

## AValiação HISTOLÓGICA PARA APÊNDICES LOCOMOTORES DE *NEOHELICE GRANULATA* AValiação DA EFICÁCIA DE FIXADORES, DESCALCIFICADORES E CORANTES PARA ESTUDO DE APÊNDICES LOCOMOTORES DE *NEOHELICE GRANULATA* (DANA, 1851)

ELIZANDRA LUÇARDO BORGES<sup>1</sup>; VINÍCIUS CUNHA GONZALEZ<sup>1</sup>; RODRIGO DESSESARDS JARDIM<sup>1</sup>; DIONÍSIO LOCH<sup>1</sup>; JOÃO CASSIMIRO MENDONÇA SOARES<sup>1</sup>; GILMA SANTOS TRINDADE<sup>1</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande - Instituto de Ciências Biológicas. Caixa Postal 474 – CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil.  
<sup>2</sup>antoniovarela@furg.br.

### RESUMO

Foram coletados dezesseis espécimes de *Neohelice granulata* no estuário da Laguna dos Patos sendo que, de cada um destes foram coletados cinco apêndices locomotores. Dois destes apêndices foram fixados em Formol a 10%, outros dois em Zenker e um em Davidson, correspondendo a 32, 32, 16 repetições respectivamente. Após os apêndices terem sido fixados em Formol e Zenker estes foram colocados nos descalcificadores Ácido Nítrico 5% e Solução de Citrato de Sódio/Ácido Fórmico. Já os apêndices fixados em Davidson permaneceram nesta solução, pois se trata de um fixador/descalcificador. Após o processamento do material as lâminas foram coradas com a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), e pela técnica Tricrômico de Gomori e Tricrômico de Mallory. Através das análises determinou-se que não há diferença estatística entre os tratamentos, porém sugere-se o fixador e descalcificador Davidson tendo em vista sua facilidade de manuseio e os baixos custos. Com relação aos corantes observou-se que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as técnicas HE e o Tricrômico de Mallory, no entanto, estes foram melhores ( $P < 0,05$ ) que o Tricrômico de Gomori. Sendo o HE o mais indicado devido ao preço e facilidade da técnica para o estudo histológico com apêndice locomotor de *Neohelice granulata*.

**PALAVRAS CHAVES:** *Neohelice granulata*, Técnicas histológicas, Fixador, Descalcificador, Corantes.

### ABSTRACT

#### Evaluation of the efficiency of fixation, decalcified and corants to study of pereopods of *Neohelice granulata* (Dana, 1851)

There were collected sixteen specimens of *Neohelice granulata* in the estuary of the Laguna dos Patos (Dos Patos Lagoon). From each of them, five pereopods were collected. Two of these pereopods were fixed in 10% Formol, other two of them in Zenker and one in Davidson, in a total of 32,32,16 repetitions respectively. After they had been fixated in Formol and Zenker they were immersed in the decalcifiers 5 % Nitric Acid and in a solution of Sodium Citrate/Formic acid. On the other hand, the appendages fixated in Davidson remained in this solution because it is a fixative/decalcified. After the material processing the glass slides were stained with the staining techniques Hematoxylin and Eosin (HE), Gomori Trichrome (TG) and Mallory Trichrome (TM). Throughout the analysis, there was determined no statistics difference between the treatments, yet it is suggested the usage of the Davidson fixative/decalcifier taking into account its handling easiness and low cost. Regarding the colorants, it was observed no difference ( $P > 0.05$ ) between the HE and Mallory Trichrome techniques, however they were found better than the Gomori Trichrome. The HE is the most indicated due to its price and technique easiness for the histological study with the *Neohelice granulata* pereopod.

**KEY WORDS:** *Neohelice granulata*, histological techniques, fixative, decalcifier, colorants.

### INTRODUÇÃO

Das espécies da família Grapsidae encontradas na região da cidade de Rio Grande, RS a mais abundante é *Neohelice granulata* (Rieger & Santos, 2001). Esta espécie distribui-se no Atlântico Sul Ocidental: Brasil (do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul), Uruguai e Argentina (Melo, 1996). O fato de ser abundante nas marismas, de fácil captura, identificação e resistente à manutenção em laboratório, faz com que a espécie seja bastante estudada (Barutot, 2007). Como exemplos existem estudos sobre aspectos ecológicos (D'Incao *et al.*, 1990), hábitos alimentares, (Santos *et al.*, 2000), composição e distribuição dos crustáceos (Decapoda) na Lagoa do Peixe do Rio Grande do Sul (Rieger & Santos, 2003) e morfologia durante o desenvolvimento juvenil de *Neohelice granulata* em

laboratório.

