacal y en intermuda no fue posible observar los gastrolitos.

Con el fin de facilitar el análisis y el estudio de las muestras se formaron tres grupos de trabajo, ordenados según el ciclo de muda: **A, B y C**.

GRUPO A. ANIMALES EN INTERMUDA

A.1. HEMATOXILINA Y EOSINA

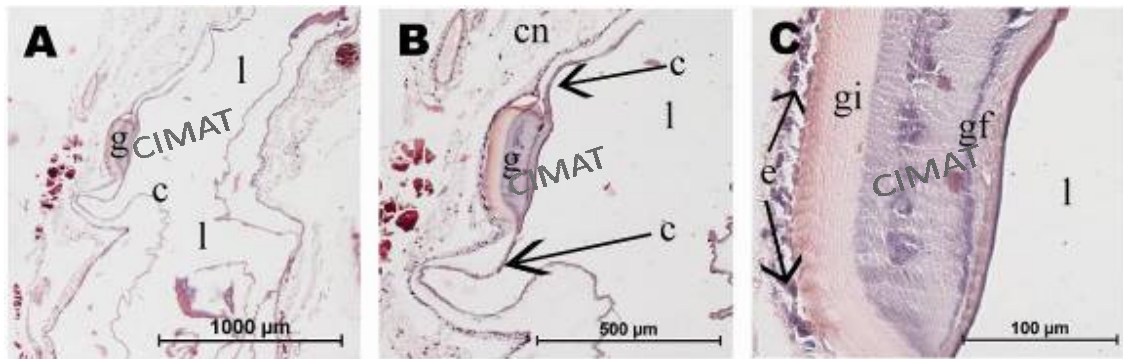


Figura 4: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda, con tinción H-E. l: lumen estomacal; c: borde cuticular; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador de gastrolito; g: gastrolito; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 4, se observa la estructura denominada “disco del gastrolito”. En el gastrolito primitivo se pueden distinguir dos sectores definidos, zona de gastrolito formado recientemente (gi) y zona de gastrolito formado con anterioridad (gf). Esta estructura está en sus primeras etapas de formación.

Se muestra además un epitelio monoestratificado, adherido al gastrolito que estaría indicando su relación con el proceso de desarrollo de este. También aparece un sector de la cutícula desprendida de la pared estomacal, producto del tratamiento de las

muestras, la cutícula recubre todo el lumen estomacal, protegiendo a la pared gástrica y al gastrolito de la digestión.

A.2. ALCIAN BLUE, pH 2,5

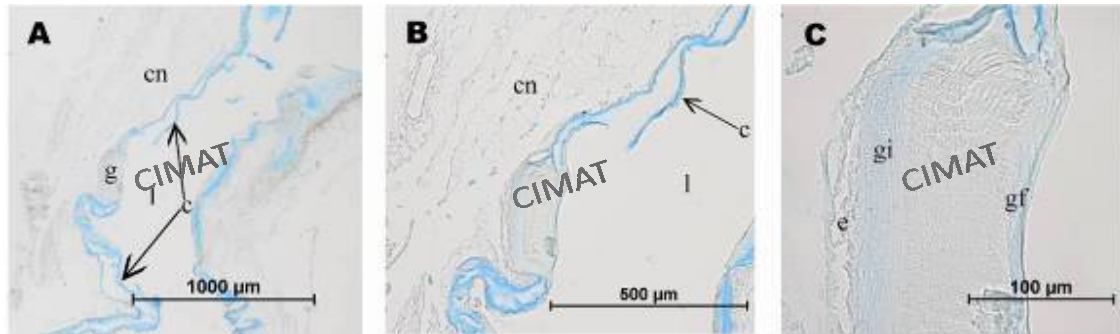


Figura 5: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda, con tinción Alcian blue a pH 2.5; g: gastrolito; l: lumen estomacal; c: borde cuticular; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador de gastrolito; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la Figura 5 podemos observar una delgada capa celular que es parte del epitelio formador del gastrolito, denominada disco del gastrolito, el tejido que se encuentra más cercano a la zona luminal del estómago presenta afinidad por el colorante, específicamente en el sector de la cutícula, lo que nos indica presencia de proteoglicanos. Con respecto al gastrolito se observa presencia de color azul más intenso en la región recientemente formada (gi).

El color azul esta dado por la presencia de cobre en el colorante, que preparado en una solución a pH 2,5 tiñe los mucopolisacáridos ácidos sulfatados y carboxilados y también las sialomucinas sulfatadas carboxiladas.

A.3. AUTOFLUORESCENCIA

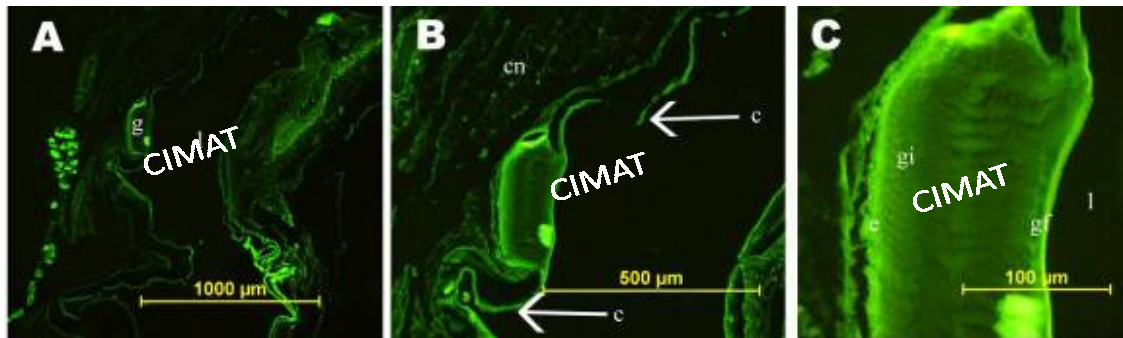


Figura 6: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda, microscopio de fluorescencia; g: gastrolito; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; c: borde cuticular; e: epitelio formador de gastrolito; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la Figura 6 es posible observar la autofluorescencia de las zonas que poseen quitina presente principalmente en el sector formador del gastrolito (e) y en el recubrimiento cuticular (c).

Tanto la quitina como el resto de los componentes se van agregando desde el epitelio al gastrolito. Se muestran sectores de tejido conectivo (cn) con autofluorescencia.

A.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se observó la presencia o ausencia de reacción positiva para los anticuerpos monoclonales que reconocían específicamente los siguientes proteoglicanos:

- a. Dermatan sulfato y condroitín-4-sulfato.
- b. Condroitín-4-sulfato.
- c. Condroitín-6-sulfato.
- d. Queratán sulfato.

Con el objetivo de discriminar entre sectores positivos y/o negativos la Figura 7 muestra el control negativo de la prueba de inmunohistoquímica para el estado de Intermuda.

