

# ASOCIACIONES HOSPEDADOR-PARÁSITO EN CRUSTÁCEOS NATIVOS VERSUS INVASORES EN EL LITORAL PATAGÓNICO



LIC. ANTONELLA CECILIA FRIZZERA

Directoras de tesis: Dras. Nuria Natalia Vázquez y Florencia  
Cremonte

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud  
Departamento de Biología General



## **Asociaciones hospedador-parásito en crustáceos nativos versus invasores en el litoral patagónico**

Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias Biológicas

**Lic. Antonella Cecilia Frizzera**

Directoras: Dras. Nuria Natalia Vázquez y Florencia Cremonte

Lugar de trabajo: Instituto de Biología de Organismos Marinos,  
CCT CONICET - Centro Nacional Patagónico  
2024

*A mi familia,  
en especial a mi hijita Evaluna y a Pori*

## Agradecimientos

Primero que nada, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis directoras, las Dras. Florencia Cremonte y Nuria Vázquez, por su invaluable guía, apoyo constante y valiosos consejos a lo largo de todo este proceso. Agradezco sinceramente su comprensión y acompañamiento en cada momento, tanto personal como profesional. ¡Gracias por hacer de este doctorado una experiencia hermosa e inolvidable!

A Flor, quiero agradecerle especialmente por su disposición a estar presente siempre que la necesité. Por dedicar incontables horas a mi lado, estudiando juntas, donde no solo me enseñó con dedicación y pasión por la investigación, sino que también me contagió su entusiasmo, incluso cuando el agotamiento parecía vencer. Su compromiso y su entrega en esta tesis, como si fuera su propia obra, fue inspirador para mí!

A Nuria, su generosidad y ánimo constante me impulsaron a seguir adelante en momentos desafiantes. Agradezco enormemente su confianza en mí para llevar a cabo esta investigación. Su paciencia infinita en la enseñanza, su atención a cada detalle y su constante acompañamiento han sido fundamentales. ¡Gracias por las experiencias compartidas y las hermosas conexiones que hemos creado juntas!

También quiero agradecer a todo el equipo del LAPA: Flor, Carmen, Nuri, Caro, Gus, Emi, por su constante apoyo y colaboración. Siempre estuvieron ahí cuando necesitaba una mano, ya fuera en el campo durante las campañas o en el laboratorio.

En especial a Carmen Gilardoni, quien me brindó una experiencia inolvidable durante la mejor campaña de todas a lo largo de la costa patagónica. Su generosidad al compartir su conocimiento y experiencia, así como su ayuda en los análisis estadísticos a pesar de la distancia, fueron esenciales para el desarrollo de mi investigación. Agradezco sinceramente todo lo que aprendí a su lado y por haber contribuido de manera significativa a este proyecto.

Al Dr. Jamie Bojko, quiero agradecerle por su disposición para colaborar en esta investigación, tanto en la realización de los análisis moleculares como en compartir sus conocimientos y sabiduría, a pesar de las distancias. Su buena predisposición ha sido invaluable y ha contribuido significativamente al avance de este proyecto.

Gracias a la EDUCACIÓN PÚBLICA y al país que la hace posible, por brindarme la formación que me ha convertido en la profesional que soy hoy en día. Especialmente, deseo reconocer a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, una

institución que llevo en mi corazón con mucho cariño por haberme brindado una educación de calidad. Además, quiero agradecer especialmente a Gabriel Casal, cuya disposición y diligencia fueron clave para agilizar los trámites y permitir la entrega de esta tesis.

A la Agencia Nacional para la Promoción de Ciencia y Técnica (PICT 2016/0653) por su crucial apoyo financiero. Por el otorgamiento de la beca que cubrió los primeros tres años de mi investigación

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por confiar en mí y permitirme dar mis primeros pasos en este apasionante camino de la investigación. Al CENPAT y al IBIOMAR, les estoy profundamente agradecida por brindarme el espacio necesario para desarrollar mi tesis.

A los CPA que contribuyeron de diversas maneras, como Bebo y Néstor, les agradezco su disposición constante durante las campañas y por transmitir una energía positiva que fue contagiosa. A María Eugenia por su amabilidad, ayuda en el procesamiento de las muestras y estar siempre dispuesta.

A Marce y Norbert del laboratorio de histología y sala de óptica, quienes mostraron una excelente disposición y dedicación para enseñarme y procesar los numerosos preparados histológicos y de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Al Dr. Nicolás Battini por brindarme cangrejos de sus muestreos y unas hermosas fotografías que enriquecieron esta tesis.

A la Dra. Evangelina Schwindt, por su buena disposición para abordar mis preguntas sobre la invasión del cangrejo.

A la Dra. Ximena Pissani por su amabilidad y disposición para resolver mis dudas en la anatomía y biología de los cangrejos.

A la Dra. Laura López Greco, por transmitirme su pasión por los cangrejos en mis primeros años del doctorado y por su dedicación al enseñarme todo lo que estuvo a su alcance.

A la Dra. Pitu Méndez, por proporcionarme cangrejos de sus muestreos y compartir sus investigaciones sobre el cangrejo verde en Patagonia.

A Maga, Pachi y Ralph, les agradezco su valioso asesoramiento y disposición para colaborar en la parte estadística de esta tesis.

A Miri, por ayudarme a realizar los mapas.

A todos los que me ayudaron en la recolección de cangrejos en las playas con la mejor predisposición; Flor, Nuri, Ema, Pori, Mariu, Carmen, Emi, Gus, Pachi, Benja (siempre en mi corazón), Feli, Mateo, mi mamá, y mi compañera perruna Inca, que muchas veces me acompañó en esas largas caminatas.

Este último año ha sido todo un desafío. Escribir la tesis habría sido imposible sin el apoyo incondicional de mi equipo favorito: mi hija Evaluna y mi gran compañero Pori, quienes estuvieron a mi lado mañana, tarde y noche, apoyándome y aguantando cada uno de mis estados de ánimo. Agradezco profundamente su constante respaldo, por nunca permitirme caer y por la enorme paciencia que han tenido conmigo durante todo este tiempo. Esta tesis también es parte de sus esfuerzos. ¡Los amo!

A mis padres, por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa, a ser paciente y perseverante, por haberme dado la oportunidad de elegir y estudiar esta profesión que amo. Por todo su apoyo incondicional. A mi mamá por tomarse el tiempo de leer y corregir la gramática de esta tesis. ¡Los amo!

A mis abuelos y mi querido tío, por siempre mandarme todo su amor y cariño. Por abrazarme a la distancia, y por alivianarme el peso que esta tesis traía consigo. ¡Los adoro infinito!

A mis hermanos que a pesar de la distancia de alguna u otra manera se hacen presentes. A Gastón, por cuidar Evaluna las veces que necesitaba.

A Flor, mi amiga y confidente, mi hermana de la vida. Quiero agradecerte por tu apoyo incondicional, por enseñarme a ver el vaso medio lleno en lugar de medio vacío, por esos momentos de mates reconfortantes en el CENPAT cuando mi mente se bloqueaba, por los viajes compartidos, las charlas profundas y por compartir la misma pasión por la ciencia. Tu presencia ha sido un alivio en cada desafío y un motivo de alegría en cada logro. Gracias por ser parte tan significativa de mi vida.

A mis amigas incondicionales, mi tribu, Lourdes, Miri, Shasa, Mari, y Flor ¿qué haría sin ustedes? Gracias por su constante acompañamiento a lo largo de este tiempo, por escucharme cuando más lo necesitaba, por esas charlas que nos reconfortan y por asegurarme que nunca me dejarán caer, que no estoy sola en este camino. Las adoro con todo mi corazón. Y a las que están lejos, las extraño mucho.

A mis amigas que están en otro continente, Barbi y Lali. A pesar de la distancia física, siempre están presentes, brindándome su apoyo en cada momento importante.

A mi querida amiga Pachi, agradezco nuestro mutuo acompañamiento durante esta última etapa de nuestras respectivas tesis. Tu constante presencia y disposición para ayudarme cuando lo necesito significa mucho para mí. ¡Te quiero!

A Miri, Rafi, Fran y Lucas, así como a Lourdes, Lau y Lean., les agradezco profundamente por su acompañamiento incondicional y por cuidar de Evi, permitiéndome avanzar con la tesis. ¡Los quiero mucho!

A mis amigas de la infancia, Marianita y Agus. a pesar de la distancia, siempre están ahí con algún mensaje o llamada, alentándome a seguir adelante y no bajar los brazos. ¡Las adoro!

A mis compas de baile, las Fortineras, por ser fuente de ánimo durante nuestros ensayos. Sus buenas energías y comprensión en mis momentos de cansancio han sido fundamentales para mantenerme motivada. Gracias por ser mucho más que un equipo, por ser mi familia en este viaje. ¡Viva el folclore y viva nuestra amistad!

¡GRACIAS A TODOS Y TODAS!!

## **Contribuciones de autores por capítulo**

### CAPÍTULO I y II

Referencia de publicación: Frizzera, A., Bojko, J., Cremonte, F., & Vázquez, N. (2021). Symbionts of invasive and native crabs, in Argentina: The most recently invaded area on the Southwestern Atlantic coastline. *Journal of Invertebrate Pathology*, 184, 107650.

**Frizzera A.:** diseño experimental, recolección de animales, histología y redacción.

**J. Bojko:** diagnóstico molecular, filogenética, diseño de diagramas y redacción.

**Cremonte F.:** supervisora, diseño experimental y redacción.

**Vázquez N.:** supervisora, diseño experimental y redacción.

### CAPÍTULO III

Referencia de publicación: Mariluan, G., Frizzera, A., Davies, C., Gestal, C., Van der Molen, S., Ortíz, N., Vázquez, N., & Cremonte, F. (en preparación). Life cycle of the apicomplexan *Aggregata valdessensis* parasitizing *Octopus tehuelchus* and transmission paths on the Patagonian coast, SW Atlantic.

**Mariluan G.:** diseño experimental, recolección de animales, infecciones experimentales y redacción.

**Frizzera A.:** diseño experimental, recolección de animales, infecciones experimentales histología y redacción.

**Davies C.:** análisis moleculares, filogenética, diseño de diagramas.

**Gestal C.:** análisis moleculares, filogenética, diseño de diagramas

**Van der Molen S:** recolección de animales y diseño de diagramas.

**Ortíz N.:** diseño experimental, recolección de animales.

**Vázquez N.:** diseño experimental, histología y redacción.

**Cremonte F.:** supervisora, diseño experimental y redacción.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos .....	iii
Contribuciones de autores por capítulo .....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS.....	10
METODOLOGÍA GENERAL.....	11
Sitios de estudio .....	11
Muestreo y toma de datos.....	14
Procesamiento de los especímenes.....	16
Identificación de los taxa parásitos o de los agentes etiológicos .....	18
Caracterización cuantitativa de las poblaciones y comunidades parásitas.....	19
Análisis de datos.....	20
CAPÍTULO I.....	21
El cangrejo verde y sus simbioses en la Patagonia.....	21
Introducción.....	22
Objetivos .....	27
Materiales y métodos.....	27
Muestreo, procesamiento y examinación de macrosimbioses.....	27
Procesamiento histológico .....	28
Extracción de hemolinfa para detectar esporas de microsporidios.....	28
Análisis moleculares y filogenéticos .....	29

Análisis estadísticos.....	29
<b>Resultados.....</b>	<b>30</b>
Datos morfométricos.....	30
Simbiontes.....	32
Análisis estadísticos.....	43
Análisis moleculares y filogenéticos .....	40
<b>Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>57</b>
<b>Simbiontes de los cangrejos nativos: <i>Cyrtograpsus altimanus</i>, <i>Cy. angulatus</i> y <i>Ovalipes trimaculatus</i> en el litoral patagónico .....</b>	<b>57</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>58</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>62</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>63</b>
Muestreo, procesamiento y examinación de macrosimbiontes.....	63
Procesamiento histológico .....	63
Observación al microscopio electrónico de barrido (MEB).....	63
<b>Resultados.....</b>	<b>63</b>
Datos morfométricos de los hospedadores.....	63
Prevalencias de simbiontes.....	65
Histopatología e índices parasitarios.....	66
Análisis estadísticos.....	79
<b>Discusión.....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>90</b>
<b>Ciclo de vida del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> que parasita a <i>Octopus tehuelchus</i> y crustáceos en la costa patagónica.....</b>	<b>90</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>91</b>
<b>Objetivo .....</b>	<b>94</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>94</b>

Muestreo de pulpos y crustáceos .....	94
Examinación macroscópica y procesamiento histológico.....	95
Observación al microscopio electrónico de barrido y de transmisión.....	96
Hospedadores intermediarios y vías de transmisión.....	96
<b>Resultados.....</b>	<b>98</b>
Redescripción de <i>Aggregata valdessensis</i> en <i>Octopus tehuelchus</i> .....	98
Descripción de la etapa de merogonia en cangrejos.....	99
Vías de Transmisión .....	102
Ciclo de vida propuesto para <i>Aggregata valdessensis</i> .....	103
<b>Discusión .....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>110</b>
<b>Interacciones hospedador-parásito en la invasión del cangrejo verde y sus implicancias en los cangrejos nativos de la costa patagónica.....</b>	<b>110</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>111</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>116</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>116</b>
Composición de las comunidades de simbioses.....	116
Análisis estadísticos de los parámetros de infección y riqueza de simbioses.....	116
Infecciones experimentales .....	117
Análisis estadísticos de los experimentos.....	119
<b>Resultados.....</b>	<b>119</b>
Composición de las comunidades de simbioses.....	119
Análisis estadísticos.....	120
Infecciones experimentales .....	121
<b>Discusión .....</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES GENERALES.....</b>	<b>133</b>
<b>Apéndice I.....</b>	<b>138</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución mundial del cangrejo verde <i>Carcinus maenas</i> (Linnaeus 1758) en su área de origen (verde) y áreas invadidas (rojo).....	6
<b>Figura 2.</b> Sitios de muestreo de cangrejos verdes invasores y nativos en la costa del Atlántico Sudoeste.....	12
<b>Figura 3.</b> Sitios de colecta en Puerto Madryn. a) Playa Kaiser. b) Playa Cerro Avanzado. ....	13
<b>Figura 4.</b> Sitio de colecta, playa Caleta Mejillón, Bahía Camarones.....	14
<b>Figura 5.</b> Colecta de cangrejos de forma manual durante la bajamar.....	15
<b>Figura 6.</b> Cassetes A y B rotulados con una porción de cada órgano de los cangrejos para ser procesados mediante histología clásica .....	18
<b>Figura 7.</b> Extracción de hemolinfa de la membrana no esclerotizada de las patas caminadoras.....	29
<b>Figura 8.</b> Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. con patología tipo viral. ....	33
<b>Figura 9.</b> Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. infectado con microorganismos procarióticos .....	34
<b>Figura 10.</b> Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. con infecciones similares a <i>Haplosporidium</i> sp.....	36
<b>Figura 11.</b> Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. infectadas con parásitos similares a <i>Mikrocytos</i> sp.....	37
<b>Figura 12.</b> Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. infectados por el microsporidio <i>Agmasoma carcini</i> .....	38
<b>Figura 13.</b> Sección histológica (H&E) de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. que muestra el gusano similar a <i>Carcinonemertes</i> sp.....	39
<b>Figura 14.</b> Esporas de microsporidio (flecha) en la hemolinfa de cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp.....	40

<b>Figura 15.</b> Análisis de máxima verosimilitud de la secuencia de microsporidios disponibles en GenBank, donde el nuevo aislado ( <i>Agmasoma carcini</i> ) se agrupa en el caldo IV, dentro del grupo <i>Agmasoma</i> y muy cercano a <i>Agmasoma penaei</i> .....	43
<b>Figura 16.</b> Gráficos de línea que muestra las probabilidades estimadas de ocurrencia de ciliados en el cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. en Bahía Camarones, para cada estación, desglosadas por sexo.....	45
<b>Figura 17.</b> Probabilidades de ciliados entre los sitios 'BC' (Bahía Camarones) y 'PM' (Puerto Madryn).....	46
<b>Figura 18.</b> Gráficos de línea que muestra las probabilidades estimadas de ocurrencia de <i>Haplosporidium</i> sp. en el cangrejo verde <i>Carcinus</i> spp. en Puerto Madryn, para cada estación, desglosadas por sexo.....	47
<b>Figura 19.</b> Ciclo de vida del trematode <i>Maritrema madrynense</i> .....	61
<b>Figura 20.</b> Ciclo de vida del acantocéfalo <i>Profilicollis chasmagnathi</i> .....	62
<b>Figura 21.</b> Larva cistacanta del acantocéfalo <i>Profilicollis chasmagnathi</i> observadas al microscopio electrónico de barrido en el cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i>	66
<b>Figura 22.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> .....	67
<b>Figura 23.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> con infección similar a <i>Haplosporidium</i> sp.....	69
<b>Figura 24.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> infectado con estados merogónicos del apicomplejo <i>Aggregata valdessaensis</i> .....	70
<b>Figura 25.</b> Sección histológica (H&E) del cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> . Acantocéfalo, <i>Profilicollis chasmagnathi</i> , en la periferia del intestino medio. ....	71
<b>Figura 26.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus angulatus</i> .....	72
<b>Figura 27.</b> Secciones histológicas (H&E) de <i>Cyrtograpsus angulatus</i> infectadas con un organismo similar a <i>Haplosporidium</i> sp.....	73
<b>Figura 28.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador <i>Ovalipes trimaculatus</i> con una infección similar a virus.....	74

<b>Figura 29.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador <i>Ovalipes trimaculatus</i> infectado por microorganismos procarióticos .....	76
<b>Figura 30.</b> Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador <i>Ovalipes trimaculatus</i> infectadas con células similares a levaduras .....	77
<b>Figura 31.</b> Sección histológica (H&E) del cangrejo nadador <i>Ovalipes trimaculatus</i> donde se observan protistas ciliados .....	78
<b>Figura 32.</b> Sección histológica (H&E) del cangrejo nadador <i>Ovalipes trimaculatus</i> infectado con nemertino similar a <i>Carcinonemertes</i> sp.....	79
<b>Figura 33.</b> Sitios de muestreo de los pulpos y de los crustáceos decápodos en la costa del Atlántico Sudoeste.....	95
<b>Figura 34.</b> Esporoquistes del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> observados mediante microscopía electrónica de barrido en el pulpito <i>Octopus tehuelchus</i> .....	98
<b>Figura 35.</b> Secciones del esporoblasto tardío del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> en el intestino del pulpito <i>Octopus tehuelchus</i> .....	99
<b>Figura 36.</b> Observación de in vivo de frotis del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> al microscopio óptico.....	101
<b>Figura 37.</b> Ultraestructura de los merozoítos del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> del cangrejo nativos <i>Cyrtograpsus altimanus</i> observada mediante microscopía electrónica de transmisión.....	102
<b>Figura 38.</b> Ciclo de vida del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> en el Atlántico Sudoeste.....	104
<b>Figura 39.</b> Diagrama conceptual de los efectos “spillback” y “spillover”, tomando como ejemplo a los cangrejos verdes invasores <i>Carcinus</i> spp. y a los cangrejos nativos <i>Cyrtograpsus</i> spp .....	113
<b>Figura 40.</b> Representación gráfica del experimento de exposición a cercarias.....	118
<b>Figura 41.</b> Diagramas de caja de los experimentos de exposición a cercarias (superior) y de cohabitación.....	122

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ejemplares por especie de cangrejo colectados en los diferentes sitios y número de cangrejos analizados con la técnica correspondiente.....	16
<b>Tabla 2.</b> Técnicas utilizadas para la identificación de los simbioses en <i>Carcinus</i> spp. en los diferentes sitios de muestreo.....	28
<b>Tabla 3.</b> Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media (entre paréntesis) de los simbioses registrados en <i>Carcinus</i> spp., recolectados estacionalmente en Puerto Madryn, Bahía Camarones y Puerto Deseado, costa del Atlántico Sudoeste.....	32
<b>Tabla 4.</b> Resultados del microbioma obtenido por metagenómica.....	41
<b>Tabla 5.</b> Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media, entre paréntesis, de los simbioses registrados en los cangrejos nativos <i>Cyrtograpsus altimanus</i> , <i>Cyrtograpsus angulatus</i> y <i>Ovalipes trimaculatus</i> recolectados estacionalmente en Puerto Madryn, costa del Atlántico Sudoeste.....	64
<b>Tabla 6.</b> Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media entre paréntesis de los simbioses registrados en el cangrejo nativo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> , recolectados en primavera y otoño en Bahía Camarones, costa del Atlántico sudoeste.....	65
<b>Tabla 7.</b> Especies del género <i>Aggregata</i> registradas en hospedadores definitivos e intermediarios, características y medidas de esporoquistes y esporozoítos y localidades. .....	93
<b>Tabla 8.</b> Prevalencia (%) del apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i> registrada en el cangrejo <i>Cyrtograpsus altimanus</i> en los diferentes tamaños examinados en la playa Santa Isabel, Patagonia, Atlántico sudoeste.....	100
<b>Tabla 9.</b> Datos coproparasitológicos obtenidos de tres ejemplares del pulpito <i>Octopus tehuelchus</i> .....	103
<b>Tabla 10.</b> Número de especímenes hallados de cada simbiote/número de especímenes de cangrejos examinados y riqueza de macrosimbioses y microsimbioses en el cangrejo	

verde invasor y en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus altimanus*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Ovalipes trimaculatus*..... 120

## RESUMEN

Cuando una especie invasora coloniza un área y adquiere los parásitos nativos, aumentando su propagación y transmitiéndolos a las especies nativas, se produce un fenómeno conocido como "efecto spillback". Por otro lado, cuando los parásitos introducidos junto con una especie invasora cambian de hospedador y afectan a las especies nativas, se da lugar a lo que se conoce como "efecto spillover". En este sentido, el objetivo de esta tesis fue estudiar los simbioses de los cangrejos verdes invasores *Carcinus* spp. (*Carcinus maenas* y su especie hermana *Ca. aestuarii*, morfológicamente muy similares), que han invadido recientemente las costas patagónicas, y de los cangrejos nativos *Cyrtograpsus altimanus*, *Cy. angulatus* y *Ovalipes trimaculatus*, a fin de determinar si han ocurrido los efectos "spillback" y/o "spillover". Se llevaron a cabo muestreos estacionales entre el 2018 y el 2019 en la costa de Puerto Madryn, donde se recolectaron un total de 870 ejemplares de *Carcinus* spp., 120 de *Cy. altimanus*, 83 de *Cy. angulatus* y 110 de *O. trimaculatus*. Adicionalmente, en la costa de Bahía Camarones se efectuaron muestreos en primavera del 2018 y otoño del 2019, obteniendo un total de 60 especímenes de *Carcinus* spp. y 26 de *Cy. altimanus*. De cada espécimen se registró el ancho máximo de caparazón y el sexo; se diseccionaron y observaron bajo lupa en busca de macroparásitos. Se fijaron los órganos en Davidson (corazón, gónada, músculo, intestino, hepatopáncreas, branquias) de 30 ejemplares de cada especie por estación, y mediante histología se obtuvieron cortes que fueron examinados al microscopio óptico. Además, se llevó a cabo un único muestreo en Punta Buque (Puerto Deseado, Santa Cruz) en 2018, donde se recolectaron 10 ejemplares de *Carcinus* spp. que fueron procesados para análisis histológicos. Con el fin de identificar a los parásitos encontrados, se aplicaron diversas técnicas como análisis moleculares y microscopías electrónicas de barrido y/o de transmisión. Asimismo, se evaluó la susceptibilidad de *Carcinus* spp. a la infección por el digeneo *Maritrema madrynense* (Microphallidae), que utiliza a los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. como hospedadores intermediarios, y al apicomplejo *Aggregata valdessensis* (Aggregatidae) cuyo hospedador definitivo es el pulpo tehuelche *Octopus tehuelchus*, a través de infecciones experimentales. Con el objetivo de dilucidar el ciclo de vida de *A. valdessensis* y determinar sus hospedadores intermediarios, se examinaron diversas especies de crustáceos, posibles ítem presa de *O. tehuelchus*, recolectados en los muestreos de Puerto Madryn. Las especies

examinadas incluyeron *Peltarion spinulosum* (n=40), *Leucippa pentagona* (n=3), *Betaeus truncatus* (n=16), *Betaeus lilianae* (n=49), *Munida gregaria* (n=23) y *Exosphaeroma* spp. (n=56). En la playa Santa Isabel, donde se conoce que coexisten pulpos y cangrejos, se realizó un muestreo adicional y se recolectaron 12 ejemplares de *O. tehuelchus* para análisis coproparasitológicos, y 60 cangrejos *Cy. altimanus*, que se procesaron histológicamente. Bajo lupa, se detectaron los trematodes *M. madrynense* en los cangrejos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* con prevalencias del 16-33% y del 17-30%, respectivamente. También se registraron larvas del acantocéfalo *Proflicollis chasmagnathi* en ambos cangrejos, con prevalencias del 8-25% en *Cy. altimanus* y del 12-25% en *Cy. angulatus*. Los resultados histológicos revelaron la presencia de un nemertino similar a *Carcinonemertes* sp. con prevalencias del 3% en *Carcinus* spp. y del 4-5% en *O. trimaculatus*, y patologías similares a inclusiones virales en *Carcinus* spp. y *O. trimaculatus* con prevalencias del 7-23% y 4-10%, respectivamente. Se observaron microorganismos procarióticos en *Carcinus* spp. y en los cangrejos nativos, con prevalencias del 2-7% y entre 12-36%, respectivamente. Se hallaron también ciliados, en todas las especies de cangrejos, con prevalencias más altas en los cangrejos nativos (53%). En *O. trimaculatus*, se observaron células similares a levaduras con una prevalencia del 3-8%. Se detectaron esporas similares a *Haplosporidium* sp. en todas las especies de cangrejos, excepto en *O. trimaculatus*, con una mayor prevalencia en los cangrejos nativos (7-40%). Microcélulas similares a *Mikrocytos* sp. se observaron en un 30% de los cangrejos verdes provenientes de Puerto Deseado. Se encontró una prevalencia del 3% de microsporidios en *Carcinus* spp., y mediante técnicas de moleculares se lo identificó como *Agmasoma carcini*, lo que representa el descubrimiento de una nueva especie. Los cangrejos verdes se encontraron infectados por un mayor número de microparásitos en comparación con los cangrejos nativos. Sin embargo, las poblaciones de *Carcinus* spp. se encontraron libres de parásitos metazoos, e incluso se demostró que eran refractarios mediante infecciones experimentales, lo que indica una reducción de su carga de macroparásitos, como el digeneo *M. madrynense* y el acantocéfalo *P. chasmagnathi* en *Carcinus* spp. en comparación con los cangrejos nativos. Además, el cangrejo invasor se encontró libre de infección por el protozoo apicomplejo *A. valdensesis*, y se halló al cangrejo nativo *Cy. altimanus* y al camarón *B. lilianae* como hospedadores intermediarios en el ciclo de vida del parásito. Este hallazgo representó el primero en el Hemisferio Sur y el segundo para una especie del género

*Aggregata* en la que se logra elucidar un ciclo de vida, lo que aporta nuevos conocimientos a la comprensión de estos parásitos en la región. Es común que las especies invasoras pierdan los parásitos de su lugar de origen. Donde *Carcinus* spp. ha sido introducido hace más tiempo, se conoce que ha adquirido parásitos; en Patagonia el tiempo transcurrido desde la introducción (probablemente durante la década de 1990) no fue suficiente para que se hayan producido asociaciones hospedador-parásito. Es esencial considerar si los patógenos identificados en *Carcinus* spp. representan un riesgo para la fauna nativa y, además, evaluar el origen de estos parásitos. En el caso de que estos patógenos sean invasores, se deben llevar a cabo investigaciones adicionales para determinar si podrían generar algún impacto en las poblaciones nativas. Si se determina que el parásito es originario de la región, existe la posibilidad de que ejerza un efecto de control sobre la población invasora.

## ABSTRACT

When an introduced species is a competent host for native parasites, and the presence of a new competent host increases parasite transmission among native host, enhancing overall infection prevalence and intensity in (i.e. spilling back to) the native hosts, a phenomenon known as the "spillback effect" occurs. On the other hand, when introduced parasites associated with introduced hosts infect (i.e. spill over to) native hosts, which then field greater infection intensities than the introduced hosts, "spillover effect" occurs. In this context, the aim of this thesis was to study the symbionts of the invasive green crabs *Carcinus spp.* (*Carcinus maenas* and its closely related sister species *Ca. aestuarii*, which are morphologically very similar), which have recently invaded the Patagonian coasts, and of the native crabs *Cyrtograpsus altimanus*, *Cy. angulatus*, and *Ovalipes trimaculatus*, to determine whether "spillback" and/or "spillover" effects have occurred. Seasonal sampling was conducted between 2018 and 2019 along the coast of Puerto Madryn, where a total of 870 specimens of *Carcinus spp.*, 120 of *Cy. altimanus*, 83 of *Cy. angulatus*, and 110 of *O. trimaculatus* were collected. Additionally, in the spring of 2018 and autumn of 2019, sampling was carried out on the coast of Bahía Camarones, collecting a total of 60 specimens of *Carcinus spp.* and 26 of *Cy. altimanus*. The maximum carapace width and sex of each specimen were recorded; they were dissected and examined under a stereomicroscope for macroparasites. Organs (heart, gonad, muscle, intestine, hepatopancreas, gills) from 30 specimens of each species per season were fixed in Davidson's solution, and histological sections were obtained and examined under a light microscope. In addition, a single sampling was conducted in Punta Buque (Puerto Deseado, Santa Cruz) in 2018, where 10 specimens of *Carcinus spp.* were collected and processed for histological analysis. Various techniques such as molecular analyses and scanning and/or transmission electron microscopy were applied to identify the parasites. Experimental infections were also conducted to assess the susceptibility of *Carcinus spp.* to infection by the digenean *Maritrema madrynense* (Microphallidae) and the apicomplexan *Aggregata valdessensis* (Aggregatidae). These parasites infect the native crabs *Cyrtograpsus spp.* and the Tehuelche octopus *Octopus tehuelchus*, respectively. To elucidate the life cycle of *A. valdessensis* and determine its intermediate hosts, various species of crustaceans collected in the Puerto Madryn were examined. The species examined included *Peltarion spinulosum* (n=40), *Leucippa pentagona* (n=3), *Betaeus truncatus* (n=16), *Betaeus lilianae* (n=49), *Munida gregaria*

(n=23), and *Exosphaeroma spp.* (n=56). In Santa Isabel Beach, where octopuses and crabs are known to coexist, an additional sampling was conducted, and 12 specimens of *O. tehuelchus* were collected for coprological analysis, while 60 *Cy. altimanus* crabs were processed histologically. Under a stereomicroscope, the trematodes *M. madrynense* were detected in the crabs *Cy. altimanus* and *Cy. angulatus*, with prevalences of 16-33% and 17-30%, respectively. Larvae of the acanthocephalan *Profilicollis chasmagnathi* were also recorded in both crabs, with prevalences of 8-25% in *Cy. altimanus* and 12-25% in *C. angulatus*. Histological results revealed the presence of a nemertean similar to *Carcinonemertes sp.* with prevalences of 3% in *Carcinus spp.* and 4-5% in *O. trimaculatus*, and virus-like inclusions in *Carcinus spp.* and *O. trimaculatus* with prevalences of 7-23% and 4-10%, respectively.

Prokaryotic microorganisms were observed in *Carcinus spp.* and native crabs, with prevalences of 2-7% and 12-36%, respectively. Ciliates were also found in all crab species, with higher prevalences in native crabs (53%). In *O. trimaculatus*, yeast-like cells were observed with a prevalence of 3-8%. Spores similar to *Haplosporidium sp.* were detected in all crab species except *O. trimaculatus*, with higher prevalence in native crabs (7-40%). Microcells similar to *Mikrocytos sp.* were observed in 30% of the green crabs from Puerto Deseado. A prevalence of 3% for microsporidia was found in *Carcinus spp.*, and using molecular techniques, it was identified as *Agmasoma carcini*, representing the discovery of a new species. The green crabs were found to be infected by a greater number of microparasites compared to the native crabs. However, populations of *Carcinus spp.* were free of metazoan parasites, and even showed resistance to experimental infections, indicating a reduction in their macroparasite load, such as the digenean *M. madrynense* and the acanthocephalan *P. chasmagnathi*, in *Carcinus spp.* compared to the native crabs. Furthermore, the invasive crab was found to be free of infection by the apicomplexan protozoan *A. valdessensis*, and the native crab *Cy. altimanus* and the shrimp *B. lilianae* were identified as intermediate hosts in the parasite's life cycle. This finding represented the first in the Southern Hemisphere and the second for a species of the genus *Aggregata* in which a life cycle has been elucidated, providing new insights into the understanding of these parasites in the region. It is common for invasive species to lose the parasites from their place of origin. Where *Carcinus spp.* has been introduced longer ago, it is known to have acquired parasites; in Patagonia, the time elapsed since its introduction (likely during

the 1990s) was not sufficient for host-parasite associations to have developed. It is essential to consider whether the pathogens identified in *Carcinus spp.* pose a risk to native fauna and, additionally, to evaluate the origin of these parasites. If these pathogens are invasive, further research should be conducted to determine whether they could impact native populations. If the parasite is found to be native, there is a possibility that it could exert a controlling effect on the invasive population.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los parásitos son organismos que mantienen una relación ecológica con otro organismo, el hospedador, del cual dependen fisiológica o metabólicamente (Crofton 1971). Esta relación puede tener efectos significativos y desproporcionados en el ecosistema en el que están presentes (Budria & Candolin 2014). Pueden tener ciclos de vida simples o directos, en los que utilizan un solo hospedador, o ciclos de vida complejos o indirectos, en los que utilizan múltiples hospedadores (Rohde et al. 1982). También pueden ser específicos para su hospedador, requiriendo siempre la misma especie, o generalistas, capaces de utilizar una variedad de organismos como hospedadores potenciales (Rohde et al. 1982). Estas características determinan la magnitud de su influencia en los hospedadores y en el ecosistema. La especificidad parasitaria se vuelve especialmente relevante para las interacciones entre especies competidoras, donde una o ambas especies intervinientes pueden verse infectadas por un parásito determinado (Thomas et al. 1995).

Los parásitos desempeñan, además, un papel fundamental en la ecología de la comunidad de cualquier sistema y pueden afectar los procesos que incluyen interacciones interespecíficas, la ecología del hospedador y la estructura de la red alimentaria (Hudson & Greenman 1998; Lefèvre et al. 2009). Modifican la distribución y abundancia de sus hospedadores, lo que a su vez afecta las interacciones en niveles superiores y, en consecuencia, la dinámica general del ecosistema (Hatcher et al. 2006; Eash-Loucks et al. 2014).

Las infecciones parasitarias imponen un costo al hospedador, ya que los parásitos dependen de ellos para su supervivencia y reproducción, lo que puede manifestarse desde efectos sutiles como pérdida de la condición corporal y daño tisular, hasta consecuencias más graves como la castración o la muerte (Combes 2001; Poulin 2011). La magnitud de estos costos depende de las características, tanto del hospedador como del parásito; por ejemplo, parásitos más virulentos pueden causar una mayor reducción en la aptitud del hospedador. Los hospedadores pueden contrarrestar los efectos de las infecciones mediante mecanismos de resistencia o tolerancia, aunque éstos pueden ser costosos y conducir a compensaciones energéticas entre la defensa inmunitaria y la reproducción (Råberg et al. 2009; Martin et al. 2011). Esta carrera armamentista, entre

hospedadores (resistencia, tolerancia) y parásitos (virulencia, infectividad) es constante a lo largo de la coevolución de la relación parásito-hospedador (Thieltges et al. 2023).

Los parásitos existen en todos los sistemas; sin embargo, su papel en las invasiones marinas está relativamente inexplorado (Blakeslee et al. 2013). Cada vez se reconoce más su importancia como factor en la biología de las invasiones (Lagrange 2017). En este contexto, los parásitos cointroducidos se definen como aquellos que han sido transportados con un hospedador a una nueva localidad, fuera de su rango natural, y los parásitos coinvasores como aquellos que han sido cointroducidos y luego se han propagado a nuevos hospedadores nativos (Lymbery et al. 2014).

Las invasiones biológicas representan una preocupación para la conservación a nivel global debido a su impacto negativo en la biodiversidad, los ecosistemas, la economía y la salud humana (Pyšek et al. 2020). Los sistemas marinos costeros se encuentran entre los ecosistemas más invadidos del mundo (Goedknecht et al. 2016). A lo largo de la historia marítima, los seres humanos han desempeñado un papel fundamental en la introducción de especies en lugares nuevos y previamente inaccesibles (Carlton & Geller 1993). Las invasiones biológicas representan una importante amenaza ambiental en el Antropoceno, reconocida como uno de los cinco principales impulsores directos del cambio en la naturaleza que se ha acelerado durante los últimos 50 años (Orensanz et al. 2002; IPBES 2019; Schwindt et al. 2020). En su mayoría, son consecuencia no intencionada de actividades primarias como el comercio y el turismo, lo que provoca el transporte involuntario de especies invasoras (Lodge et al. 2006; Hulme 2015). Los principales vectores citados para estas introducciones accidentales son la acuicultura, el agua de lastre y el "fouling" de los barcos (adhesión de organismos al casco del barco) (Williams et al. 2013).