Esta espécie também é frequentemente utilizada em aspectos fisiológicos como em bioensaios de toxicidade de metais pesados e pesticidas, mostrando particular sensibilidade. Monserrat & Bianchini (1995), Monserrat *et al* (1997) e López *et al* (2001) realizaram estudos com essa espécie para verificação de fatores relacionados ao estresse e de substâncias tóxicas, como o metilparation. A presença de parasitas no hepatopâncreas afetando os níveis de glicogênio do órgão foi verificada por Robaldo *et al* (1999). Nery & Santos (1993) estudaram o metabolismo dos carboidratos durante a osmoregulação desta espécie. Além disso, a *Neohelice granulata* vem sendo utilizada como modelo teórico em estudos de regeneração de tecidos, sendo principalmente analisada a influência de radiações infravermelhas

nos processos de regeneração e de muda por Gonzalez (2006).

Já foram estudados aspectos histológicos da morfologia das brânquias em relação ao habitat e aos hábitos respiratórios por Luquet *et al* (1998), sendo que para este estudo foi utilizado como fixador formol a 10% + 1% de Ácido Acético, obtendo resultados positivos no preparo das lâminas. Genovese *et al* (2000) relataram mudanças morfométricas nas brânquias desta espécie sob condições de hipo e hiperregulação osmótica e Barutot (2007) descreveu a estrutura histológica das gônadas desse crustáceo. Nestes estudos foi utilizado o fixador Bouin para uma melhor preservação da integridade celular do órgão analisado e os corantes utilizados foram a Hematoxilina e a Eosina.

Fonseca *et al* (2005), realizaram estudos sobre o pigmento lipofuscina em *Neohelice granulata*, sendo que neste estudo foi realizada análise subjetiva e empírica para verificação do melhor fixador. Foi observado que a técnica mais apropriada consistia em uma mistura de formaldeído a 10% em água destilada quando comparada a formaldeído a 10% em a água do mar.

Até o presente momento não foram encontrados trabalhos que relatem a histologia dos apêndices locomotores de *Neohelice granulata*. A estrutura morfológica dessa espécie consiste em um exoesqueleto quitinoso, estrutura que confere proteção contra predadores, além de proteger os caranguejos contra a desidratação no ambiente terrestre. Esta estrutura é formada pela epiderme e embora ofereça a esses animais proteção, dificulta o crescimento dos artrópodes de uma maneira geral. Como solução para esse problema os artrópodes, em especial os caranguejos, realizam ecdises periódicas por toda a vida a fim de realizarem o seu crescimento normal (Schmidt – Nielsen, 1996).

A musculatura dos apêndices locomotores é essencial para o movimento, uma vez que os músculos se prendem ao lado interno do exoesqueleto e ambos agem como alavanca para que esses animais possam se deslocar. Os caranguejos possuem 5 pares de apêndices locomotores sendo que o primeiro par é modificado em forma de pinça, adaptada aos processos de alimentação. Para a sua proteção esses animais realizam o processo de

autotomia na junção basíscio do apêndice locomotor (Ruppert & Barnes, 2005). Ao estudar-se a estrutura morfológica desses animais, evidencia-se a presença de um exoesqueleto de quitina. Desta forma sabe-se que além da fixação é necessária a realização da descalcificação, porém, deve-se considerar que descalcificadores são de natureza ácida, podendo comprometer as estruturas celulares menos resistentes, como tecido muscular e tecido conjuntivo, devendo-se assim levar em conta o tempo de permanência das peças nos descalcificadores para o preparo de lâminas histológicas.

Halperin *et al* (2000) ao realizarem estudos com *Neohelice granulata* (DANA, 1851) utilizaram solução de ácido nítrico 5% durante 20 horas, tendo obtido resultados positivos quanto à preservação de tecidos moles, mesmo utilizando um descalcificador classificado como forte por Tolosa *et al* (2003) sendo que isto ocorreu devido às peças ficarem por um menor período de tempo neste descalcificador.

Segundo Furtado *et al* (2004) para a descalcificação da concha do molusco *Bradybaena Similiaris* é necessário utilizar a solução descalcificadora ácido nítrico a 10%, já que a concha possui grande resistência à descalcificação. O tempo de permanência na solução descalcificadora é determinado de acordo com o tamanho do animal.

Percebe-se que as soluções descalcificadoras utilizadas são adequadas para o estudo histológico, mas apresentam problemas no que se refere ao tempo de descalcificação e a preservação do material. Com base nisto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer os fixadores, descalcificadores e corantes mais adequados para a análise histológica de apêndice locomotor de *Neohelice granulata* (DANA, 1851).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta dos animais e dos Apêndices Locomotores

Os espécimes de *Neohelice granulata* foram coletados no estuário da laguna dos Patos na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. Os caranguejos foram mantidos em tanques de água salgada com 20 de salinidade, 25° C e fotoperíodo de 12:12 C:E, com período de aclimação de sete dias. Durante esse período, os caranguejos foram alimentados *ad libitum*

com carne moída bovina. Destes, foram mantidos para o trabalho apenas aqueles que não apresentaram ausência de membro, sendo esta triagem realizada em laboratório.