Control Negativo Intermuda

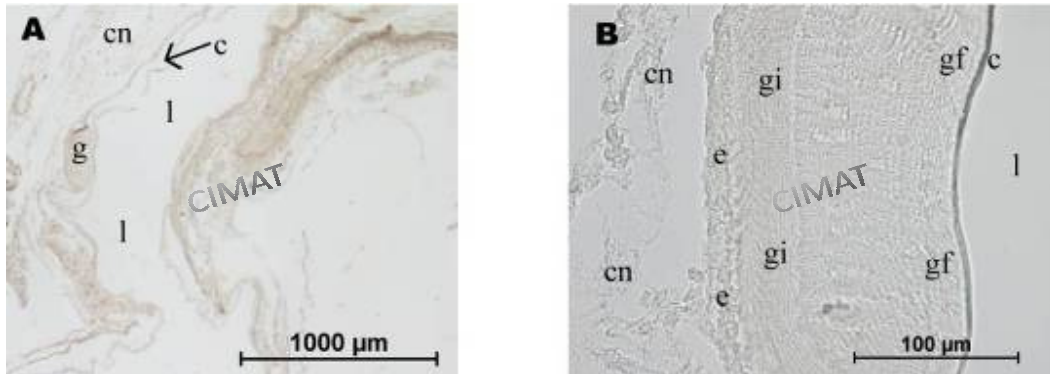


Figura 7: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda, incubados sólo con segundo anticuerpo en reacción inmunohistoquímica; g: gastrolito; cn: tejido conectivo laxo; l: lumen estomacal; c: cutícula; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 40x.

En la Figura 7 se observa que no hay reacción positiva para el segundo anticuerpo utilizado como control.

a) Dermatan sulfato y condroitín-4-sulfato

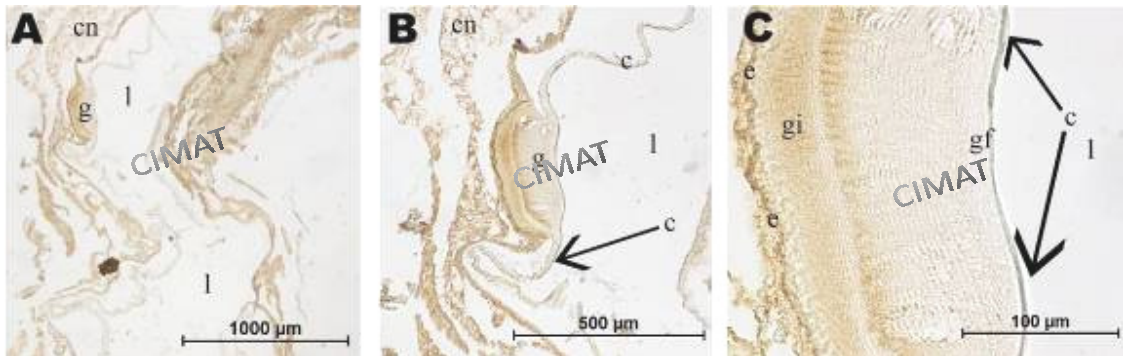


Figura 8: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda. g: gastrolito; cn: tejido conectivo laxo; l: lumen estomacal; c: cutícula; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

La Figura 8 muestra una reacción positiva que indica la presencia de los proteoglicanos dermatán sulfato y condroitín-4-sulfato, presentes en el delgado epitelio formador de gastrolito (e). En la zona de gastrolito de formación más temprana (gf) la reacción es más tenue, en la cutícula (c), no se observa reacción positiva.

b) Condroitín-4-sulfato

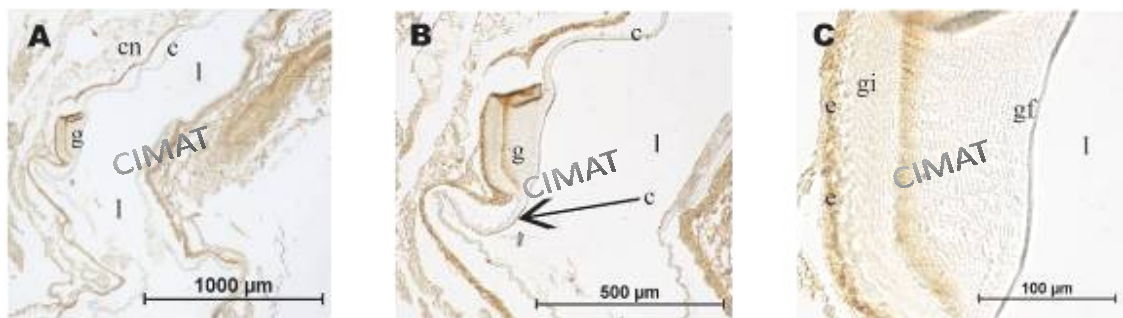


Figura 9: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda g: gastrolito; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; c: cutícula; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

La Figura 9, nos permite discriminar entre la presencia de condroitín-4-sulfato y dermatán sulfato, mostrando una clara positividad de la reacción para el epitelio responsable de la formación del gastrolito (e) evidenciando por lo tanto la presencia de condroitín-4-sulfato en él. El gastrolito también muestra reacción positiva para este anticuerpo con cierta distribución localizada.

c) Condroitín-6-sulfato

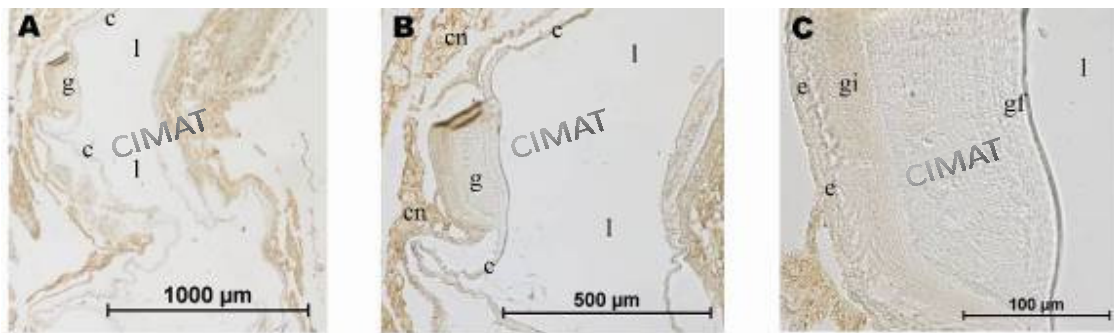


Figura 10: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda. g: gastrolito; c: cutícula; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la Figura 10 se observa reacción positiva para condroitín-6-sulfato en el tejido conectivo (cn) y una reacción levemente positiva en el epitelio formador y en todo el gastrolito.