Una de las principales consecuencias de la introducción de especies invasoras es la pérdida de biodiversidad a nivel global, ya que compiten con las nativas y pueden llevarlas a la extinción. Este fenómeno representa una preocupación crítica para la conservación a nivel mundial (Pejchar & Mooney 2009; Simberloff et al. 2013). Con una globalización económica cada vez mayor, al igual que las redes comerciales y la conectividad de los ecosistemas del mundo, se espera que se intensifique la dispersión y los impactos de las especies exóticas (Seebens et al. 2016). Comprender por qué algunas

especies tienen éxito o fracasan al invadir un área nueva puede ayudar a prevenir futuras introducciones (Carlton 1996; Stachowicz et al. 1999; Chang et al. 2011).

Cuando las especies son introducidas en un ambiente nuevo, diferentes escenarios pueden alterar el funcionamiento del ecosistema (Lymbery et al. 2014, Gallardo et al. 2016), causando una multitud de impactos en la biota nativa (Davis 2009; McGeoch et al. 2010; Lockwood et al. 2013). Entre los impactos directos se encuentran, la competencia por recursos y la depredación de especies nativas (Simberloff et al. 2013). Sin embargo, las especies invasoras también pueden ejercer efectos indirectos, como, por ejemplo, alterar la dinámica hospedador-parásito, lo que puede dar lugar a enfermedades emergentes en las especies nativas (Goedknecht et al. 2017a; Chalkowski et al. 2018). La frecuencia de estos efectos se puede observar en la lista de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN) de las “100 especies invasoras más perjudiciales del mundo” (Lowe et al. 2000), donde se indica que aproximadamente una cuarta parte de las especies invasoras en la lista causan impactos ecológicos y económicos debido a enfermedades (Hatcher et al. 2012). La presencia o ausencia de parásitos en un área introducida podría tener un fuerte impacto sobre la abundancia, distribución y demografía del hospedador (Torchin et al. 2001) y afectar gravemente la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas (Roy et al. 2017). Llevar, perder o ganar parásitos puede alterar el potencial invasivo de las especies invasoras (Torchin et al. 2003; Vilcinskis 2015) y puede generar cambios en la comunidad invadida (Dunn & Hatcher 2015).

Los parásitos invasores se han asociado con una disminución en el estado sanitario de la vida silvestre, y varios de estos ejemplos se han vinculado explícitamente con una pérdida de biodiversidad nativa (Roy et al. 2017); sin embargo, alternativamente pueden tener el potencial de controlar la población invasora a través del control biológico (Messing & Wright 2006). Un concepto particularmente importante es el de “competencia aparente”, en el cual un parásito afecta la aptitud de una especie en mayor grado que a otra (Hatcher et al. 2006; Lefèvre et al. 2009). Esta discrepancia en el impacto de la infección también puede conducir a un incremento en la biodiversidad, ya que las especies que normalmente podrían ser desplazadas por la competencia directa pueden persistir debido a la competencia aparente (Lefèvre et al. 2009).

Las especies invasoras pueden albergar parásitos que provienen de tres posibles procedencias: (I) el área de origen de la especie invasora, (II) una ubicación intermedia entre el área de origen de la especie invasora y su ubicación actual, y (III) la ubicación donde la especie invasora se establece (Chalkowski et al. 2018). Es relevante comprender cómo los parásitos afectan las interacciones entre especies nativas e invasoras (Seebens et al. 2016). Se han realizado varios estudios sobre cómo los parásitos median en el éxito de las invasiones, ya sea a través de que las especies invasoras escapen de sus parásitos (provenientes de su lugar de origen) (Torchin et al. 2001; Blakeslee et al. 2009; Simmons 2014), la co-introducción de hospedador y parásito (Lymbery et al. 2014; Goedknecht et al. 2016), o la adquisición de parásitos nativos por parte de una especie invasora (Prenter et al. 2004a; Goedknecht et al. 2016).

La liberación de enemigos naturales (parásitos) durante el proceso de translocación puede aumentar la probabilidad del éxito invasivo para las especies introducidas, fenómeno conocido como la "hipótesis de liberación de enemigos" (Elton 1958; Keane & Crawley 2002). A lo largo de este proceso, diversas barreras pueden intervenir para reducir la presencia de depredadores y parásitos que son cointroducidos en el nuevo hábitat de la especie (Keane & Crawley 2002; Torchin et al. 2003; Colautti et al. 2004). Un ejemplo destacado es el cangrejo verde invasor, *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), cuya liberación de parásitos ha sido objeto de varias investigaciones (Torchin et al. 2001; Blakeslee et al. 2015, Bojko et al. 2018).

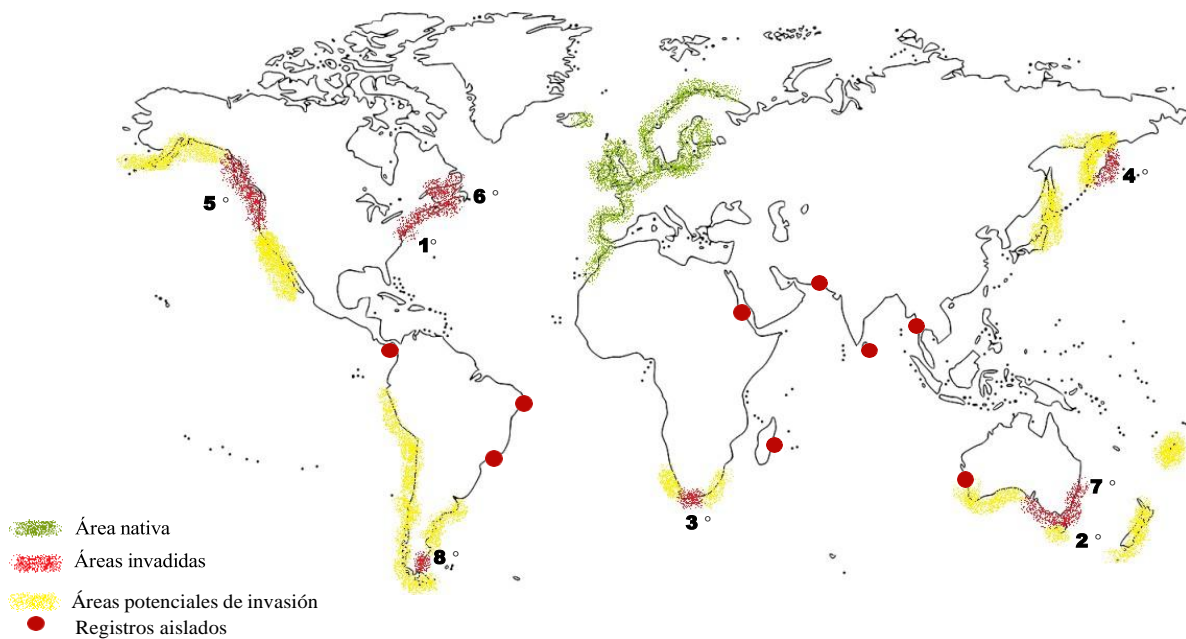
Las especies invasoras pueden modificar las interacciones establecidas entre parásitos y hospedadores en la región invadida. Por ejemplo, cuando las especies invasoras funcionan como hospedadores alternativos para parásitos nativos o previamente establecidos, pueden aumentar el tamaño de las poblaciones de parásitos y llevar a niveles de infección más altos en las poblaciones de hospedadores nativos, fenómeno conocido como el "efecto spillback" (Kelly et al. 2009).

Otro mecanismo subyacente implica la cointroducción de parásitos junto con especies invasoras, los cuales pueden luego transmitirse a especies hospedadoras nativas previamente no expuestas. Este fenómeno, conocido como "efecto spillover", tiene el potencial de desencadenar la aparición de enfermedades que podrían tener consecuencias en cascada en los ecosistemas invadidos (Daszak et al. 2000; Prenter et al. 2004a; Kelly et al. 2009).

Se conoce que los invertebrados albergan una amplia gama de especies parasitarias y pueden representar un riesgo significativo como portadores de parásitos, lo que resulta en daños y pérdidas económicas, tanto para la producción y seguridad alimentaria, como para la biodiversidad global (Daszak et al. 2000; Roy et al. 2017). En 2017, se identificaron alrededor de 1054 invertebrados acuáticos invasores a nivel mundial, representando riesgos para el medio ambiente, la economía, la salud humana y la vida silvestre (Bojko et al. 2021). Entre estos invasores, los crustáceos conformaron el grupo más numeroso, con 323 especies, destacándose la importancia de los decápodos, especialmente *Ca. maenas* (Bojko et al. 2021).

La ubicuidad de especies marinas hermanas, las cuales solo pueden ser identificadas mediante análisis genéticos, sugiere que muchas invasiones son crípticas y se identifican erróneamente, lo que resulta en una subestimación de la diversidad de las especies invasoras (Geller et al. 1997). En el caso de los cangrejos verdes (*Carcinus* spp.), dos especies nativas de Europa, *Ca. maenas* (especie atlántica) y *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847 (especie mediterránea), son morfológicamente muy similares (Carlton & Cohen 2003; Leignel et al. 2014).

*Carcinus maenas* es un invasor exitoso a nivel global debido a su plasticidad fenotípica, amplia tolerancia y dieta omnívora, con poblaciones establecidas en todos los continentes excepto la Antártida (Darling et al. 2008; Young & Elliott 2019) (Figura 1). Según todas las estimaciones, *Ca. maenas* es una de las especies invasoras más ampliamente distribuidas y dañinas en los ecosistemas marinos (Base de Datos Global de Especies Invasoras de la UICN 2023). Su distribución de origen incluye Mauritania, en el noroeste de África, Europa del Norte, Reino Unido, Noruega, Islas Feroe e Islandia (Behrens Yamada & Gillespie 2008; Compton et al. 2010). Esta larga y compleja historia de invasión comenzó a principios del siglo XIX con el establecimiento de la primera población invasora conocida en la costa atlántica de Estados Unidos, probablemente introducida a través de lastre sólido (Carlton & Cohen 2003; Roman 2006). Desde entonces, se ha establecido en Australia (en la década de 1890), Sudáfrica (1983), Japón (1984), la costa del Pacífico de América del Norte (1989), las provincias marítimas del norte de Canadá (1991), Tasmania (1993) y más recientemente, Argentina (1999 o previamente) (Hidalgo et al. 2005).



**Figura 1.** Distribución mundial del cangrejo verde *Carcinus maenas* (Linnaeus 1758) en su área de origen (verde) y áreas invadidas (rojo). Los números indican el orden de invasión: 1) Costa este de Estados Unidos (1817), 2) Australia (1890), 3) Sudáfrica (1983), 4) Japón (1984), 5) Costa oeste de Estados Unidos (1989), 6) provincias marítimas del Norte de Canadá (1991), 7) Tasmania (1993), 8) Argentina (1999). Mapa extraído de [https://en.wikipedia.org/wiki/Carcinus\\_maenas](https://en.wikipedia.org/wiki/Carcinus_maenas) con datos provenientes de CSIRO, Darling et al. (2008) y Torchin et al. (2001).

*Carcinus aestuarii*, originario del Mar Mediterráneo (Carlton & Cohen 2003; Behrens Yamada & Gillespie 2008), sólo se ha registrado fuera de su área origen en Sudáfrica y Japón (Geller et al. 1997; Carlton & Cohen 2003). No se conoce ningún caso de *Ca. aestuarii* estableciéndose de forma independiente de su congénere *Ca. maenas*, y se ha sugerido que puede haber híbridos de *Ca. maenas* × *Ca. aestuarii* en lugares poco estudiados de su área de distribución de origen, o pueden estar presentes en poblaciones introducidas después del establecimiento de ambas especies (Geller et al. 1997).

En la costa del Atlántico sudoeste, *Ca. maenas* fue detectado en 2001 por Vinuesa (2005) en Comodoro Rivadavia (45° 52' S) y Rada Tilly (45° 93' S), mientras que Hidalgo et al. (2005) registraron la especie en Bahía Camarones (44° 79' S) en 2003. Los mencionados autores hipotetizan que habría arribado a Argentina en 1999 o previamente. En 2015, la especie fue reportada en Puerto Madryn (42° 46' S) en el Golfo Nuevo, extendiendo así su rango de distribución 250 km hacia el norte (Torres &

González-Pisani 2016). Según un estudio llevado a cabo por Darling et al. (2008), la población de Argentina es genéticamente más similar a las poblaciones australianas y de Tasmania, por lo cual se hipotetiza que la introducción habría ocurrido desde allí.

El cangrejo verde habita en las costas rocosas desde la zona intermareal hasta una profundidad de 5-6 metros (Klassen & Locke 2007). En la Patagonia, se ha informado que coexiste con los cangrejos nativos *Cyrtograpsus altimanus* Rathbun, 1914, *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851, entre otros (Vinuesa 2005). Por otra parte, en el submareal somero de los Golfos Nuevo y San Jorge (42°- 43°S y 64°- 65°O respectivamente), existen especies de cangrejos reconocidas como recursos pesqueros, como el cangrejo nadador, *Ovalipes trimaculatus* (De Haan, 1833) (Vinuesa 2005; Dima et al. 2013; de la Barra 2019), que también se ha observado que coexiste con el cangrejo verde (Malvé et al. 2020).

Un estudio reciente de metagenómica realizado por Cordone et al. (2022) detectó secuencias correspondientes a *Ca. aestuarii* en el ADN del contenido estomacal de *Ca. maenas* en el Golfo Nuevo, debido a la alta abundancia de secuencias de ambas especies en cada muestra individual, los autores sugieren la posibilidad de hibridación en la región patagónica. Teniendo en cuenta estos resultados y para simplificar las referencias a ambas especies de cangrejo verde, se utilizará el término "*Carcinus* spp." a lo largo de esta tesis, reconociendo la posible coexistencia e hibridación entre *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii* en la región patagónica.

Asimismo, *Carcinus* spp. ha experimentado un aumento significativo en su abundancia en la región de Patagonia, colonizando diversas áreas costeras. Este fenómeno plantea preocupaciones sobre su posible impacto en múltiples especies y supone una amenaza para las comunidades tanto intermareales como submareales en la zona patagónica (Battini & Bortolus 2020). No hay ningún estudio parasitológico en *Carcinus* spp. en el Atlántico sudoeste. Hasta la fecha, Cordone et al. (2022) detectaron secuencias asignadas al género *Carcinonemertes* en la costa patagónica, un parásito nemertino conocido por infectar poblaciones de este cangrejo (Torchin et al. 1996). En el Apéndice I se detallan los simbiosomas que se conocen en su área de origen y en los sitios que ha invadido.

Los cangrejos nativos, *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, se han reportado como hospedadores intermediarios en el ciclo de vida de un trematode y de un acantocéfalo

en Patagonia (Díaz & Cremonte 2010; Alda et al. 2011a, 2013; Bagnato et al. 2015; Rodríguez et al. 2017). Con respecto al cangrejo *O. trimaculatus*, si bien la especie tiene particular relevancia económica y social por ser un recurso pesquero desde hace más de una década (de la Barra 2019), no existen antecedentes de estudios parasitológicos.

Se ha observado que ciertos crustáceos decápodos podrían desempeñar un papel crucial como hospedadores intermediarios en el ciclo de vida de un grupo de protozoos apicomplejos, especialmente del género *Aggregata* (Dobell 1925; Hochberg 1990; Gestal et al. 2002a). El ciclo de vida de éstos, incluye a los pulpos como hospedadores definitivos, siendo los crustáceos su presa habitual (Dobell 1925, Hochberg 1983). En la costa atlántica de Patagonia, se conoce que estos protozoos infectan al pulpito tehuelche *Octopus tehuelchus* (d'Orbigny, 1834) y al pulpo colorado, *Enteroctopus megalocyathus* (Gould, 1852) (Sardella et al. 2000); sin embargo, aún no se ha identificado con certeza qué especies de crustáceos decápodos son los hospedadores intermediarios en este ciclo. Las poblaciones de especies invasoras, como las del cangrejo verde, que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, resultan ser un modelo ideal para evaluar el efecto de las especies invasoras sobre las nativas (Bojko et al. 2018). Hasta la fecha, los parásitos en las especies invasoras están muy poco estudiados (Roy et al. 2017). Una comprensión clara de los parásitos transportados por especies invasoras es fundamental para evaluar de manera efectiva el riesgo que representan éstos para la biodiversidad nativa.

A lo largo de esta tesis se utilizarán diversos términos, tales como: **parásito**: organismo que vive dentro o sobre otro organismo (el **hospedador**), el cual depende metabólicamente de éste y provoca cierto grado de daño, lo que puede afectar la salud e incluso provocar su mortalidad (Poulin 2006); con ello nos referimos a todos los microparásitos, macroparásitos y patógenos. Se utilizará el término **patógeno**: agente infeccioso viral, bacteriano o unicelular que reduce la supervivencia y el estado de salud del hospedador. Asimismo, se utilizará el término **comensal** para describir a un epibionte o ectobionte que convive con el hospedador sin alterar su estado de salud. Estos términos se engloban dentro del concepto de "simbionte". El término **introducción** se refiere a un organismo que es desplazado directa o indirectamente por actividades humanas más allá de los límites de su área de distribución geográfica nativa hacia un área en la que no ocurre naturalmente (Falk-Petersen et al. 2006). El término

**macroparásitos** incluye a los helmintos y artrópodos. Generalmente, estos parásitos no se replican directamente dentro del hospedador definitivo, salvo en ciertos estadios asexuales de los digeneos y cestodos. Tienen un tiempo generacional largo, y su tamaño poblacional depende de la inmigración y muerte de los individuos. En estudios epidemiológicos, la unidad de análisis son los individuos parásitos. La enfermedad en el hospedador está relacionada con la intensidad de la infección (Bush et al. 1997), y el término **microparásitos** se refiere a los parásitos de tamaño microscópico que generalmente incluye virus, bacterias (rickettsias incluidas) y protozoos. Estos organismos presentan un tiempo generacional corto, pueden ser intra o extracelulares, y su abundancia es difícil de cuantificar. En estudios epidemiológicos, la unidad de análisis es el hospedador infectado (Anderson & May 1981).

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar los parásitos que afectan a poblaciones de cuatro especies de crustáceos decápodos: un invasor (*Carcinus* spp.) y tres nativos (*Cyrtograpsus altimanus*, *Cy. angulatus* y *Ovalipes trimaculatus*) que habitan el litoral patagónico, con el fin de evaluar la presencia de parásitos en las poblaciones naturales, y la potencial ocurrencia de los efectos “spillback” (transmisión de parásitos nativos a hospedadores invasores) y “spillover” (transmisión de parásitos del hospedador invasor a hospedadores nativos).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS ASOCIADAS

1. Determinar los simbioses presentes en *Carcinus* spp. en los sitios recientemente invadidos en el litoral patagónico y en las poblaciones de los cangrejos nativos *Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *Ovalipes trimaculatus*.
2. Comparar la prevalencia la intensidad media y la riqueza de los simbioses hallados en *Carcinus* spp. y en las poblaciones de los cangrejos nativos *Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*.

Hipótesis 2: Los valores de prevalencia, intensidad media y riqueza de simbioses en *Carcinus* spp. son menores que en los cangrejos nativos (*Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*), debido a la posible liberación de parásitos por parte del cangrejo invasor y al corto tiempo desde su introducción, insuficiente para que se establezca una asociación hospedador-parásito estable.

3. Evaluar la susceptibilidad del cangrejo invasor y de los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. al apicomplejo *Aggregata* sp. (Aggregatidae) y (en caso de que no se encuentren especímenes parasitados en las poblaciones naturales), infectándolos experimentalmente con ooquistes presentes en el pulpito Tehuelche, *Octopus tehuelchus* (hospedador definitivo).

Hipótesis 3: *Carcinus* spp. y los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. son susceptibles a la parasitación por coccidios del género *Aggregata*, dado que ambos son presas del pulpito Tehuelche (*O. tehuelchus*), hospedador definitivo en el ciclo de vida del parásito.

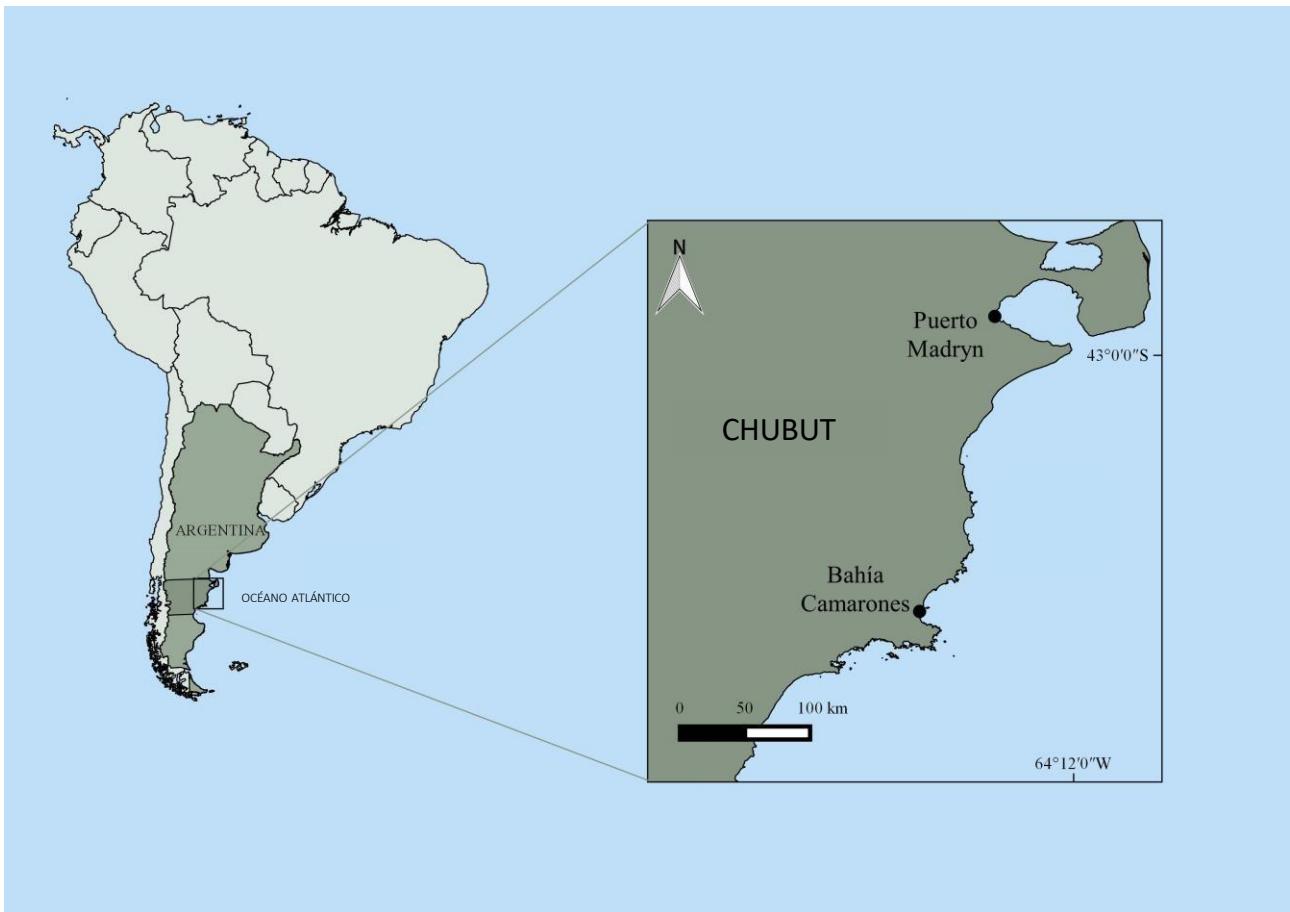
4. Evaluar la susceptibilidad del cangrejo invasor al parásito digeneo, *Maritrema madrynense* (Microphallidae) mediante experimentos de exposición y cohabitación.

Hipótesis 4. *Carcinus* spp. es susceptible de hallarse parasitado por metacercarias de *M. madrynense* (y otros trematodes microfálidos eventualmente presentes en los nativos), dado que las gaviotas cocineras transmiten estos parásitos y el cangrejo verde es un ítem presa de las mismas.

## **METODOLOGÍA GENERAL**

### **Sitios de estudio**

Los sitios de estudio comprendieron los niveles intermareales rocosos y submareal somero de las localidades de Puerto Madryn y Bahía Camarones, provincia del Chubut (Figura 2). Los sitios de colecta en la localidad de Puerto Madryn fueron Playa Kaiser (42°47' S; 64°59' O) y Cerro Avanzado (42°50' S; 64°53' O), que se encuentran en el extremo sur de la ciudad, sobre el golfo Nuevo (Figura 3). El sitio de muestreo en la localidad de Bahía Camarones fue Caleta Mejillón (47°45' S; 65°52' O) (Figura 4). Los sitios de muestreo fueron seleccionados considerando la coexistencia del cangrejo invasor con las especies nativas en los niveles intermareales y submareales, basándose en la presencia documentada del cangrejo invasor en estas áreas, así como en la accesibilidad del muestreo y el historial de investigación existente en dichos sitios (Hidalgo et al. 2005; Vinuesa et al. 2005; Torres & González-Pisani et al. 2015).



**Figura 2.** Sitios de muestreo de cangrejos verdes invasores y nativos en la costa del Atlántico sudoeste. El mapa fue elaborado en QGIS 3.14.15. (Development Team, 2020. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>).



**Figura 3.** Sitios de colecta en Puerto Madryn. a) Playa Kaiser. b) Playa Cerro Avanzado.



**Figura 4.** Sitio de colecta, playa Caleta Mejillón, Bahía Camarones.

### **Muestreo y toma de datos**

Captura de cangrejos: durante la primavera y verano de 2018, y el otoño e invierno de 2019 (Tabla 1), se recolectaron manualmente durante las bajamares (Figura 5) los especímenes de *Carcinus* spp., *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, y mediante buceo autónomo el cangrejo nadador *O. trimaculatus*. Para la colecta de los ejemplares se contó con los permisos correspondientes otorgados por la Dirección de Fauna y Flora Silvestre de la Provincia del Chubut (Disposición N° 06/2018 DF y FS). Posteriormente, los cangrejos fueron transportados al Laboratorio de Parasitología del Instituto de Biología de Organismos Marinos (CCT CONICET - CENPAT), en Puerto Madryn, donde se aseguraron las condiciones óptimas de temperatura y humedad durante el transporte, mediante su colocación en cajas de telgopor cubiertas por algas. Luego, los cangrejos fueron alojados en acuarios conectados a un sistema cerrado de circulación de agua en la Sala de Acuarios Experimental del CCT, donde permanecieron hasta su procesamiento sin suministro de alimento, aproximadamente hasta 48 horas.



**Figura 5.** Colecta de cangrejos de forma manual durante la bajamar.

**Tabla 1.** Número de ejemplares por especie de cangrejo colectados en los diferentes sitios (N total incluyendo todas las estaciones del año), y número de cangrejos analizados con la técnica correspondiente.

Sitio	Especie (N total)	Técnica	N
Puerto Madryn	<i>Carcinus</i> spp. (N=870)	Observación bajo lupa	870
		Microscopía óptica de cortes histológicos	120
	<i>Cyrtograpsus altimanus</i> (N= 140)	Observación bajo lupa	140
		Microscopía óptica de cortes histológicos	65
	<i>Cyrtograpsus angulatus</i> (N= 83))	Observación bajo lupa	83
		Microscopía óptica de cortes histológicos	53
Bahía Camarones	<i>Ovalipes trimaculatus</i> (N=95)	Observación bajo lupa	95
		Microscopía óptica de cortes histológicos	95
Bahía Camarones	<i>Carcinus</i> spp. (N=60)	Observación bajo lupa	60
		Microscopía óptica de cortes histológicos	60
	<i>Cyrtograpsus altimanus</i> (N=26)	Observación bajo lupa	26
		Microscopía óptica de cortes histológicos	26

Registros de datos del hospedador: de acuerdo a las regulaciones vigentes de cuidado animal (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council 2010), se procedió a la anestesia mediante la disposición de cada ejemplar en un frasco tapado dentro de un congelador a -20 °C durante aproximadamente 30 minutos (mayor tiempo de exposición para cangrejos de mayor tamaño). Cada espécimen fue medido con un calibre, registrando el ancho máximo del caparazón (distancia entre los extremos distales de las espinas laterales posteriores). Asimismo, se registró el sexo de acuerdo a la morfología del abdomen.

### Procesamiento de los especímenes

Examinación macroscópica: se examinó la superficie externa para detectar la presencia de epibiontes y de eventuales patógenos: lesiones en el exoesqueleto tales como perforaciones o pústulas de color negro en el caparazón, ocasionado por hongos y bacterias; en la zona del abdomen, parásitos castradores tales como rizocéfalos o nemertinos que se alimentan de los huevos del cangrejo.

Procesamiento histológico: una sección de corazón, hepatopáncreas, intestino, branquia, gónada y músculo de cada individuo fueron procesados mediante la histología clásica, para lo cual se utilizaron dos cassettes de biopsia, rotulados como A y B, donde en el

cassette A se colocó una porción de corazón, hepatopáncreas, gónada y músculo del cuerpo, y en el cassette B se colocó una porción de branquia, intestino y músculo del apéndice (Figura 6). Ambos cassettes fueron colocados en solución Davidson (Howard et al. 2004) por 24 hs para su fijación y luego conservados en etanol 70%. Posteriormente, el Med. Vet. Marcelo Santo, en el laboratorio de Histología del CCT CONICET-CENPAT, llevó a cabo la deshidratación mediante una serie progresiva de alcoholes, finalizando en xileno y posterior inclusión en parafina. Cada bloque así obtenido fue cortado con micrótopo en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, montado y teñido con hematoxilina-eosina (Howard et al. 2004).

Adicionalmente, previa fijación, pequeñas secciones, de aproximadamente 5  $\text{mm}^3$ , de los mismos órganos fueron conservadas en etanol 96% para eventuales análisis moleculares, y también otras pequeñas secciones de los mismos órganos en glutaraldehído 2,5% buffer fosfato para eventuales estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET). El mencionado procesamiento se realizó de acuerdo al protocolo del Laboratorio de referencia de la Unión Europea para Enfermedades de Crustáceos disponible en Internet (<http://www.crustaceanrcl.eu/sops/2014.pdf>).



**Figura 6.** Cassettes A y B rotulados con una porción de cada órgano de los cangrejos para ser procesados mediante histología clásica; 1) corazón, 2) hepatopáncreas, 3) gónada, 4), músculo del cuerpo, 5) branquia, 6) músculo de los apéndices, 7) intestino medio.

### **Identificación de los taxa parásitos o de los agentes etiológicos**

Examinación macroscópica interna: luego de la extracción de cada órgano para los procesamientos anteriormente descritos se examinó bajo lupa la cavidad general del cuerpo, el tracto digestivo, la gónada, la glándula digestiva, el abdomen y las branquias en busca de macroparásitos o de anomalías.

Observación al microscopio óptico: se examinaron los cortes histológicos, teñidos con hematoxilina y eosina. Los especímenes de helmintos que se hallaron fueron preservados en etanol 96% en freezer para la posterior secuenciación de su ADN, y en formol 4% o glutaraldehído 2,5% para estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB). Los parásitos hallados fueron determinados hasta el nivel taxonómico más

preciso posible, recurriendo a distintos métodos según el taxón parásito y consultando la bibliografía pertinente o recurriendo a especialistas cuando fue necesario.

Observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) y/o al microscopio electrónico de transmisión (MET): para la observación mediante MEB, las muestras fueron recortadas a 3-5 mm, luego fijadas en glutaraldehído al 2,5% a 4°C y deshidratadas en un gradiente de etanol (25%, 50%, 70%, 80% y 90%), manteniéndolas sumergidas cada vez durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaron tres inmersiones en etanol al 100% durante 10 minutos cada una, seguido por un proceso de reemplazo del punto crítico utilizando hexametildisilazano. Los tejidos fueron secados al aire bajo campana y montados en portaobjetos con cinta bifaz, metalizados y fotografiados utilizando un Microscopio Jeol JSM-6460LV. Para el caso del MET se realizaron post-fijaciones en tetróxido de osmio. El examen de las muestras al MEB se realizó en el IBIOMAR por el Téc. Norberto Andrés de Garín y al MET en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la ciudad de La Plata.

Análisis moleculares: los órganos de los cangrejos infectados, observados previamente en los cortes histológicos, fueron enviados al Dr. Jamie Bojko de National Horizons Centre (Teesside University, Darlington) para su posterior análisis molecular.

### **Caracterización cuantitativa de las poblaciones y comunidades parásitas**

#### Parámetros cuantitativos de las poblaciones parásitas

Se calcularon los siguientes índices parasitológicos según Bush et al. (1997):

**Prevalencia**: número de hospedadores infectados por una especie parásita particular, dividido por el número de total de hospedadores examinados; se expresa en porcentaje.

**Intensidad media**: intensidad promedio de una especie particular de parásito entre los hospedadores infectados. Se calcula como número total de parásitos/ número de hospedadores infectados.

#### Parámetros cuantitativos de las comunidades

Asimismo, para caracterizar de manera cuantitativa a las comunidades, se calculó la riqueza específica, como número de especies parásitas.

## **Análisis de datos**

Para conocer las variables que afectan al parasitismo se modeló la variable respuesta: presencia-ausencia de cada especie de parásito, en función de las variables explicativas: talla, sexo, estación del año, sitio de procedencia y especie de cangrejo utilizando Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución binomial y función enlace “logit” (Agresti 2012) mediante la función `glm` del paquete `lme` (Bates et al. 2015). Los supuestos de los modelos fueron corroborados utilizando la biblioteca DHARMA (Hartig 2018). La selección del mejor modelo se llevó a cabo utilizando el método stepwise según el Criterio de Información de Akaike (stepAIC) en el programa R (Ripley 2002). Para investigar las diferencias entre grupos, se realizaron comparaciones múltiples a posteriori mediante el test de Tukey (Zar 1999) utilizando la función “`emmeans`” del paquete `emmeans` (Lenth et al. 2021). Los gráficos se realizaron utilizando el paquete `ggplot2`. Todos los análisis estadísticos fueron corridos utilizando el software de código abierto R versión 3.6.1 (R. Core Team 2020). Se utilizó un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  para todos los análisis estadísticos. Cabe mencionar que no se realizaron análisis estadísticos para el índice “intensidad”. Esto se debió a que, en el caso de algunos simbioses, no se pudo calcular dicho índice o los valores obtenidos fueron demasiado bajos para permitir un análisis estadístico significativo.

# CAPÍTULO I

## El cangrejo verde y sus simbiosis en la Patagonia



Foto: Nicolás Battini

## Introducción

Los sistemas marinos costeros se consideran entre los ecosistemas más invadidos del mundo (Goedknecht et al. 2016). Aunque la costa del Atlántico sudoeste ha sido menos expuesta a invasiones biológicas debido a la menor intensidad del transporte marítimo en comparación con otras áreas (Orensanz et al. 2002), la realidad es que la mayoría de los ecosistemas costeros en esta región ya han sido modificados por la acción humana o se espera que lo sean en un futuro cercano. Actualmente, la costa argentina alberga un total de 129 especies marinas introducidas y 72 criptogénicas, con una estimación de detección de una nueva invasión cada 178 días (Schwindt et al. 2020).

El cangrejo verde ha demostrado una notable capacidad de adaptación y resistencia a entornos fuera de su área de origen (Carlton & Cohen 2003; Tepolt & Somero 2014; Young & Elliott 2019). Esta adaptabilidad biológica le permitió invadir con éxito nuevos ecosistemas mediante el transporte marítimo y la dispersión de larvas en corrientes oceánicas (Thresher et al. 2003; Hidalgo et al. 2005; Klassen & Locke 2007; Behrens Yamada et al. 2017). Como resultado, *Ca. maenas* se encuentra ahora en latitudes más polares, incluyendo la costa patagónica de Argentina y las costas de Terranova y Columbia Británica en Canadá (Cuculescu et al. 1998; Best et al. 2017).

La introducción de *Ca. maenas* en la Patagonia argentina pudo haber tenido lugar en el puerto de Comodoro Rivadavia (sur de la provincia de Chubut), probablemente a través de las aguas de lastre de un buque petrolero; en años sucesivos la población se extendió hacia el norte hasta Bahía Camarones, probablemente mediante el transporte larvario (Hidalgo et al. 2005). Como se mencionó en “Introducción general”, en un estudio llevado a cabo por Cordone et al. (2022) mediante metabarcoding, los autores sugieren la posibilidad de hibridación en la región patagónica de *Ca. maenas* y su especie hermana *Ca. aestuarii*. Cordone et al. (2022) descartaron la posibilidad de que los resultados fueran consecuencia de canibalismo, como ya ha ocurrido en otros cangrejos verdes (Gehrels et al. 2017), ya que, durante las inspecciones visuales, en ninguna parte del contenido estomacal de *Ca. maenas* se encontraron restos de cangrejo. En línea con estas observaciones, en la Bahía de Tokio, los análisis genéticos han confirmado la coexistencia de cangrejos híbridos de ambas especies (Geller et al. 1997).