Foram coletados cinco apêndices locomotores, quatro do lado direito e um do lado esquerdo de dezesseis espécimes de *Neohelice granulata*, sendo a escolha destes animais ao acaso. Os apêndices

foram tracionados mecanicamente para indução da autotomia, sendo utilizado somente o basipodito para análise histológica. Esta estrutura esta situada após a estrutura entre o coxopodito e a articulação do apêndice locomotor (Figura 1). Para evitar perda de hemolinfa os animais ficaram em aquário seco por 30 minutos.

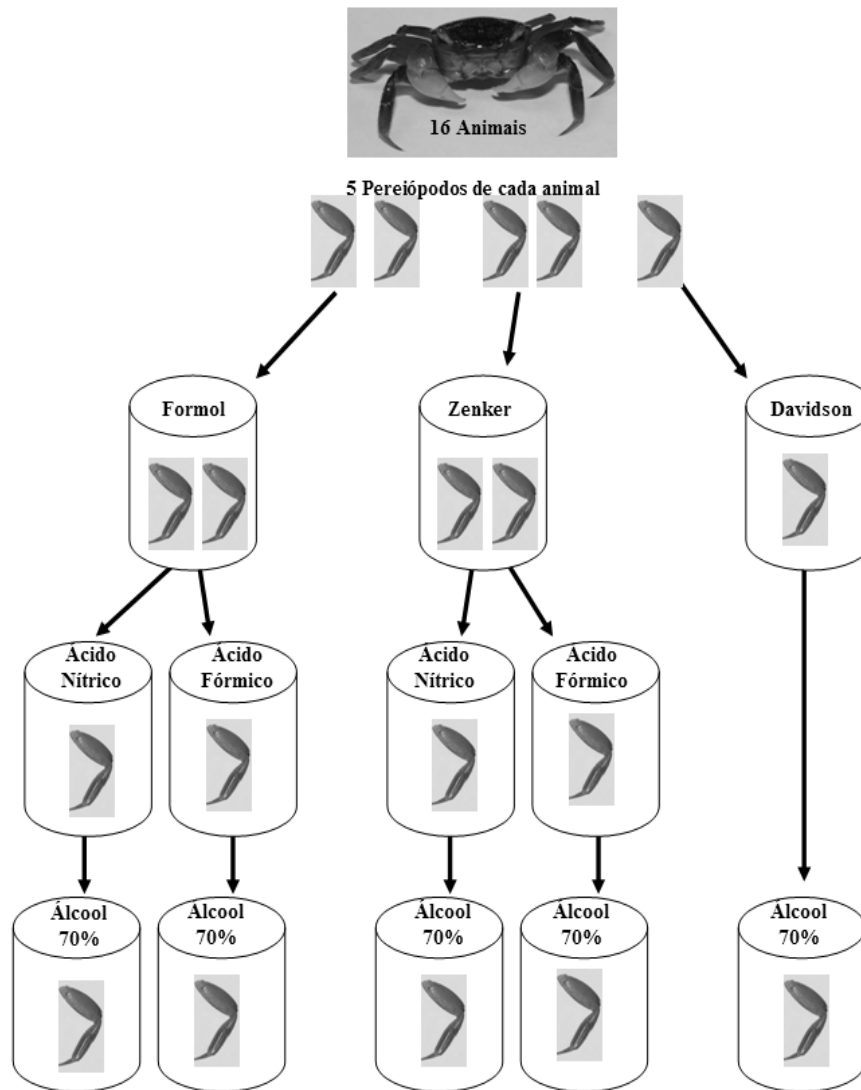


Figura 1: Fluxograma do processo de obtenção, fixação e descalcificação dos apêndices locomotores.

**Fixação e descalcificação dos Apêndices Locomotores.**

Dois destes apêndices locomotores foram fixados em formol à 10%, outros dois em Zenker e um em Davidson, sendo feitas 32, 32 e 16 repetições para cada tratamento respectivamente. Após os apêndices terem sido fixados em Formol e Zenker por um período de 24 horas, foram transferidos para as

soluções descalcificadoras ácido nítrico a 5% e solução de citrato de sódio + ácido fórmico por mais 96 horas, com 16 repetições em cada um dos dois tratamentos. Já os apêndices fixados em Davidson permaneceram nesta solução por um período de 48 horas, pois este consiste em um fixador e descalcificador.

O material foi processado para confecção das

lâminas histológicas somente após completa descalcificação. Para a verificação da descalcificação completa do apêndice locomotor foi utilizado o teste do oxalato, sendo utilizados 5 ml do líquido descalcificador em que os apêndices estavam imersos e 1 ml de oxalato de amônia saturada que foi adicionado ao líquido descalcificador (Tolosa *et al*, 2003). Para avaliar a descalcificação deixou-se essa solução em repouso por 15 minutos, sendo verificada a formação ou não de precipitado no tubo de ensaio. Enquanto ocorreu formação de precipitado os apêndices foram caracterizados como ainda calcificados (descalcificação incompleta), sendo posteriormente renovado o líquido descalcificador.