d) Queratán sulfato

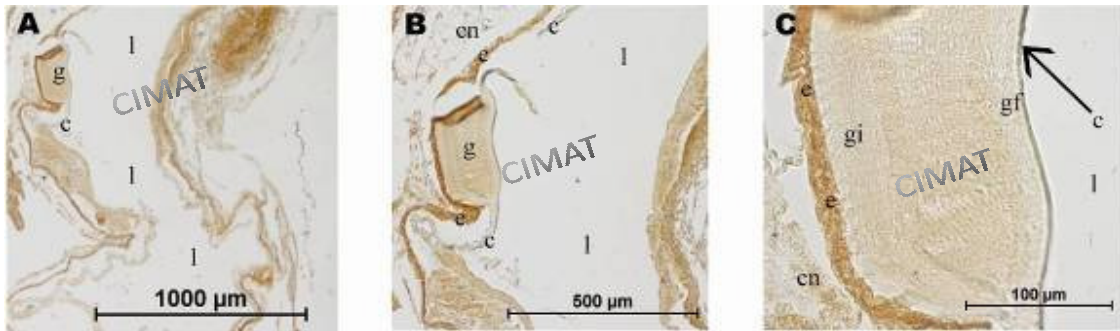


Figura 11: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Intermuda. g: gastrolito; c: cutícula; l: lumen estomacal; e: epitelio formador; cn: tejido conectivo laxo; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la Figura 11 se observa una intensa reacción positiva para queratán sulfato en el epitelio formador (e) y menos intensa en el gastrolito.

La presencia e intensidad para la reacción inmunohistoquímica de los proteoglicanos para el estado de intermuda en los sectores de interés se resume en la tabla N°2.

GRUPO B. ANIMALES EN PREMUDA

B.1. HEMATOXILINA Y EOSINA

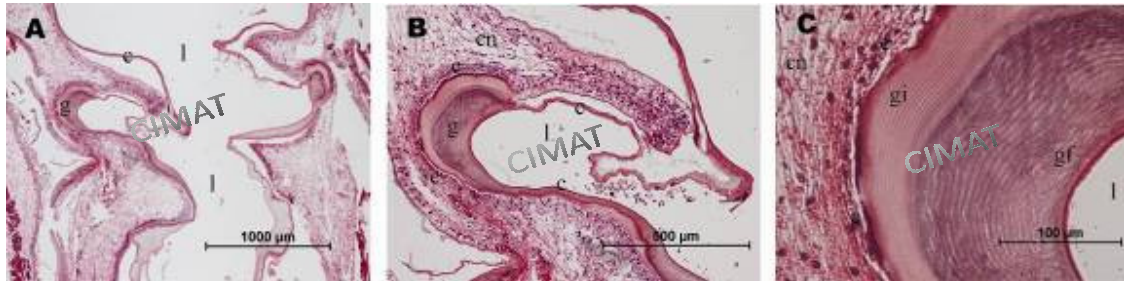


Figura 12: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda con tinción H-E. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito; c: cutícula. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 12 se distinguen claramente los componentes del disco del gastrolito en una zona del estómago de langosta de tenaza roja, se aprecia principalmente en esta etapa un epitelio que ha aumentado su altura observándose un epitelio columnar (Shechter *et al.*, 2008) en la zona asociada al gastrolito y está en íntimo contacto con éste que se está desarrollando, también es posible observar una capa de tejido conectivo laxo por debajo de este epitelio.

B.2. ALCIAN BLUE, pH 2,5

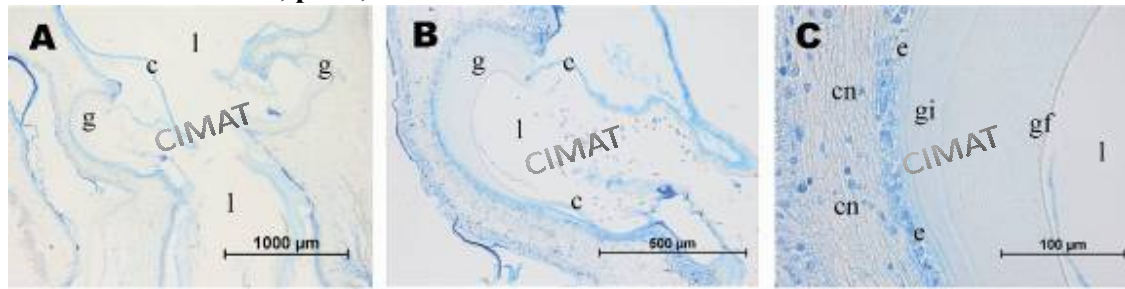


Figura 13: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda con tinción de Alcian-blue. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito; c: cutícula. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la Figura 13 se observa una clara presencia de proteoglicanos principalmente en el epitelio formador del gastrolito. Se observa además una tinción menos intensa en todo el gastrolito en formación, presentando la zona más tardía de formación de gastrolito (gi), una tinción un poco más intensa que la zona más temprana de formación del gastrolito (gf).

Existe además presencia de proteoglicanos en el tejido conectivo laxo localizado debajo del epitelio formador.

B.3. AUTOFLUORESCENCIA

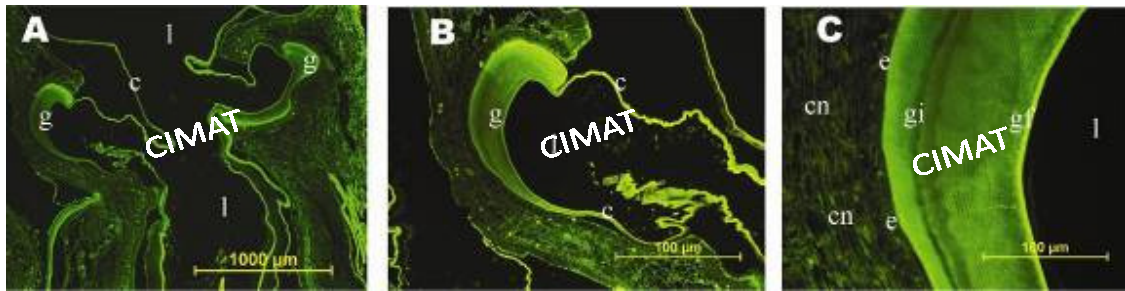


Figura 14: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda, microscopía de fluorescencia. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 14 se ven en tres aumentos distintos la autofluorescencia del gastrolito dada por la presencia de quitina tanto en la zona de formación más tardía de gastrolito (gi); como en la zona de formación más temprana de gastrolito (gf), además se distingue la cutícula que recubre todo el lumen estomacal.

A diferencia de lo visto en intermuda, el epitelio formador no aparece tan intensamente autofluorescente, el gastrolito en cambio se ve intensamente autofluorescente.