Los especímenes de ambas especies invasoras, *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii*, pueden alcanzar un ancho máximo del caparazón de 9-10 cm y vivir de 4 a 7 años (Young

& Elliott 2019). El caparazón es ligeramente más ancho que largo, con 5 puntas marginales por lado entre el ojo y el punto más ancho del caparazón (Cohen et al. 1995; Klassen & Locke 2007). Los cangrejos juveniles y adultos habitan la zona intermareal, siendo los adultos más abundantes tanto en estas áreas como en las submareales, a menudo a una profundidad de 6-7 metros (Vinuesa 2005; Young & Elliot 2019). La temperatura es un factor determinante de la distribución de *Carcinus* spp, afectando principalmente el ciclo reproductivo de la especie y los tiempos de desarrollo embrionario (Vinuesa 2007). *Carcinus maenas* suele habitar costas resguardadas de aguas someras, costas rocosas y praderas de pastos marinos, aunque también se lo ha observado en hábitats submareales a profundidades desde 20 hasta 55 metros, lo que podría asociarse a la temperatura del agua (Crothers 1968; Leignel et al. 2014). Según un estudio de Vinuesa (2007) en el Golfo San Jorge, la época reproductiva de *Ca. maenas* inicia en enero con el registro de abrazos de precópula siendo el macho de talla mayor a la hembra. Luego el macho ayuda a mudar a la hembra, ocurre la copula “copula en blando” y se mantiene el abrazo de postcópula hasta el endurecimiento de la hembra. Transcurrido el periodo de cópula, las hembras migran a niveles inferiores del litoral durante el otoño e invierno, eclosionando las larvas en setiembre.

Dentro de su área de distribución de origen, el cangrejo verde es un depredador voraz que reduce significativamente las poblaciones de presas de invertebrados bentónicos (Reise 1978, Jensen & Jensen 1985), y compite y desplaza a otros decápodos por el alimento (Eriksson et al. 1975; McDonald et al. 2001). El cangrejo verde ha afectado negativamente a diversas poblaciones de moluscos y crustáceos en todo el mundo, convirtiéndose en una de las especies marinas invasoras que ha ocasionado cambios ecológicos significativos en los ecosistemas invadidos (Grosholz et al. 2000; Poirier et al. 2017; Anton et al. 2019; Márquez et al. 2024). *Carcinus maenas* está incluida entre las 100 especies invasoras más exitosas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (IUCN) (Lowe et al. 2000).

Una vez establecidas en nuevas áreas, las poblaciones de *Ca. maenas* han provocado disminuciones dramáticas en diversos componentes, incluyendo lechos de pastos marinos como *Zostera* spp. (Klassen & Locke 2007; Matheson et al. 2016; Howard et al. 2019), poblaciones de peces costeros (Matheson et al. 2016), especies nativas de cangrejos (McDonald et al. 2001; Gehrels et al. 2016), y bivalvos (Walton et al. 2002; Grosholz et al. 2011; Tan & Beal 2015). Un ejemplo impactante de esto ocurrió en Maine,

EE.UU., donde la proliferación de *Ca. maenas* coincidió con una drástica disminución de los stocks de la almeja de caparazón blando *Mya arenaria* Linnaeus, 1758 y el colapso de su pesquería (Glude 1955; Hanks 1961). En la costa oeste de América del Norte, el cangrejo verde ha sido documentado como un factor que impacta sobre diversos niveles tróficos de las redes alimentarias nativas, lo que ha llevado a una disminución significativa en la abundancia de varios taxones de invertebrados (Grosholz et al. 2000). En Patagonia, el comportamiento agresivo de *Ca. maenas* ha resultado en una notable disminución en la presencia del gasterópodo comestible *Buccinastrum deforme* (King, 1832), afectando la pesquería y amenazando la biodiversidad de los ecosistemas costeros (Márquez et al. 2024).

Las interacciones conflictivas entre el cangrejo verde *Ca. maenas* y otros crustáceos decápodos nativos generan preocupaciones significativas, ya sea por depredación o competencia, tanto para especies de decápodos comerciales como no comerciales (McDonald et al. 2001; Lynch & Rochette 2009; Sigurdsson & Rochette 2013). Ejemplos de impacto incluyen el potencial de *Ca. maenas* para afectar negativamente a langostas americanas juveniles *Homarus americanus* Milne Edwards, 1837 en el Golfo de San Lorenzo, Canadá (Rossong et al. 2006), así como su dominio en la competencia por el alimento con el cangrejo costero *Hemigrapsus oregonensis* (Dana, 1851) en la costa este de América del Norte (Jensen et al. 2002). En las costas de Patagonia, el mismo fenómeno fue observado con el cangrejo nativo *Cy. angulatus* (Hidalgo et al. 2007). Los estudios del contenido estomacal de *Carcinus* spp. documentan una dieta diversa que incluye anélidos (Gee et al. 1985), algas (Elner 1980), crustáceos (Ropes 1968) y particularmente moluscos (Hughes & Elner 1979; Hadlock 1980; Cohen et al. 1995; Klassen & Locke 2007; Hidalgo et al. 2007; Conkerton et al. 2017). En Patagonia, después de su identificación, se ha llevado a cabo un monitoreo regular del comportamiento alimentario de este cangrejo invasor mediante observaciones de campo con escafandra autónoma (SCUBA), durante las cuales se identificaron varias especies presas, incluyendo a los cangrejos *Cyrtograpsus* spp. (Battini & Bravo 2020). Recientemente, Cordone et al. (2022) utilizaron diferentes técnicas para estudiar la dieta del cangrejo verde que habita en el golfo Nuevo, encontrando que los principales phyla consumidos también fueron los más abundantes en el área de estudio (Mollusca, Arthropoda y Phaeophyceae).

La robustez y alto potencial reproductivo del cangrejo verde lo convierten en una especie sumamente difícil de erradicar una vez establecido en un sitio (Drinkwin et al. 2018; Mabin et al. 2020). A pesar de los esfuerzos considerables de gobiernos y países para eliminar su invasión (Ens et al. 2022), los daños causados por estos crustáceos son tan graves que la tarea se vuelve un gran desafío. La persistencia de este problema resalta la necesidad urgente de estrategias más efectivas para gestionar y controlar su propagación.

*Carcinus* spp. actúa como hospedador de una amplia diversidad de fauna de simbioses, tanto en su área de origen de distribución como en sus áreas introducidas (ver Apéndice I). En su área de distribución de origen, los cangrejos verdes se ven afectados por diversos parásitos helmintos, entre los cuales se incluyen el acantocéfalo *Profillicolis botulus* (Van Cleave, 1916); los digeneos trematodes *Maritrema portucalensis* Pina, Russell-Pinto & Rodrigues, 2011, *Microphallus* spp.; cestodes y nemertinos (Coe 1902; Torchin et al. 2001; Kuris et al. 2005; Stentiford & Feist 2005; Pina et al. 2011; Bojko et al. 2018).

En las costas de América del Norte, donde estos cangrejos han sido introducidos, se ha registrado la presencia de únicamente tres especies de helmintos que los infectan: *Profillicollis botulus* Meyer, 1931, *Microphallus similis* (Jägerskiöld, 1900) y un nematodo larvario no identificado (Bratney et al. 1985; Blakeslee et al. 2009; 2015; Bojko et al. 2018). En particular, la infección por *P. botulus* desencadena una respuesta de melanización cuando lisa el epitelio intestinal del cangrejo (Bojko et al. 2018). Aunque se ha observado una respuesta inmune de melanización por *P. botulus*, no se han identificado respuestas inmunitarias similares en otras infecciones helmínticas que afectan a los cangrejos verdes (Coe 1902; Bratney et al. 1985; Stentiford & Feist 2005; Pina et al. 2011; Blakeslee et al. 2015; Bojko et al. 2018).

En la reciente región invadida de la Patagonia, se ha detectado la presencia del género *Carcinonemertes* en cangrejos verdes mediante metagenómica (Cordone et al. 2022). Las especies del nemertino *Carcinonemertes* son conocidas por parasitar poblaciones de este cangrejo (Torchin et al. 1996). Estos gusanos, que infectan una variedad de crustáceos decápodos, son reconocidos como voraces depredadores de huevos (Wickham 1978; Kuris & Wickham 1987; Berben et al. 2023). Su impacto ecológico es el de un depredador, ya que mata a embriones individuales; sin embargo, considerando tanto su ciclo de vida, la estrecha vinculación con el hospedador y el empleo de señales

químicas mediadas por este último, son tan prominentes que su biología se asemeja efectivamente al parasitismo (Kuris 1993). Los gusanos *Carcinonemertes* son responsables del colapso de las pesquerías de crustáceos en la costa oeste de América del Norte (Wickham 1980; Shields & Kuris 1988; Shields et al. 1990) dado su efecto negativo sobre el desempeño reproductivo femenino (Wickham 1979; Kuris et al. 1991; Kuris 1993, Torchin et al. 1996; Simpson 2018).

Además, los cangrejos verdes en su área de distribución de origen se ven afectados por diversos simbioses no helmintos (Ver Apéndice I). Entre estos se incluyen virus, el microsporidio *Ameson pulvis* (Pérez, 1905), protozoos *Haplosporidium* spp., gregarinas, dinoflagelados *Hematodinium* spp., el rizocefálo *Sacculina carcini* Thompson, 1836, isópodos y tunicados (Stentiford & Feist 2005; Bojko et al. 2018; Davies et al. 2019; 2020; Bojko et al. 2018). En el caso de áreas introducidas, se han registrado simbioses no helmintos como virus, bacterias, el microsporidio *A. pulvis*, y *Parahepatospora carcini* Bojko, Clark, Bass, Dunn, Stewart-Clark, Stebbing & Stentiford, 2017, el dinoflagelado *Hematodinium perezii* Chatton & Poisson, 1931, y una ameba no identificada (Bojko et al. 2017; 2018; 2021). Estos hallazgos se registraron en Nueva Escocia, Canadá y áreas limítrofes de Estados Unidos, donde los cangrejos han estado presentes desde su introducción en 1991, hace más de 30 años (Darling et al. 2008).

Las filogenias de microsporidios construidas a partir de datos de secuencias de genes ribosomales han llevado a propuestas para cinco clados microsporidios taxonómicamente distintivos (I, II, III, IV, V), cada uno de los cuales puede ser posteriormente alineado en tres agrupaciones ecológicas amplias: Marinosporidia (V); Terresporidia (II, IV); y Aquasporidia (I, III) (Vossbrinck & Debrunner-Vossbrinck, 2005). El clado IV forma un grupo particularmente interesante debido al hecho de que contiene a la familia Enterocytozoonidae, donde todos los taxones conocidos infectan invertebrados acuáticos o peces (Bojko et al. 2017). Hasta la fecha, los microsporidios que afectan a *Ca. maenas* pertenecen al Clado I (*A. pulvis*) y al Clado IV (*P. carcini*).

Hasta el momento, no se ha llevado a cabo un estudio específico para detectar simbioses en *Carcinus* spp. en el Atlántico sudoeste. La realidad es que se carece de un conocimiento exhaustivo acerca de los simbioses transportados por organismos invasores (Roy et al. 2017). Un análisis detallado de las asociaciones de los simbioses en *Carcinus* spp. crea un escenario propicio que facilita la realización de investigaciones sobre la movilidad y dispersión de simbioses a lo largo de rutas invasivas. Estos

estudios podrían contribuir de manera significativa a nuestra comprensión del mecanismo de liberación de parásitos.

## Objetivos

- Determinar los simbiosites presentes en *Carcinus* spp. en los sitios recientemente invadidos en el litoral patagónico.
- Cuantificar la prevalencia y la intensidad media de los simbiosites hallados en *Carcinus* spp.

## Materiales y métodos

### Muestreo, procesamiento y examinación de macrosimbiosites

El sitio de estudio y la metodología empleada fueron descriptos en “Materiales y métodos generales”.

En la costa de Puerto Madryn se llevaron a cabo muestreos estacionales durante los años 2018 y 2019, abarcando un total de 870 cangrejos verdes. En Bahía Camarones, los muestreos se realizaron en la primavera de 2018 y en el otoño de 2019, obteniendo un total de 60 cangrejos verdes. Adicionalmente, se realizó un muestreo puntual de 10 cangrejos verdes en Puerto Deseado, provincia de Santa Cruz, en el intermareal de la playa Punta Buque (48° 06' S; 65° 55' O) durante el otoño de 2018 (Tabla 2).

Se realizaron las disecciones de cada ejemplar y se examinaron bajo lupa en busca de simbiosites, tal como se detalla “Metodología general”.

Como parte de un muestreo adicional destinado a identificar parásitos en la hemolinfa, durante la primavera y el verano de 2021, se recolectaron un total de 60 ejemplares de *Carcinus* spp. en el intermareal inferior próximo al muelle Almirante Storni de la ciudad de Puerto Madryn (42°49' S; 65°04' O) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Técnicas utilizadas para la identificación de los simbiontes en *Carcinus* spp. en los diferentes sitios de muestreo.

Técnica aplicada	n (sitio)	Objetivo
Observación bajo lupa	870 (Puerto Madryn)	Epibiontes y simbiontes macroparásitos
	60 (Bahía Camarones)	
	10 (Puerto Deseado)	
Microscopía óptica de cortes histológicos	120 (Puerto Madryn)	Identificación de microparásitos y patologías
	60 (Bahía Camarones)	
	10 (Puerto Deseado)	
Microscopía óptica de hemolinfa	60 (muelle Almirante Storni)	Identificación de microsporidios
Análisis molecular y filogenético	2 (muestreo puntual en muelle Almirante Storni y Puerto Madryn)	Identificación taxonómica y filogenia del microsporidio

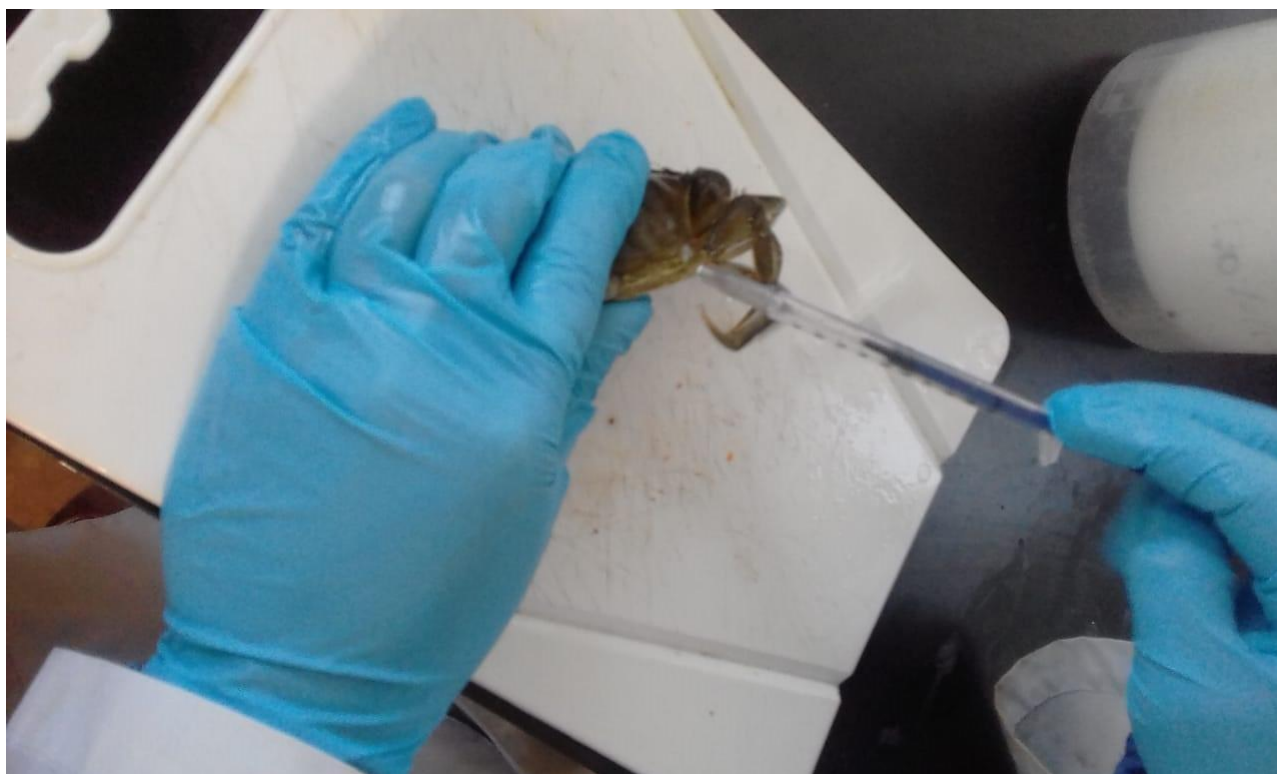
### Procesamiento histológico

Aproximadamente 30 ejemplares por estación del año colectados en Puerto Madryn y Bahía Camarones, más el total de los ejemplares (10) colectados en Puerto Deseado, fueron procesados mediante histología clásica (Tabla 2), siguiendo el protocolo que se describió en “Metodología general”.

### Extracción de hemolinfa para detectar esporas de microsporidios

Los cangrejos colectados en la playa cercana al muelle fueron exclusivamente sometidos a la extracción y procesamiento de hemolinfa con el objetivo de hallar la presencia de microsporidios presentes en la misma (Tabla 2). Este procedimiento consistió en obtener 0,2 ml hemolinfa de la membrana no esclerotizada de las patas caminadoras, utilizando una jeringa de plástico de 1 ml (Figura 7). Posteriormente, la hemolinfa obtenida se transfirió a tubos Eppendorf y se diluyó en una proporción 1:2 con una solución de Alsever, la cual actúa como agente anticoagulante. Dicha solución anticoagulante contiene citrato de sodio (27 mM), NaCl (336 mM), glucosa (115 mM) y EDTA (9 mM), y se ajustó a un pH de 7,2 antes de ser conservada a 5°C, siguiendo el protocolo establecido por Kondo al. (2003). Posteriormente, se realizó la observación de estas preparaciones bajo un microscopio óptico (Leica DM2500) equipado con contraste de interferencia

Nomarsky. Los ejemplares en los que no se observaban parásitos fueron devueltos a su ambiente natural.



**Figura 7.** Extracción de hemolinfa de la membrana no esclerotizada de las patas caminadoras.

### Análisis moleculares y filogenéticos

Los órganos (hepatopáncreas, corazón, branquias y músculo) de dos ejemplares de *Carcinus* spp., de los cuales uno de ellos presentaba signos evidentes de una infección microsporidiana mediante previa observación al microscopio óptico y el otro cangrejo mediante observación de esporas en la hemolinfa, fueron enviados (fijados en etanol 96%) al Dr. Jamie Bojko (Universidad de Teesside, Inglaterra) para estudios moleculares a fin de determinar la identidad taxonómica del hospedador y posterior análisis metagenómico, para determinar su microbioma. Asimismo, el Dr. Bojko realizó análisis adicionales para determinar la identidad taxonómica del microsporidio sospechado y su posición filogenética (Frizzera et al. 2021; Bojko et al. 2023).

### Análisis estadísticos

Se estudió la presencia o ausencia de los parásitos más prevalentes (prevalencia igual o superior al 3%) *Carcinus* spp. en función de la talla, el sexo, la estación del año y el sitio de procedencia, tal como se detalla en la sección de "Metodología general". Además, se

investigó la relación entre la talla del hospedador y la intensidad de los ciliados mediante el análisis de correlación de Spearman (Siegel 1979). Adicionalmente, para evaluar si la talla de los cangrejos variaba según las variables sexo, estación y sitio, se utilizó GLM con una distribución gaussiana y función enlace "identity" (Agresti 2012). También se evaluaron las diferencias en la talla entre cangrejos de Puerto Madryn y Bahía Camarones en función del sexo y la estación, considerando únicamente las estaciones coincidentes en ambos sitios durante el muestreo. Los supuestos de los modelos, la selección del mejor modelo y las comparaciones múltiples se explican en detalle en la sección de "Metodología general".

## **Resultados**

### Datos morfométricos

La talla media de las especies de cangrejos recolectadas por sitio se detalla en la Tabla 3.

En los cangrejos procedentes de Puerto Madryn, tanto la estación ( $\chi^2 = 18,896$ ,  $p < 0,001$ ) como el sexo ( $\chi^2 = 15,390$ ,  $p < 0,001$ ) tuvieron efectos significativos sobre el tamaño de los cangrejos, mientras que la interacción entre estación y sexo no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Los machos resultaron significativamente más grandes que las hembras, con una diferencia promedio de 10,4 mm ( $p = 0,0003$ ). Además, se observaron diferencias significativas en el tamaño entre las estaciones del año, particularmente entre el verano y el otoño, con los cangrejos en verano siendo en promedio 13,38 mm más grandes que en otoño ( $p = 0,0015$ ).

En los cangrejos procedentes de Bahía Camarones, la interacción entre estación y sexo fue significativa ( $\chi^2 = 7,082$ ,  $p = 0,0078$ ). En la primavera las hembras (54,9 mm) resultaron significativamente más grandes que los machos (40,5 mm;  $p = 0,0024$ ); mientras que, en otoño, no se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ).

El análisis que evaluó el efecto de las variables estación, sexo, y sitio sobre la talla de los cangrejos, revelaron que el sitio tuvo un efecto significativo ( $\chi^2 = 18,007$ ,  $p < 0,001$ ). Asimismo, se observaron interacciones significativas entre estación y sexo ( $p = 0,026$ ) y entre sexo y sitio ( $p = 0,017$ ). Las hembras de ambos sitios difirieron significativamente

en tamaño, siendo más grandes las provenientes de Bahía Camarones (18,36 mm,  $p < 0,001$ ).

La distribución sexual (hembra/macho) en *Carcinus* spp. exhibió variaciones entre los distintos sitios. En Puerto Madryn, los cangrejos mostraron un sesgo masculino (340/530), mientras que, en Bahía Camarones se observó un sesgo hacia las hembras (36/24) (Tabla 3). En Puerto Deseado, la distribución sexual fue equitativa, con un conteo de 5 machos y 5 hembras (Tabla 3). En el intermareal cercano al muelle Almirante Storni de Puerto Madryn, la proporción de sexo fue de 32 hembras por 18 machos.

**Tabla 3.** Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media (entre paréntesis) de los simbiontes registrados en *Carcinus* spp., recolectados estacionalmente en Puerto Madryn, Bahía Camarones y Puerto Deseado, costa del Atlántico sudoeste. La tabla se divide en dos partes: la primera muestra el total de ejemplares observados en el microscopio estereoscópico (lupa), las medidas de AC y la proporción de sexos correspondientes; la segunda parte presenta los resultados de la submuestra procesada para histología observada bajo microscopio óptico y los simbiontes hallados. Todos los ejemplares de Bahía Camarones y Puerto Deseado fueron procesados para histología. Por lo tanto, los datos morfológicos y la proporción de sexos se presentan en la primera sección de la tabla.

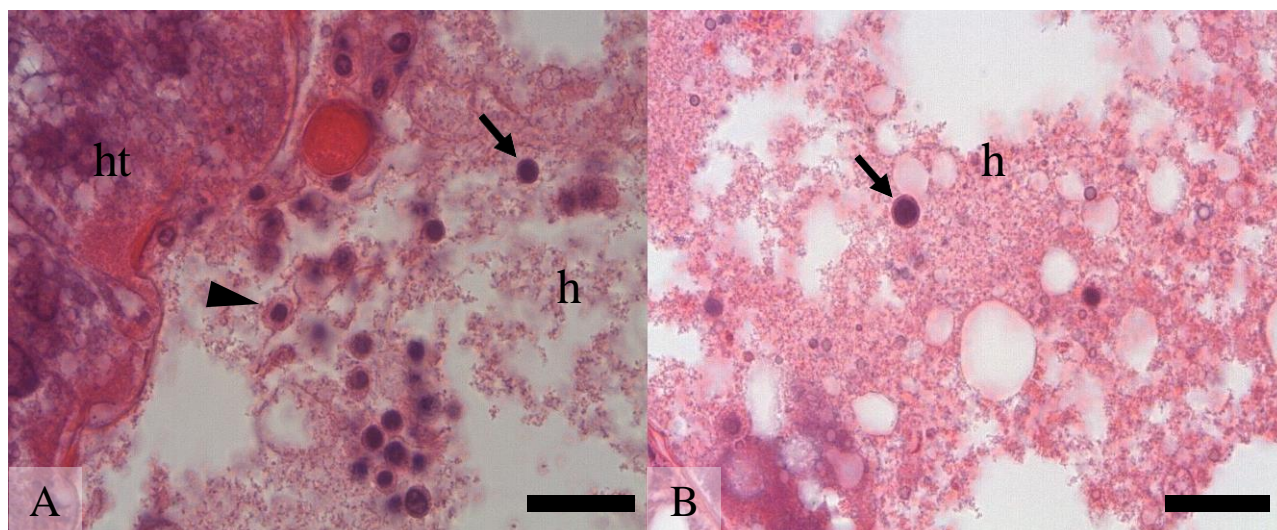
Sitios	Puerto Madryn				Bahía Camarones		Puerto Deseado	
	Estación	primavera	verano	otoño	invierno	primavera	otoño	
<b>N total (microscopio estereoscópico)</b>		<b>230</b>	<b>255</b>	<b>200</b>	<b>185</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>10</b>
AC y rango (mm)		43 (21 -77)	53 (30 - 73)	39 (9 - 70)	45 (12 -68)	49 (20-76)	51 (34-72)	53 (35-75)
Proporción de sexos (hembra/macho)		88/142	89/166	91/109	72/113	17/13	19/11	5/5
<b>N (Histología)</b>		<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>10</b>
AC y rango (mm)		43 (24- 61)	50 (30-72)	37 (10-70)	47 (12-68)	-	-	-
Proporción sexual (hembra/macho)		5/25	10/20	13/17	12/18	-	-	-
Virus-like		7	23	23	20	0	0	0
Microorganismos procarióticos		0	7 (20)	0	0	0	0	2 (15)
Ciliados		0	7 (8,3)	13 (6,5)	3 (7)	20 (8,8)	20 (5,8)	0
Microsporidio <i>Agmasoma carcini</i>		0	0	0	3	0	0	0
<i>Haplosporidium</i> -like		16	0	20	3	7	0	0
<i>Mikrocytos</i> -like		0	0	0	0	0	0	30

### Simbiontes

*Carcinus* spp. se halló libre de epibiontes y macrosimbiontes, como se muestra en la Tabla 3. Por otro lado, a través de los análisis histológicos, se identificaron siete simbiontes presentes en *Carcinus* spp. (Tabla 3).

Se pudo apreciar una aparente patología de origen viral en los núcleos de los hemocitos circulantes. Específicamente, se observó un viroplasma, teñido de un tono púrpura oscuro, causando hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina en la célula

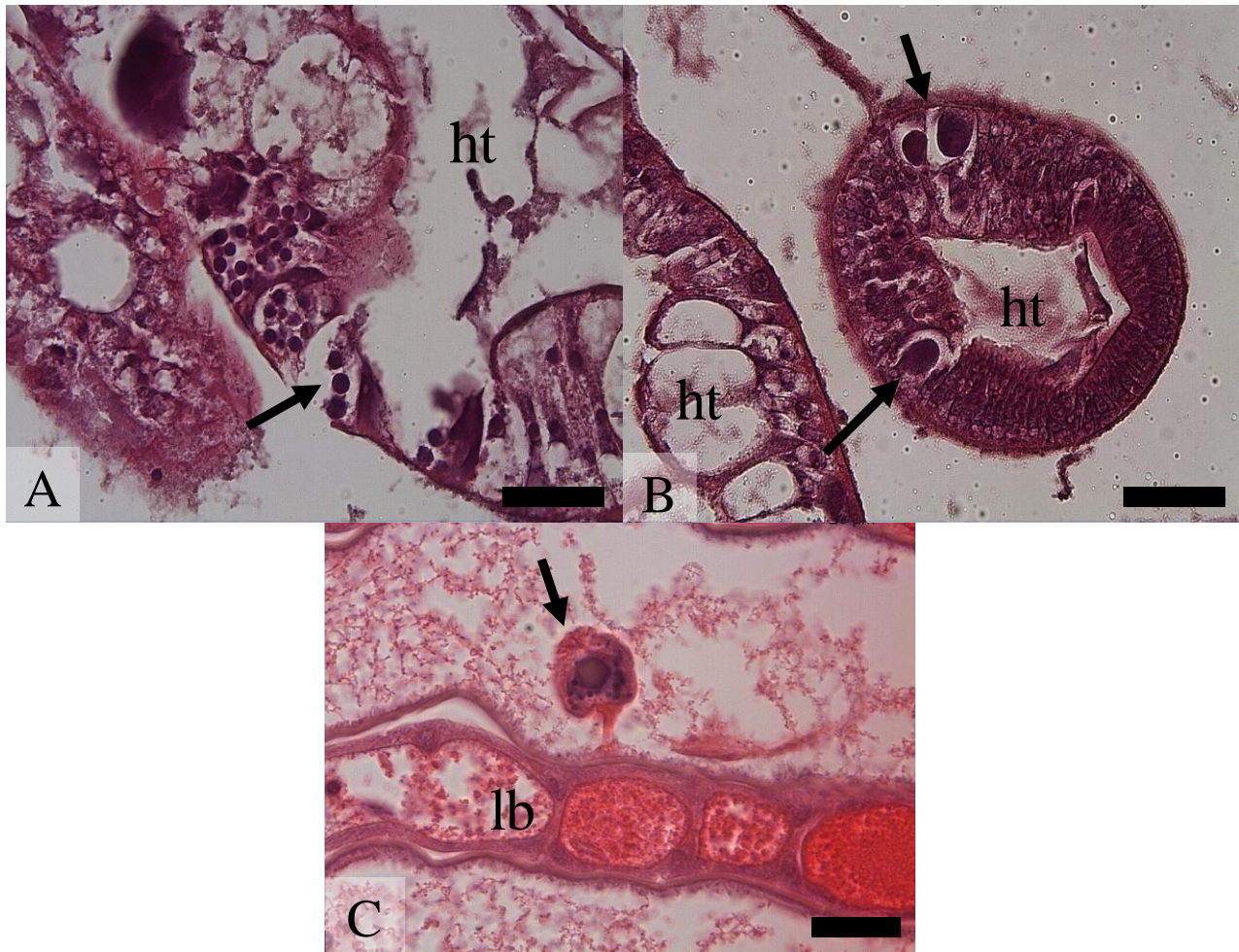
del hospedador (Figura 8 A-B). Sin embargo, esta infección no pareció inducir una respuesta inflamatoria por parte del hospedador. La mayor prevalencia de esta infección se registró en los cangrejos recolectados en Puerto Madryn durante el verano y otoño (23%) y en invierno (20%), en comparación con los resultados obtenidos en Bahía Camarones (Tabla 3). En Puerto Deseado no se observaron inclusiones del tipo viral.



**Figura 8.** Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. con patología tipo viral en los hemocitos ubicados en el hemocele (h) alrededor de los túbulos hepatopancreáticos (ht). A) Se aprecian hemocitos no infectados (punta de flecha) e infectados (flecha). B) Detalle de un hemocito infectado, destacando la migración de la cromatina (flecha). Barras de escala: 20  $\mu$ m.

Se observaron microorganismos procariotas basófilos intracelulares en las células epiteliales del hepatopáncreas en los cangrejos de Puerto Madryn (verano 7%) y en Puerto Deseado (2%) con intensidades medias de 20 y 15 respectivamente (Tabla 3). La presencia de estas colonias provocó hipertrofia de la célula hospedadora (Figura 9 A-B).

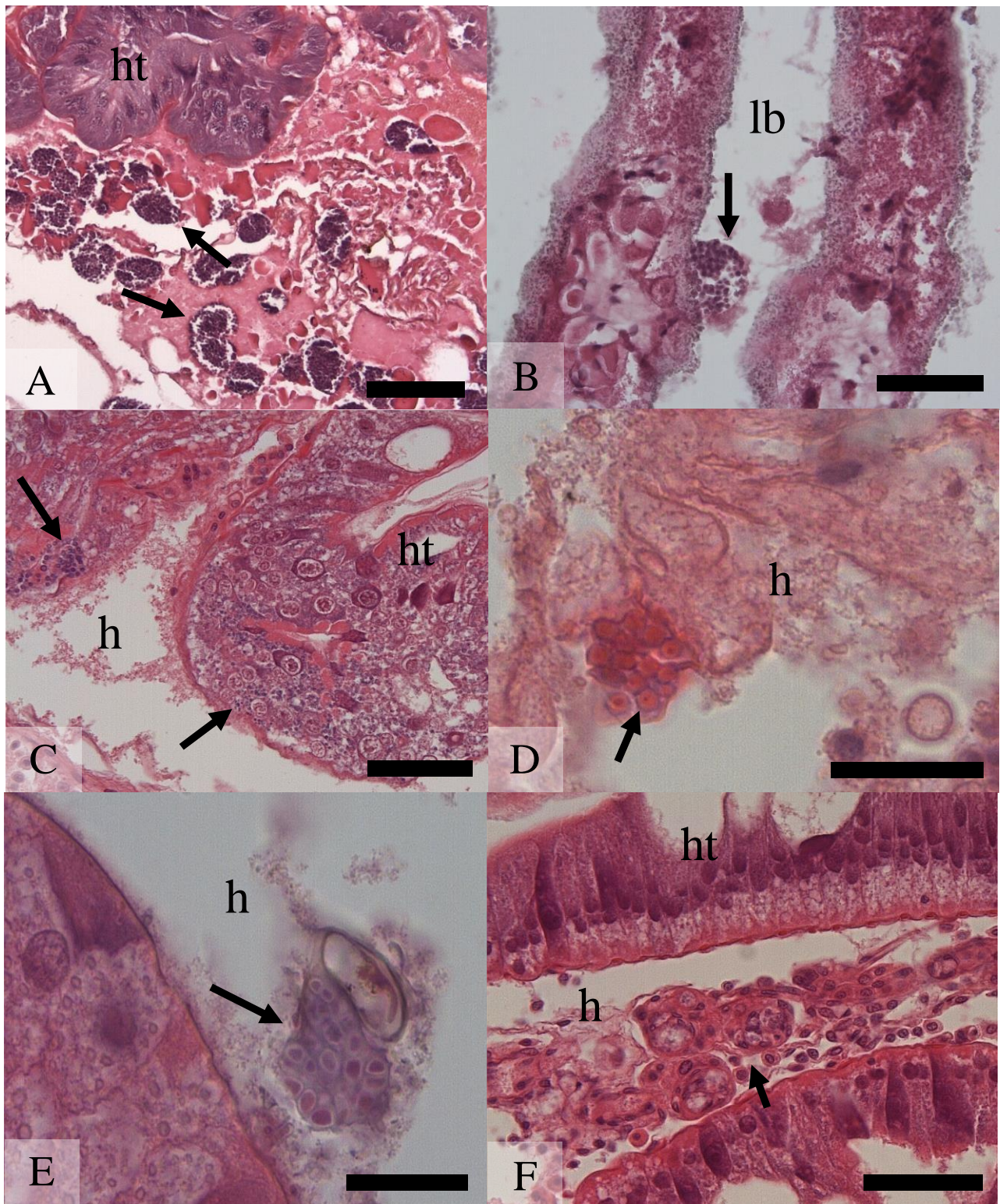
Se observaron protistas ciliados pedunculados en las branquias. Se caracterizaron como basófilos, con un macronúcleo curvo y varios micronúcleos (Figura 9 C). La mayor prevalencia e intensidad media se registró en los cangrejos colectados en otoño en Puerto Madryn, con valores de 13% y 6,5 respectivamente (Tabla 3).



**Figura 9.** Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. infectado con microorganismos procarióticos. A) Colonias basófilas intracelulares de microorganismos procariotas (flecha) en células epiteliales del hepatopáncreas (ht). B) Colonias de microorganismos procariotas causando hipertrofia de las células del hospedador (flechas). C) Ciliado pedunculado (flecha) en la lamela branquial (lb). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, B), 20  $\mu\text{m}$  (C).

Se detectaron infecciones similares a *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) evidenciándose la presencia de plasmodios en hepatopáncreas y branquias (Figura 10 A-B) y etapas unicelulares en el hepatopáncreas (Figura 10 C). Asimismo, se constató la presencia de esporoquistes con esporoblastos y esporas en desarrollo en su interior, en el hemocele y en la luz del túbulo del hepatopáncreas, el corazón y en el interior de las lamelas branquiales (Figura 10 D). Se identificaron también esporas maduras circulando en el hemocele del hepatopáncreas (Figura 10 E). En los órganos en donde se observaron las esporas en desarrollo, se asociaron a una respuesta inflamatoria en forma de encapsulamiento, pero sin presencia evidente del parásito (Figura 10 F).