Após descalcificados, os apêndices locomotores de *Neohelice granulata* foram submetidos às seguintes etapas para a confecção de lâminas histológicas; desidratação em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, 96%, 100% I, 100% II), sendo que cada peça ficou 1 hora em cada concentração, diafanização em três banhos de 20 minutos com xilol 100%, impregnação em parafina e inclusão. Os cortes histológicos foram obtidos em espessura de 5µm através de um micrótomo rotativo (Tolosa *et al*, 2003). As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, com o Tricrômico de Gomori e

Tricrômico de Mallory sendo confeccionadas 6 lâminas de cada técnica de coloração que foram montadas com bálsamo do Canadá sintético.

Após a montagem, as lâminas foram analisadas subjetivamente por dois avaliadores, um avaliador experiente (Professor titular de histologia) e um avaliador com pouca experiência (Monitor de histologia) para verificação subjetiva do melhor fixador, corante e também verificação de lâminas que poderiam ser aproveitadas para estudo dos animais. A análise foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz, sendo levada em conta à integridade dos tecidos moles que compõem o apêndice locomotor. Os avaliadores classificaram as lâminas como adequadas (positivamente) ou inadequadas (negativamente). As figuras 2, 3 e 4 caracterizam cortes histológicos avaliados positivamente e negativamente quando corados com Hematoxilina e Eosina. As figuras 2 e 3 indicam que a fixação foi bem realizada porque os tecidos conjuntivo e muscular permaneceram intactos logo após a camada externa de quitina, enquanto que a figura 4 indica uma fixação mal realizada, pois os tecidos moles praticamente se desintegraram durante a confecção da lâmina.

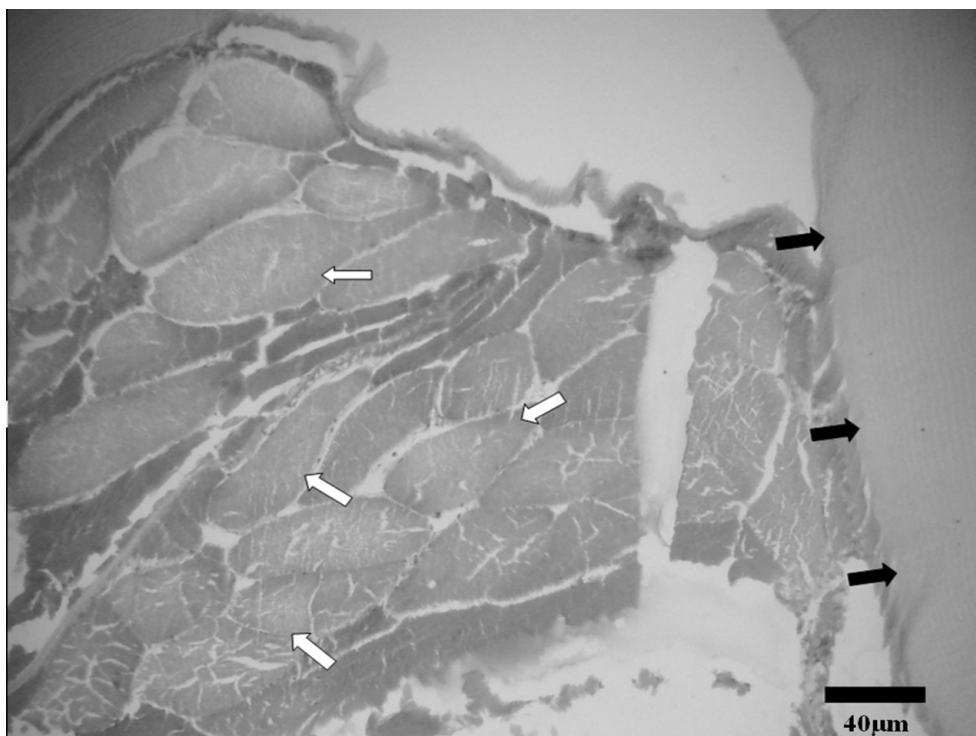


Figura 2: Apêndice Locomotor corado com HE, considerado adequado para o estudo (Setas brancas indicam o tecido muscular, setas pretas indicam a camada de quitina ambos bem preservados). Barra de escala = 40µm