B.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Control negativo Premuda

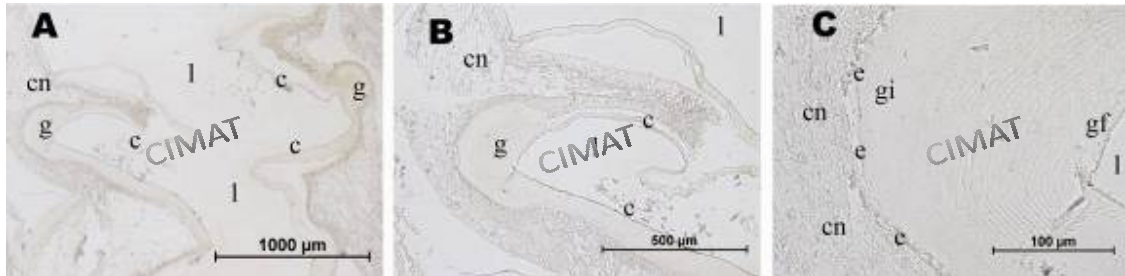


Figura 15: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda. cn: tejido conectivo laxo; g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 15 se muestra la ausencia total de reacción y se distinguen claramente diferentes sectores dentro de las tres imágenes.

a) Dermatógeno sulfato y condroitín-4-sulfato

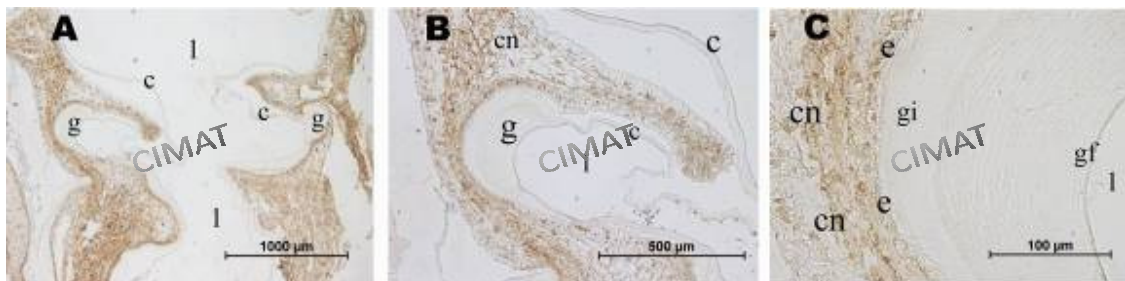


Figura 16: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 16 se observa reacción positiva a la presencia de dermatógeno sulfato y condroitín-4-sulfato en el sector de tejido conectivo (cn), una intensa reacción positiva en el epitelio formador (e) y una reacción menos intensa en todo el gastrolito.

b) Condroitín-4-sulfato

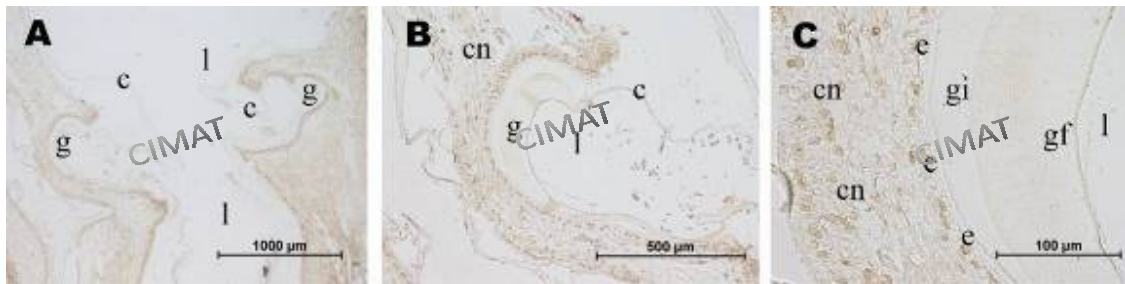


Figura 17: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 17 se muestra una reacción positiva menos intensa en el epitelio formador (e) y en el tejido conectivo (cn), se observa también una reacción poco intensa en el gastrolito (g).

c) Condroitín-6-sulfato

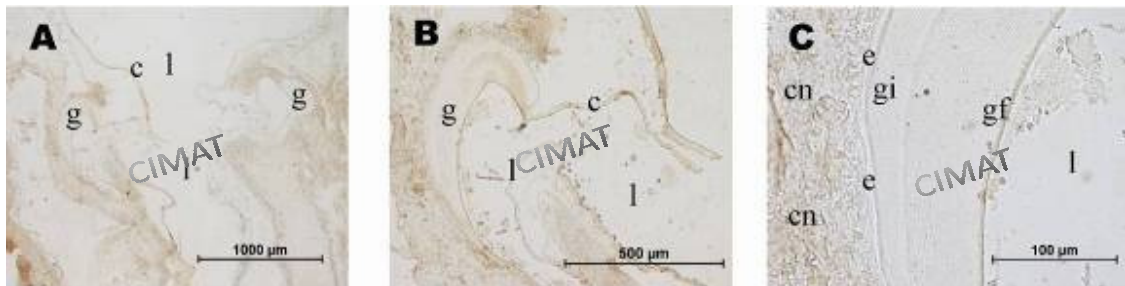


Figura 18: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 18 se observa una leve reacción positiva para condroitín-6-sulfato en el epitelio (e) y gastrolito (g), y un poco más intensa en el tejido conectivo (cn).

d) Queratán sulfato

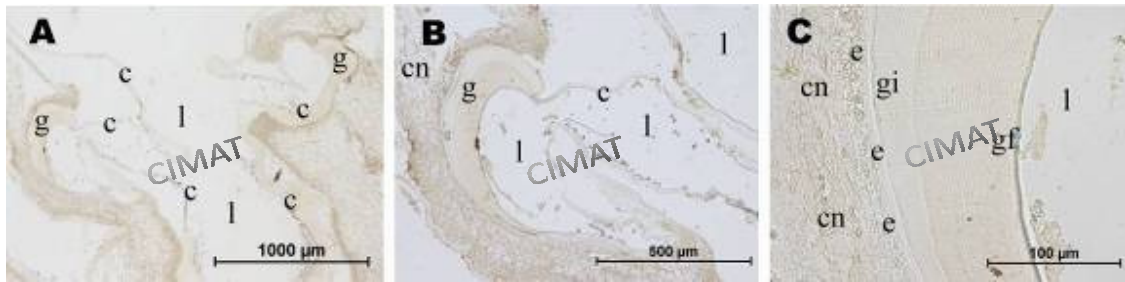


Figura 19: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Premuda. g: gastrolito; c: borde cuticular; l: lumen estomacal; cn: tejido conectivo laxo; e: epitelio formador; gi: zona más tardía de formación de gastrolito; gf: zona más temprana de formación de gastrolito. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

La figura 19 muestra la presencia de queratán sulfato, con una distribución homogénea en toda la muestra, es decir está presente en gastrolito (g), epitelio formador (e) y tejido conectivo (cn) de manera similar.

La presencia e intensidad para la reacción inmunohistoquímica de los proteoglicanos para el estado de premuda en los sectores de interés se resume en la tabla N°2.