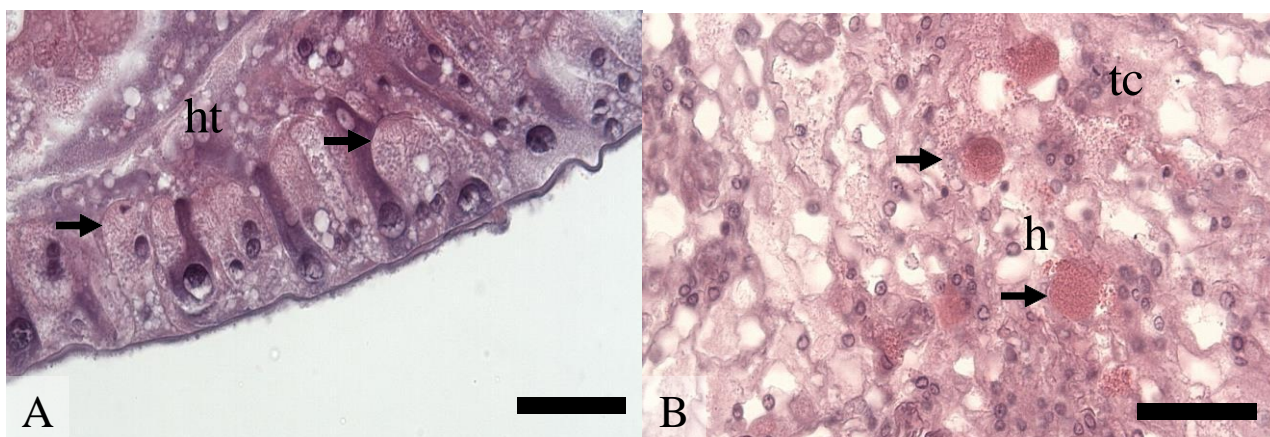
Además, las infecciones parecen inducir una degeneración de los tejidos del hospedador, principalmente en el hepatopáncreas. En los cangrejos de Puerto Madryn, el haplosporidio se halló en primavera, otoño e invierno con prevalencias de 16%, 20% y 3% respectivamente, y en los de Bahía Camarones sólo en primavera con una prevalencia de 7% (Tabla 3). No se observaron parásitos similares a *Haplosporidium* sp. en los cangrejos de Puerto Deseado.



**Figura 10.** Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. con infecciones similares a *Haplosporidium* sp. Plasmodios A) en hepatopáncreas (ht) (flecha) B) en branquias, adyacentes a la lamela branquial (lb) (flecha). C) Etapas unicelulares en el hepatopáncreas (flecha). D) Esporoquiste con esporas en desarrollo en el hemocele (h) del hepatopáncreas (flecha). E) Esporas maduras (flecha) en el hemocele

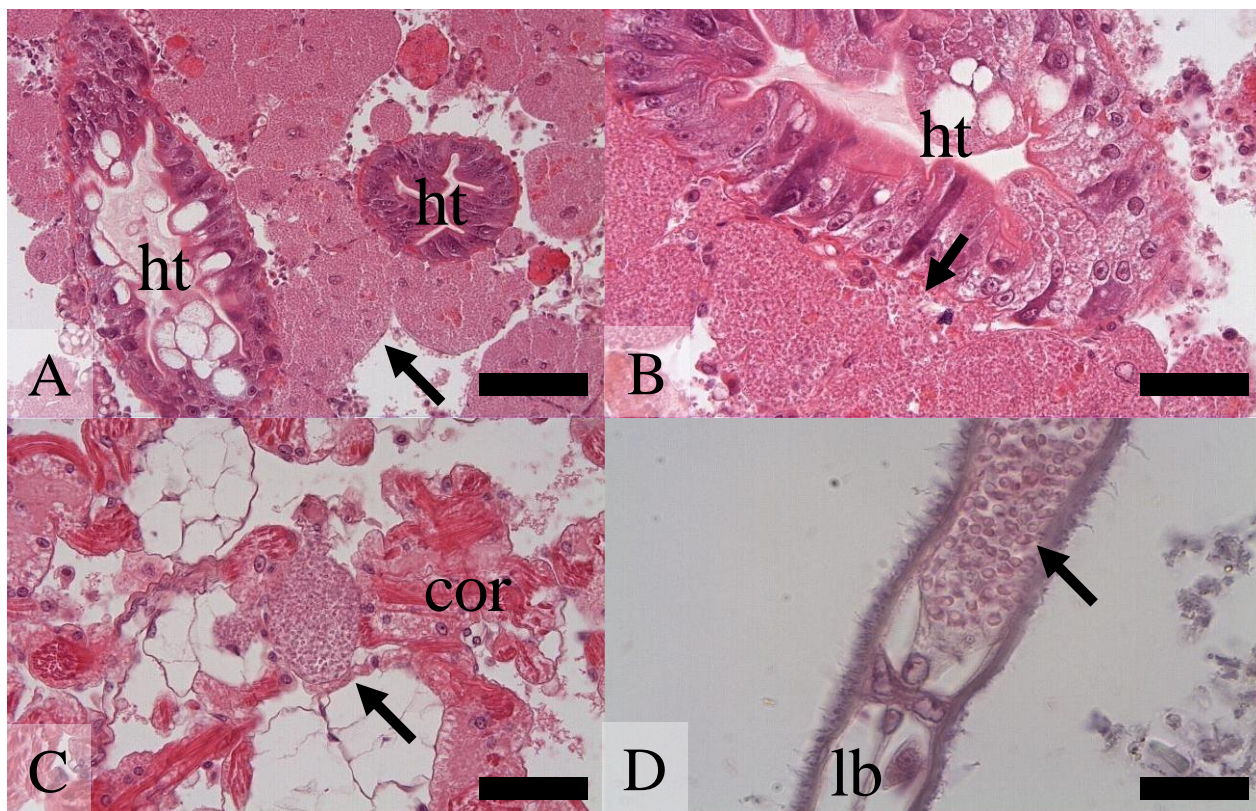
del hepatopáncreas (ht). F) Encapsulación por hemocitos (flecha). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B, C, F), 20  $\mu\text{m}$  (D, E).

En los cangrejos de Puerto Deseado se identificaron microcélulas de parásitos similares a *Mikrocytos* sp. (Figura 11). Estas microcélulas se observaron tanto en el hemocele como en el epitelio del hepatopáncreas (Figura 11 A). Se hallaron microcélulas unicelulares intracelulares y plasmodios extracelulares. Además, también se detectaron formas unicelulares libres y plasmodios circulando en la hemolinfa de cangrejos infectados. Se observaron plasmodios en el corazón (Figura 11 B). En cuanto al epitelio del hepatopáncreas, donde se identificaron las microcélulas, se evidenció una notable hipertrofia (Figura 11 A). La prevalencia de la infección fue del 30% (Tabla 3). Cabe destacar que en las otras localidades de estudio no se halló a este parásito.



**Figura 11.** Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. infectadas con parásitos similares a *Mikrocytos* sp. A) Sección transversal del tubo hepatopancreático (ht), observándose epitelio infectado (flechas); notar la hipertrofia de la célula hospedadora. B) Infección por plasmodio (flechas) en el tejido cardíaco (tc). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, B).

En el hemocele del hepatopáncreas, en las branquias, en el músculo y en el corazón de un solo ejemplar macho de cangrejo verde de Puerto Madryn se observaron esporas de un microsporidio (Figuras 12 A-D). Esta infección pareciera afectar las células de inclusión de reserva y al tejido muscular del corazón, pero no provocaría una respuesta evidente por parte del hospedador. Este parásito fue hallado posteriormente en otros individuos al examinar la hemolinfa de los cangrejos (muestreo en la playa aledaña al Muelle Almirante Storni). No se observó en cangrejos de los otros sitios y se lo describe más abajo en detalle utilizando datos moleculares y filogenéticos.



**Figura 12.** Secciones histológicas (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. infectados por el microsporidio *Agmasoma carcini*. A) Sección transversal del hepatopáncreas (ht) infectado con plasmodios (flechas). B) Alta magnificación del hepatopáncreas infectado. C) Infección por microsporidios en el corazón (cor). D) Alta magnificación de la lámina branquial (lb) infectada (gl), notar las esporas (flecha). Barras de escala: 100  $\mu$ m (A, C), 50  $\mu$ m (B), 20  $\mu$ m (D).

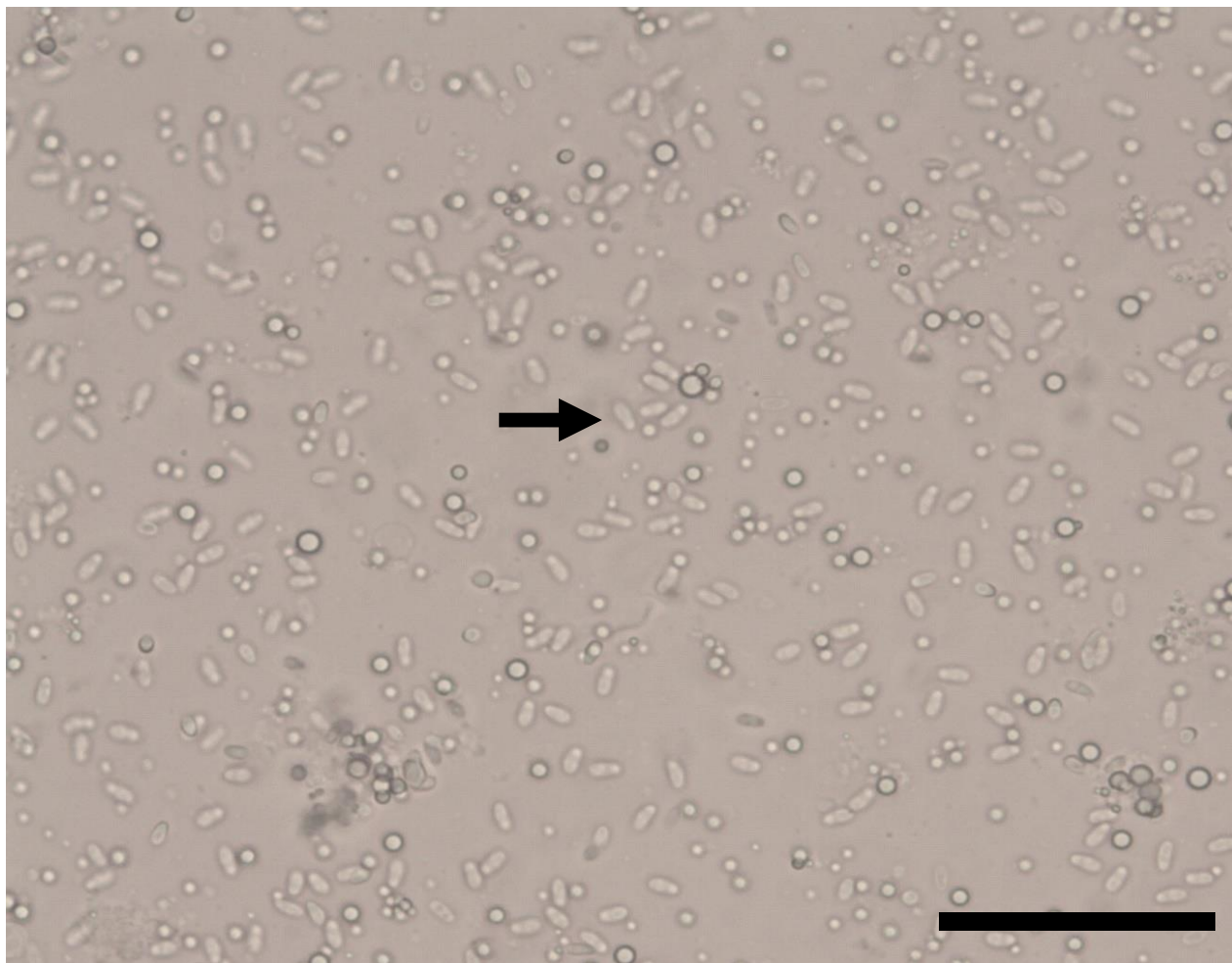
Mediante histología, se identificó una infección similar a la causada por el nemertino *Carcinonemertes* sp., en un solo ejemplar hembra de Puerto Madryn, con una prevalencia del 3% (Tabla 3). Este nemertino fue observado en la región cercana a la epidermis, específicamente en el hemocele (Figura 13). Se identificó como nemertino por la presencia de una probóscide, un ciego intestinal y las capas de músculo circular y longitudinal en el corte histológico (Figura 13).



**Figura 13.** Sección histológica (H&E) de cangrejo verde *Carcinus* spp. que muestra el gusano similar a *Carcinonemertes* sp. en el hemocele debajo de la epidermis. Obsérvese la probóscide (flecha grande), el ciego intestinal (asterisco), y las capas musculares; circular (flecha pequeña) y longitudinal (punta de flecha). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

#### Análisis de la hemolinfa

Se detectaron esporas del microsporidio *A. carcini* en la hemolinfa de tres ejemplares de *Carcinus* spp. (Figura 14). Los cangrejos infectados presentaron signos externos, como letargo o debilidad. Además, se observó una pequeña muestra de agua del contenedor en el que se mantenían a los cangrejos antes de su procesamiento y se identificaron las mismas esporas que fueron observadas en la hemolinfa.



**Figura 14.** Esporas de microsporidio (flecha) en la hemolinfa de cangrejo verde *Carcinus* spp. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

#### Análisis moleculares y filogenéticos

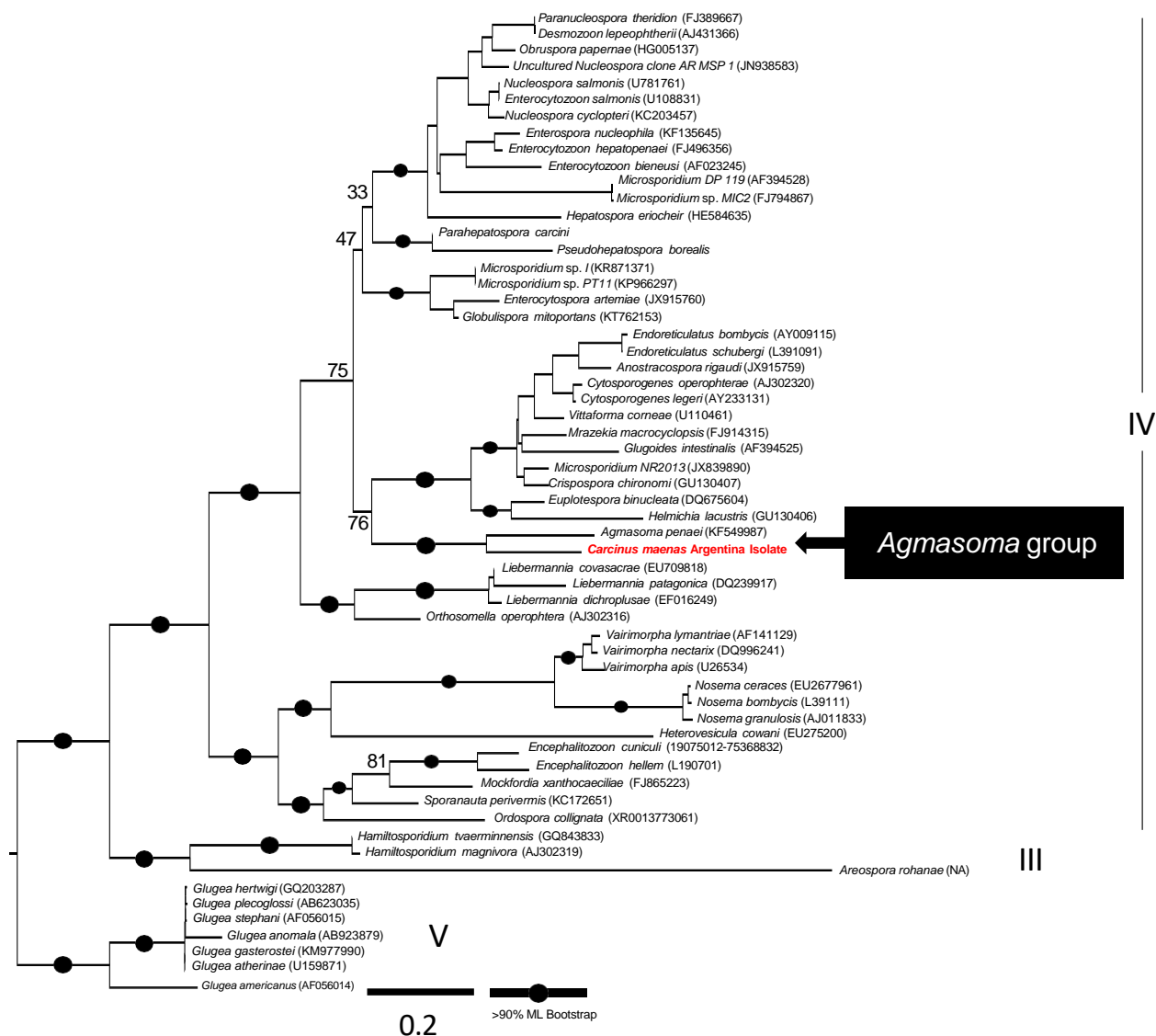
El análisis de las secuencias de los dos cangrejos reveló una similitud del 100% con *Ca. aestuarii* y *Ca. maenas*. Los análisis metagenómicos revelaron secuencias relacionadas a 46 bacterias y cinco eucariotas, incluyendo al microsporidio *Agmasoma penaei* (Microsporidia) (Tabla 4).

La secuencia del marcador molecular 16S del parásito microsporidiano mostró una similitud genética del 83% con *Agmasoma penaei* y menor porcentaje con otros microsporidios. El análisis filogenético de estas secuencias reveló que nuestro aislado de microsporidio forma parte del CLADO IV (Figura 15). A partir de estos resultados, el nuevo parásito fue nombrado informalmente *Agmasoma carcini*. n. sp (con dos variantes: *Ac* var. *aestuarii* y *Ac* var. *maenas*) en un trabajo realizado recientemente por Bojko et al. (2023).

**Tabla 4.** Resultados del microbioma obtenido por metagenómica.

Blastn Hit	Cobertura (%)	Similitud (%)	E-value	Acceso
Clon Bacteriano	61	92	0.0	KF771567
Clon Bacteriano	100	94	7e-89	JQ240786
Clon Bacteriano	99	90	0.0	KX158563
Gammaproteobacteria	100	99	2e-134	AJ240917
Clon Bacteriano	100	99	2e-124	KJ590592
<i>Phaeobacter piscinae</i>	100	100	4e-59	MT525294
Clon Bacteriano	100	99	3e-173	JX391653
Clon Bacteriano	100	94	2e-126	KU828109
Clon Bacteriano	100	100	7e-124	HQ727500
Gammaproteobacteria	42	91	6e-171	KJ364606
Clon Bacteriano	80	84	2e-158	JN430130
Clon Bacteriano	63	85	2e-146	EU686591
<i>Halobacteriovorax</i> sp.	77	82	3e-144	CP027772
Clon Bacteriano	100	100	4e-172	KJ491764
Oceanospirillaceae	100	99	0.0	KX014259
<i>Lewinella cohaerens</i>	100	99	4e-173	MK589118
<i>Monaibacterium</i> sp.	100	99	3e-148	MT570011
Acidimicrobidae	99	95	0.0	JX193407
<i>Bacteriovorax</i> sp.	99	98	3e-153	AY580409
<i>Arcobacter</i> sp.	100	99	0.0	HM057667
<i>Cyclobacterium</i> sp.	100	99	0.0	MK587639
Clon Bacteriano	82	93	2e-177	JN431585
Alphaproteobacteria	100	95	0.0	AB981876
<i>Cobetia</i> sp.	100	100	6e-171	MK079507
Alphaproteobacteria	100	97	0.0	DQ269054
Alphaproteobacteria	97	90	0.0	GQ349335
<i>Aestuariibaculum scopimerae</i>	100	92	0.0	JQ195940
Clon Bacteriano	100	98	0.0	JQ287053
<i>Colwellia</i> sp.	99	99	4e-178	KM873069
Saprospiraceae	100	96	3e-148	KU691078
Clon Bacteriano	64	81	2e-160	DQ009279
Clon Bacteriano	99	99	0.0	AB476265
<i>Hellea balneolensis</i>	100	94	0.0	NR_042992
<i>Phaeobacter porticola</i>	100	99	0.0	CP016364
<i>Maribacter litoralis</i>	100	95	5e-147	MG456900
Gammaproteobacteria	100	99	0.0	EF215779

<i>Maribacter</i> sp.	99	99	0.0	MK967024
Clon Bacteriano	60	99	0.0	JX017083
<i>Neptuniibacter</i> sp.	100	99	1e-131	LC465499
<i>Winogradskyella</i> sp.	100	99	0.0	KY770285
Deltaproteobacterium	98	99	0.0	AF468246
<i>Alteromonas</i> sp.	100	100	3e-163	MN099610
Clon Bacteriano	100	100	6e-176	LC002976
Alphaproteobacterium	100	99	0.0	JN092219
<i>Winogradskyella sediminis</i>	100	97	0.0	NR_151891
<i>Roseovarius gaetbuli</i>	100	99	4e-75	NR_134163
<i>Cyclobacterium marinum</i>	100	98	0.0	CP002955
Clon Bacteriano	99	98	0.0	HM126984
Clon Bacteriano	100	98	0.0	HQ326351
Clon Bacteriano	100	89	0.0	JQ287227
Clon Bacteriano	61	95	0.0	JN480742
<i>Sulfitobacter indolifex</i>	100	100	8e-103	NR_027563
Clon Bacteriano	100	93	0.0	EF645939
<i>Fuerstia marisgermanicae</i>	100	95	0.0	KX757851
Deltaproteobacteria	100	99	0.0	LC171303
Clon Bacteriano	100	98	3e-158	JQ199759
Clon Bacteriano	100	99	0.0	KY235960
Clon Bacteriano	100	99	9e-154	HM437553
Clon Bacteriano	100	97	0.0	KP410319
<i>Squamamoeba japonica</i>	98	98	0.0	JN638032
<i>Agmasoma penaei</i>	85	81	0.0	KF549987
<i>Choanoeca perplexa</i>	100	99	2e-62	KT757437
<i>Filasterea</i> sp.	100	93	8e-62	MT611055
<i>Incisomonas marina</i>	62	99	0.0	JN848814



**Figura 15.** Análisis de máxima verosimilitud de la secuencia de microsporidios disponibles en GenBank, donde el nuevo aislado (*Agmasoma carcini*) se agrupa en el caldo IV, dentro del grupo *Agmasoma* y muy cercano a *Agmasoma penaei*. El género *Glugea* se encuentra fuera del grupo. Los puntos negros en las ramas indican un soporte de más del 90 % en el bootstrap.

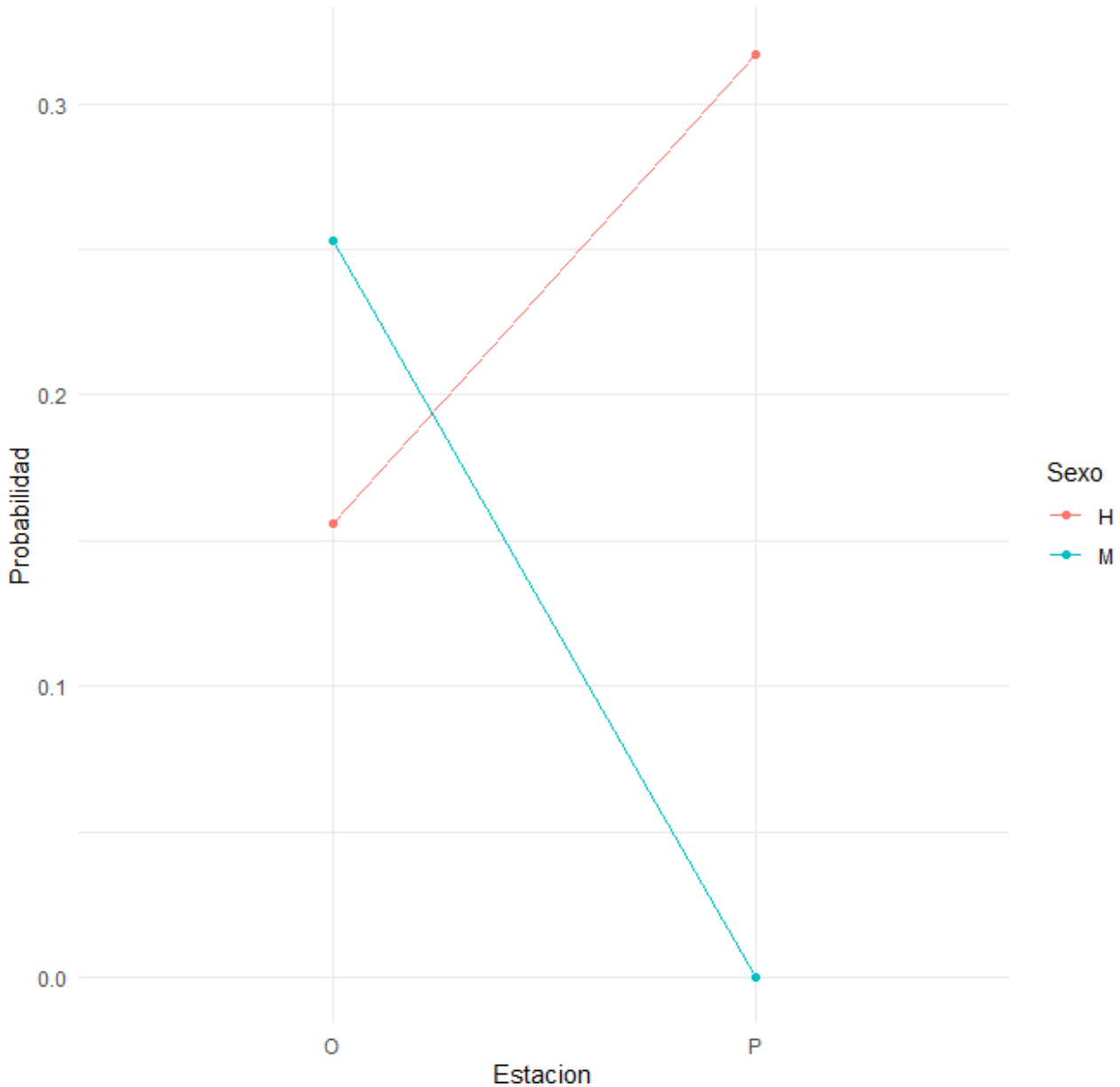
Análisis estadísticos

**Virus:** los análisis sobre la presencia/ausencia de partículas virales en cangrejos de Puerto Madryn indican que la prevalencia no exhibió variaciones significativas en relación con ninguna de las variables consideradas en el estudio (talla, sexo, estación). El modelo nulo, representado por  $Virus \sim 1$  que refleja la ausencia de variables predictoras, mostró el mejor ajuste a los datos, sugiriendo que la presencia de virus no está influenciada por ninguna de las variables exploradas. En Bahía Camarones, el

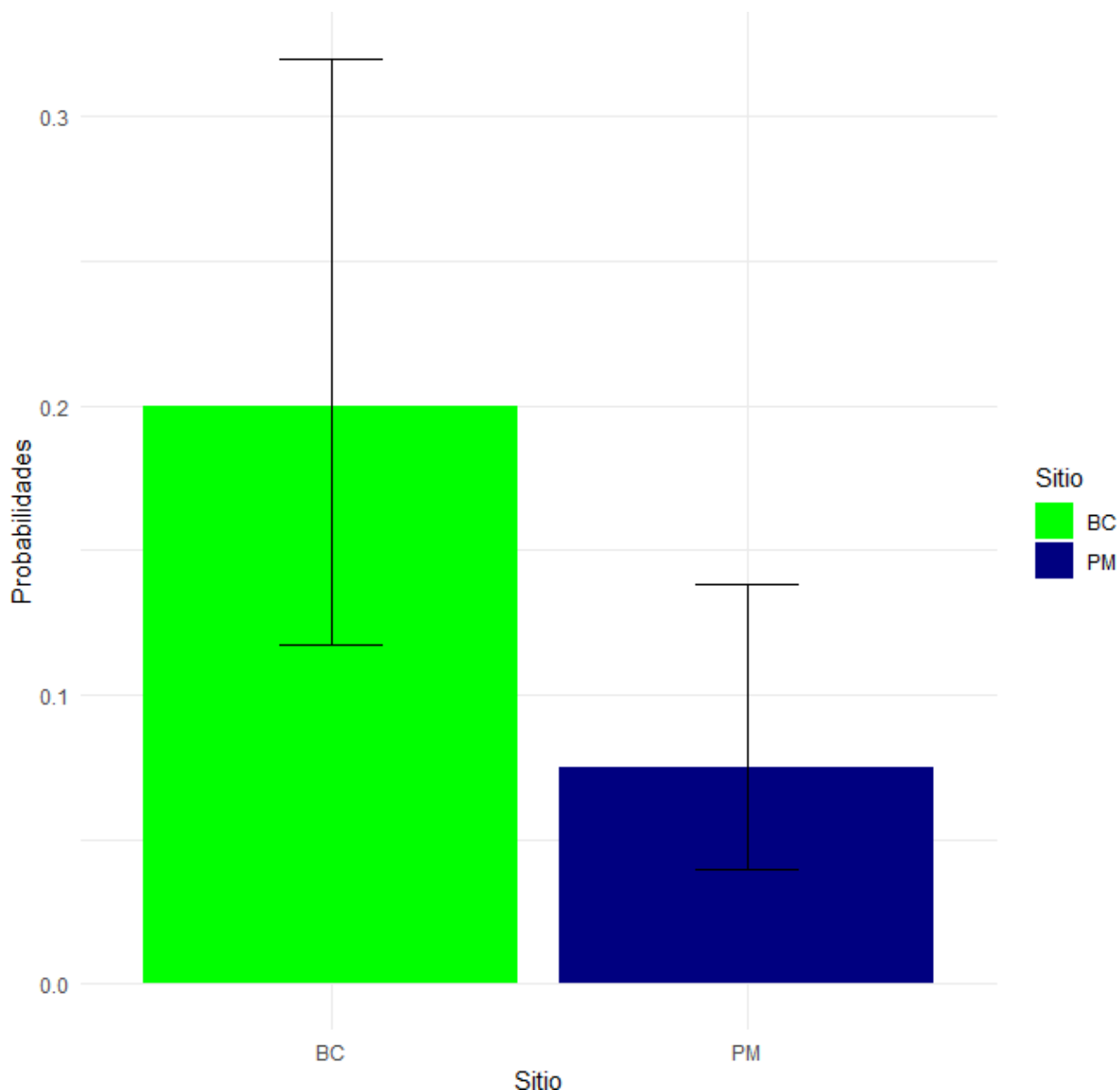
mejor modelo seleccionado para explicar la variación en la prevalencia de infecciones similares a virus incluyó la variable talla (Virus ~ Talla), pero no reveló diferencias significativas.

**Ciliados:** los análisis sobre las infecciones por ciliados en Puerto Madryn indican que la prevalencia no exhibió variaciones significativas en relación con ninguna de las variables consideradas en el estudio (talla, sexo, estación). En Bahía Camarones, el modelo más adecuado para explicar la variación en la prevalencia incluyó las variables sexo, estación y la interacción entre sexo y estación (Ciliados ~ Sexo + Estación + Sexo: Estación). Se observaron diferencias significativas en la interacción entre sexo y estación ( $\chi^2 = 7,0268$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,00803$ ), evidenciándose que las hembras presentan mayor infección en primavera y los machos en otoño (Figura 16). Sin embargo, ni la variable sexo ( $\chi^2 = 1,4819$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,22348$ ) ni la variable estación ( $\chi^2 = 0,0067$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,93479$ ) mostraron diferencias significativas de forma individual. Las prevalencias difieren significativamente entre los cangrejos de cada sitio ( $\chi^2 = 5,7024$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,01694$ ), siendo mayor en Bahía Camarones (Figura 17).

No se halló correlación significativa entre las intensidades de infección y la talla de los individuos ( $p = 0,165$ ,  $\rho = 0,1039$ ).



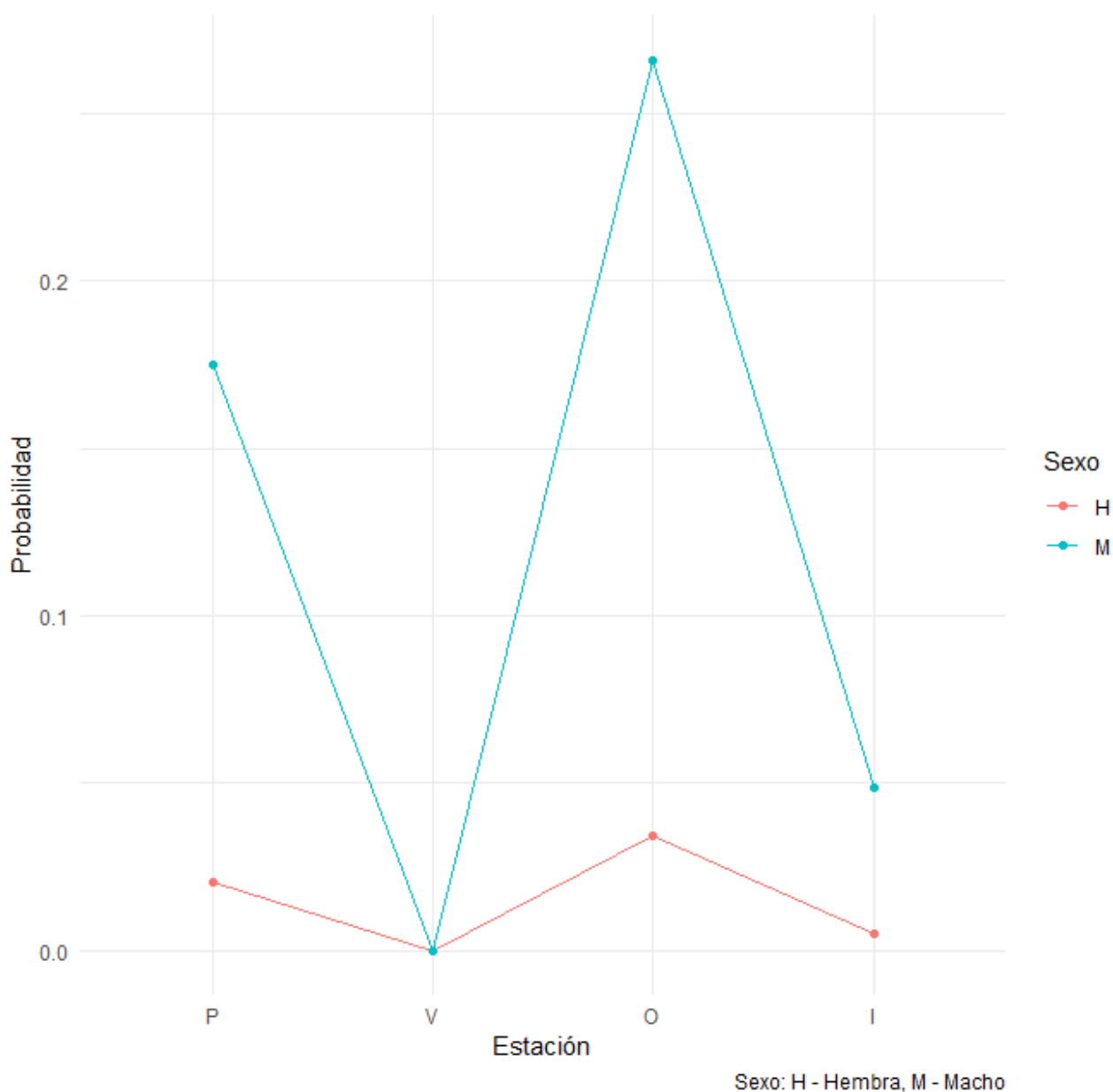
**Figura 16.** Gráficos de línea que muestra las probabilidades estimadas de ocurrencia de ciliados en el cangrejo verde *Carcinus* spp. en Bahía Camarones, para cada estación, desglosadas por sexo. Cada línea representa un sexo diferente: Hembras (H) y machos (M). Las estaciones están representadas en el eje horizontal, mientras que las probabilidades están en el eje vertical. Las líneas muestran la tendencia de cambio en las probabilidades a través de las estaciones para cada sexo.



**Figura 17.** Probabilidades de ciliados entre los sitios 'BC' (Bahía Camarones) y 'PM' (Puerto Madryn). Los datos representan la probabilidad de cierta condición en los sitios de muestreo. Las barras muestran las medias y las líneas de error muestran el intervalo de confianza del 95%.