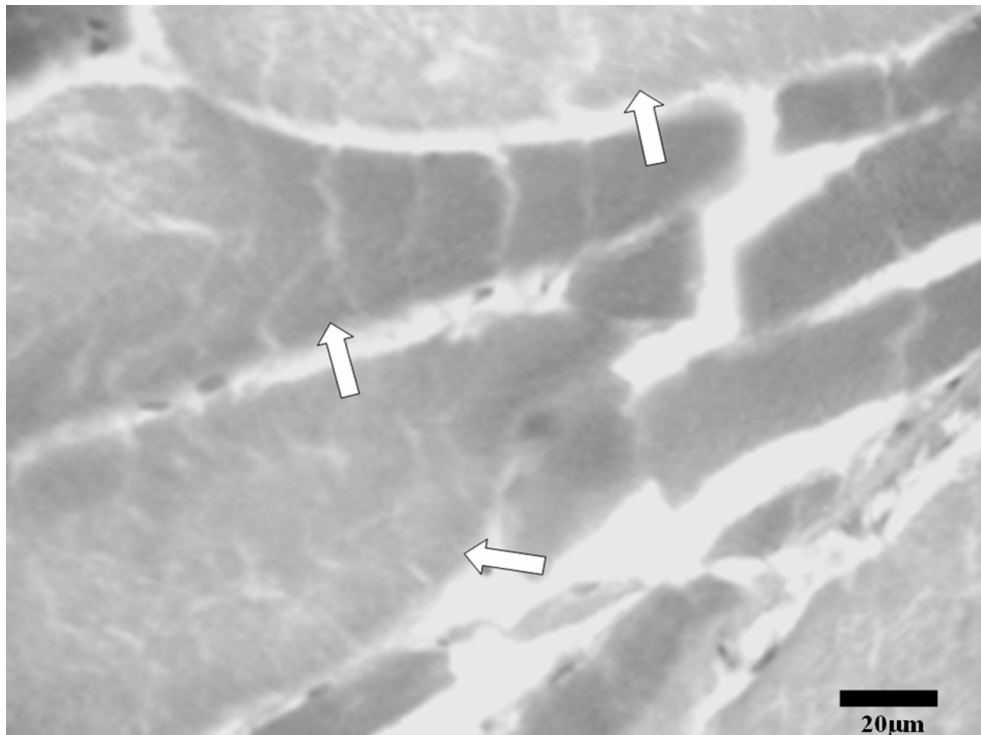


Figura 3: Apêndice Locomotor corado com HE, considerado adequado para o estudo (Setas brancas setas indicam o tecido muscular bem preservado). Barra de escala = 20µm

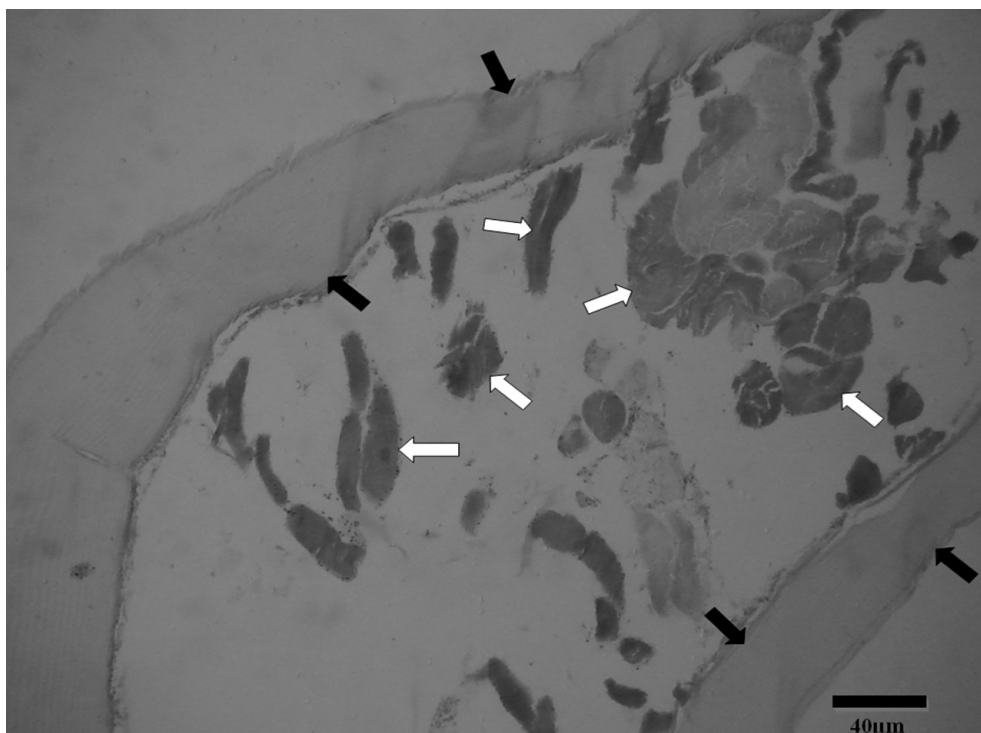


Figura 4: Apêndice Locomotor corado com HE, considerado inadequado para o estudo (Setas brancas indicam o tecido muscular, setas pretas indicam a camada de quitina ambos bem preservados). Barra de escala = 40µm

Os resultados obtidos e suas interações foram analisados estatisticamente através do teste Chi-Quadrado no programa Statistix® 8.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da análise das lâminas histológicas do apêndice locomotor de *Neohelice granulata* mostram que fixadores,

fixador/descalcificador e soluções descalcificadoras obtiveram a mesma eficácia na preservação da integridade celular, não havendo diferença ( $P>0,05$ ) estatística entre os diferentes tratamentos. Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 demonstram não existir diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre estes tratamentos tanto na avaliação feita pelo professor da área de histologia quanto na avaliação feita pelo monitor.