GRUPO C. ANIMALES EN POSTMUDA

C.1. HEMATOXILINA Y EOSINA

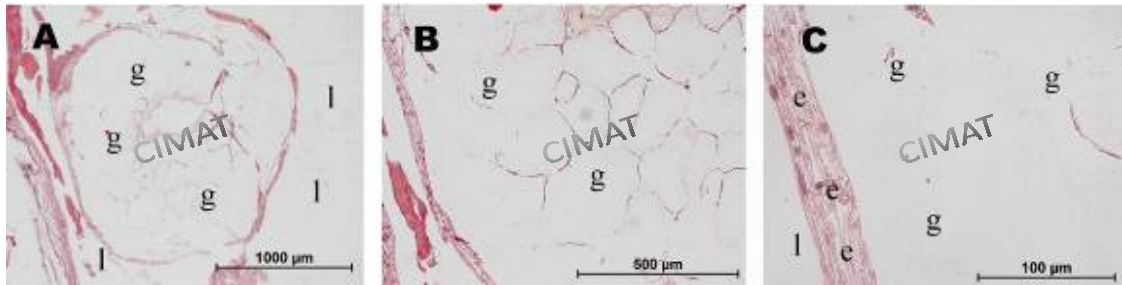


Figura 20: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda con tinción H-E. l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 20 se muestra un gastrolito formado por completo, que ya ha comenzado el proceso de degradación, no es posible distinguir bordes cuticulares, pero si es interesante ver que el epitelio formador del gastrolito esta adherido a él, con menor altura que en la etapa de premuda. Ya no se distinguen zonas en el gastrolito, y este se presenta como una estructura homogénea.

C.2. ALCIAN BLUE, pH 2,5.

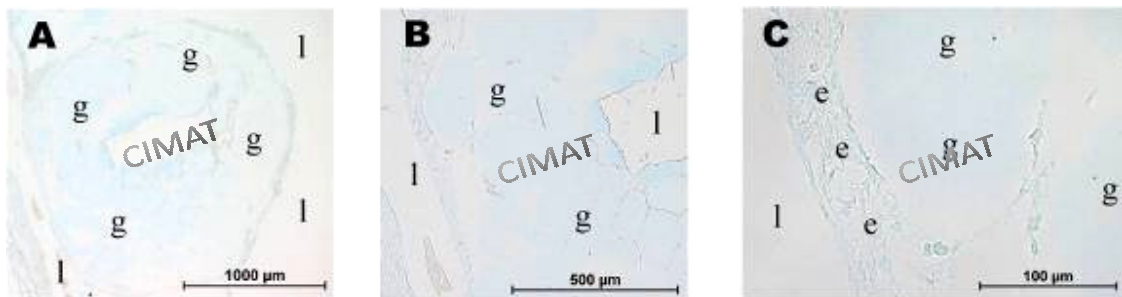


Figura 21: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda con tinción de Alcian-blue. l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 21 se observa presencia de proteoglicanos en gastrolito y en el epitelio adherido a éste, existe una distribución homogénea de la tinción en ambas zonas.

C.3. AUTOFLUORESCENCIA

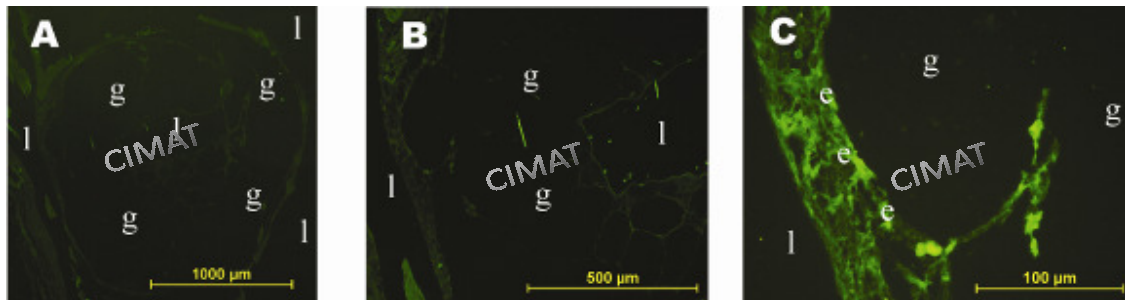


Figura 22: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda con microscopio de fluorescencia. l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 22 no se observa una clara presencia de autofluorescencia en el gastrolito, sólo en el epitelio formador adherido a éste es posible distinguirla.

C.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Control negativo postmuda

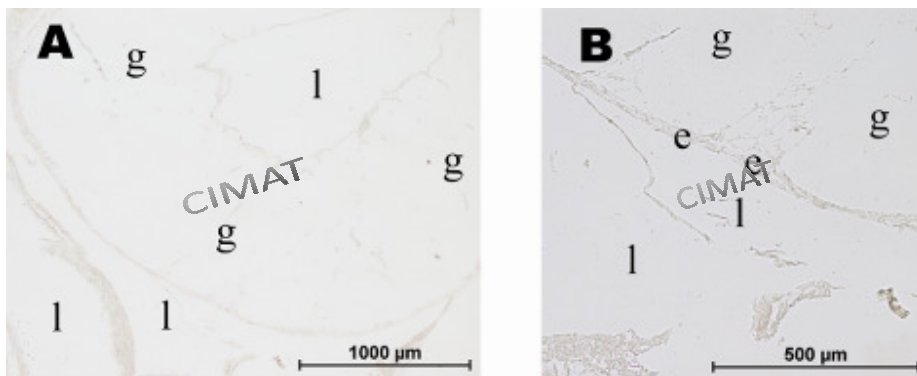


Figura 23: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda. l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 40x.

En la figura 23 se observan las distintas zonas de interés en este estudio, sin reacción, para poder discriminar que sectores resultaron ser positivos a las reacciones de búsqueda de los distintos proteoglicanos.

a) Dermatán sulfato y condroitín-4-sulfato

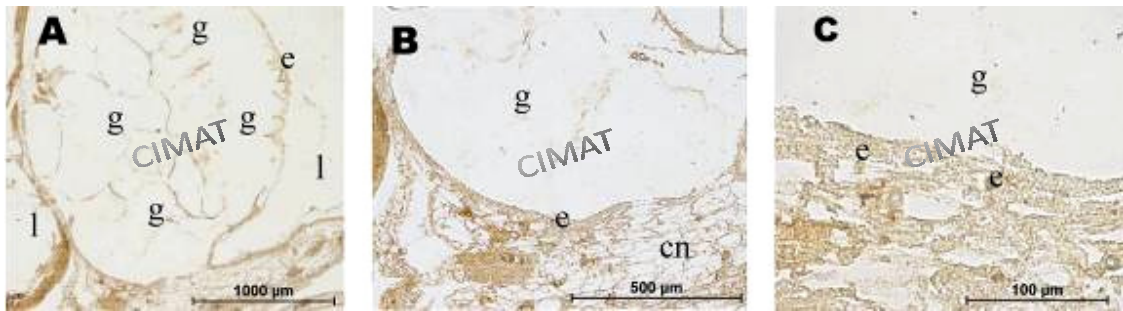


Figura 24: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda
l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 24 se muestra un sector de epitelio que no se ha desprendido de la pared estomacal y que muestra reacción positiva a dermatán sulfato y condroitín-4-sulfato, también el tejido conectivo subyacente muestra positividad a la reacción, existe además otro sector en el gastrolito que posee una parte de epitelio formador adherido que también muestra una reacción positiva.