***Haplosporidium* sp.:** en los ejemplares recolectados en Puerto Madryn, el análisis de la prevalencia de *Haplosporidium* sp. reveló que el mejor modelo, seleccionado por su menor AIC, incluyó las variables de sexo, estación y talla ( $Haplosporidium \sim \text{Sexo} + \text{Estación} + \text{Talla}$ ). Se encontraron diferencias significativas en las variables de sexo ( $\chi^2 = 6,0527$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,01388$ ) y estación ( $\chi^2 = 8,5916$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,03524$ ). Específicamente, se observó que los machos presentaron una mayor prevalencia que las hembras (Figura 18). Además, los cangrejos en otoño mostraron

mayor infección, seguida por las estaciones de primavera y verano (Figura 18). No se observaron diferencias significativas en relación con la talla.



**Figura 18.** Gráficos de línea que muestra las probabilidades estimadas de ocurrencia de *Haplosporidium* sp. en el cangrejo verde *Carcinus* spp. en Puerto Madryn, para cada estación, desglosadas por sexo. Cada línea representa un sexo diferente: hembras (H) y machos (M). Las estaciones están representadas en el eje horizontal, mientras que las probabilidades están en el eje vertical. Las líneas muestran la tendencia de cambio en las probabilidades a través de las estaciones para cada sexo.

## Discusión

En este capítulo se investiga por primera vez la parasitofauna del cangrejo verde invasor en las costas patagónicas. A través de técnicas histológicas y metagenómica, se revela que *Carcinus* spp. forma un complejo patobioma que abarca desde virus, bacterias y microorganismos eucariotas hasta un metazoo, similar a un nemertino del género *Carcinonemertes*, siendo este último, el único parásito helminto hallado. Se evidencia el hallazgo de una nueva especie de microsporidio, *A. carcini*, y la presencia de un posible *Haplosporidium* sp. Los análisis moleculares revelan la presencia de ambas especies de cangrejo verde *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii* en la región patagónica. Estos hallazgos resaltan la complejidad de las interacciones simbiote-hospedador en la invasión de *Carcinus* spp., ofreciendo una visión detallada de la diversidad y posibles impactos de los simbioses en el ecosistema local.

A diferencia de lo observado en el presente trabajo de tesis, en el Atlántico norte, tanto en poblaciones introducidas como originarias, se han observado infecciones prevalentes causadas por un digeneo trematodo, *M. similis* (Torchin et al. 2001; Blakeslee et al. 2009; Bojko et al. 2018), así como por el acantocéfalo *P. botulus* (Torchin et al. 2001; Bojko et al. 2018). En Patagonia, se han registrado infecciones por helmintos en cangrejos nativos, específicamente *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*. Estas infecciones son causadas por trematodos de la familia Microphallidae, incluyendo a *Maritrema madrynense* Díaz & Cremonte, 2010 (Díaz & Cremonte 2010; Bagnato et al. 2015), así como larvas de acantocéfalos de la familia Polymorphidae, *Profilicollis chasmagnathi* (Holcman-Spector, Mañé-Garzón & Dei-Cas, 1977) (Rodríguez et al. 2017, Lorenti et al. 2018). Estos hallazgos sugieren que la reciente invasión de *Carcinus* spp. en las costas patagónicas, considerada como una invasión contemporánea (con menos de 30 años desde su establecimiento) (Barnard et al. 2022), podría aún no haber evolucionado hasta el establecimiento de una asociación hospedador-parásito. Investigaciones previas han demostrado que la historia coevolutiva y el tiempo transcurrido desde la introducción pueden influir en la prevalencia y abundancia de las infecciones en los hospedadores (Torchin et al. 2001, 2002; Kołodziej-Sobocińska et al. 2018; Barnard et al. 2022).

Un nemertino similar a *Carcinonemertes* sp. se halló en un ejemplar de *Carcinus* spp., identificado a partir de cortes histológicos. Este hallazgo concuerda con el reporte previo de Cordone et al. (2022) en la misma zona de estudio, por metabarcoding. Se ha

observado en áreas introducidas y originarias que *Ca. maenas* puede ser parasitado por nemertinos del género *Carcinonemertes* (Crothers 1968, Torchin et al. 1996). Sin embargo, es importante destacar que las especies parasitarias que afectan a las poblaciones del lugar de origen difieren de las invasoras. En su área de distribución de origen, *Ca. maenas* se ve afectado por *Carcinonemertes carcinophila* (Kölliker, 1845) (Crothers 1968; Comely & Ansell 1989), mientras que en áreas donde ha sido introducido, como en América del Norte, se ha registrado la presencia de *Carcinonemertes epialti* Coe, 1902 (Torchin et al. 1996). Se ha observado que esta última especie está presente en los huevos de muchas especies de cangrejos nativos de América del Norte, y probablemente desempeña un papel en el control de la fecundidad, tanto en las poblaciones originarias como en las invasoras de *Ca. maenas* (Torchin et al. 1996). Los nemertinos que parasitan huevos de crustáceos decápodos presentan una variedad de complejidades en su ciclo de vida adaptadas a los patrones de incubación de sus hospedadores (Kuris 1993). *Carcinonemertes carcinophila* completa su ciclo de vida dentro de la masa ovígera del hospedador, migrando desde las branquias hacia los huevos (Kuris & Wickham 1987; Comely & Ansell 1989). En el presente trabajo se observó en los cortes histológicos la ubicación del nemertino en el hemocele por debajo de la epidermis, sin comprometer ningún tejido. La ausencia de observaciones de nemertinos en las branquias y la masa ovígera podría sugerir que se trata de un ejemplar en tránsito hacia la masa ovígera, o que hubiera permanecido en esa ubicación luego de la muda. Esta última posibilidad se respalda con informes que indican la transferencia de nemertinos durante la muda de los cangrejos (Wickham et al. 1984). Por ejemplo, el nemertino *Carcinonemertes pinnotheridophila* McDermott & Gibson, 1993 se aloja en las cámaras branquiales, desde donde puede moverse hacia la sutura ecdisial antes del cambio de exoesqueleto (McDermott & Gibson 1993). Además, Santos & Bueno (2001) registraron nemertinos *C. carcinophila* en el cangrejo *Callinectes danae* Smith, 1869 en la etapa de post-muda, lo que respalda esta posibilidad. Si las intensidades y prevalencias del nemertino aumentaran con el tiempo, se podría sugerir que el nemertino está ejerciendo una presión significativa sobre *Carcinus* spp., lo que podría resultar en una reducción del impacto general causado por estos cangrejos en las costas patagónicas. En consecuencia, resulta imperativo llevar a cabo análisis moleculares pertinentes para determinar su identidad taxonómica. Esto permitirá

evaluar si corresponde a las especies previamente reportadas en *Ca. maenas* o si, por el contrario, se trata de un parásito nativo de las costas patagónicas.

Las inclusiones similares a virus que infectan a los hemocitos alrededor del hepatopáncreas se asemejan a un virus reportado en *Ca. maenas*; el virus en forma de bastón descrito como RV-CM o virus B en poblaciones originarias e invasoras (Bazin et al. 1974; Johnson 1988). Sin embargo, los datos sobre la prevalencia de estos virus en entornos naturales son escasos (Bonami & Zhang et al. 2011). Sólo se encontró RV-CV de *Ca. maenas* en 1 de 29 cangrejos muestreados en EE. UU (Johnson 1988). Se han clasificado varios virus de cangrejos como posibles miembros de la familia Nimaviridae, siendo el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) la única especie confirmada en esta familia. El virus como el RV-CM y el virus tau, reportados en *Carcinus* spp. comparten similitudes morfológicas con el WSSV, sugiriendo que podrían ser formas ancestrales de este último (Bazin et al. 1974; Johnson 1976;1988; Mari & Bonami 1986; Pappalardo et al. 1986; Bonami & Zhang 2011; Kon et al. 2011; Bateman & Stentiford 2017). En el presente estudio se observó una mayor prevalencia en otoño y verano (23%), pero no hubo diferencias significativas entre estas estaciones. Estudios previos indican que la temperatura del agua ejerce una influencia significativa en la tasa de replicación del WSSV (Moser et al. 2012). Con el cambio climático y el consiguiente calentamiento de los océanos, se plantea la posibilidad de que este aumento de temperatura facilite la propagación del virus entre las poblaciones de *Carcinus* spp. en las costas patagónicas (Altizer et al. 2013). Todos los crustáceos decápodos se consideran susceptibles al WSSV (Stentiford et al. 2009; OIE 2019). *Carcinus maenas* muestra una susceptibilidad limitada con una replicación a niveles bajos en los tejidos y una mortalidad también baja (Bateman et al. 2012); los sobrevivientes de la infección posiblemente se convierten en portadores del virus (Kanchanaphum et al. 1998; Hameed et al. 2000). Dado que el virus detectado en el presente estudio presenta similitudes morfológicas con WSSV por lo observado por histología, se requieren estudios adicionales para investigar, tanto la filogenia de estos patógenos, como la susceptibilidad potencial de los crustáceos nativos en Argentina, como *Palaemon macrodactylus* Rathbun 1902, *Artemesia longinaris* Spence Bate 1888 y *Cy. angulatus*, que se han reportado infectados por WSSV (Martorelli et al. 2010; 2012).

Las infecciones bacterianas en los cangrejos son bastante comunes; sin embargo, sorprendentemente pocos agentes causales han sido identificados (Shields et al. 2015).

Los microorganismos procariotas que infectan el epitelio del hepatopáncreas en los ejemplares del presente estudio, presentan similitudes con una enfermedad conocida como síndrome de la hemolinfa lechosa en poblaciones en el lugar de origen de *Ca. maenas* (Eddy et al. 2007), y que posteriormente se encontró en poblaciones invasoras (Bojko et al. 2018). Esta enfermedad, causada por organismos similares a Rickettsias (RLO's), presenta una prevalencia elevada hacia finales del verano y principios del otoño (aproximadamente del 25%), pero es muy baja en otros momentos del año (menos del 1%) (Eddy et al. 2007). En el presente estudio se observaron estas infecciones sólo en verano, en concordancia con los trabajos mencionados. Es importante destacar que la temperatura ha sido identificada como un factor que afecta directa e indirectamente los sistemas inmunológicos de los crustáceos, lo que puede resultar en una inmunosupresión y un aumento en la prevalencia y gravedad de las enfermedades (Eddy et al. 2007). Además, Chisholm & Smith (1994) revelaron que la temperatura reduce la actividad antibacteriana de los hemocitos de *Ca. maenas*.

Los ciliados son frecuentes en la cutícula, apéndices y branquias de los crustáceos (Shields et al. 2015). En este estudio se observaron ciliados entre las lamelas branquiales en cangrejos de ambos sitios. En Bahía Camarones, la prevalencia de infección fue más alta, mostrando un patrón estacional significativo. Durante la primavera, las hembras presentaron una mayor prevalencia, mientras que durante el otoño los machos fueron los más afectados. Este patrón estacional podría estar relacionado al proceso de ecdisis, dado que se sabe que la carga de epibiontes está correlacionada con la duración de la intermuda (Carman & Dobbs 1997). En Patagonia, los machos del cangrejo verde *Ca. maenas* mudan en noviembre y las hembras durante el apareamiento en enero/febrero (Vinuesa 2007), lo que podría explicar estas diferencias en las prevalencias de infección, dado que se encuentran en periodo de muda terminal; dónde los cangrejos alcanzan su fase final de crecimiento, lo que podría explicar por qué estos individuos muestran mayores prevalencias de infección, siendo previsible que los periodos de muda más largos o incluso el estado de muda terminal acumulan las mayores cargas parasitarias (Carman & Dobbs 1997). A pesar de que hay estudios que respaldan la existencia de una correlación entre la intensidad infección de ciliados y el tamaño del cuerpo del cangrejo (Haefner & Spacher 1985), en el presente estudio no se observó tal correlación. Los ciliados hallados en el presente estudio comparten similitudes con los ciliados "peritricos", ya que frecuentemente se agrupan

en colonias entre las lamelas branquiales de sus hospedadores y por la presencia de un tallo (Shields et al. 2015). Aunque suelen ser comensales inofensivos, las infecciones pueden interferir con las funciones vitales del hospedador, como la respiración, la excreción, la alimentación y la motilidad, si ocurren con alta intensidad. (Visse 2007; Jones et al. 2016). El cangrejo *Ovalipes stephensoni* Williams, 1976 presentó una prevalencia del 94,5%, pero el área branquial afectada no era lo suficientemente extensa como para impedir la respiración; por lo tanto, no se consideró un patógeno importante (Haefner & Spacher 1985). En nuestro estudio, las prevalencias de infección no superaron el 20%, y no se observaron alteraciones evidentes en las branquias, por lo que por el momento podríamos considerarlos como simbiosis inofensivos. Sin embargo, es importante monitorear su presencia, ya que infecciones en alta intensidad podrían afectar la supervivencia del hospedador y aumentar su nivel de estrés.

El presente estudio confirma la presencia de una nueva especie de microsporidio. La especie es similar y cercana filogenéticamente a *A. penaei*, un patógeno prolífico y dañino de especies de camarones peneidos acuícolas, *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Clotilde-Ba & Toguebaye, 2001). El análisis filogenético muestra que esta especie se agrupa junto a *A. penaei*; sin embargo, su similitud genética es del 83%, por debajo del 90%, lo que sugiere que el nuevo miembro podría pertenecer al género *Agmasoma*. En un estudio realizado en colaboración con Bojko et al. (2023), a partir de los datos del presente estudio, se concluyó que este parásito microsporidio es un miembro basal de Enterocytozoonida, confirmando la relación con *A. penaei*, y una única especie de microsporidio, informalmente denominada *A. carcini*, con dos variantes *Ac. var. aestuarii* y *Ac. var. maenas*, ya que se detectó infectando a ambas especies de cangrejo verde, *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii*. Bojko et al. (2017) informaron sobre la detección de una nueva infección por un microsporidio, *P. carcini*, en poblaciones invasoras de *Ca. maenas* en las costas de Canadá. Aunque *P. carcini* también infecta el hepatopáncreas, se observó que *A. carcini* se desarrolla en el hemocele que rodea los túbulos, mientras que *P. carcini* lo hace en el citoplasma de las células del epitelio. A pesar de su presencia, ninguno de estos parásitos parece causar patologías visibles a nivel histológico. En contraste, *Abelspora portucalensis* Azevedo, 1987, un microsporidio hallado en poblaciones originarias de *Ca. maenas*, conduce a la formación de "quistes blancos" en la superficie del hepatopáncreas (Azevedo 1987). Tanto *A. carcini* del presente estudio como *P. carcini* se encuentran en prevalencias muy bajas en las poblaciones invasoras,

en contraste con la alta prevalencia de *A. portucalensis* en las poblaciones originarias de *Ca. maenas*. Esta discrepancia sugiere la posibilidad de que el parásito haya sido adquirido en las costas patagónicas mediante la transferencia desde un hospedador simpátrico nativo desconocido, lo que podría estar relacionado con la baja prevalencia de la infección. Esta baja prevalencia podría indicar que *A. carcini* es difícil de detectar, posiblemente debido a que posea un alto potencial patogénico, lo que podría resultar en una mortalidad rápida en los individuos infectados. En este estudio se proporcionan datos patológicos adicionales para este parásito que infecta a *Carcinus* spp., proporcionando un elemento más clásico de descripción sistemática, pero aun careciendo de información a nivel de ultraestructura y desarrollo. La evaluación de cómo la infección afecta la salud de los individuos y su posible contribución a la mortalidad podría ayudar a determinar si *A. carcini* tiene el potencial de ser utilizado como agente de control biológico para *Carcinus* spp. en la costa patagónica.

En las poblaciones de *Carcinus* spp. analizadas en este estudio, se registraron infecciones similares a las causadas por *Haplosporidium*, con prevalencias superiores a las registradas en *Ca. maenas* en sus áreas de distribución de origen. En estos últimos, se ha documentado la presencia de infecciones provocadas por *Haplosporidium littoralis* Stentiford, Bateman, Stokes & Carnegie 2013 *Haplosporidium carcini* Davies, Bass, Ward, Batista, Malkin, Thomas, Bateman, Feist, Coates and Rowley, 2020 y *Haplosporidium cranc* Davies, Bass, Ward, Batista, Malkin, Thomas, Bateman, Feist, Coates and Rowley, 2020 (Stentiford et al. 2013; Davies et al. 2020a). Plasmodios uninucleados y multinucleados de *H. littoralis* infectaron los hemocitos, células del tejido conectivo y fagocitos con una prevalencia del 7,6% (Stentiford et al. 2013). Tanto *H. carcini* como *H. cranc* han sido observados en la hemolinfa, branquias y hepatopáncreas, aunque ambos con prevalencias de infección bajas, inferiores al 2% (Davies et al. 2020a). En concordancia, las infecciones observadas en nuestro estudio afectaron los mismos órganos y tejidos, principalmente se observaron plasmodios alrededor de los túbulos y en el epitelio del hepatopáncreas. Las prevalencias halladas en este trabajo fueron máximas en otoño (20%) y los machos resultaron los más infectados. Se ha registrado previamente un papel potencial para la estacionalidad en infecciones causadas por algunos *Haplosporidium*, por ejemplo; *Haplosporidium echinogammari* Urrutia, Bass, Ward, Ross, Bojko, Marigomez & Feist, 2019 que infecta al anfípodo *Echinogammarus marinus* (Leach, 1816) (Urrutia et al. 2019), y Di Giorgio

et al. (2014), quienes registraron una tendencia en la estacionalidad de la infección por *Haplosporidium patagon* Ituarte, Bagnato, Siddall & Cremonte 2014 que parasita a los gasterópodos *Siphonaria lessonii* Blainville, 1827 y *Siphonaria lateralis* A. Gould, 1846, con un máximo en la prevalencia en otoño e invierno en la costa rocosa litoral en Puerto Deseado, Santa Cruz. Esta mayor susceptibilidad de los machos podría estar relacionada con su comportamiento más activo y exploratorio, que los lleva a tener una mayor exposición a posibles fuentes de infección (Hunter & Naylor 1993; Warman et al. 1993; Aagaard et al. 1995; Aagaard 1996). Para identificar taxonómicamente a este parásito y evaluar si se trata de una especie ya descrita en el Atlántico Norte o de la especie nativa *H. patagon*, es imprescindible llevar a cabo estudios moleculares. La identificación precisa mediante técnicas moleculares nos permitirá establecer su relación con otras especies conocidas. En caso de confirmar su identidad, este hallazgo representaría el primer registro de *Haplosporidium* en poblaciones invasoras de *Carcinus* spp. en la región.

Se ha descubierto un nuevo grupo de parásitos que se clasifican dentro del orden propuesto Mikrocytida (Hartikainen et al. 2014). Estos parásitos comparten algunas características con su grupo emparentado, los Haplosporidia (Burki et al. 2013; Abbott et al. 2014). En el presente estudio se hallaron microcélulas similares a *Mikrocytos* en el epitelio del hepatopáncreas, en el hemocele y en el corazón de *Carcinus* spp., con prevalencias del 30%. Se ha informado que estos parásitos causan infecciones potencialmente graves en cangrejos juveniles *Cancer pagurus* Linnaeus, 1758, en varios sitios intermareales en todo el Reino Unido alcanzando prevalencias del 38% (Hartikainen et al. 2014, Edwards et al. 2019). Sin embargo, no se ha hallado esta infección en otros decápodos que comparten el mismo hábitat intermareal con dicho cangrejo, como el cangrejo verde *Ca. maenas* (Edwards et al. 2019). Este grupo de parásitos en general ha recibido poca atención, excepto por la especie *Mikrocytos mackini* Farley, Wolf & Elston 1988 que es responsable de la enfermedad conocida como la "enfermedad de la isla Denman" en las ostras del Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Farley et al. 1988). Es importante destacar que *Carcinus* spp. podría actuar como reservorio y hospedador alternativo, ya que este podría estar presente en las ostras invasoras *C. gigas*, presentes en la costa patagónica (Orensanz et al. 2002), tal como se ha reportado que infecta a las ostras del Pacífico (Farley et al. 1988). Se necesita realizar análisis moleculares para su identificación taxonómica, así como una

investigación exhaustiva sobre el rango de hospedadores y la distribución de estos nuevos parásitos para evaluar el riesgo para las poblaciones de invertebrados nativos en nuestras costas y determinar si este parásito fue introducido junto con *Carcinus* spp. Si se confirma la presencia de este patógeno a través de análisis moleculares, sería el primer informe de su presencia en *Carcinus* spp. en la naturaleza.

En el presente estudio, las poblaciones de *Carcinus* spp. en Bahía Camarones, exhiben una talla mayor en comparación con las de Puerto Madryn. Este hallazgo parece estar en concordancia con la regla de tamaño-temperatura para organismos ectotérmicos, que sugiere que los individuos más grandes se encuentran en las regiones más frías de su rango de distribución (Kelley et al. 2011). Estudios adicionales han corroborado que el tamaño corporal de los adultos de *Ca. maenas* muestran una correlación negativa con la temperatura ambiental en diversas regiones, tanto en sus áreas de origen como áreas donde ha invadido (noreste del Pacífico) (Kelley et al. 2015). Aunque la relación entre temperatura y tamaño no está completamente establecida en nuestra población de estudio, la mayor talla observada en Bahía Camarones, podría atribuirse a su latitud más austral y a las temperaturas más frías.

A pesar de esta riqueza de microparásitos, la invasión de los cangrejos persiste. Los cangrejos verdes continúan expandiendo su rango de distribución hacia el norte de la Patagonia, con registros en la costa del golfo San Matías, provincia de Río Negro (Malvé et al. 2020). Es crucial ahora considerar si alguno de los simbioses identificados en este estudio podría representar un riesgo para las especies nativas de interés pesquero y para otras especies autóctonas.

El cangrejo verde del Mediterráneo, conocido como *Ca. aestuarii*, está emergiendo como un invasor de alcance global, tal como se indicó en el estudio reciente de Lee et al. (2020). Con los datos obtenidos en el presente estudio, podemos afirmar que la población invasora de *Carcinus* spp. en la costa patagónica está conformada por ambas especies, *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii*, y además la presencia de híbridos según Cordone et al. (2022). Sin embargo, siguen existiendo numerosos interrogantes respecto a la ruta de introducción de estas “especies” y la potencial hibridación entre las dos especies de *Carcinus* spp.

La confirmación de la presencia de *Ca. aestuarii* en las costas argentinas representa una oportunidad excepcional para recopilar información relacionada con aspectos patológicos y la dinámica de esta invasión críptica. Es relevante comprender

con mayor precisión la densidad y distribución de ambas especies, así como evaluar el riesgo potencial de transmisión e introducción de patógenos, lo cual se detalla en el “Capítulo IV”. Si bien existe una cantidad considerable de datos concernientes a los patógenos que afectan a *Ca. maenas*, como se documenta en la investigación de Bojko et al. (2021), los estudios que aborden el perfil de patógenos en *Ca. aestuarii* son más limitados.

Algunos descubrimientos, como las observaciones de posibles virus, requieren estudios más sensibles y precisos para confirmar su presencia. Se necesitan estudios adicionales, como análisis moleculares y observaciones en microscopio electrónico de transmisión (MET) para identificación taxonómica y poder evaluar el origen de los simbiontes que se observaron y sus efectos patológicos que pueden causar en sus hospedadores.

## CAPÍTULO II

### Simbiontes de los cangrejos nativos: *Cyrtograpsus altimanus*, *Cy. angulatus* y *Ovalipes trimaculatus* en el litoral patagónico



Foto: Nicolás Battini

## Introducción

En los ecosistemas intermareales rocosos, los cangrejos, junto con depredadores como estrellas de mar, caracoles perforadores y peces, desempeñan un papel fundamental al ejercer un control jerárquico en la estructura de la comunidad (Hidalgo et al. 2007). Este control se manifiesta desde la cima de la cadena trófica hacia abajo, influyendo en las tasas de sucesión (McCook & Chapman 1993), patrones locales en la diversidad de especies (Paine 1966), densidades y distribuciones de presas (Paine 1966; Yamada & Boulding 1996), e interacciones competitivas (Paine 1974).

Los cangrejos nativos de las costas patagónicas del género *Cyrtograpsus*, también conocidos como cangrejos de las rocas *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, pertenecen a la familia Varunidae, son exclusivos de ambientes marinos y desempeñan un papel crucial en los ecosistemas costeros (Rojas 2014). *Cyrtograpsus altimanus* es, en promedio, el depredador más abundante en el intermareal rocoso, junto con *Cy. angulatus*, aunque este en menor proporción (Hidalgo et al. 2007). Su importancia reside en su contribución a las redes tróficas de niveles inferiores. Alteraciones en estos niveles pueden tener impactos significativos en elementos de niveles tróficos superiores, incluyendo los recursos utilizados en actividades pesqueras (Rojas 2014).

La distribución geográfica de *Cy. altimanus* abarca desde Río Grande en Brasil (32°23' S; 52°19' O), con poca frecuencia en la provincia de Buenos Aires y más abundante en la Patagonia, hasta las costas de Chubut (45°51' S; 45°51' O) (Boschi 1964; 1979; Boschi & Gavio 2005). Estos cangrejos, de pequeño tamaño, habitan el intermareal rocoso de las costas e invaden los estuarios cuando existen hábitats apropiados, tales como sustratos duros con espacios donde ocultarse o utilizando fondos duros artificiales o naturales donde pueda esconderse (Spivak 1997). Su distribución en muchos casos está solapada con *Cy. angulatus*, con quien cohabita (Rojas 2014).

La distribución de *Cy. angulatus* abarca las costas de Sudamérica Austral, desde Río de Janeiro en Brasil (22°54' S; 43°11' O) hasta Puerto Deseado en Argentina (47°44' S; 65°51' O) en el Atlántico (Boschi 1964); desde la isla San Lorenzo (12°4' S; 77°14' O) en Perú hasta Talcahuano en Chile (37°1' S; 73°9' O) (Retamal 1981). Son más abundantes debajo de rocas depositadas en sustrato fangoso, donde encuentran refugio en madrigueras excavadas en el sedimento (Iribarne et al. 2003).

El cangrejo nadador *O. trimaculatus*, perteneciente a la familia Portunidae, es una especie nativa explotada comercialmente por una pesquería artesanal en Patagonia (de la Barra et al. 2019; Sánchez-Carnero et al. 2022). Los portúnidos han sido identificados como especies clave (Silliman & Bertness 2002), desempeñándose como depredadores activos, con gran influencia en las tramas tróficas en las que participan (Hines et al. 1990; Clark et al. 1999). El cangrejo nadador, al igual que otras especies de portúnidos, es un carnívoro generalista (de la Barra et al. 2018). Es una especie cosmopolita, su distribución geográfica es amplia y discontinua. La misma abarca áreas del Océano Pacífico Sudeste, Atlántico Sudoeste, África del Sur y Océano Índico. En Sudamérica la especie se distribuye en latitudes medias (25° - 45°), que van desde Bahía Independencia (Perú) hasta Canal Trinidad en Chile en la costa pacífica y desde San Pablo (Brasil) hasta el Golfo San Jorge en la costa atlántica (Spivak 1997, Vinuesa 2005) sin embargo, a pesar de su buena proyección comercial, existe escasa información biológica. Habita fondos arenosos y poco profundos; en el litoral de Argentina se presenta en toda la región costera de la provincia de Buenos Aires, desde la Bahía Samborombón hasta el litoral de la provincia del Chubut (Stephenson & Rees 1968; Olivier et al. 1966).

Los crustáceos han tenido un rol importante en la transmisión de parásitos, ya que muchas especies actúan como primeros o segundos hospedadores intermediarios de endoparásitos, contribuyendo tanto al desarrollo del parásito como en su dispersión. Numerosas especies de digeneos, cestodos, nematodos y acantocéfalos poseen al menos un estadio larval que requiere de un crustáceo (Marcogliese 1995). En el ambiente marino, los crustáceos son depredados por un vertebrado (pez, ave o mamífero) donde el endoparásito se desarrolla hasta alcanzar el estado adulto (Rohde 2005). Sin embargo, a pesar de la importancia que cumplen los crustáceos en el ciclo de vida de los endoparásitos marinos, en Argentina, los estudios son escasos.

Los parásitos trematodos digeneos son comunes en los ecosistemas intermareales, donde su ciclo de vida complejo generalmente involucra a varios miembros de la comunidad animal (Mouritsen & Poulin 2002). Los cangrejos se infectan con digeneos cuando las cercarias, después de abandonar a los caracoles, a quienes utilizan como primeros hospedadores intermediarios, se enquistan como metacercarias en la cavidad corporal o en el hepatopáncreas (Díaz & Cremonte 2010). En el caso de los

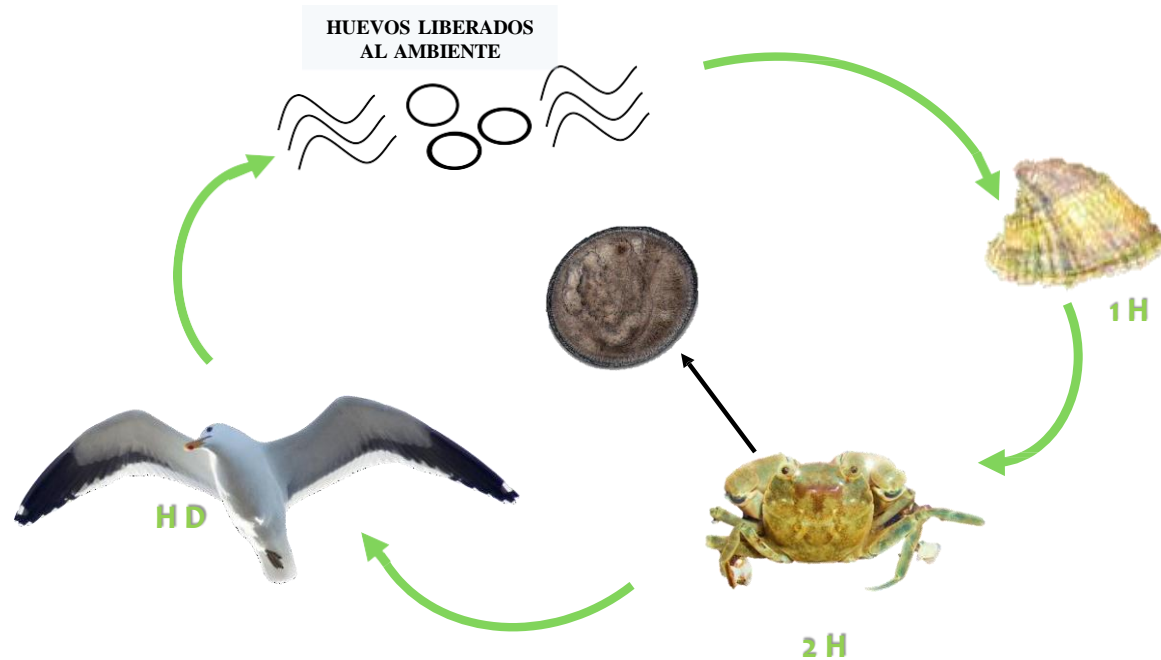
acantocéfalos, los cangrejos ingieren los huevos del parásito (que contienen la larva acantor) depositados en las heces de las aves. Después de la ingestión, los huevos eclosionan y las larvas alcanzan la cavidad corporal del cangrejo, donde se desarrollan hasta la etapa acantela y, finalmente, hasta la etapa cistacanto. Las metacercarias y cistacantos necesitan ser ingeridos por un hospedador definitivo adecuado para completar sus ciclos de vida (Díaz & Cremonte 2010; Lorenti et al. 2018)

Además de su potencial para causar daños en el hospedador, incluyendo mortalidad dependiendo de su intensidad, los parásitos que se transmiten mediante la red trófica a menudo inducen cambios en el comportamiento del hospedador para maximizar las tasas de transmisión (e.g., manipulación parasitaria, facilitación) (Mouritsen & Poulin 2002).

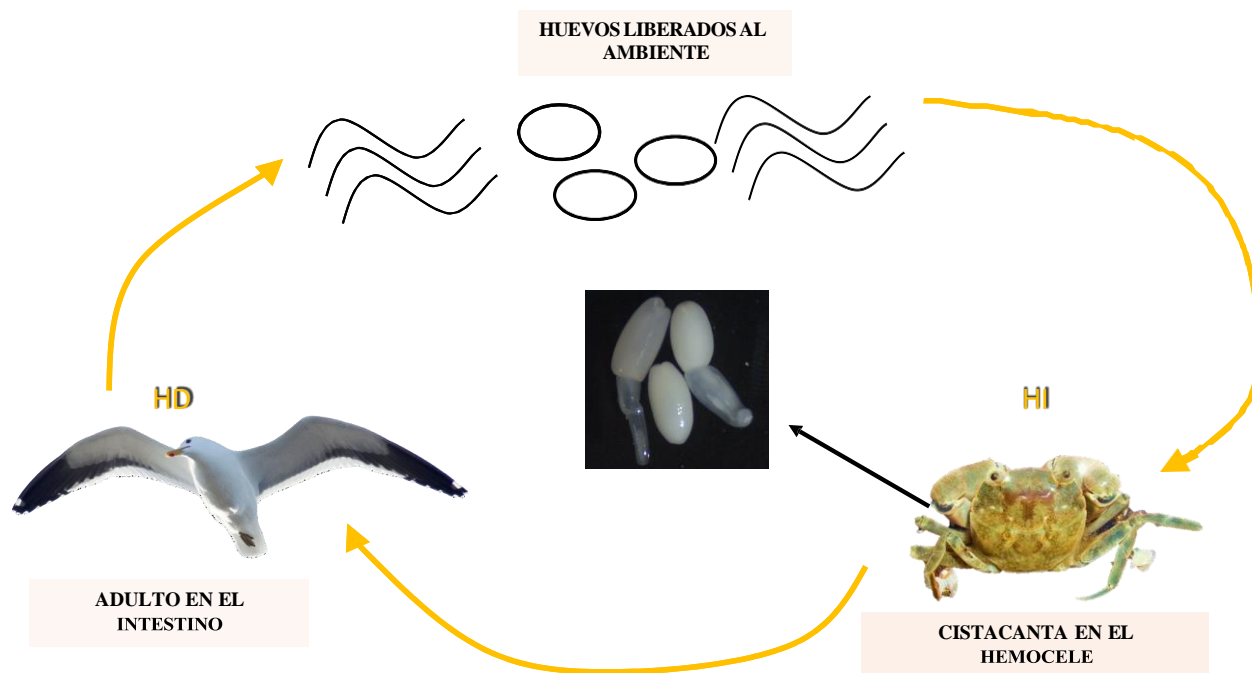
El cangrejo *Cy. altimanus* ha sido reportado como segundo hospedador intermediario en el ciclo de vida del trematode *M. madrynense* (Digenea: Microphallidae), donde la fuente de infección es el gasterópodo *S. lessonii* (Díaz & Cremonte 2010; Bagnato et al. 2015) (Figura 19). En el caso de *Cy. angulatus*, ha sido reportado como segundo hospedador intermediario en el ciclo de vida del trematode *Maritrema orensense* Cremonte & Martorelli, 1998 y *M. bonaerense* Etchegoin & Martorelli, 1997 (Digenea: Microphallidae) donde la fuente de infección es el gasterópodo *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835), en el estuario de Bahía Blanca (Alda et al. 2011b, 2013).

Larvas cistacantas del acantocéfalo *P. chasmagnathi* (Polymorphidae) fueron reportadas utilizando a los cangrejos como hospedadores intermediarios a lo largo de las costas del Atlántico Sudoeste. En Patagonia, ha sido hallado en *Cy. altimanus* (Rodríguez et al. 2017) y el adulto parasita a la gaviota cocinera *Larus dominicanus* Lichtenstein, 1823, la cual actúa como hospedador definitivo (Lorenti et al. 2018) (Figura 20).

Ciclo de vida del trematode *Maritrema madrynense*



**Figura 19.** Ciclo de vida del trematode *Maritrema madrynense*. HD, Hospedador definitivo, gaviota cocinera *Larus dominicanus*; 1H, primer hospedador intermediario, gasterópodo *Siphonaria lessonii*; 2H, segundo hospedador intermediario, cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*. En el medio del ciclo obsérvese una metacercaria enquistada de *M. madrynense*.

Ciclo de vida del acantocéfalo *Profilicollis chasmagnathi*

**Figura 20.** Ciclo de vida del acantocéfalo *Profilicollis chasmagnathi*. HD, hospedador definitivo, gaviota cocinera *Larus dominicanus*; HI, hospedador intermediario, cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*. En el medio del ciclo, obsérvese larvas de acantocéfalo *P. chasmagnathi*.

Los cangrejos nativos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas costeros donde habitan y, sin embargo, se sabe muy poco sobre los parásitos y patógenos que pueden afectarlos. En particular, no existen estudios parasitológicos de *O. trimaculatus* a pesar de poseer relevancia económica y social por ser un recurso pesquero, además ser un depredador muy voraz (de la Barra 2018).