Tabela 1. Percentagem de lâminas histológicas avaliadas positivamente pelo monitor, sendo levado em consideração à integridade estrutural do músculo, quitina e qualidade da coloração em relação à fixadores e descalcificadores (nº de lâminas de boa qualidade/ nº total de lâminas)

Fixador/Descalcificador	Músculo	Quitina	Coloração
Davidson/Davidson	16,7% (8/48)	35,4% (17/48)	20,8% (10/48)
Formol/Ac Nítrico	22,9% (11/48)	45,8% (22/48)	27,1% (13/48)
Formol/Ac Fórmico	16,7% (8/48)	47,9% (23/48)	22,9% (11/48)
Zenker/Ac Nítrico	14,6% (7/48)	37,5% (18/48)	27,1% (13/48)
Zenker/Ac Fórmico	20,8% (10/48)	50,0% (24/48)	20,8% (10/48)

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) estatística, na mesma coluna, dentre os tratamentos

Tabela 2. Percentagem de lâminas histológicas avaliadas positivamente pelo professor levando em consideração integridade estrutural do músculo, quitina e qualidade da coloração em relação aos fixadores e descalcificadores (nº de lâminas de boa qualidade/ nº total de lâminas)

Fixador/Descalcificador	Músculo	Quitina	Coloração
Davidson/Davidson	37,5% (18/48)	56,2% (27/48)	10,4% (5/48)
Formol/Ac Nítrico	39,5% (19/48)	77,0% (37/48)	16,6% (8/48)
Formol/Ac Fórmico	35,4% (17/48)	70,8% (34/48)	20,8% (10/48)
Zenker/Ac Nítrico	50,0% (24/48)	64,5% (31/48)	12,5% (6/48)
Zenker/Ac Fórmico	45,8% (22/48)	72,9% (35/48)	14,5% (7/48)

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) estatística, na mesma coluna, dentre os tratamentos

Devido a esse resultado o fixador/descalcificador Davidson se torna indicado em relação aos fixadores formol a 10%, Zenker e soluções descalcificadoras ácido nítrico a 5% e ácido fórmico, pois, com Davidson o tempo de fixação e descalcificação foi reduzido já que as peças foram descalcificadas em um período aproximado de 48 horas. Já as peças que foram fixadas em formol a 10% e Zenker permaneceram por 24 horas nos fixadores para posterior transferência para as soluções descalcificadoras ácido nítrico a 5% e solução de citrato de sódio/ácido fórmico, permanecendo no total por um período de aproximadamente 96 horas nessas soluções.

Além disso, a utilização de Davidson diminui os

custos, pois para a preparação dessa solução é necessário apenas aldeído fórmico, álcool, ácido acético e água destilada. No entanto para preparação do Formol 10%, Zenker, ácido nítrico e citrato de sódio/ácido fórmico é necessária à utilização de vários reagentes químicos, aumentando assim os custos para o preparo das lâminas histológicas.

Dumont (2004) ao utilizar Davidson para a extração e preservação de gônada fresca do camarão *A. longinaris* caracterizou esse como sendo um líquido específico para a fixação e descalcificação de crustáceos, pois, promove a remoção do fosfato de cálcio tecidual destes animais preservando a integridade das estruturas celulares permitindo o corte do organismo.

Entretanto para tecidos que não possuem deposição de cálcio não há necessidade de descalcificação. Dessa forma o fixador Formol é adequado para estudos histológicos como sugere Sousa & Petriella (2006) que observaram o formol como sendo o fixador ideal para a preservação do trato digestivo do crustáceo decapoda *P. argentinus*. Sendo da mesma forma eficiente para preservação de ovários de *Aristaeomorpha foliacea* Risso (1826).

Segundo Kao *et al* (1999) o formol é o fixador mais adequado para a análise do trato digestivo de crustáceos, visto que consegue preservar todas as estruturas dos tecidos que compõem este sistema, sendo identificado o epitélio, o tecido conjuntivo e o tecido muscular. Para o tecido ovariano o fixador formol foi eficiente já que foram observados os diferentes estágios de maturação dos oocitos. Além do Formol o fixador Bouin é frequentemente utilizado na preservação de gônadas de *Neohelice granulata* DANA (1851) descrito por Barutot (2007). Nesta análise foram identificados os diferentes estágios de maturação das gônadas sendo estes considerados

imaturos, rudimentares, em desenvolvimento e desenvolvidos.

O fixador Bouin também é utilizado na fixação de hepatopâncreas da mesma espécie de crustáceo decápode descrito por Robaldo *et al* (1999), além da fixação das brânquias dessa mesma espécie de crustáceo analisado por Genovese *et al* (2000).

No presente estudo a preservação das estruturas celulares não faz referência à derme e epiderme já que essas foram deterioradas em todos os tratamentos não podendo ser identificadas nos cortes. Provavelmente esse fato deve-se a descalcificação, já que essa é extremamente agressiva devida sua natureza ácida. Com isso foi perdida a parte logo abaixo da quitina que consiste na pele do crustáceo.