b) Condroitín-4-sulfato

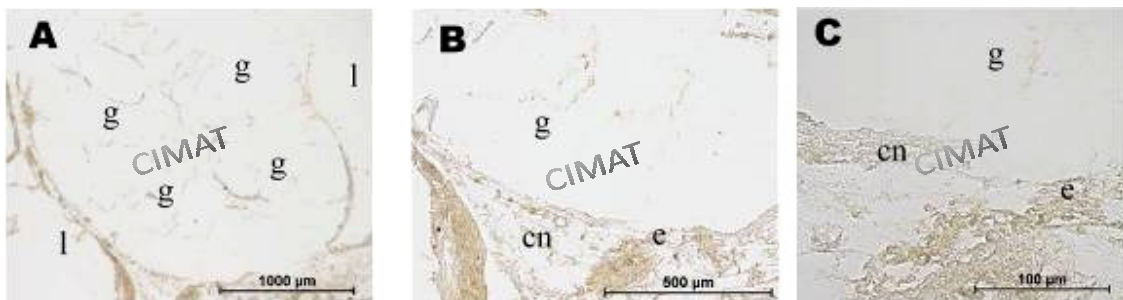


Figura 25: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda
l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

Al comparar la Fig. 24 con la Fig. 25, se observa una reacción menos intensa, lo cual sugiere que la mayor intensidad de la muestra de la Fig. 24 se debe principalmente a

dermatán sulfato, y se confirma la presencia de condroitín-4-sulfato en el epitelio formador.

c) Condroitín-6-sulfato

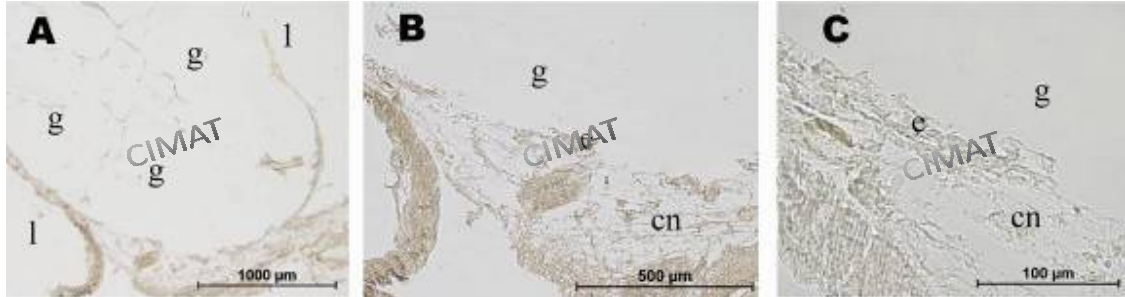


Figura 26: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda
l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

En la figura 26, se observa reacción negativa tanto en el gastrolito (g) como en el epitelio (e) y levemente positiva en el tejido conectivo (cn).

d) Queratán sulfato

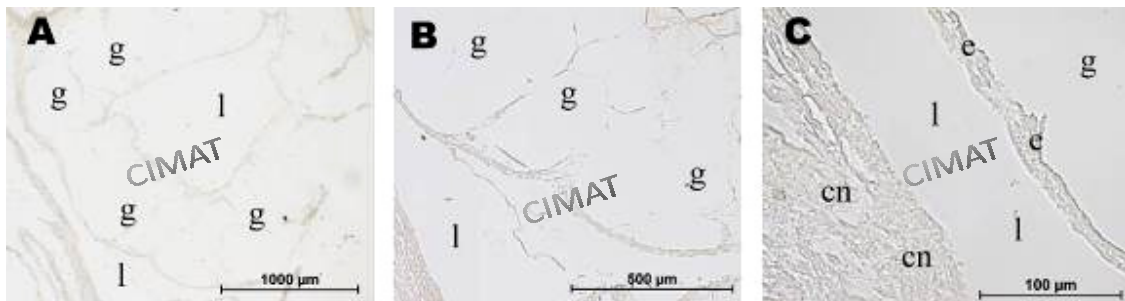


Figura 27: Corte transversal de estómago de *Cherax quadricarinatus* en Postmuda
l: lumen estomacal; g: gastrolito; e: epitelio formador. **A:** 4x; **B:** 10x; **C:** 40x.

La figura 27 presenta reacción negativa para el proteoglicano buscado en el epitelio formador y baja reacción positiva en el gastrolito y tejido conectivo.

La presencia e intensidad para la reacción inmunohistoquímica de los proteoglicanos para el estado de postmuda en los sectores de interés se resume en la tabla N°2.

Tabla N°2: presencia e intensidad de reacciones inmunohistoquímicas para los distintos estados de ciclo de muda de *Cherax quadricarinatus*.

Etapa	Sector	Proteoglicano buscado e intensidad de reacción			
		Dermatán Sulfato- Condroitín-4-Sulfato	Condroitín- 4-Sulfato	Condroitín- 6-Sulfato	Queratán Sulfato
Intermuda	Epitelio	+++	++	+	+++
	Gastrolito	+++	++	+	+++
	Tejido Conectivo	+++	++	++	++
Premuda	Epitelio	+++	+	+	+
	Gastrolito	++	+	+	++
	Tejido Conectivo	+++	+	++	+
Postmuda	Epitelio	++	+	-	-
	Gastrolito	++	+	-	+
	Tejido Conectivo	+++	++	+	+

Reacción negativa: -

Reacción baja: +

Reacción moderada: ++

Reacción alta: +++

X. DISCUSIÓN

Para la clasificación de la etapa del ciclo de muda de los ejemplares, se utilizó observación directa y radiográfica, de manera similar a lo realizado por Nakatsuji *et al.*, el año 2000, en que lograron establecer los tiempos para cada etapa del ciclo de muda, en el *crayfish Procambarus clarkii*, mantenido en ambiente controlado y con una previa intervención quirúrgica, si bien ellos usaron radiografías lo complementaron con estudios hormonales. En esta memoria de título se utilizaron cortes histológicos seriados que permitieron hallar el inicio de formación de gastrolitos en la etapa clasificada como intermuda por los estudios radiográficos. Por este método en esta etapa no se observaron estructuras compatibles con gastrolitos, esto, debido a la radiolucidez del gastrolito inicial que aún no habría comenzado su calcificación.

El uso de métodos radiográficos complementados con estudios hormonales (Nakatsuji *et al.*, 2000), en adición con cortes histológicos seriados, podrían definir de manera más certera las etapas del ciclo de muda.