### Objetivos

- Determinar los simbioses presentes en las poblaciones de los cangrejos nativos *Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*.
- Cuantificar la prevalencia y la intensidad media de los simbioses hallados en las tres especies de cangrejos.

## Materiales y métodos

### Muestreo, procesamiento y examinación de macrosimbiontes

El área de estudio y metodología empleada es la misma para las tres especies bajo estudio y fue descrita en “Metodología general”. En la costa de Puerto Madryn se llevaron a cabo muestreos estacionales durante los años 2018 y 2019, abarcando un total de 140 especímenes de *Cy. altimanus*, 83 de *Cy. angulatus* y 95 de *O. trimaculatus*. En Bahía Camarones, los muestreos se realizaron en la primavera de 2018 y en el otoño de 2019, obteniendo un total de 26 especímenes de *Cy. altimanus*.

### Procesamiento histológico

Aproximadamente entre ocho y 20 ejemplares de *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* y todos los ejemplares de *O. trimaculatus* fueron procesados mediante histología clásica, siguiendo el protocolo que se describe en “Metodología General”.

### Observación al microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las larvas de acantocéfalo *P. chasmagnathi* halladas fueron procesadas como se describe en “Metodología General” para ser observadas en el MEB.

## Resultados

### Datos morfométricos de los hospedadores

En la primavera, tanto los cangrejos *Cy. altimanus* de Puerto Madryn como aquellos colectados en Bahía Camarones exhibieron un tamaño promedio de 16 y 15 mm, respectivamente (Tablas 5 y 6). El tamaño promedio de *Cy. angulatus* en Puerto Madryn fue de 27 mm en primavera (Tabla 5). Para el cangrejo nadador *O. trimaculatus* el tamaño promedio fue mayor en invierno, alcanzando los 87 mm (Tabla 5).

La distribución por sexos (hembra/macho) en *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* varió, tanto entre estaciones del año, como entre diferentes sitios (Tabla 5 y 6). En *O. trimaculatus* la proporción de sexos se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media, entre paréntesis, de los simbiontes registrados en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus altimanus*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Ovalipes trimaculatus* recolectados estacionalmente en Puerto Madryn, costa del Atlántico sudoeste. La tabla se divide en dos partes: la primera muestra los resultados de los simbiontes hallados mediante microscopio estereoscópico (lupa); la segunda parte presenta los resultados de la submuestra procesada para histología y observada bajo microscopio óptico. Todos los ejemplares de *Ovalipes trimaculatus* observados bajo lupa fueron procesados para histología. Por lo tanto, los datos morfológicos y la proporción de sexos se presentan en la primera sección de la tabla.

Especie de cangrejo	<i>Cyrtograpsus altimanus</i>				<i>Cyrtograpsus angulatus</i>				<i>Ovalipes trimaculatus</i>				
	Estación	primavera	verano	otoño	invierno	primavera	verano	otoño	invierno	primavera	verano	otoño	invierno
<b>N total (microscopio estereoscópico)</b>		50	30	30	30	23	27	22	11	20	25	29	21
AC y rango (mm)		16 (6-25)	13 (11-17)	12 (10-16)	13 (11-18)	27 (22-35)	24(17-31)	24 (17-32)	23 (12-38)	83 (71-96)	86 (74-117)	81 (67-104)	87 (71-108)
Proporción de sexos (hembra/macho)		8/42	13/17	11/19	7/23	18/5	7/20	10/22	7/4	17/3	9/16	17/12	17/4
Trematode <i>Maritrema madrynense</i>		16 (3,5)	33 (2)	30 (3,3)	27 (2,2)	17 (2)	30 (1,8)	27 (1,3)	27 (1,6)	-	-	-	-
Acantocéfalo <i>Profilicollis chasmagnathi</i>		8 (0,75)	13 (2)	20 (1,8)	23 (1,6)	13 (5,6)	22 (1,6)	23 (2,4)	18 (1,5)	-	-	-	-
<b>N Histología</b>		20	15	15	15	20	15	10	8	20	25	29	21
AC y rango (mm)		16 (15-20)	13 (12-17)	13 (10-16)	13 (11-16)	27 (22-31)	24 (18-30)	27 (17-30)	24 (14-28)	-	-	-	-
Proporción sexual (hembra/macho)		1/19	5/10	4/11	5/10	15/5	5/10	4/6	5/3	-	-	-	-
Virus-like		0	0	0	0	0	0	0	0	10	4	0	10
Microorganismos procarióticos		0	20	0	0	0	27	20	12	30	36	17	5
Bacterias filamentosas		100	100	100	100	85	87	80	80	0	0	0	0
Levaduras-like		0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	4
Ciliados		20 (39)	13 (31,5)	60 (3,3)	53 (2,2)	25 (22)	53 (59,7)	20 (6,5)	50 (43,7)	35 (47)	56 (29,6)	45 (39,5)	0
<i>Haplosporidium</i> sp.		10	13	7	0	40	0	0	0	0	0	0	0
Apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i>		5	0	6	0	0	0	0	25	0	0	0	0
Acantocéfalo <i>P. chasmagnathi</i>		5 (1)	0	0	0	0	0	20 (1)	0	0	0	0	0
Nemertino <i>Carcinonemertes</i> sp.		0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	5

**Tabla 6.** Ancho promedio (AC) y rango del caparazón y proporción de sexos de los cangrejos y prevalencia (%) e intensidad media entre paréntesis de los simbioses registrados en el cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*, recolectados en primavera y otoño en Bahía Camarones, costa del Atlántico sudoeste. La tabla se divide en dos partes: la primera muestra los resultados de los simbioses hallados mediante microscopio estereoscópico (lupa); la segunda parte presenta los resultados de la submuestra procesada para histología y observada bajo microscopio óptico.

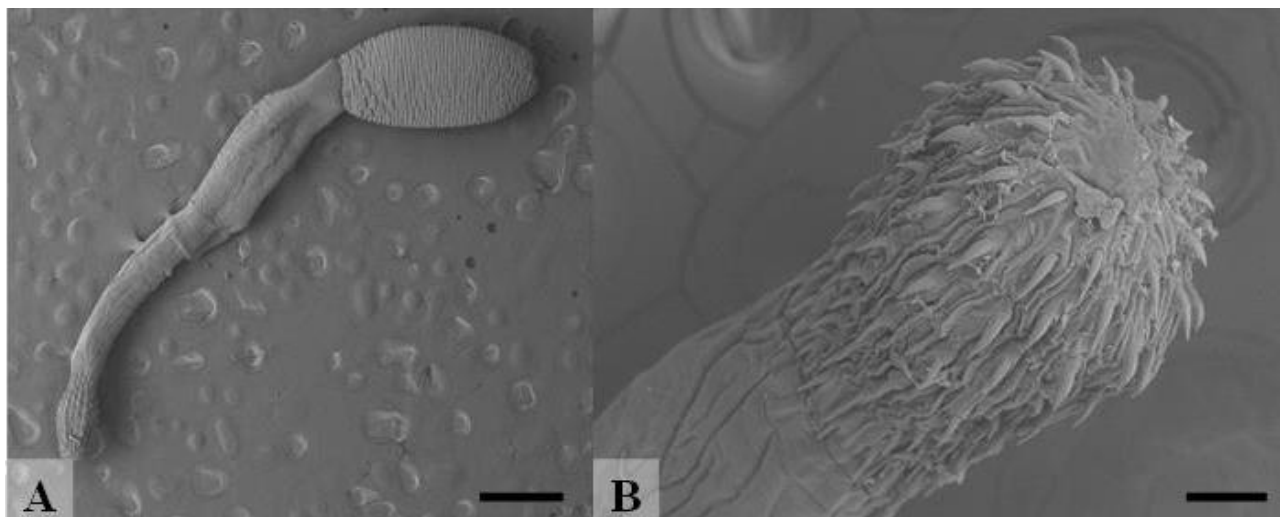
Especie de cangrejo	<i>Cyrtograpsus altimanus</i>	
	primavera	otoño
<b>N total</b>	20	6
AC y rango (mm)	15 (11-18)	14 (9-16)
Proporción sexual (hembra/macho)	7/13	3/3
<b>N total (microscopio estereoscópico)</b>		
Trematode <i>Maritrema madrynense</i>	35 (2,3)	16 (1)
Acantocéfalo <i>Profilicollis chasmagnathi</i>	0	33 (2)
<b>N Histología</b>		
Virus-like	0	0
Microorganismos procarióticos	0	16
Ciliados	10 (7)	0
<i>Haplosporidium</i> sp.	5	0
<i>P. chasmagnathi</i>	0	20

### Prevalencias de simbioses

Se hallaron metacercarias del trematodo *M. madrynense* en los cangrejos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, ubicadas dentro del hemocele en todos los casos analizados. En Puerto Madryn, las mayores prevalencias se registraron en verano (33%) con una intensidad media de 2 en *Cy. altimanus* y del 30% y una intensidad media de 1,8 en *Cy. angulatus* (Tabla 5). Por otro lado, en Bahía Camarones, la prevalencia de *M. madrynense* en *Cy. altimanus* fue del 35%, con una intensidad media de 2,3 en primavera (Tabla 6).

Se observaron larvas cistacantas de *P. chasmagnathi* (Figuras 21 A y B) en el celoma de *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*. Estas larvas rodeaban el intestino medio y, en ocasiones, se encontraban encapsuladas. En lo que respecta a *Cy. altimanus*, se identificó una mayor prevalencia de este parásito en invierno, en un 23% y una intensidad media de 1,6 en Puerto Madryn (Tabla 5) y un 33% e intensidad media de 2 en otoño en Bahía Camarones (Tablas 6). Por otro lado, en el caso de *Cy. angulatus*, se

registró la mayor prevalencia en el otoño, alcanzando un 23% y una intensidad media de 2,4 (Tabla 5).



**Figura 21.** A) Larva cistacanta del acantocéfalo *Profilicollis chasmagnathi* observadas al microscopio electrónico de barrido en el cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*. B) Detalle de las espinas de la probóscide. Barras de escala: 500  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B).

El cangrejo nadador *O. trimaculatus* se encontró libre de epibiontes y macrosimbiontes.

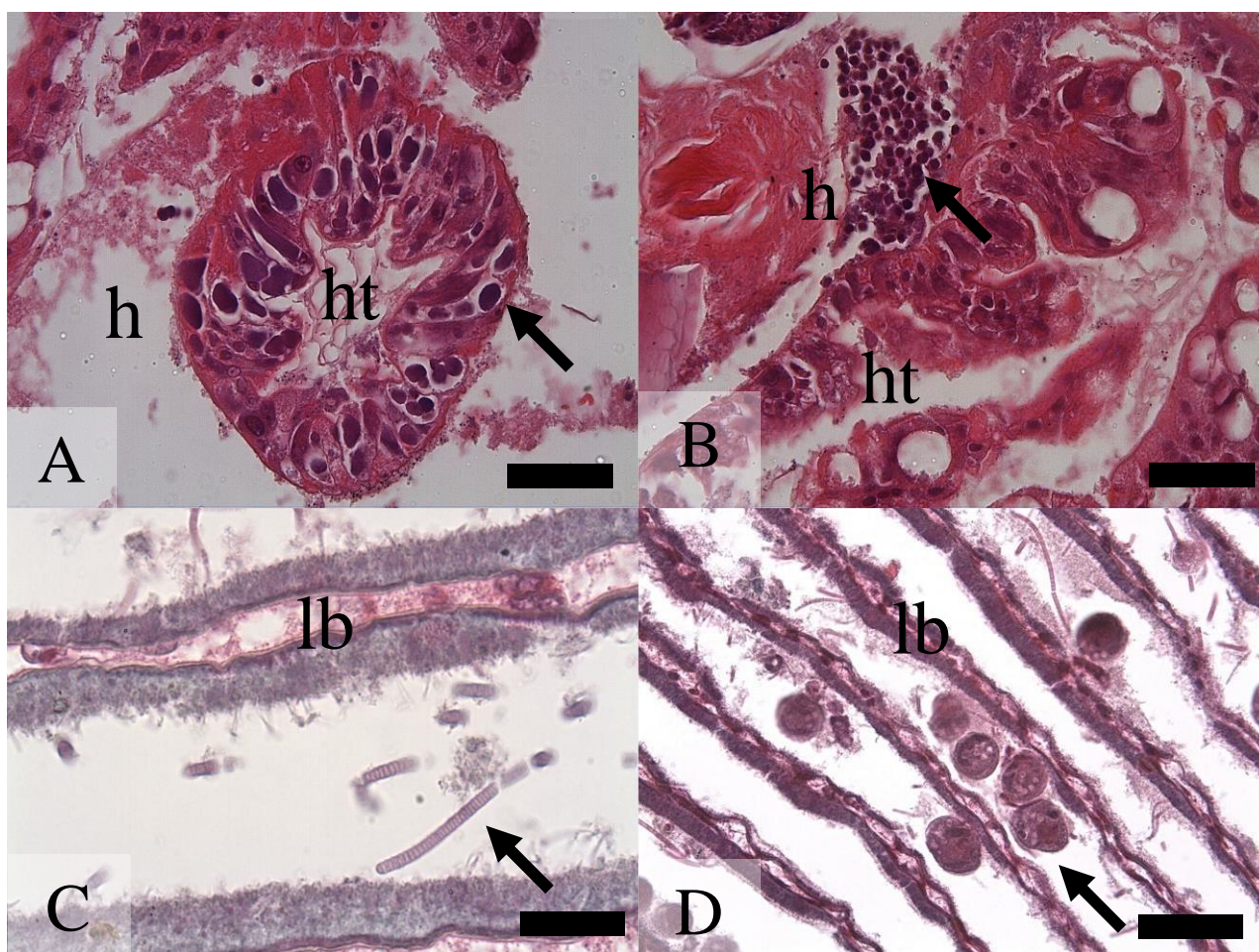
#### Histopatología e índices parasitarios

- *Cyrtograpsus altimanus*

Se identificaron cinco simbioses por histología (Tablas 5 y 6). Se observaron colonias intracelulares basófilas de microorganismos procariontes infectando los hemocitos y el epitelio del hepatopáncreas en cangrejos provenientes de Puerto Madryn, con una prevalencia del 20% en verano (Figura 22 A; Tabla 5). Estas colonias también se observaron alrededor de los túbulos del hepatopáncreas en otoño en cangrejos procedentes de Bahía Camarones, con una prevalencia del 16% (Figura 22 B). En las branquias de todos los ejemplares, tanto de Puerto Madryn como de Bahía Camarones, se observaron bacterias filamentosas (Figura 22 C).

Se observó la presencia de ciliados en las branquias (Figuras 22 D) en cangrejos recolectados en ambos sitios, Puerto Madryn y Bahía Camarones. La prevalencia de ciliados en los cangrejos provenientes de Puerto Madryn alcanzó el 60% y se observó en

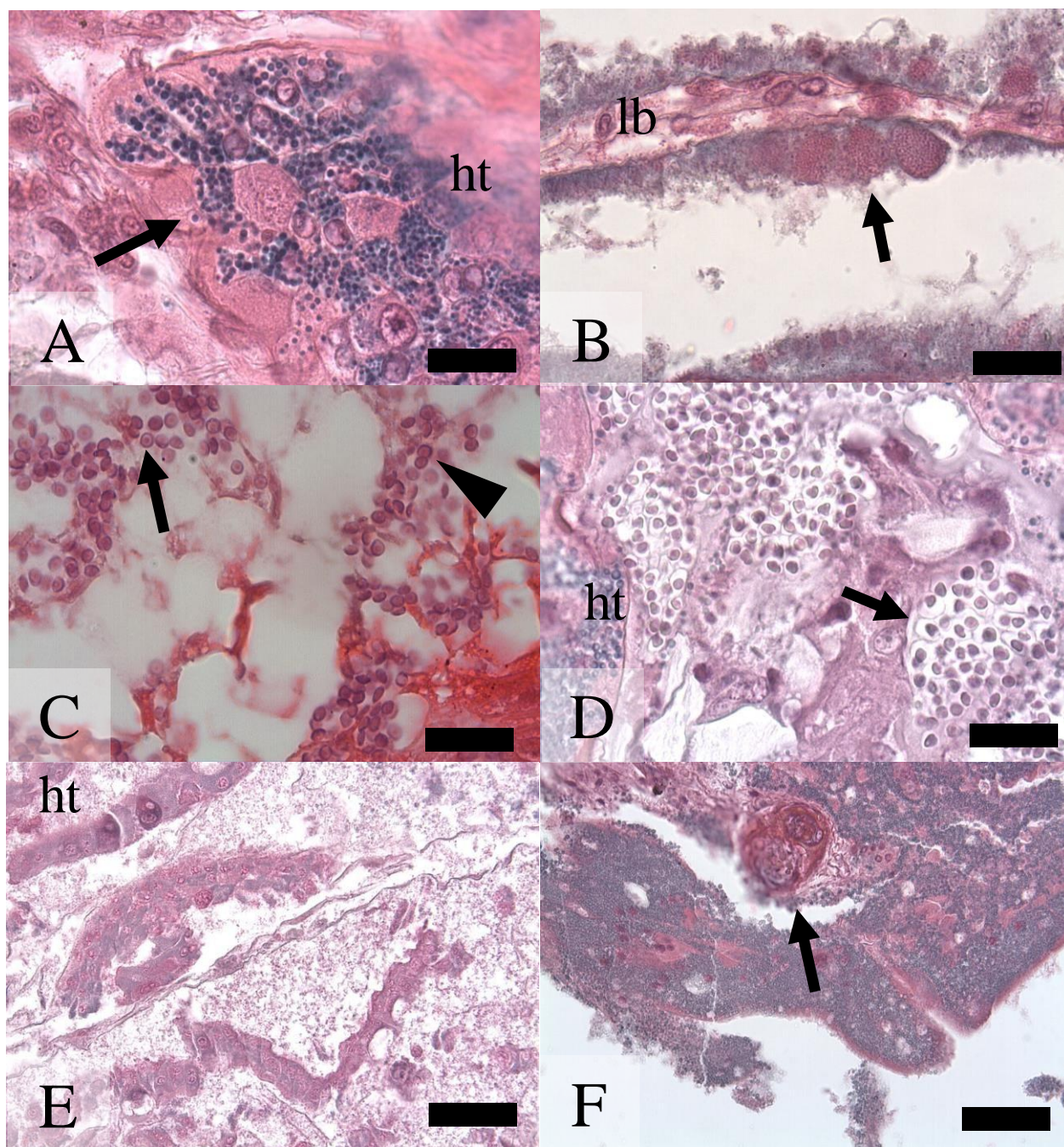
todas las estaciones, a diferencia de los cangrejos recolectados en Bahía Camarones, donde no superó el 10% y solo se observaron en primavera (Tablas 5 y 6).



**Figura 22.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*. A) Túbulos hepatopancreáticos (ht) infectados con colonias intracelulares basófilas de microorganismos procariotas (flecha). B) Colonias intracelulares basófilas de microorganismos procariotas (flecha) en el hemocele (h) alrededor de los túbulos del hepatopáncreas (ht). C) Bacterias filamentosas (flecha) observadas con alta magnificación en las lamelas branquiales (lb). D) Ciliados (flecha) con un micronúcleo y varios micronúcleos, ubicados en la cámara branquial, entre las lamelas (lb). Barras de escalas: 50 µm (A, B, C) y 20 µm (D).

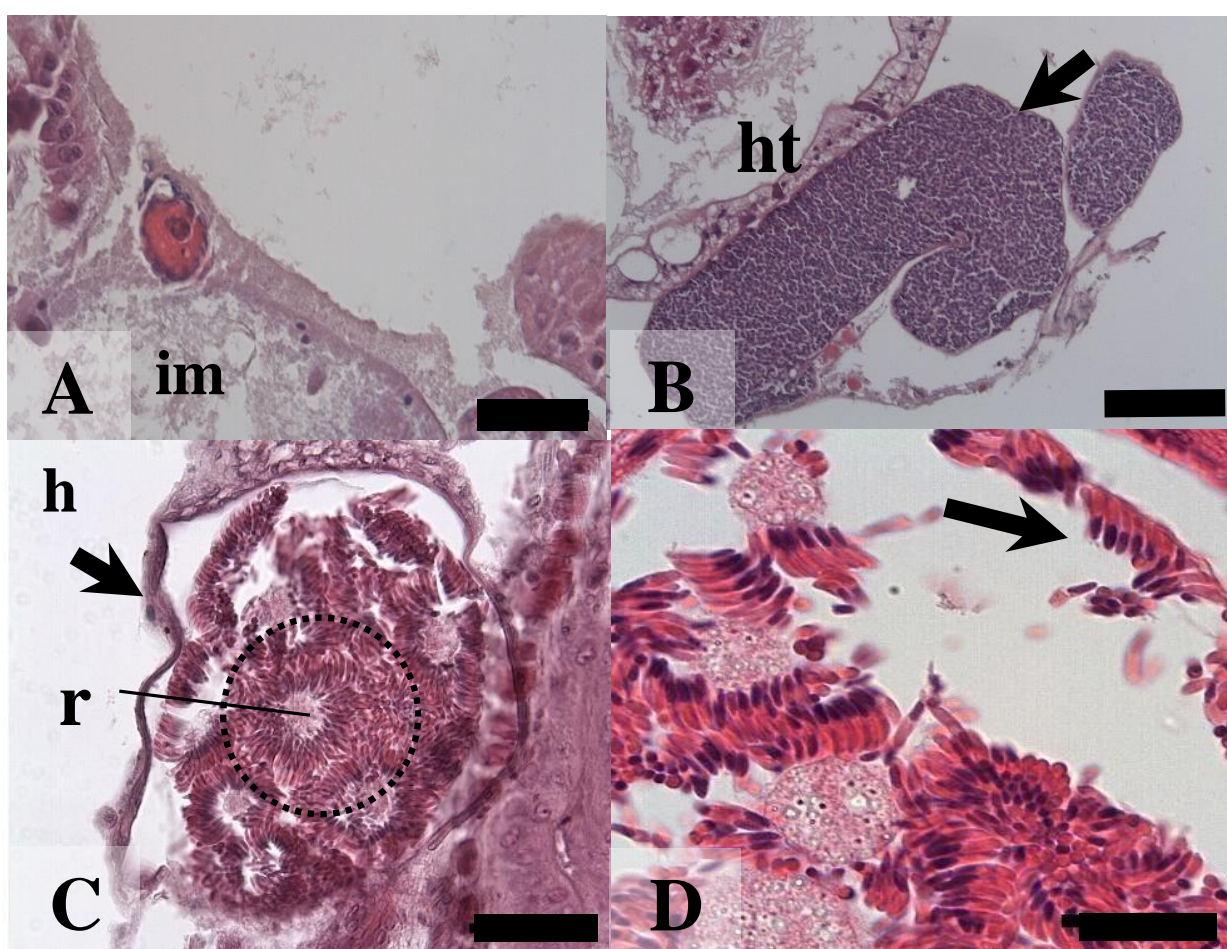
Se identificaron diversas formas unicelulares, plasmodios, esporas en desarrollo y maduras, las cuales presentaron similitudes con *Haplosporidium* sp. (Figura 23). Las células del epitelio del hepatopáncreas exhibían una marcada hipertrofia, albergando abundantes células unicelulares con características similares a las de *Haplosporidium* sp. (Figura 23 A). Asimismo, se detectó la propagación del parásito hacia las branquias, donde se observaron plasmodios multinucleados en proximidad a las lamelas

branquiales (Figura 23 B). En algunos individuos se observaron esporoblastos en el hemocele del hepatopáncreas; los mismos contenían un endoplasma bien definido que albergaba un cuerpo basófilo (Figura 23 C). Esporas maduras fueron observadas en el tejido conectivo del corazón y alrededor de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 23 D). Las infecciones a menudo estaban acompañadas de lisis del tejido; esta afección se observó principalmente en el hepatopáncreas (Figura 23 E). Además, se observó una respuesta del hospedador con la formación de nódulos melanizados y agregaciones de hemocitos (Figura 23 F). Este parásito fue detectado en cangrejos de Puerto Madryn durante las estaciones de primavera, verano y otoño, siendo más prevalente en verano (13%) (Tabla 5). En Bahía Camarones su presencia se limitó a la primavera, con una prevalencia del 5% (Tabla 6).



**Figura 23.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus* con infección similar a *Haplosporidium* sp. A) Epitelio del hepatopáncreas (ht) con células unicelulares (flecha). B) Plasmodios multinucleados (flecha) adyacentes a las lamelas branquiales (lb). C) Esporoblastos conteniendo un cuerpo basófilo (flecha); obsérvese la pared del endoplasma bien definida (punta de flecha). D) Esporas maduras (flecha) en el hemocele del hepatopáncreas (ht). E) Hepatopáncreas (ht) con evidencia de lisis. F) Granuloma melanizado (flecha) en el hepatopáncreas. Barras de escala: 20  $\mu$ m (A, B, C D, E) y 50  $\mu$ m (F).

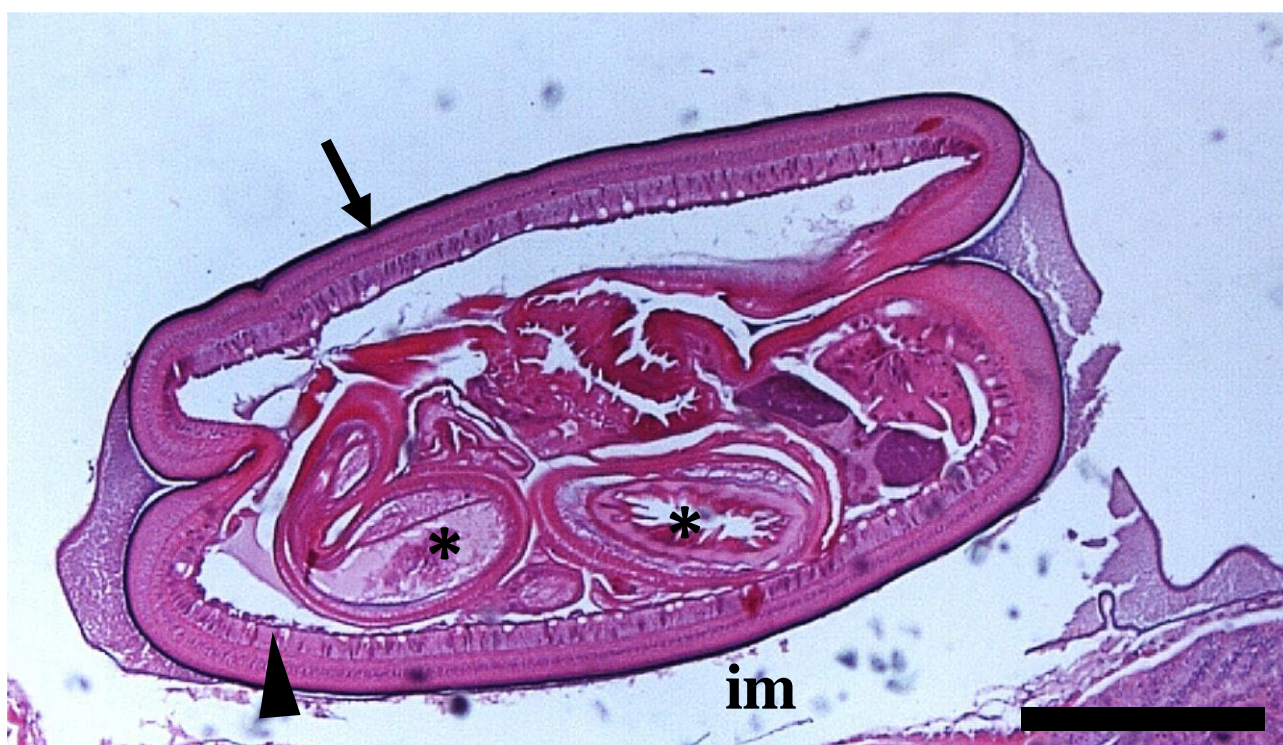
Se observaron etapas de merogonia del apicomplejo *Aggregata valdessensis* Sardella, Ré & Timi, 2000, en el intestino y alrededor del hepatopáncreas. Se detectaron etapas uninucleadas, donde la célula representa la etapa más temprana de la merogonia; presenta un núcleo central y se encuentra en la submucosa del intestino medio (Figura 24 A). En el hemocele del hepatopáncreas se observaron merontes inmaduros con merozoítos en una etapa temprana de desarrollo (Figura 24 B) y merontes maduros que contenían merozoítos completamente desarrollados que rodean una gran masa residual, dispuestos radialmente, con la apariencia de una "roseta" (Figuras 24 C y D). La prevalencia de infección fue del 3% en primavera y del 6% en otoño en Puerto Madryn (Tabla 5).



**Figura 24.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus* infectado con estados merogónicos del apicomplejo *Aggregata valdessensis*. A) Etapa de desarrollo uninucleada (flecha) en el intestino medio (im). B) Meronte inmaduro (flecha) en el hemocele (h) del hepatopáncreas (ht) con merozoítos en desarrollo agrupados. C) Meronte maduro (punta de flecha) en el hemocele (h) del hepatopáncreas con merozoítos completamente desarrollados agrupados en forma de roseta (círculo)

rodeando la masa residual (r). D) Detalle de un meronte maduro que contiene merozoítos completamente desarrollados dispersos (punta de flecha) libres en el hemocele del hepatopáncreas. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, C), 100  $\mu\text{m}$  (B), 20  $\mu\text{m}$  (D).

El acantocéfalo *P. chasmagnathi* se encontró encapsulado en la periferia del intestino medio (Figura 25). Se observó en el 5% de las secciones histológicas de los cangrejos provenientes de Puerto Madryn en primavera y en el 20% de la población de Bahía Camarones en otoño, con una intensidad media de 1 y 2, respectivamente (Tablas 5 y 6).



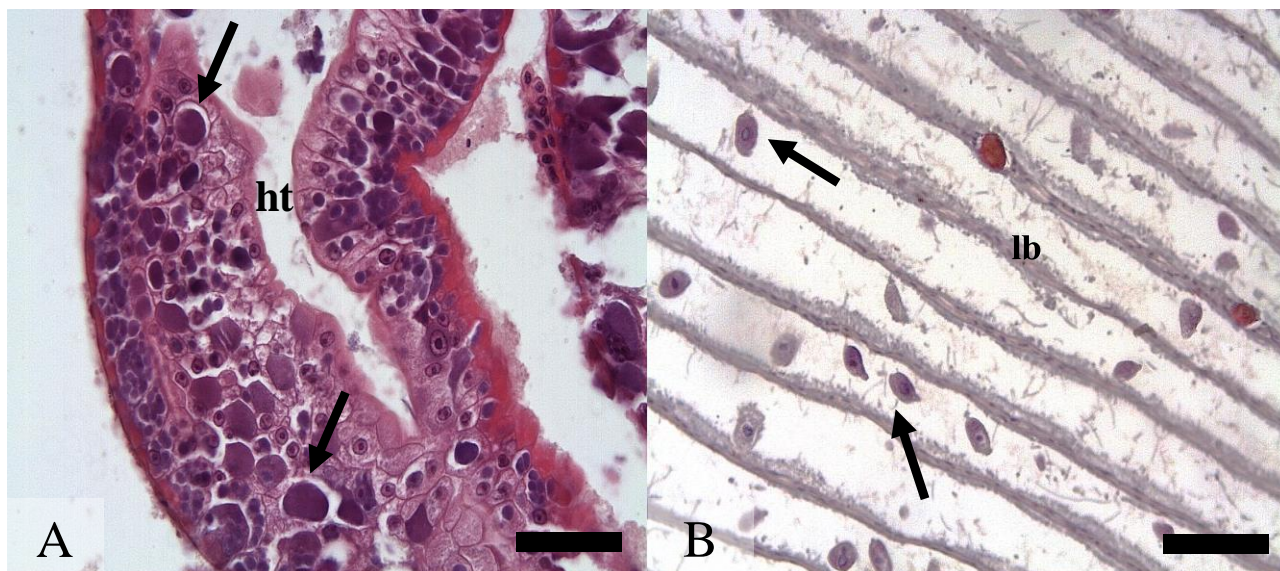
**Figura 25.** Sección histológica (H&E) del cangrejo nativo *Cyrtograpsus altimanus*. Acanthocefalo, *Profilicollis chasmagnathi*, en la periferia del intestino medio (im). Obsérvese la cutícula (flecha), la hipodermis sincicial (punta de flecha) y la probóscide invaginada (asteriscos). Barra de escala: 400  $\mu\text{m}$ .

- *Cyrtograpsus angulatus*

Se identificaron, mediante la observación de cortes histológicos, cinco simbioses en los cangrejos provenientes de Puerto Madryn (Tabla 5). Se observaron colonias intracelulares basófilas de microorganismos procariontas infectando el epitelio del hepatopáncreas (Figura 26 A) con una prevalencia máxima del 27% en verano (Tabla

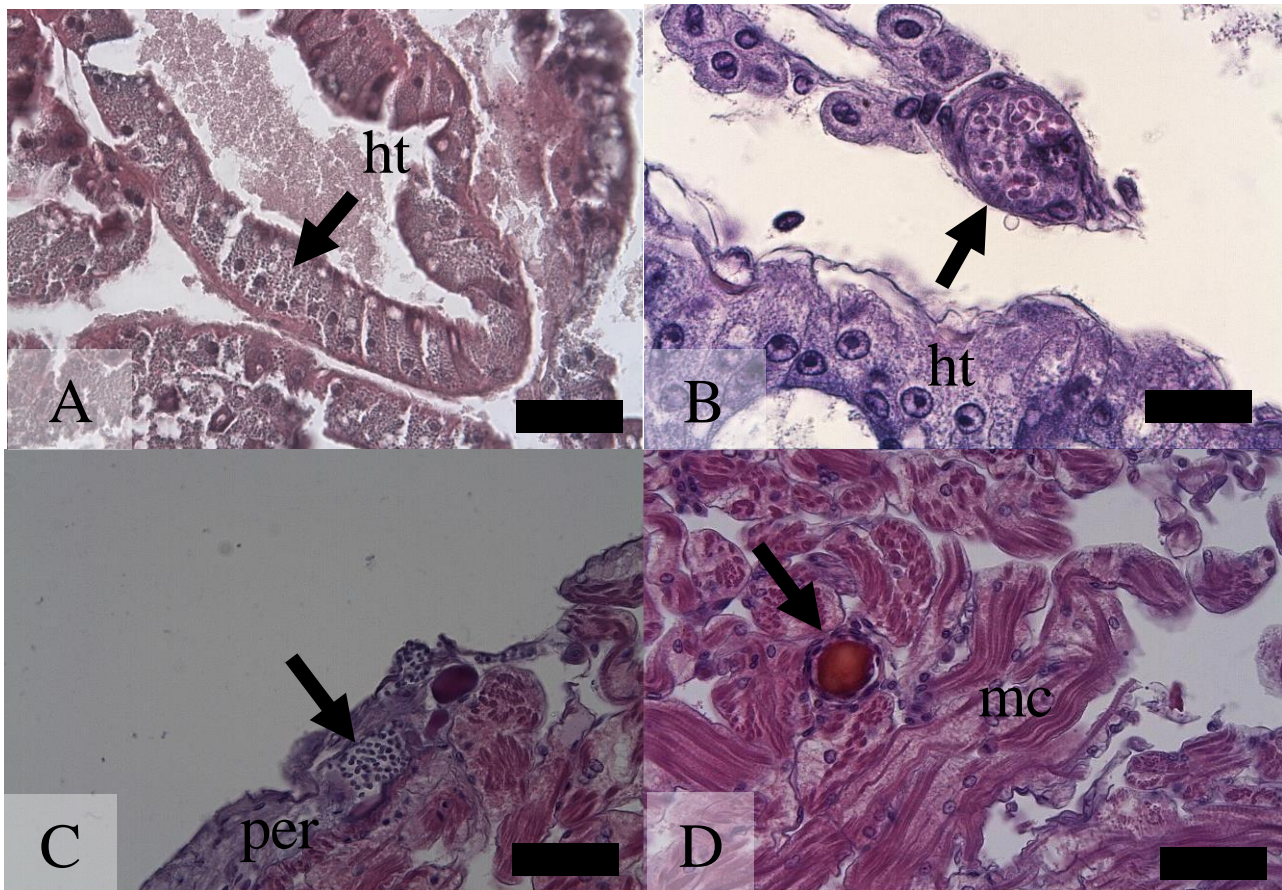
5). En las branquias se observaron bacterias filamentosas con una prevalencia máxima del 87% en verano.

Se observaron protistas ciliados pedunculados en las branquias (Figura 26 B). Se hallaron en cangrejos recolectados en todas las estaciones del año, con una prevalencia máxima del 53% en verano y una intensidad media de 59,7 (Tabla 5).