Apesar de ter sido descrito por Dumont (2004) que o fixador/ descalcificador Davidson permite apenas a coloração pelo corante Hematoxilina e Eosina (HE), ao analisar os resultados da tabela 3 percebe-se que não houve diferença estatística entre as colunas nos diferentes tratamentos.

Tabela 3. Percentagem de lâminas histológicas avaliadas positivamente sendo consideradas as interações de fixadores/descalcificadores com corantes (número de lâminas de boa qualidade/ número total de lâminas)

Fixador/Descalcificador	HE	Gomori	Mallory
Davidson/Davidson	12,5% (2/16)	0% (0/16)	18,7%(3/16)
Formol/Ac Nítrico	18,7% (3/16)	6,25% (1/16)	25,0% (4/16)
Formol/Ac Fórmico	37,5% (6/16)	6,25% (1/16)	18,7% (3/16)
Zenker/Ac Nítrico	12,5% (2/16)	6,25% (1/16)	18,7% (3/16)
Zenker/Ac Fórmico	25,0% (4/16)	0% (0/16)	18,7% (3/16)

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) estatística, na mesma coluna, dentre os tratamentos.

Esses resultados sugerem o uso da solução Davidson como fixador e descalcificador não interferindo na qualidade da coloração das lâminas e tampouco interferindo na utilização da técnica Tricrômico de Mallory. Porém quanto ao corante Tricrômico de Gomori foi observada uma perda da qualidade das lâminas histológicas quando os cortes foram submetidos ao tratamento com o fixador Davidson, mas esse dado não significa que existe uma interação negativa do fixador e descalcificador Davidson com esse corante, já que foram obtidos resultados negativos, quanto à qualidade das lâminas histológicas, em todos os tratamentos. Sendo assim,

este fato pode ser devido a algum problema ocorrido durante a técnica de coloração com Tricrômico de Gomori.

Na tabela 4 é evidenciada a ação dos corantes, sendo verificado que a técnica Tricrômico de Gomori (TG) apresenta-se inferior quando comparada a Hematoxilina e Eosina (HE) e ao Tricrômico de Mallory (TM). Dentre as três técnicas de coloração utilizadas nas análises realizadas conclui-se que os corantes mais indicados são a Hematoxilina e Eosina, devido à facilidade, baixo custo, e a qualidade não diferir da técnica Tricrômico de Mallory.

Tabela 4: Percentagem de lâminas histológicas avaliadas positivamente sendo considerado a qualidade da coloração. (número de lâminas de boa qualidade/ número total de lâminas)

Corantes	Porcentagem de lâminas de boa qualidade
Hematoxilina/Eosina	21,2% <sup>a</sup> (17/80)
Tricrômico de Mallory	20,0% <sup>a</sup> (16/80)
Tricrômico de Gomori	3,75% <sup>b</sup> (3/80)

Letras minúsculas, na mesma coluna, diferem (P<0,05) estatisticamente.

A Hematoxilina cora, preferencialmente, os componentes ácidos das células em um tom azul escuro, sendo estes componentes chamados de basófilos. A Eosina, ao contrário, é um ácido que cora as estruturas básicas das células em rosa ou avermelhado, dependendo da quantidade de proteína encontrada na célula, sendo que estas estruturas são abundantes no citoplasma e são chamadas de acidófilas (Gartener & Hiatt, 1999).

Mesmo que algumas lâminas não apresentem ótima qualidade como seria esperado, é possível observar e distinguir várias estruturas celulares dos apêndices locomotores. Entretanto, a quitina preservou melhor suas características morfológicas, durante o processo de fixação, quando comparada ao tecido muscular. Isto ocorre devido a quitina conter depósito de fosfato de cálcio, mantendo-a mais rígida e resistente.

## CONCLUSÃO

Por não apresentar diferenças estatísticas significativas (P>0,05) entre os tratamentos no que se refere à preservação da integridade das estruturas celulares, sugere-se a utilização de Davidson tendo em vista sua facilidade de manuseio e os baixos custos.