Se ha podido comprobar que existe una relación entre la altura del epitelio formador y la etapa del ciclo de muda, apareciendo en la etapa inicial del desarrollo del gastrolito, como un epitelio bajo, formado por células íntimamente relacionadas con el gastrolito primitivo. En la siguiente etapa el epitelio aumenta en altura y permanece adherido al gastrolito. Finalmente en la etapa de degradación del gastrolito en la cual éste se encuentra en el lumen estomacal, restos del epitelio formador continúan adheridos.

El epitelio formador es el encargado de aportar los distintos componentes del futuro gastrolito, por lo tanto, es el responsable de formar la matriz extracelular de la cual se encuentran formando parte los PG descritos en esta memoria de título.

En intermuda, se observó un epitelio monoestratificado cuboidal, el cual estaría iniciando el aporte de materiales para el desarrollo del gastrolito, en este estado la intensidad de reacción que se observa para cada proteoglicano en el epitelio, es la misma que se ve en el gastrolito.

En premuda, hallamos un epitelio de mayor altura, un epitelio columnar con una participación mucho más notoria en el proceso de formación del gastrolito, ha aumentado la altura celular y los proteoglicanos que se describen se muestran todos con la misma intensidad, excepto queratán sulfato que presenta una reacción más intensa en el gastrolito. Es en esta etapa en que se observan claramente los componentes del disco del gastrolito, el recubrimiento cuticular del estómago, la epidermis gástrica y el tejido conectivo laxo subepidérmico.

En postmuda el epitelio continúa íntimamente relacionado con un gastrolito de gran tamaño que ya ha caído en el lumen estomacal y ha comenzado su digestión, pues llegó a su mayor tamaño y perdió el recubrimiento cuticular, aún es posible observar algún componente del disco que existió, como por ejemplo restos epiteliales y el tejido conectivo laxo, que estaba por debajo de él.

Al igual que lo descrito en otras estructuras biomineralizadas como cáscaras de huevo de aves, conchas de moluscos y crustáceos (Arias *et al.*, 1993; Mann, 2001) en el gastrolito de la langosta de tenaza roja *C. quadricarinatus*, los componentes orgánicos sólo constituyen una pequeña fracción de la masa total de éste. Mientras la fase inorgánica en todos estos modelos es carbonato de calcio, la distribución y composición de las macromoléculas de la escasa fase orgánica varía en tales modelos, lo que sugiere

que éstas tienen un rol decisivo en el control del desarrollo y propiedades mecánicas de tales biocerámicas.

A diferencia de lo realizado anteriormente por Navarrete (2004), en que se utilizaron gastrolitos de langostas en la etapa de postmuda, en este estudio se utilizaron muestras de gastrolitos en su sitio de formación o de degradación, según la etapa del ciclo de muda en que se encontrara el ejemplar seleccionado.

Respecto a la presencia y distribución de PG en las distintas secciones de estómagos de *C. quadricarinatus*, se ha podido determinar y discriminar en que lugares y en que etapas existe mayor intensidad de reacción inmunohistoquímica para estos PG. De manera similar a lo descrito por Fernández *et al.*, (1997), en la formación de la cáscara de huevo de gallina, en la que queratán sulfato al estar presente en las mamilas se presenta como un promotor de mineralización induciendo al parecer el depósito inicial de cristales de calcita, dadas sus características físico-químicas que le atribuyen afinidad por el calcio, también en la formación del gastrolito de *C. quadricarinatus* se observó una intensa reacción en intermuda que corresponde al inicio de su formación. Por otra parte, en la formación de cáscara de huevo, dermatán sulfato aparece en etapas posteriores de la mineralización logrando una estabilización del proceso. Entonces en el ejemplo de biomineralización, de la formación de la cáscara del huevo de gallina, existe una similitud al desarrollo del gastrolito, pues en ambos ocurre un depósito secuencial de biomoléculas que regulan el depósito del mineral.

Dermatán sulfato está presente en los tres estados del ciclo de muda estudiados, existe una reacción intensamente homogénea en los sectores de interés: el epitelio formador, gastrolito y tejido conectivo. La presencia de este PG se encuentra asociada a

la presencia de condroitín-4-sulfato ya que el anticuerpo 2B6 en presencia de enzima condroitinasa ABC identifica a ambos, para discriminar la presencia de dermatán sulfato de condroitín-4-sulfato se debe comparar con las muestras expuestas a 2B6 en presencia de condroitinasa ACII identificando en este caso sólo condroitín-4-sulfato. Se ha propuesto que dermatán sulfato podría ser el responsable de mantener al carbonato de calcio en estado amorfo y en este modelo de biomineralización estudiado, dermatán sulfato, se presenta con intensidad constante en el gastrolito en las tres etapas.

Condroitín-4-sulfato tiene una reacción menos intensa en intermuda, y se distribuye de manera homogénea en los tres sectores de interés (epitelio formador, gastrolito, tejido conectivo). Se observó una disminución de la intensidad de reacción para este anticuerpo en etapas siguientes de premuda y postmuda, tanto en el epitelio formador, como en el gastrolito y tejido conectivo.

Condroitín-6-sulfato, está presente en el tejido conectivo, a lo largo de todo el ciclo de muda, presentando mediana intensidad en intermuda y premuda, disminuyendo en postmuda. Además, está presente en el epitelio formador y en la zona recientemente formada del gastrolito, con baja intensidad de reacción en intermuda y premuda, para luego estar ausente en postmuda. El hallazgo de la presencia de éste proteoglicano en particular, representa otra diferencia en cuanto a la composición de la matriz orgánica del gastrolito de *C. quadricarinatus*, estudiada por Navarrete (2004), donde reconoce condroitín-6-sulfato, mediante el uso de inmuno-oro y no con inmunoperoxidasa.

Queratán sulfato, presenta una reacción intensa en intermuda en el gastrolito y medianamente intensa en el tejido conectivo, pero muy marcada en el epitelio formador. Luego en premuda se observa una reacción menos intensa en los tres sectores de interés

y finalmente en postmuda existe una muy baja reacción y no se presenta en el epitelio. Lo que sugiere su importancia en el inicio del proceso de biomineralización.

En general, podríamos decir que el epitelio es el responsable de la producción y distribución temporal de los proteoglicanos hallados en las distintas pruebas realizadas, además pareciera existir una temporalidad en la secreción de cada uno de estos PG, variando en las diferentes etapas del ciclo de muda. Es así, como dermatán sulfato se secretaría mayoritariamente en las primeras etapas de formación, intermuda y premuda, en conjunto con condroitín-4-sulfato actuando como moduladores de la disposición espacial del carbonato de calcio en la matriz orgánica, disponiendo el calcio secretado por el epitelio, en forma de carbonato de calcio amorfo. Queratán sulfato, por su parte, se produce principalmente en intermuda y sería el PG iniciador de la calcificación. Por su parte el condroitín-6-sulfato que se presenta en premuda e intermuda, en el epitelio y gastrolito, no resulta claro su rol en el desarrollo del gastrolito, pero si se hace manifiesto en las tres etapas, en el tejido conectivo laxo, subyacente al epitelio de formación.