**Figura 26.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nativo *Cyrtograpsus angulatus*. A) Colonias intracelulares de microorganismos procariotas basófilas (flecha) en células epiteliales del hepatopáncreas (ht). B) Ciliados con un macronúcleo (flecha), ubicados en las branquias entre las lamelas branquiales (lb). Barras de escala: 50 µm (A, B).

Plasmodios multinucleados y esporas en desarrollo, similares a *Haplosporidium* sp. fueron observados en el hepatopáncreas y en el corazón (Figura 27). Las células del epitelio del hepatopáncreas se observaron hipertrofiadas y repletas de una gran cantidad de células uninucleadas (Figura 27 A). En el hemocele del hepatopáncreas (alrededor de los túbulos) (Figura 27 B) y en el corazón (Figura 27 C) se observaron esporas en desarrollo dentro de un esporoquiste. La respuesta del hospedador consistió en la formación de nódulos (Figura 27 D). Esta patología se halló en cangrejos provenientes de Puerto Madryn con una prevalencia del 15% en primavera (Tabla 5).



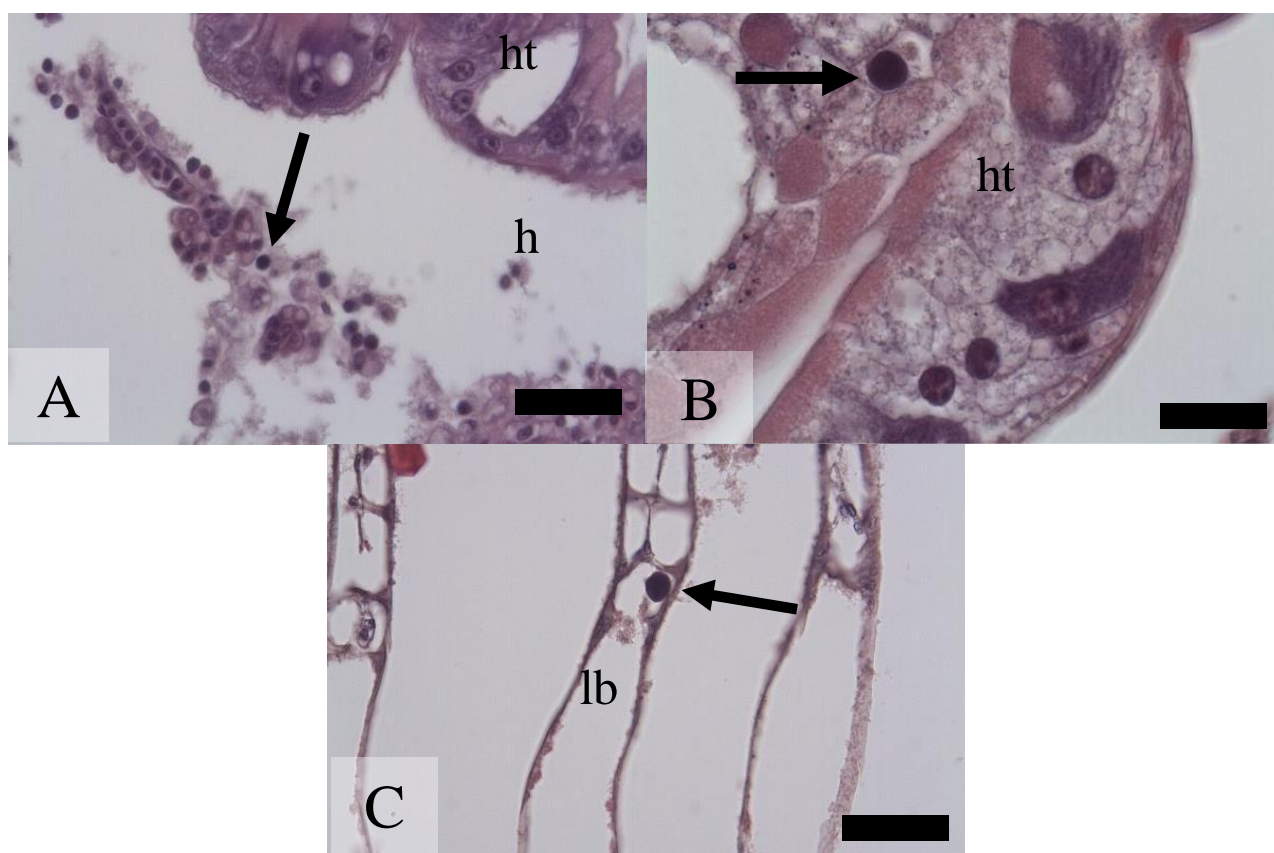
**Figura 27.** Secciones histológicas (H&E) de *Cyrtograpsus angulatus* infectadas con un organismo similar a *Haplosporidium* sp. A) Túbulo del hepatopáncreas infectado; obsérvese la hipertrofia de las células del epitelio del túbulo del hepatopáncreas (ht) que contiene un gran número de formas unicelulares del parásito (flecha). B) Esporoquiste que contiene esporas en desarrollo, obsérvese la respuesta del hospedador causando una agregación de hemocitos alrededor (flecha). C) Esporas en desarrollo dentro de un esporoquiste en el pericardio (per) del corazón. D) Nódulo con encapsulación hemocítica en el músculo cardíaco (flecha). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, C, D), 20  $\mu\text{m}$  (B).

Merontes maduros del apicomplejo *A. valdensesis* fueron observados alrededor de los túbulos del hepatopáncreas, idénticos a los observados en *Cy. altimanus* (Figura 24 D). Se observan merozoítos dispuestos en forma de roseta dentro de los merontes. La prevalencia de infección fue del 2% en invierno, en Puerto Madryn (Tabla 5).

El acantocéfalo, *P. chasmagnathi* se observó en el 20% de las secciones histológicas de los cangrejos recolectados en otoño con una intensidad media de 1, idénticos a los observados en *Cy. altimanus* (Figura 25).

- *Ovalipes trimaculatus*

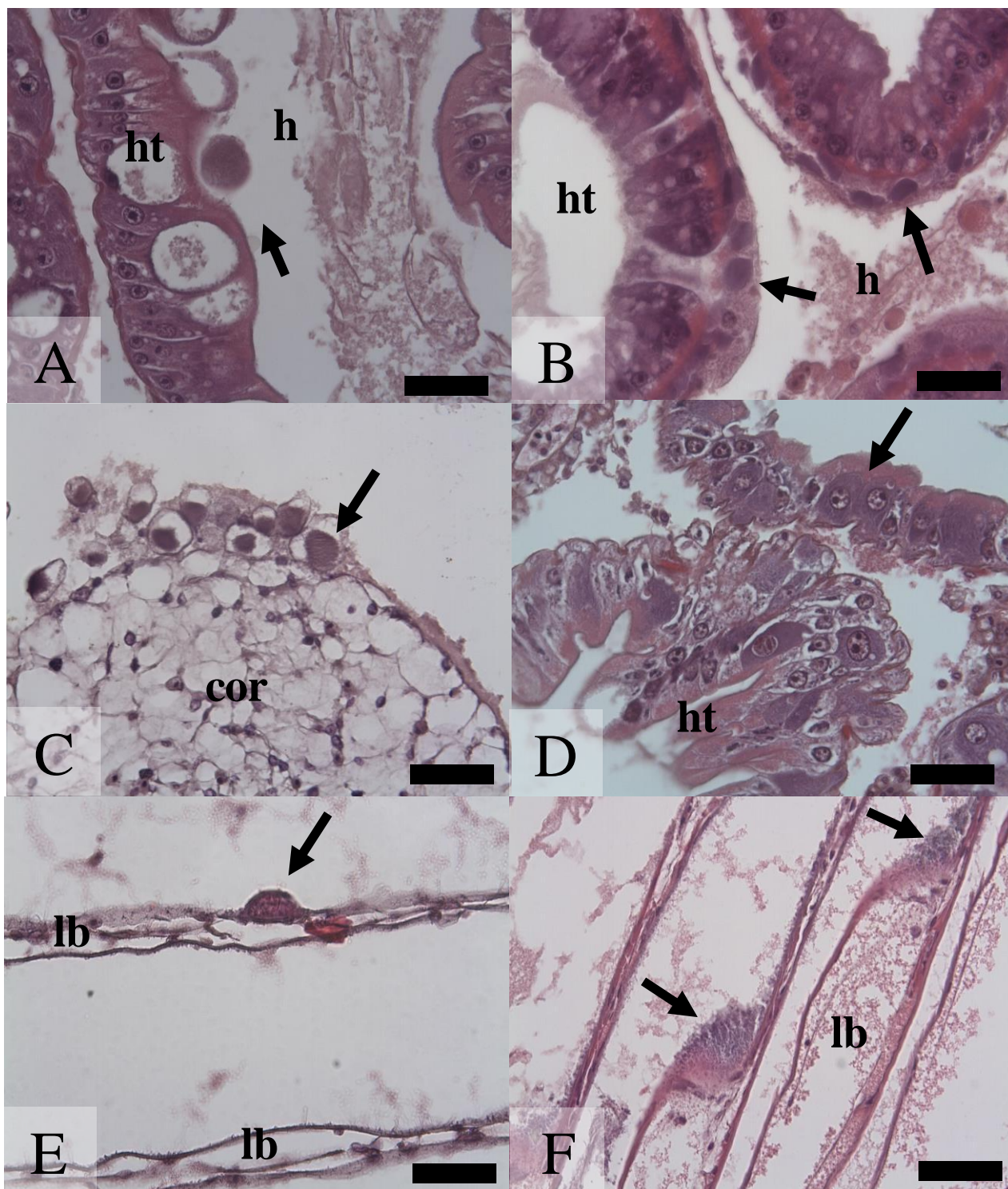
Se identificaron cinco simbiontes mediante la observación de cortes histológicos (Tabla 5). Se observaron infecciones similares a virus, tanto en el hemocele que rodea al hepatopáncreas, como en el epitelio y en el interior de las lamelas branquiales (Figura 28). La patología observada se caracterizó por la presencia de células infectadas con núcleos hipertrofiados y basófilos. Esta infección también se asoció con agregación de hemocitos (Figura 28 A). Durante las estaciones de primavera y otoño, se registró una prevalencia máxima del 10% en los individuos recolectados. Sin embargo, a pesar de esta infección, no se observó en los cortes histológicos ninguna respuesta por parte del hospedador.



**Figura 28.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* con una infección similar a virus. A) Hemocitos con el núcleo hipertrofiado basófilo (flecha) en el hemocele (h) alrededor del hepatopáncreas (ht). B-C) Inclusiones basófilas intranucleares en epitelio del hepatopáncreas y en las lamelas branquiales (lb). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, C); 20  $\mu\text{m}$  (B).

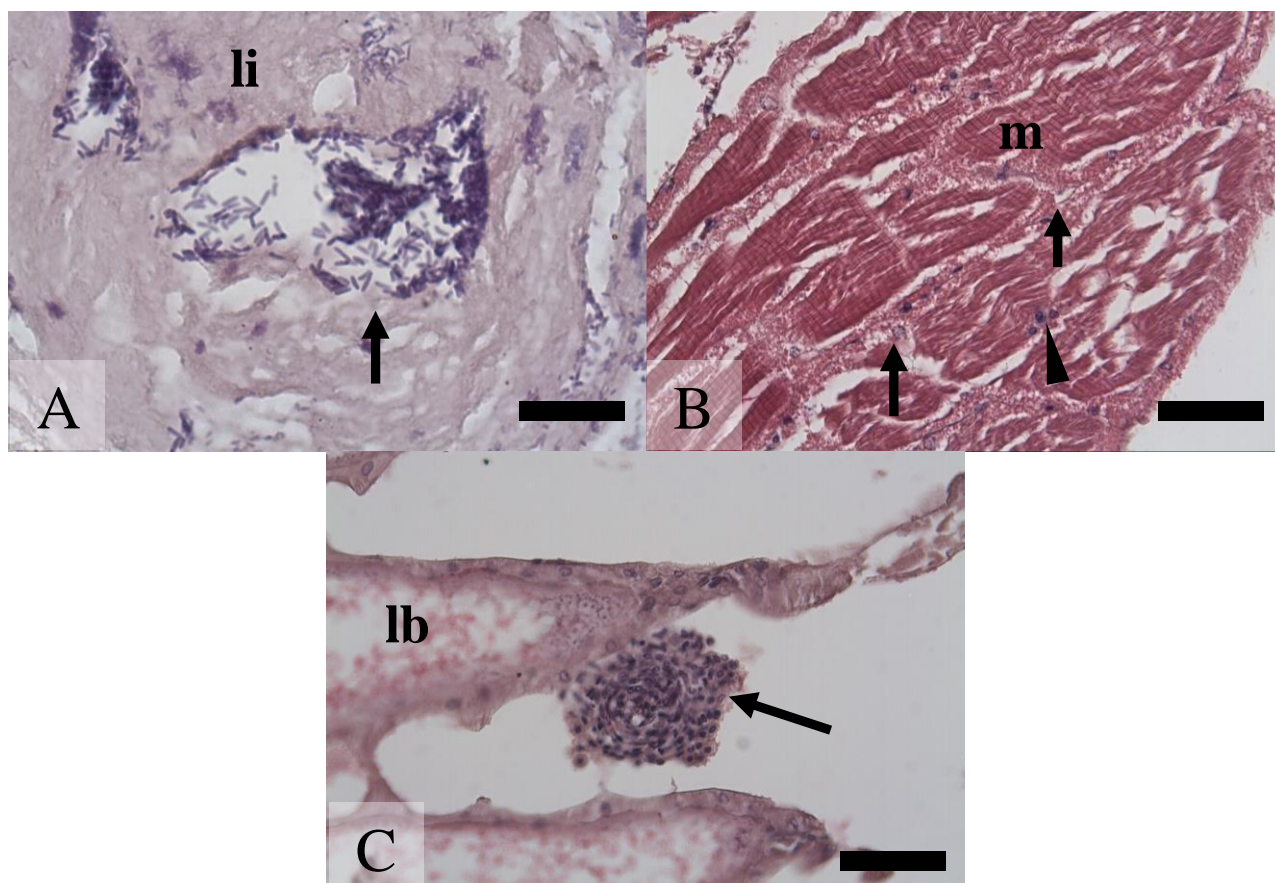
Se identificaron microorganismos procariotas en diversos tejidos, incluyendo el hepatopáncreas, el corazón, branquias y el músculo. En todos los casos, se manifestaron en forma de colonias basófilas procariotas (Figura 29) en el hemocele que rodea los

órganos infectados y en algunos casos en el tejido conectivo (Figuras 29 A, B y C), con aspecto denso, granular y de color púrpura (tinción H&E). En algunos ejemplares, se observaron infectando las células del epitelio del hepatopáncreas (Figura 29 D); en las branquias se hallaron ubicadas adyacentes a las lamelas (Figura 29 E) y en los extremos de las mismas (Figura 29 F). La presencia de estos microorganismos se constató en las cuatro estaciones del año, siendo la prevalencia más elevada durante el verano (36%) (Tabla 5). Es relevante destacar que, a pesar de su presencia, no se observaron alteraciones en los núcleos de las células hospedadoras y no se evidenciaron respuestas inmunitarias en los órganos afectados.



**Figura 29.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* infectado por microorganismos procarióticos. A, B) Colonias de microorganismos procarióticos (flecha) en el hemocele (h), adyacente al hepatopáncreas (ht), C) y al corazón (cor). D) Colonias intracelulares (flecha) invadiendo el citoplasma de las células del hepatopáncreas (ht). E) Microorganismos procarióticos (flecha) adheridos a la lamela branquial (lb). F) Colonia de microorganismos (flecha) en extremo de la lamela branquial (lb). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D, E, F).

Se observaron células ovoides similares a levaduras (Figura 30) en el lumen del intestino y tejido conectivo asociado al mismo (Figura 30 A), y en músculo (Figura 30 B), donde también se observaron hifas. Se registró escaso daño en el tejido infectado, pero se observaron acumulaciones de hemocitos (nódulos) obstruyendo los senos hemales en las branquias (Figura 30 C). La prevalencia fue del 8% en verano y 3% en invierno (Tabla 5).



**Figura 30.** Secciones histológicas (H&E) del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* infectadas con células similares a levaduras. A) Numerosas células similares a levaduras (flecha) concentradas en el lumen del intestino (li). B) Células similares a levaduras (punta de flecha) e hifas (flechas) en el músculo (m). C) Agregaciones de hemocitos (flecha) formando un nódulo entre las lamelas branquiales (lb). Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B, C).

Se evidenció infección de protistas ciliados en las branquias, incluyendo aquellos con pedúnculo. Se caracterizaron por poseer un macronúcleo en forma de herradura, y por varios micronúcleos (Figura 31). Se hallaron sin aparente respuesta inmune por

parte del hospedador. Se observaron en las cuatro estaciones del año, registrando la mayor prevalencia en verano (56%), con una intensidad media de 29,6 (Tabla 5).



**Figura 31.** Sección histológica (H&E) del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* donde se observan protistas ciliados (flecha) entre las lamelas branquiales (lb). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Se observó una infección que presentó similitudes con el nemertino *Carcinonemertes* sp. (Figura 32). Este simbiote se detectó entre las lamelas branquiales y fue identificado como nemertino por la presencia de un esófago, de capas de músculos circular y longitudinal y una epidermis ciliada. No se observó patología en el tejido branquial adyacente. La prevalencia de infección fue del 5% en primavera e invierno y del 4% en verano; los ejemplares infectados fueron hembras (Tabla 5).



**Figura 32.** Sección histológica (H&E) del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* infectado con nemertino similar a *Carcinonemertes* sp. entre las lamelas branquiales (lb). Presenta una epidermis ciliada (punta de flecha) músculos circulares (flecha larga) y músculos longitudinales (flecha corta) y un esófago (asterisco). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

### Análisis estadísticos

- *Cyrtograpsus altimanus*

***Maritrema madyrnense*:** en los cangrejos provenientes de Puerto Madyrn, el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó a la Estación **del año** (Maritrema ~Estación), pero no tuvo significancia estadística ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, en los cangrejos provenientes de Bahía Camarones, el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó el efecto conjunto de Sexo, Estación y la interacción entre ambos (Maritrema ~ Sexo + Estación + Sexo: Estación), aunque tampoco tuvo significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

***Profilicollis chasmagnathi***: en los cangrejos provenientes de Puerto Madryn el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia fue el modelo nulo (*Profilicollis* ~ 1) lo que refleja la ausencia de variables predictoras, sugiriendo que la presencia de este helminto no está influenciada por ninguna de las variables exploradas.

**Ciliados**: en los cangrejos provenientes de Puerto Madryn, el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó la talla (Ciliados ~ Talla). Se observó una asociación significativa entre la talla del hospedador y la presencia de ciliados ( $\chi^2 = 4,0497$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,04418$ ), indicando que la prevalencia de ciliados aumenta junto con el tamaño del hospedador.

***Haplosporidium* sp.**: en los cangrejos provenientes de Puerto Madryn, el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia fue el modelo nulo (Haplosporidia ~ 1), lo que refleja la ausencia de variables predictoras, sugiriendo que la presencia de este parásito no está influenciada por ninguna de las variables exploradas.

- *Cyrtograpsus angulatus*

***Maritrema madrynense* y *Profilicollis chasmagnathi***: En ambos casos, para ambos parásitos, el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia fue el modelo nulo, donde la presencia de estos parásitos se representa como ~1. Esto sugiere la ausencia de variables predictoras que influyeran la presencia de estos helmintos, indicando que su aparición no está influenciada por ninguna de las variables exploradas.

**Microorganismos procariotas**: el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó la Estación (M. procariotas ~ Estación). Se observó una asociación significativa ( $\chi^2 = 8,9637$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,02978$ ); las prevalencias fueron más altas durante el verano seguido por el otoño.

**Ciliados**: el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó el Sexo, Estación y Sexo: Estación (Ciliados ~ Sexo + Estación + Sexo: Estación), aunque no tuvo significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

- *Ovalipes trimaculatus*

**Microorganismos procariotas**: el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó la Estación (M. procariotas ~ Estación), la cual presentó una asociación significativa ( $\chi^2 = 10,64$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,01384$ ). Las prevalencias fueron mayores en primavera y verano.

**Ciliados:** el mejor modelo para explicar la variación en la prevalencia incluyó la Estación (Ciliados ~ Estación), la cual presentó una asociación significativa ( $\chi^2 = 23,172$ ,  $df = 3$ ,  $p = 3,718e-05$ ). Las mayores prevalencias fueron en verano; en invierno hubo ausencia de ciliados.

### Comparación entre especies

El modelo más adecuado para explicar la variación en la prevalencia de *M. madrynense*, *P. chasmagnathi* y los ciliados, utilizando como variable la especie de cangrejo hospedador (*Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*), fue el modelo nulo. Esto indica la ausencia de una relación predictiva significativa, sugiriendo que no hay especificidad hospedadora por parte del parásito.

## **Discusión**

Este estudio contribuye al conocimiento de los simbiositos presentes en los cangrejos nativos de la Patagonia, en particular *Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*. Es importante destacar que el presente constituye el primer reporte sobre simbiositos en *O. trimaculatus*, lo cual añade un componente significativo a nuestra comprensión de esta especie y su importancia económica en la región. Se hallaron diversas infecciones en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp., las cuales incluyen parásitos helmintos de las familias Microphallidae y Profilicolidae, así como protozoos similares a *Haplosporidium* sp. y el apicomplejo *A. valdessensis*. Por otro lado, el cangrejo nadador *O. trimaculatus* presentó infecciones de virus y levaduras, además de la presencia de un nemertino similar a *Carcinonemertes* sp. La detección de *A. valdessensis* y *Carcinonemertes* spp. constituyen nuevos registros en estas especies de cangrejos en la costa Atlántica sudoeste.

Infecciones por dos parásitos helmintos, *M. madrynense* y *P. chasmagnathi*, se observaron en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. en ambos sitios de estudio. Este hallazgo constituye el primer registro de *M. madrynense* en *Cy. angulatus*, ya que su presencia había sido documentada en *Cy. altimanus* (Díaz & Cremonte 2010; Bagnato et al. 2015). Díaz & Cremonte (2010) encontraron que el 33% de los cangrejos *Cy. altimanus* estaban infectados con *M. madrynense*. Las prevalencias halladas en este estudio alcanzaron hasta un 35% para *M. madrynense* y un 33% para *P. chasmagnathi*. Las larvas del acantocéfalo *P. chasmagnathi* habían sido previamente reportadas

infectando al 26,6% de *Cy. altimanus* de las costas de Puerto Madryn (Lorenti et al. 2018), mientras que para *Cy. angulatus* se registraron prevalencias del 20% en el estuario de Bahía Blanca (Alda et al. 2011a). En este estudio, en Puerto Madryn, observamos una mayor prevalencia de *P. chasmagnathi* en otoño e invierno, aunque estos datos no tuvieron significancia estadística y coinciden con lo observado por Lorenti et al. (2018). Lorenti et al. (2018) también hallaron una mayor prevalencia en machos que en hembras, aunque en nuestro estudio no se observó una asociación entre el sexo y la prevalencia de infección. En el caso específico de los cangrejos recolectados en Bahía Camarones no se observaron infecciones por *P. chasmagnathi* en primavera, pero sí en otoño. Es importante mencionar que el tamaño de la muestra de cangrejos analizados en este último sitio fue relativamente pequeño, lo que resalta la necesidad de realizar un muestreo más exhaustivo que abarque todas las estaciones del año para comprender mejor la dinámica de estas infecciones en este sitio. Las intensidades de infección observadas para ambos helmintos fueron relativamente bajas. Las infecciones de metacercarias en crustáceos pueden alcanzar intensidades sorprendentemente altas, afectando el comportamiento, la morbilidad y la mortalidad del hospedador (Robaldo et al. 1999; González 2016; Violante-González et al. 2016). Robaldo et al. (1999) observaron que la intensidad de *M. szidati* en el hepatopáncreas de *Neohelice granulata* (Dana, 1851) osciló entre 2 y 802, provocando necrosis y cambios en los niveles de glucógeno en intensidades elevadas. La necrosis focal y el desplazamiento de tejido son comunes alrededor de las metacercarias (Stentiford & Feist 2005); los crustáceos pueden encapsular y melanizar las metacercarias, lo que resulta en la muerte del parásito (Bryan-Walker et al. 2007). Dada las bajas intensidades no se observaron este tipo de patologías en el presente estudio. Además de los efectos directos sobre la morfología y la fisiología del hospedador, los digeneos pueden afectar la fecundidad y la tasa de respiración de los hospedadores infectados (Gates et al. 2018; Arundell et al. 2019). Los acantocéfalos pueden inducir cambios en el comportamiento, incluyendo castración, alteraciones en la pigmentación y modificaciones en el comportamiento que incrementan la tasa de depredación (Nickol 1985; Moore & Gotelli 1990; Kolluru et al. 2011) Dadas las bajas intensidades de infección observadas por *P. chasmagnathi*, tampoco se observaron cambios notables en los hospedadores, ni variaciones respecto a las tallas. La intensidad de la infección suele estar relacionada con el tamaño del hospedador, y las infecciones con alta intensidad pueden resultar en una reducción de

la fecundidad y un aumento de la mortalidad (Liat & Pike 1980; Thompson 1985; Latham & Poulin 2002). La ausencia de estos helmintos en *O. trimaculatus* puede deberse a que este habita en zona submareales, y estos parásitos están asociados con estuarios y zonas intermareales rocosas (Díaz & Cremonte 2010; Bagnato et al. 2015; Rodríguez et al. 2017). Ambos helmintos culminan su ciclo de vida en la gaviota cocinera, por lo cual sus hospedadores intermediarios deben estar asequibles para ser depredados por esta ave.

En los cortes histológicos de *O. trimaculatus* fueron observadas secciones con características compatibles con el nemertino *Carcinonemertes* sp.; estuvieron ubicados entre las lamelas branquiales y presentaron el epitelio ciliado característico. Estos ejemplares mostraron una gran similitud con los juveniles de *Carcinonemertes* sp. presentes en las branquias de la langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (Latreille, 1804), donde se registraron prevalencias del 22% (Atherley et al. 2020). En contraste, las prevalencias registradas en el presente estudio fueron bajas, menos del 5%, y solo se encontró un macho infectado; el resto fueron hembras no ovígeras. En línea con nuestro estudio, *C. carcinophila* y el nemertino hallado en *P. argus* poseen etapas juveniles que infectan las branquias del hospedador, tanto de hembras no ovígeras como de machos (Humes 1942; Atherley et al. 2020). La presencia de un nemertino en las lamelas branquiales indica el potencial de esta especie para ser transferida de machos a hembras hospedadoras, posiblemente a través de la cópula (Wickham et al. 1984; Wickham 1986; Shields & Kuris 1990), así como para migrar de las branquias de las hembras a las masas de huevos cuando el hospedador ovoposita (Atherley et al. 2020). Este tipo de ciclo de vida lo exhibe *C. carcinophila* en *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, *Carcinonemertes carcinophila imminuta* Humes, 1942 en *Ca. danae* y *Carcinonemertes* sp. en *P. argus* (Kuris 1993; Santos & Bueno, 2001; Atherley et al. 2020). En el presente estudio, el único macho infectado se registró en el período de actividad reproductiva de *O. trimaculatus*, en invierno, época en el que se encuentran parejas en cópula (Martelli 2018). Atherley et al. (2020) registraron altas prevalencias en machos de *P. argus* en los periodos de alta actividad reproductiva, y en hembras las prevalencias fueron mayores en los meses de baja actividad reproductiva. Sin embargo, como sugieren Atherley et al. (2020) se esperaría una tendencia opuesta, donde los gusanos son transferidos de los machos a las hembras durante la cópula. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio adicional sobre los patrones de prevalencia de infección de ambas especies de

nemertinos a lo largo de un período de tiempo extendido para establecer cualquier correlación entre la reproducción del hospedador y la prevalencia e intensidad de la infección. Además, es necesario realizar estudios moleculares para su identificación taxonómica, combinados con estudios morfológicos, ya que existen ligeras variaciones morfológicas entre especies (González-Cueto et al. 2014). Este patógeno puede afectar la salud reproductiva de *O. trimaculatus* hasta el punto de disminuir los números de su población, como se ha informado en varias pesquerías de cangrejos (Kuris et al. 1991; Shields 2012).

Infecciones similares a virus solo se detectaron en *O. trimaculatus*, identificadas por la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos en el hepatopáncreas y las branquias, característica del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) (Nimaviridae) (Somboonna et al. 2010). Martorelli et al. (2010, 2012) informaron la presencia de este patógeno viral en camarones *A. longinarius*, *P. macrodactylus* y el cangrejo *Cy. angulatus* en el estuario de Bahía Blanca, Argentina, marcando la presencia más austral del virus en el Océano Atlántico sur. Aunque Martorelli et al. (2010) notaron puntos blancos en el caparazón dorsal y la cutícula interna de la cámara branquial en *Cy. angulatus* y *P. macrodactylus*; estas patologías no se observaron en los ejemplares de *O. trimaculatus* en el presente estudio. A pesar de los informes sobre la presencia de este virus en *Cy. angulatus* (Martorelli et al. 2010) en provincia de Buenos Aires, no se observaron infecciones en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. en el presente estudio. Las bajas prevalencias observadas en *O. trimaculatus* ( $\leq 5\%$ ) y la ausencia en *Cyrtograpsus* spp. pueden ser atribuidas a la falta de patologías evidentes. Chang et al. (2001) descubrieron que el 27,2% de los cangrejos azules *C. sapidus* estaban positivos para WSSV, pero no mostraban síntomas evidentes, sugiriendo la posibilidad de que actúen como reservorios del virus. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la diversidad específica de la especie al interpretar las prevalencias de WSSV y los efectos de la enfermedad en las poblaciones de cangrejos. Por lo tanto, sería relevante confirmar con análisis moleculares si las infecciones virales observadas en *O. trimaculatus* corresponden al virus WSSV, y realizar estudios adicionales que abarquen una gama más amplia de localidades y poblaciones para comprender la distribución y la frecuencia de este virus.

Se observaron infecciones causadas por microorganismos procariotas en las tres especies de cangrejos. Estas infecciones exhibieron similitudes con las ocasionadas por

Organismos Similares a Rickettsias (RLO) (Eddy et al. 2007; Bojko et al. 2018, Ryazanova et al. 2020; Bojko et al. 2022). Las prevalencias de los procariotas en las tres especies de cangrejos aquí estudiados se vieron significativamente afectadas por las estaciones; se observó un aumento durante los períodos más cálidos del año. Específicamente, en *Cy. altimanus*, sólo se registraron infecciones en el verano (20%), mientras que en *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*, aumentaron progresivamente hacia la temporada estival, alcanzando una prevalencia del 36%. Estudios previos han demostrado que las infecciones por RLO's tienen un patrón estacional, asociados con un aumento de la temperatura del agua (Morales-Covarrudias et al. 2010; Ryazanova et al. 2020). Cabe señalar que este patrón es característico no sólo de la infección por RLO, sino también de muchas otras enfermedades de los crustáceos (Ryazanova et al. 2020). No fue posible cuantificar la cantidad de colonias por espécimen, pero si se observó que los túbulos del hepatopáncreas con mayor cantidad de colonias presentaban necrosis e infiltración de hemocitos en los tejidos, estas características histopatológicas permiten un diagnóstico de infección por RLO, así como la diferenciación de otras patologías hepatopancreáticas (Varela-Mejías & Peña-Navarro 2016; Bojko et al. 2022). Algunos ejemplares presentaban áreas dañadas del epitelio de los túbulos del hepatopáncreas intercaladas con áreas de epitelio con una estructura "normal", similar a lo observado por Bojko et al. (2022) en el cangrejo real azul *Paralithodes platypus* (Brandt, 1851) infectado por un organismo similar a RLO que afecta las células epiteliales del hepatopáncreas. Para avanzar en la comprensión de estas infecciones será necesario llevar a cabo estudios moleculares y de microscopía electrónica de transmisión para su identificación taxonómica y para comprender mejor su patogenia. Además, es esencial realizar nuevos muestreos y evaluar las manifestaciones visuales de la enfermedad en individuos infectados, así como el alcance y el patrón de infección de las células epiteliales del hepatopáncreas, dada la posible letalidad de la enfermedad para el organismo hospedador (Bojko et al. 2022). Conocer el tipo específico de RLO implicado es crucial, ya que estos microorganismos podrían estar regulando la abundancia de las poblaciones naturales de los cangrejos nativos en la costa patagónica.

Se detectaron bacterias filamentosas en las branquias de cangrejos nativos del género *Cyrtograpsus*, presentando una patología similar a la descrita por Stentiford & Feist (2005), Alda et al. (2011a), Bojko et al. (2018). Alda et al. (2011a) informaron sobre la presencia de este tipo de bacterias en las branquias de *Cy. angulatus*, con una

prevalencia del 12%. En este estudio, las prevalencias de infección fueron notablemente altas, del 100% en *Cy. altimanus* y alcanzando un 87% en *Cy. angulatus*. Como señalaron Alda et al. (2011a), estas bacterias filamentosas muestran similitudes con *Leucothrix mucor* Ørsted, 1844, una bacteria filamentosa Gram-negativa que se encuentra comúnmente en superficies externas como branquias, huevos, algas y otras superficies en ambientes marinos (Johnson et al. 1971; Bland & Brock 1973). Es frecuente hallarla en masas de huevos y ocasionalmente en las branquias de varios crustáceos (Bland & Amerson 1974; Bodammer & Sawyer 1981). La presencia de esta bacteria suele ser indicativa de un exceso de nutrientes, como contaminación por agentes contaminantes o una carga nutricional elevada (Sawyer et al. 1984; Schuwerack et al. 2001). Para identificar taxonómicamente a estas bacterias y comprender su impacto en la salud de los cangrejos y en los ecosistemas marinos en general, se requieren investigaciones adicionales, incluyendo análisis moleculares y microscopía electrónica de transmisión.

Se detectaron organismos similares a levaduras en el cangrejo nadador *O. trimaculatus*, una ocurrencia poco común en cangrejos. La primera descripción documentada fue realizada por Stentiford et al. (2003) en dos especies de cangrejos, *Cancer pagurus* Linnaeus 1758 y *Necora puber* (Linnaeus, 1767). Además, se han reportado casos en el cangrejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), relacionados con la enfermedad del cangrejo letárgico (Boeger et al. 2007), y en *Ca. maenas* (Davies et al. 2020). En el presente estudio, las prevalencias observadas fueron relativamente bajas ( $\leq 8\%$ ), aunque en *Ca. maenas* las prevalencias reportadas fueron aún menores (0,4%) (Davies et al. 2020b). La apariencia de los hongos observados en cortes histológicos en el presente estudio es similar a la reportada en *U. cordatus* (Boeger et al. 2007). Además, se evidenció una respuesta del hospedador en forma de encapsulación hemocítica, tal como han reportado trabajos previos en cangrejos infectados por estos organismos (Boeger et al. 2007; Smith et al. 2013). Es común observar la infección de levaduras ocurriendo simultáneamente con otras infecciones, tales como *Haplosporidium* sp. y *Hematodinium* sp. en cangrejos (Stentiford et al. 2003; Smith et al. 2013; Davies et al. 2020b). Stentiford et al. (2003) no detectaron ninguna infección por levaduras en cangrejos libres de *Hematodinium*, lo que sugiere que el hongo podría ser un patógeno oportunista, posiblemente explotando el sistema inmunológico debilitado del cangrejo hospedador. De hecho, las infecciones fúngicas suelen asociarse con la depresión

inmunológica en muchos grupos de animales, incluidos los cangrejos (Welsh & Sizemore 1985; Mydlarz et al. 2006). Tanto los patógenos primarios como las condiciones ambientales inadecuadas son factores conocidos que causan estrés y debilitamiento subsiguiente de la respuesta inmunológica del hospedador (Stentiford & Feist 2005). Davies et al. (2020b) proponen que las infecciones fúngicas de los decápodos son raras y probablemente afectan sólo a los animales decadentes. Sin embargo, en el presente estudio no se asociaron estas infecciones con otras, aunque dado el bajo número de individuos infectados es posible que hayan estado sometidos a algún tipo de estrés, lo que podría haber aumentado su susceptibilidad a la infección. Teniendo en cuenta que todo el material utilizado en presente estudio fue fijado antes del descubrimiento de la infección por organismos similares a levaduras, fue imposible cultivar e identificar la especie de levadura responsable. La identificación molecular (Fell 1993; Lu et al. 1997) y las técnicas de cultivo son necesarias para dilucidar la identidad de los organismos similares a levaduras detectados en *O. trimaculatus* y para proporcionar material para estudios de transmisión que determinen la susceptibilidad de hospedadores comprometidos y no comprometidos.