Com relação aos corantes observou-se que não houve diferença (P>0,05) entre os corantes Hematoxilina Eosina e a técnica Tricrômico de Mallory, entretanto, estes foram superiores (P<0,05) à técnica Tricrômico de Gomori. Sendo o HE o mais indicado devido ao preço e facilidade da técnica para o estudo histológico com apêndice locomotor de *Neohelice granulata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUTOT, R. A. 2007. Biologia e Dinâmica Populacional do Caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, DANA, 1851 (Crustácea, Decapoda, Varunidae): Em dois marismas no Estuário da Lagoa dos Patos. 130p., **Tese de Doutorado**. Oceanografia biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.
- DANA, J.D. (1851): Conspectus crustaceorum quae in orbis terrarum circumnavigatione CAROLO WILKES e classe Republicae Foederatae duce lexit et deeripsit. – **Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.**, 5: 247-254, 267-272.
- D'INCAO, F., G.K. SILVA, M.L. RUFFIN, A.C. BRAGA. 1990. Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Revista Atlântica**, Rio Grande, 12(285-293).
- DUMONT, L.F.C. 2004. Análise da população de *Artemesia longinaris* BATE, 1888 (Dendrobranchiata, Penaeidae) no litoral do Rio Grande do Sul 190 páginas. **Tese de Doutorado**. Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.
- FONSECA, D.B., C.K. PARISE, R.A. BARUTOT, F. D'INCAO, 2005. Ocorrência de lipofuscin age pigment in *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Varunidae). **Nauplius** 13(2): 175-18.
- FURTADO, M.C., C.A. BESSA, M.N. CASTANÓN. 2004. Ovoteste de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae): histologia e produção de gametas **Revista Brasileira de Zociências**, 6(1): 7-17.
- GARTNER, L. P. & J. L. HIATT, 1999. Tratado de histologia. 1ª edição, 234 páginas Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- GENOVESE, G., C.M. LUQUET, D.A. PAZ, G.A. ROSA, & G.N. PELLERANO .2000 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.
- GONZALEZ, V.C. 2006. Influência da radiação infravermelha nos processos de regeneração e muda de *chasmagnathus granulatus* dana, 1851 (grapsidae, sesarminae). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 36 páginas **Tese Mestrado**. Fisiologia Animal Comparada.
- HALPERIN, J., M. ANSALDO, G.N. PELLERANO & C.M. LUQUET. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* DANA, 1851- Physiological and morphological studies. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A** 126: 341-349.
- LÓPEZ, G.L., M. SANCHEZ, G. NICOLOSO, D. MEDESANI & E. RODRÍGUEZ. 2001. Toxicity of Cadmium and Cooper on Larval and Juvenile stages of the estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). **Environmental Contamination and Toxicology**. 41: 333-338
- LUQUET, C.M., G.A. ROSA, C.C. FERRARI, G. GENOVESE & G.N. PELLERANO. 1998 Gill Morphology of the intertidal Estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* DANA, 1851 (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habitats. **Crustacea**. 15(1): 230-241.
- MELO, G.A.S. 1996. **Manual de Identificação dos Brachyuras (Caranguejos e Siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Ed. Plêiade, FAPESP, 604p.



- MONSERAT, J. & A. BIANCHINI. 1995. Effects of temperature and salinity on the toxicity of a commercial formulation of methyl parathion to *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Braz. Journ. Med. and Biol. Res.**, 28:74-78.
- MONSERAT, J.M, A. BIANCHINI & M. REBELO 1997. Toxicity and anticholinesterase. Effect of Formulated methyl parathion to the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) pre-exposed to sesaol. **Comp. Biochem. Physiol.** 118C (3): 329-334.
- NERY, L.E. M & E.A. SANTOS. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** 106B(3): 747-753.
- RIEGER, P. J. & A. L. F.SANTOS, 2001. Desenvolvimento larval de *Chasmagnathus granulatus* DANA, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae), em laboratório. I. Estudo da morfologia de cerdas nas fases de zoea e megalopa e das variações dos padrões corporais da fase de megalopa. **Revista Brasileira de Zoologia.** 18(4): 1281-1317.
- RIEGER, P. J. & A. L. F. SANTOS. 2003. Morfologia e Distribuição Topográfica das Cerdas Durante o Desenvolvimento Juvenil de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) em Laboratório. **Comun. Museu de Ciências Tecnológicas, PUC, RS, Sér. Zool.**, 16(2): 175-198.
- ROBALDO, R.B, J. MONSERAT, J.C.B. COUSIN & A. BIANCHINI. 1999. Effects of metacercariae (Digenea: Microphallidae) on the hepatopancreas of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae). **Dis. Aquat. Org.** 37: 153-157
- RUPPERT, E. & R. BARNES, 2005. **Zoologia do Invertebrados: Uma abordagem funcional e evolutiva**, 7ªed. Editora Roca, São Paulo, SP. 1168 páginas.
- TOLOSA, C.M.E., J.C. RODRIGUES, A.O. BEHMER & F.G.A. NETO. 2003. **Manual de Técnicas para Histologia e Patologia**. 2ª.ed. Editora Manole, Barueri, São Paulo. 341 p.
- SANTOS, S, P.J. RIEGER, R.R.R. VIEIRA & R.A. BARUTOT. 2000. Composição e distribuição dos Crustáceos (Decapoda) na Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia.** 17(1): 213-223.
- SOUSA, L. & A.M. PETRIELLA. 2006. Morphology and histology of *P. argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. **BIOCELL.** 30(2): 287-294.
- SCHMIDT – NIELSEN, K. 1996. **Fisiologia Animal Comparada: Adaptação e Meio Ambiente**. 5ªed. Editora Santos, SP, 564 páginas.
- KAO, H.C., T.Y. CHAN & H.P. YU. 1999. Ovary Development of the Deep-water Shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Crustacea: Decapoda: Aristeidae) from Taiwan. **Zoological Studies.** 38(4): 373-378.

Recebido: 08/09/2008

Aceito: 05/06/2009