De acuerdo a lo descrito por Travis (1963), que indica que en la etapa de intermuda se completa la formación de los componentes no calcificados del disco del gastrolito. En el presente estudio se demuestra que existe una actividad fisiológica en éste sector especializado del estómago y se ha dado inicio a la formación de las futuras reservas de calcio.

En esta memoria de título se ha estudiado la presencia de algunos PG durante el desarrollo de gastrolitos en la langosta de tenaza roja *C. quadricarinatus*, cuya distribución tisular, temporal y espacial, podría influir en el resultado de dicho proceso de biomineralización.

XI. CONCLUSIONES

1. Con el uso de radiografías es posible distinguir las distintas etapas del ciclo de muda.

2. A través del uso de métodos histológicos, es posible distinguir el gastrolito desde el inicio de su formación y determinar con completa certeza la etapa del ciclo de muda.

3. El epitelio formador, se modifica a través de las distintas etapas del ciclo de muda.

4. Los proteoglicanos identificados en el gastrolito y en su epitelio formador son: dermatán sulfato, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato y queratán sulfato; ellos aparecen en un orden temporal definido.

5. Dermatan sulfato y condroitín-4-sulfato dada su aparición y mantención, mantendrían el carbonato de calcio en la forma no cristalizada, es decir, como carbonato de calcio amorfo.

6. Queratán sulfato, por su aparición temprana durante la formación del gastrolito, se comportaría como un iniciador de la calcificación.

7. Las conclusiones 4, 5 y 6 sugieren que los proteoglicanos estarían involucrados en el ordenamiento temporal y espacial de los componentes del gastrolito.

8. Existe una intensa actividad fisiológica durante todo el ciclo de muda en el sector especializado del estómago (intermuda-premuda-postmuda).

9. En esta memoria de título se demuestra que existe un epitelio responsable de la secreción ordenada de algunas macromoléculas involucradas en el desarrollo de los gastrolitos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, J.L.; CARRINO, D.A.; FERNÁNDEZ, M.S.; RODRÍGUEZ, J.P.; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. 1992. Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 298: 293-302.

ARIAS, J.L.; FERNÁNDEZ, M.S. 2003. Biomimetic process through the study of mineralized shells. *Materials Characterization*. 50: 189-195.

ARIAS, J.L.; FINK, D.J.; XIAO, S., HEUER, A.H.; CAPLAN, A.I. 1993. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *International Review of Cytology*. 145: 217-250.

ARIAS, J.L.; NEIRA-CARRILLO, A.; ARIAS, J.I.; ESCOBAR, C.; BODERO, M.; DAVID, M.; FERNÁNDEZ, M.S. 2004. Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering. *Journal of Materials Chemistry*. 14: 2154-2160.

BARNES, R.S.K.; CALOW, P.; OLIVE, P.J.W. AND GOLDWING D.W. 1993. *The invertebrates: a new synthesis*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 488 p.

BOWATER, R.O. ; WINGFIELD M.; FISK, A.; CONDON, K.M. L.; REID, A.; PRIOR, H.; KULPA, E.C. 2002. A parvo-like virus in cultured redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* from Queensland, Australia. *Inter-Research* 50: 79-86.

CHUNG, J.; WEBSTER, S. 2003. Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3280-3288.

FERNÁNDEZ, M.S.; ARAYA, M.; ARIAS J.L. 1997. Eggshell are shaped by a precise spatio-temporal of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biology*. 16: 13-20.

FERNÁNDEZ, M.S.; MOYA, A; LÓPEZ, L; ARIAS J.L. 2001. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Matrix Biology*. 19: 793-803.

HECKER, A; TESTENIÈRE, O; MARÍN, F; LUQUET, G. 2003. Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. *FEBS Letters*. 535: 49-54.

HUXLEY, T. 1880. The crayfish, an introduction to the study of zoology. v. XXVIII of the International Scientific Series. Appleton and company, New York, USA (Reprinted 1973, 1974, 1977, M.I.T. Press, Cambridge, MA, USA). 371p. En línea: <<http://www2.biology.ualberta.ca/palmer/thh/crayfish.htm>> [consulta: 20-05-2008].

LOWENSTAM, H.A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1131.

LOWENSTAM, H.A.; WEINER, S. 1989. On Biomineralization. Oxford University Press. New York, USA. 324 p.

LUQUET, G.; MARIN, F. 2004. Biomineralisations in crustaceans: Storage strategies. *Comptes Rendus Palevol*. 3: 515-534.

MANN, S. 1983. Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding*. 54: 125-174.

MANN, S. 2001. Biomineralization. Oxford University Press, Oxford, UK, 198 pp.

MORSE, A. 1945. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *Journal of Dental Research*. 24: 143-153.

NAKATSUJI, T; KEINO, H; TAMURA, K; YOSHIMURA, S; KAWAKAMI, T; AIMOTO, S; SONOBE, H. 2000. Changes in the amounts of the molt-inhibiting hormone in sinus glands during the molt cycle of the american crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zoological Science*. 17: 1129-1136.

NAVARRETE, M. 2004. Caracterización de algunas macromoléculas involucradas en la mineralización de gastrolitos de langosta de tenaza roja, *Cherax Quadricarinatus* (von Martens, 1868) Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. 44 p.

RODRÍGUEZ, R. 2002. Inmunolocalización de algunos proteoglicanos presentes en la concha del Picoroco, *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. 36 p.

SHECHTER, A; BERMAN, A; SINGER, A; FREIMAN, A; GRINSTEIN, M; EREZ, J; AFLALO, E; SAGI, A. 2008. Reciprocal changes in calcification of the gastrolith and cuticle during the molt cycle of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Biological Bulletin*. 214: 122-134.

SIMKISS, K.; WILBUR, K.M. 1989. Biomineralization cell biology and mineral disposition. Academic Press. San Diego, USA. 337 p.

TRAVIS, D. 1960. The deposition of skeletal structures in the Crustacea. The histology of the gastrolith skeletal tissue complex and the gastrolith in the crayfish, *Orconectes (Cambarus) virilis* Hagen-Decapoda. *Biological Bulletin*. 118: 137-149.

TRAVIS, D. 1963. Structural features of mineralization from tissue to macromolecular levels of organization in the decapod crustacea. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 109: 177-245.

WILLEN, M.D.; SORREL, J.M.; LEKAN C.C.; DAVIS, B.R.; CAPLAN, A.I. 1991. Patterns of glycosaminoglycan/proteoglycan immunostaining in human skin during aging. *The Journal of Investigative Dermatology.* 96: 968-974.