Protistas ciliados fueron observados en las branquias de las tres especies de cangrejos nativos estudiadas en este trabajo de tesis. Estos fueron morfológicamente similares a *Epistylis* sp. hallados en *Cy. angulatus* en el estuario de Bahía Blanca, con prevalencias del 35% (Alda et al. 2011a). En el presente estudio las prevalencias fueron mayores, alcanzando valores del 60% y 53% en *Cyrtograpsus altimanus* y *Cy. angulatus* respectivamente y del 56% en *O. trimaculatus*. Las prevalencias de ciliados resultaron significativamente mayores en cangrejos *Cy. altimanus* más grandes; esta correlación podría explicarse por el hecho de que los hospedadores más grandes son más viejos y, por lo tanto, tuvieron una exposición más prolongada a los parásitos (Poulin 1997). En *O. trimaculatus* las prevalencias fueron mayores en verano y otoño, siendo cero en invierno. Se conoce que la temperatura del agua modela patrones en las infecciones por simbiosis (Huchin-Mian et al. 2018). Feigenbaum (1975) y Hudson & Lester (1992) reportaron variación estacional en ciliados, los cuales aumentaron en verano y disminuyeron en invierno. Las infecciones por ciliados se asocian con condiciones estresantes y, como tales, se han considerado patógenos oportunistas que, de hecho, rara vez se observan en muestras recolectadas directamente del campo (Meyers 1990; Small et al. 2005). Los ciliados ocurren en la hemolinfa y prefieren tejidos ricos en oxígeno

como las branquias; sin embargo, en infecciones con alta intensidad se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos (Shields et al. 2022). Se ha sugerido que la alta intensidad de ciliados puede deberse a la inmunosupresión del hospedador, junto con cambios en la estructura de las branquias causados por contaminantes (Khan 1990; Yeomans et al. 1997).

Se halló un agente patógeno similar al haplosporidio en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. en ambos sitios de estudio. Además de los moluscos como hospedadores, ha habido múltiples reportes de haplosporidio que infectan a los crustáceos; incluyendo tanto la hemolinfa como los tejidos conectivos de especies de cangrejos como *Panopeus herbstii* Milne Edwards, 1834, *Rhithropanopeus harrisi* (Gould, 1841), *Ca. maenas* y *C. sapidus* (Sprague 1963; Perkins 1975; Marchand & Sprague 1979; Stentiford et al. 2003; Davies et al. 2020a). También se han observado en la hemolinfa de camarones como *Pandalus platyceros* Brandt, 1851 y *Pandalus borealis* Krøyer, 1838 (Meyers et al. 1994; Bower & Meyer 2002; Reece et al. 2004), así como tejidos conectivos de anfípodos (Larsson 1987; Winters & Faisal 2014; Urrutia et al. 2019). En este estudio, la infección parecía restringirse inicialmente a los tejidos del hepatopáncreas, afectando a todos los tipos de células epiteliales, aunque también se observaron invadidos el corazón, el músculo y las branquias. Las células del hepatopáncreas mostraban múltiples etapas de desarrollo plasmodial. Es importante destacar que en Argentina sólo se ha reportado *Haplosporidium patagon* Ituarte, Bagnato, Siddal & Cremonte, 2014 en las lapas pulmonadas *S. lessonii* y *S. lateralis* en el intermareal de Puerto Deseado, Santa Cruz, con prevalencias menores al 13% (Di Giorgio et al. 2014), y los esporoquistes de *S. lessonii* presentaban similitudes histológicas con los observados en este estudio, donde las prevalencias alcanzaron el 15%. En algunos hospedadores crustáceos infectados por *Haplosporidium* sp., se ha observado la falta de esporulación (Stentiford et al. 2013, Davies et al. 2020a), como fue el caso en *Cy. angulatus* en este estudio. Urrutia et al. (2019) sugirieron que esta ausencia podría deberse a la posibilidad de que la esporulación ocurra en otra especie hospedadora. La clasificación de estos parásitos como miembros del filo Haplosporidia basándose únicamente en la morfología debe considerarse tentativa, especialmente en ausencia de información genética (Bateman et al. 2011). Por lo tanto, es crucial realizar análisis moleculares para confirmar su identidad.

Este estudio representa un avance significativo en la comprensión de los simbioses presentes en los cangrejos nativos de la Patagonia, resaltando la complejidad de las interacciones de simbioses en los ecosistemas marinos. Se necesitan más investigaciones, incluyendo análisis moleculares, para conocer la identidad taxonómica y nuevos estudios utilizando indicadores de salud para comprender la patogenia de estos simbioses. Es crucial realizar muestreos exhaustivos durante todas las estaciones del año y en diferentes localidades para obtener una visión completa de la dinámica de estas infecciones en los cangrejos patagónicos. En última instancia, este estudio proporciona una sólida base para futuras investigaciones sobre la salud de los cangrejos en la región, subrayando la importancia de conservar y proteger estos ecosistemas marinos para mantener la biodiversidad y el equilibrio ecológico, con posibles implicaciones para la gestión y conservación de estas poblaciones en su hábitat natural.

## **CAPÍTULO III**

### **Ciclo de vida del apicomplejo *Aggregata valdessensis* que parasita a *Octopus tehuelchus* y crustáceos en la costa patagónica**

## Introducción

Las especies del género *Aggregata* Frenzel, 1885 (Aggregatidae) son endoparásitos que exhiben un ciclo de vida heteroxeno, involucrando a un cefalópodo como hospedador definitivo, en el cual el parásito desarrolla las etapas de gametogonia y esporogonia, y a crustáceos como hospedadores intermediarios, donde se desarrolla la etapa de merogonia (Dobell 1925; Hochberg 1990; Gestal et al. 2002a). Junto con otros protozoos intracelulares obligados unicelulares, estos constituyen un nuevo clado de apicomplejos denominado Marosporida, que es hermano de los Coccidia y Hematozoa (Mathur et al. 2020). Hasta la fecha, se han descrito 13 especies (Tabla 7) en todo el mundo (Colunga-Ramírez et al. 2021; Ren & Zheng 2022; Wang et al. 2023) con *A. octopiana* como especie tipo (Castellanos-Martínez et al. 2013). La mayoría de las especies se han descrito en función del tamaño y la morfología del esporoquiste y el número y tamaño de los esporozoítos dentro de los esporoquistes (Hochberg 1990; Gestal et al. 2010).

El único ciclo de vida completamente elucidado es el de *Aggregata eberthi* (Labbé, 1895) (Gestal et al. 2002a); aunque también existen observaciones sobre la especificidad del hospedador intermediario de *A. octopiana*. (Hochberg 1990; Gestal et al. 2002a). El ciclo de vida de *A. eberthi* ha sido estudiado por varios autores a lo largo del tiempo, quienes realizaron infecciones experimentales alimentando a sepias (hospedador definitivo) recién nacidas con crustáceos infectados (Léger & Duboscq 1906, 1908; Levine 1985, Dobell 1925; Hochberg 1990). Los experimentos inversos, alimentando crustáceos con trozos infectados del tracto digestivo de los cefalópodos, fueron realizados por Léger & Duboscq (1908) y Dobell (1925). Finalmente, el ciclo de vida fue completamente elucidado utilizando herramientas moleculares por Gestal et al. (2002a). A través de infecciones experimentales, se conoce actualmente que ocho especies diferentes de camarones y cangrejos pueden actuar como hospedadores intermediarios para *A. eberthi*, y seis especies de cangrejos actuarían como hospedadores intermediarios para *A. octopiana* (Léger & Duboscq 1906, 1908; Moroff 1908, Dobell 1925, Gestal et al. 2002a).

Una ruta de transmisión propuesta para las especies europeas de *Aggregata* fue a través del consumo post mortem del hospedador definitivo infectado (Léger & Duboscq 1906, 1908; Moroff 1908, Dobell 1925, Gestal et al. 2002a). Esta ruta de transmisión

parece probable considerando que la mayoría de los cefalópodos tienen una vida corta y mueren después de su único evento reproductivo, mientras que muchos cangrejos se alimentan como carroñeros generalistas. Además, Dobell (1925) y Hochberg (1983) han sugerido que las células digestivas hipertrofiadas de los hospedadores definitivos con esporoquistes completamente desarrollados (con esporas en su interior) pasarían a través de las heces del cefalópodo y luego serían ingeridas por crustáceos bentónicos, causando el desarrollo subsecuente de la etapa de merogonia. Sin embargo, la eliminación de esporoquistes completamente desarrollados a través de las heces del pulpo nunca fue probada.

En la costa norte de la Patagonia, en el Atlántico sudoeste, se han descrito dos especies: *Aggregata valdessensis* Sardella, Ré & Timi, 2000, que infecta a *Octopus tehuelchus* d'Orbigny 1934, y *Aggregata patagonica* Sardella, Ré & Timi, 2000, que infecta a *Enteroctopus megalocyathus* (Gould, 1852). Estos hallazgos fueron documentados por Sardella & Ré (1988) y Sardella et al. (2000). En el Mar argentino, el "Pulpito" *O. tehuelchus* es una especie de interés comercial para la pesca artesanal y está atrayendo gran interés y aceptación en los mercados locales (Ré 1998; Narvarte 2007), incrementando asimismo las demandas a nivel global (FAO 2018). Esta especie se encuentra en el Océano Atlántico entre el sur de Brasil (16°S) y el norte de la Patagonia argentina (45°S), y desde el intermareal hasta los 100 m de profundidad (Ortiz & Ré 2011; Braga et al. 2022). Este pequeño pulpo (hasta 150 g de peso total) es un depredador activo y oportunista, que se alimenta principalmente de mejillones, caracoles, poliquetos, cangrejos, otros pequeños crustáceos y pequeños peces (Storero et al. 2016).

En *O. tehuelchus*, se observaron esporoquistes de *A. valdessensis* en el intestino proximal y el ciego digestivo (Sardella & Ré 1988, Sardella et al. 2000; Vázquez et al. 2023). Los hospedadores intermediarios no se conocen, aunque Sardella & Martorelli (1997) describieron la etapa de merogonia de *Aggregata* sp. en los camarones *Pleoticus muelleri* (Bate 1888) y *Artemesia longinaris* (Bate 1888) provenientes de aguas del sur de la Patagonia. Sin embargo, considerando el tamaño y los hábitos de estos crustáceos, no parece probable que actúen como hospedadores intermediarios de *A. valdessensis*, como han sugerido Storero et al. (2013).

**Tabla 7.** Especies del género *Aggregata* registradas en hospedadores definitivos e intermediarios, características y medidas de esporoquistes y esporozoítos y localidades. Las medidas de longitud y ancho se dan como rangos en  $\mu\text{m}$ . [] = indica hospedador experimental.

Especies de <i>Aggregata</i>	Hospedador definitivo (Cefalópoda)	Hospedador intermediario (Crustacea)	Localidad	Sitio de infección en el hospedador definitivo	Esporoquistes			Esporozoítos			Referencias	
					superficie	forma	largo	ancho	N	largo		ancho
<i>A. octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i> (Octopodidae)	<i>Inachus dorsettensis</i> , <i>I. mauritanicus</i> , <i>Pinnotheres pisum</i> , <i>Pagurus arrosor</i> , <i>Eupagurus prideauxi</i> , <i>E. sculptimanus</i>	NE Pacífico O. Mediterráneo	intestino, ciego y otros órganos	espinoso (MEB)	esférica	11-15	11-15	8	16-24		Gestal et al. (1999)
<i>A. eberthi</i>	<i>Sepia officinalis</i> (Sepiidae)	<i>Macropipus depurator</i> , <i>M. arcuatus</i> , <i>M. holsatus</i> , <i>M. corrugatus</i> , <i>Palaemon elegans</i> , <i>P. adspersus</i>	NE Atlántico O. Mediterráneo	intestino y ciego	liso (MEB)	ovoide	8-9		3	15-17		Labbé (1895)
<i>A. kudo</i>	<i>Sepia elíptica</i> (Sepiidae)	-	Océano Índico	intestino	liso	esférica a ovoide	9-14		6-12	16-18		Narasimhamurti (1979)
<i>A. dobelli</i>	<i>Enteroctopus dofleini</i> (Octopodidae)	-	NE Pacífico	intestino y ciego	liso	subesférica a subovoide	18-31	15-27	9-22	18-23	2	Poynton et al. (1992)
<i>A. millerorum</i>	<i>Octopus bimaculoides</i> (Octopodidae)	-	NE Pacífico	intestino, ciego, esófago y buche	liso	subesférica a subovoide	12-20	11-17	8-10	18-31	2	Poynton et al. (1992)
<i>A. sagittata</i>	<i>Todarodes sagittatus</i> (Ommastrephidae)	-	NE Atlántico	intestino y ciego	liso	subesférica a subovoide	17	15	4-8	12		Gestal et al. (2000)
<i>A. patagonica</i>	<i>Enteroctopus megalocyatus</i> (Enteroctopodidae)	-	SO Atlántico	intestino y ciego	liso	esférica a ovoide	13	12	8	18		Sardella et al. (2000)
<i>A. andresi</i>	<i>Martialia hyadesi</i> (Ommastrephidae)	-	SO Atlántico	ciego e inicio del recto	liso	subovoide	10	8	3	16-20	2-2,5	Gestal et al. (2005)
<i>A. bathytherma</i>	<i>Vulcanoctopus hydrothermalis</i> (Enteroctopodidae)	-	NE Pacífico	intestino y ciego	liso	subesférica a subovoide	27-32	24-32	14-17	49	5	Gestal et al. (2010)
<i>A. polibraxiona</i>	<i>Octopus bimaculatus</i> (Octopodidae)	-	Golfo de California, México	ciego	proyecciones (MET)	ovoide a esférica	12-24	11-22	11-13	16-26	1-4	Colunga-Ramírez et al. (2021)
<i>A. sinensis</i>	<i>Amphioctopus fangsiao</i> , <i>Octopus minor</i> (Octopodidae)	-	NO Pacífico	intestino, ciego y otros órganos	espinoso	esférica a ligeramente subovoide	19-22	19-21	5-18	18-25	2-3	Ren & Zheng (2022)
<i>A. aspera</i>	<i>Amphioctopus ovulum</i> , <i>A. marginatus</i> (Octopodidae)	-	SO Pacífico	intestino y ciego	protuberancias irregulares (MET)	esférica a ovoide	16-18	15-18	12-16	13-17	1,6-2,4	Wang et al. (2023)
<i>A. valdessensis</i>	<i>Octopus tehuelchus</i> (Octopodidae)	<i>Cyrtograpsus altimanus</i> , <i>Cy. angulatus</i> , [ <i>Betaeus liliana</i> ]	So Atlántico	intestino y ciego	liso (MET)	esférica	11-13	11-13	4	16-20	3-4	estudio actual

## Objetivo

- Redescribir *Aggregata valdessensis* mediante observaciones in vivo y microscopía electrónica de barrido y transmisión.
- Elucidar el ciclo de vida de *A. valdessensis*.
- Evaluar dos posibles vías de transmisión de *A. valdessensis*: a través del consumo post mortem y de la ingestión de heces del pulpito.

## Materiales y métodos

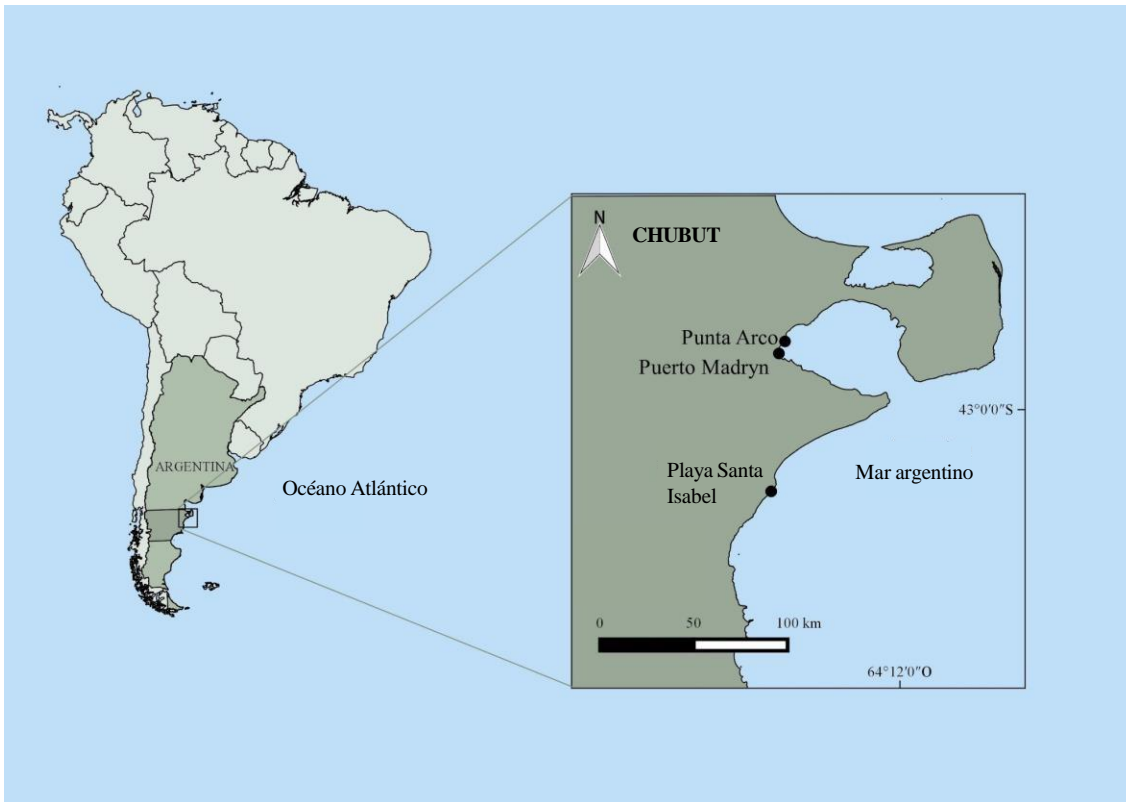
### Muestreo de pulpos y crustáceos

Se recolectaron ejemplares adultos de *O. tehuelchus* utilizando trampas de líneas colocadas a 10 metros de profundidad en Punta Arco (42°49' S; 61°04' O), Puerto Madryn, provincia del Chubut, Argentina (Figura 33), entre junio de 2017 y marzo de 2022 (se complementó la recolección con datos obtenidos de muestreos previos y registros existentes en el laboratorio).

En total, se recolectaron 1.460 ejemplares de crustáceos decápodos pertenecientes a 9 especies; el método de examinación de tres de estas especies fue explicada en capítulos anteriores (Capítulos I y II) (*Cy. altimanus* (n=120), *Cy. angulatus* (n=83) y *Carcinus* spp. (n=870)). Adicionalmente, se recolectaron manualmente en la zona intermareal inferior de la costa de Puerto Madryn otras 6 especies de crustáceos decápodos: *Peltarion spinulosum* (White, 1843) (n=40) y *Leucippa pentagona* Edwards, 1833 (n=3) (Brachyura); *Betaeus truncatus* Dana, 1852 (n=16) y *Betaeus liliana* Boschi, 1966 (n=49) (Caridea); *Munida gregaria* (Fabricius, 1793) (n=23) (Anomura); y *Exosphaeroma* spp. (n=56) (Isopoda).

Dado que los cangrejos estudiados en los capítulos anteriores se encontraron libres de infección o con prevalencias muy bajas (ver Capítulo II), en enero de 2022 se llevó a cabo un muestreo adicional en la playa Santa Isabel (Chubut) (Figura 33), una extensa área intermareal rocosa donde se conoce que cohabitan pulpos y cangrejos. De esta playa, se recolectaron manualmente 12 ejemplares de *O. tehuelchus* y 60 *Cy. altimanus* durante la marea baja.

Todos los organismos fueron transportados inmediatamente al laboratorio y colocados en recipientes con un sistema cerrado de circulación de agua de mar hasta su procesamiento.



**Figura 33.** Sitios de muestreo de los pulpos y de los crustáceos decápodos en la costa del Atlántico sudoeste. El mapa fue elaborado en QGIS 3.14.15. (Development Team, 2020. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>).

#### Examinación macroscópica y procesamiento histológico

Los especímenes de *O. tehuelchus* fueron anestesiados y sacrificados mediante exposición a una solución de agua de mar filtrada con 3,5 % de MgCl<sub>2</sub> durante 30 minutos, seguido de decapitación como método confirmatorio (Vázquez et al. 2023). El tracto digestivo fue examinado bajo un microscopio estereoscópico para detectar la presencia de células hipertrofiadas blancas, tipo “quistes” (Sardella & Ré 1988). Se realizaron frotis de fragmentos del tejido intestinal en portaobjetos y se examinaron a través de un microscopio óptico Leica DM2500. Las hipertrofias parasitarias, esporoquistes y esporozoítos se describieron y midieron empleando una cámara digital Leica DFC 280 y su respectivo software.

Se llevó a cabo el análisis macroscópico de los crustáceos mediante el procedimiento detallado en la sección "Metodología general". Con el propósito de caracterizar los estadios de la merogonia, se sometieron a procesamiento histológico un total de 15 ejemplares de *Cy. altimanus* provenientes de la playa Santa Isabel, siguiendo la metodología detallada en la sección mencionada anteriormente.

#### Observación al microscopio electrónico de barrido y de transmisión

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), se homogeneizaron pequeñas porciones intestinales de pulpos y cangrejos infectados para el posterior aislamiento de los esporoquistes. Luego, la suspensión de esporoquistes aislados y los fragmentos del tejido intestinal infectado fueron fijados en solución de Bouin y deshidratados en una serie de etanol (Gestal et al. 1999). Las muestras fueron sumergidas luego en hexametildisilazane durante 5 minutos y expuestas a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 minutos (Gilardoni et al. 2019). Las muestras secas fueron recubiertas con oro/paladio y observadas mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6460 LV SEM.

Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), pequeños fragmentos de tejido infectado de pulpo y cangrejo fueron fijados en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato (pH 7,2 - 7,4) en una cámara de vacío durante 2 horas a 4 °C y post-fijados en OsO<sub>4</sub> tamponado al 1% durante 1 hora a la misma temperatura. Después de la deshidratación en una serie de etanol graduada, el tejido infectado fue embebido en Spurr (Vázquez et al. 2010). Secciones ultrafinas (90 nm) fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas mediante un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL).

#### Hospedadores intermediarios y vías de transmisión

Se realizaron infecciones experimentales y análisis coproparasitológicos para explorar las vías de transmisión post mortem y mediante el consumo de heces, respectivamente.

#### **Infecciones experimentales**

Las especies utilizadas para las infecciones experimentales fueron presas comunes de *O. tehuelchus*, como los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp., (Ré & Gómez Simes 1992, Storero et al. 2016). Además, se utilizaron a los cangrejos verdes invasores *Carcinus* spp., que cohabitan con los cangrejos nativos en la costa norte de la Patagonia (Hidalgo

et al. 2005; Vinuesa et al. 2005; Torres & González-Pisani 2016), ya que fue citado como probable hospedador intermediario en el ciclo de vida de *Aggregata* sp. según Léger & Dubosq (1908). Además, aunque en esta tesis se determinó que estaban libres de infecciones (ver resultados en la sección “Capítulo I”), es posible que, en condiciones de laboratorio, resultaran infectados. Los ejemplares de cada especie se recolectaron en la zona intermareal inferior de la costa de Puerto Madryn. Se colocaron individualmente 16 ejemplares de *Cy. altimanus*, 16 de *Carcinus* spp. y 18 de *B. lilianae* en frascos de 100 ml con agua de mar filtrada y se les ofreció como alimento un fragmento del intestino infectado de *O. tehuelchus*. Todos los individuos fueron observados hasta que consumieron todo el fragmento de intestino y luego se devolvieron al acuario. Después de 72 horas, se repitió el mismo procedimiento para incrementar la probabilidad de obtener individuos parasitados. Al término de una semana después de la segunda alimentación, los crustáceos fueron diseccionados; se extrajo una porción del intestino y se observó bajo un microscopio óptico para detectar la presencia de cualquier etapa viable.

### **Análisis coproparasitológico**

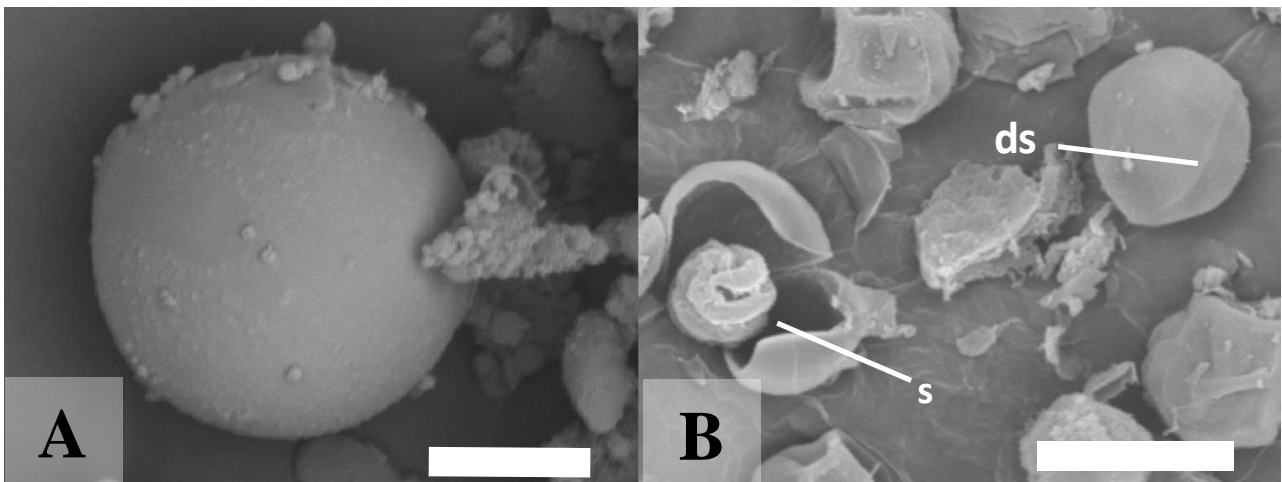
Se mantuvieron tres ejemplares de *O. tehuelchus* en recipientes individuales con agua de mar a 16°C y se alimentaron exclusivamente con una dieta de *Carcinus* spp. (ya que se determinó que se encontraban libres de infecciones, ver resultados en la sección “Capítulo I”). Durante 15 días las heces fueron recogidas individualmente cada vez que los pulpos defecaban, se pesaron con una balanza analítica y se procesaron siguiendo la técnica de sedimentación adaptada de Telemann (Yanet et al. 2017).

Cada muestra de heces se trituró en un mortero de vidrio con 2 ml de ácido acético al 5% y se dejó reposar (cada muestra) durante 5 minutos; después, el sobrenadante se filtró a través de un tamiz de 1 mm dentro de un tubo de ensayo, y finalmente, se añadieron 2 ml de éter y se agitó vigorosamente a mano antes de la centrifugación (MICROCEN 24, ORTO ALRESA) a 1500 rpm durante 1 minuto. Para cada muestra, se tomaron seis alícuotas de 100 µl desde el fondo del tubo con una micropipeta. Los esporoquistes maduros se contaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico Leica DM2500 con una magnificación de 40x (Vázquez et al. 2023).

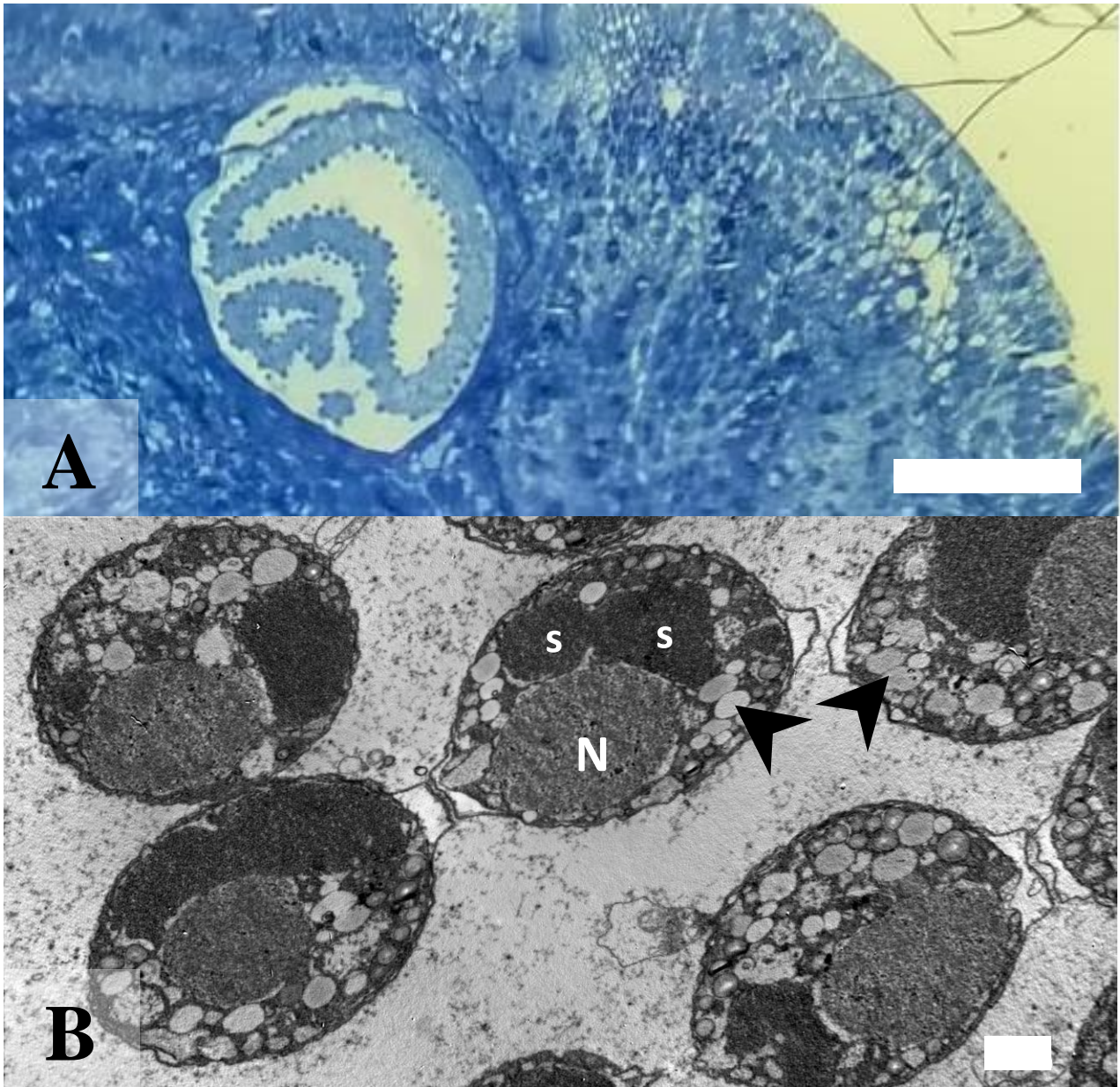
## Resultados

### Redescripción de *Aggregata valdessensis* en *Octopus tehuelchus*

Macroscópicamente se identificaron hipertrofias celulares provocadas por parásitos, denominadas en adelante como "xenomas", manifestándose como "quistes" blanquecinos en el tracto digestivo de los hospedadores; el intestino y el ciego fueron los únicos órganos infectados. Los diámetros de los xenomas variaron de 2 a 3,5 mm (media = 2,69 mm). Estas estructuras contuvieron esporoquistes esféricos (Figura 34) con un diámetro de 11,24-13,00  $\mu\text{m}$  (media = 12,41  $\mu\text{m}$ ) y 4 esporozoítos vermiformes. Los esporozoítos presentaron longitudes que variaban de 16,61 a 20,86  $\mu\text{m}$  (media = 19,24  $\mu\text{m}$ ) y de 2,85 a 3,66  $\mu\text{m}$  de ancho (media = 3,28  $\mu\text{m}$ ). La microscopía electrónica de barrido de los esporoquistes completamente desarrollados reveló que tienen una pared lisa; presentando una sutura o mecanismo de dehiscencia que pasa transversalmente a través de la pared (Figura 34). Las imágenes del microscopio electrónico de transmisión (TEM) de los esporoblastos tardíos muestran una membrana delgada que rodea a los esporozoítos en desarrollo, cada uno con un núcleo único ( $\cong 5 \mu\text{m}$  de tamaño) y citoplasma lleno de gotas de lípidos; cada célula está unida a la siguiente por la membrana, formando cuentas de rosario visibles en la sección semifina (Figura 35).



**Figura 34.** Esporoquistes del apicomplejo *Aggregata valdessensis* observados mediante microscopía electrónica de barrido en el pulpito *Octopus tehuelchus*. A) Aspecto general de un esporoquiste individual que muestra la pared lisa. B) Esporoquiste con mecanismo de dehiscencia visible (ds) y esporozoítos (s). Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$  (A, B).



**Figura 35.** Secciones del esporoblasto tardío del apicomplejo *Aggregata valdessensis* en el intestino del pulpito *Octopus tehuelchus*. A) Sección semifina (tinción de azul de toluidina) observada al microscopio óptico. B) Ultraestructura de los esporoblastos tardíos mostrando el núcleo (N), esporozoítos en desarrollo (s) y gotas de lípidos (flechas); note la pared delgada. Barras de escalas: 50  $\mu\text{m}$  (A); 2  $\mu\text{m}$  (B).

#### Descripción de la etapa de merogonia en cangrejos

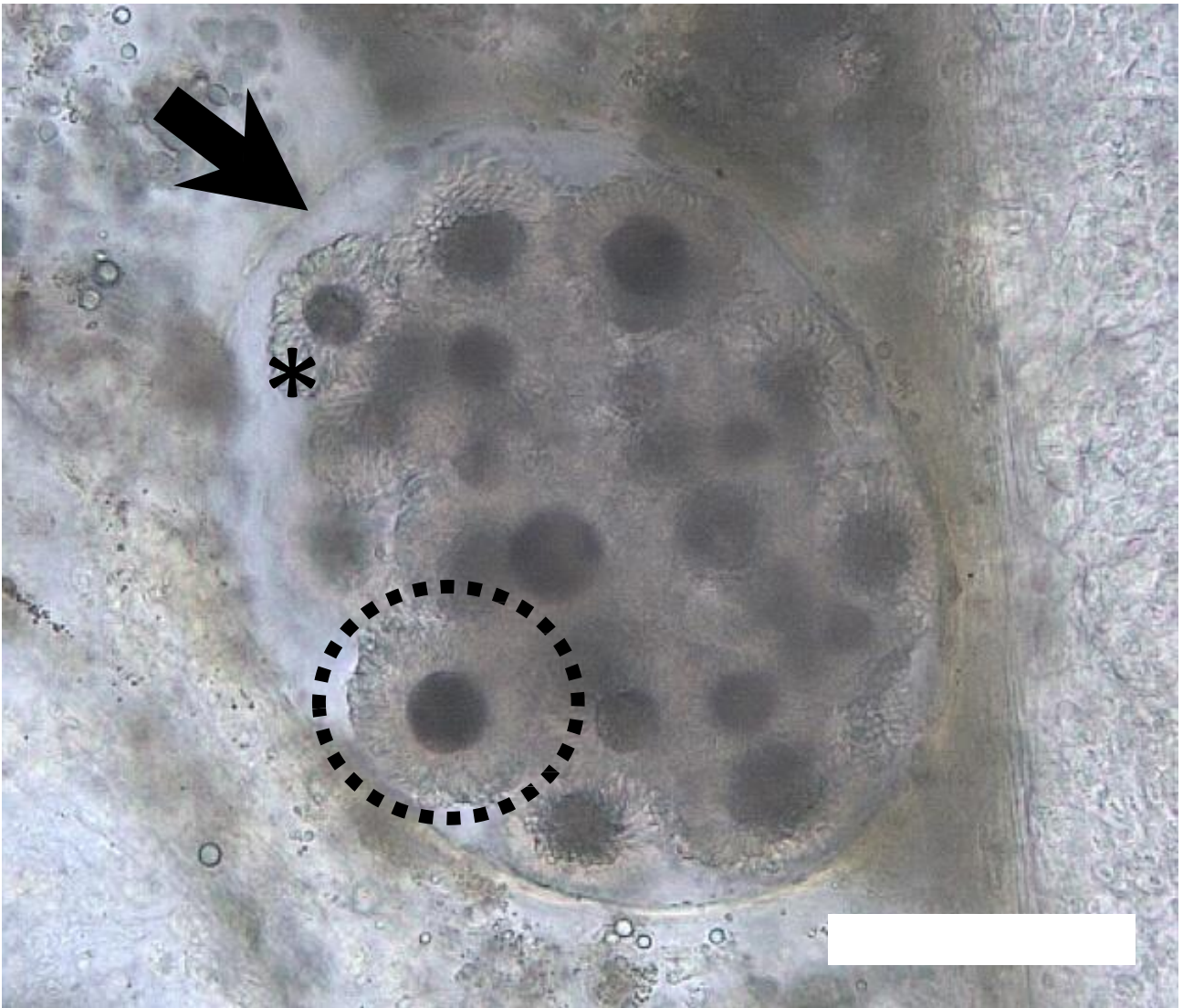
De las nueve especies de crustáceos examinadas, sólo se encontraron estadios de la etapa merogonia en los en los cangrejos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*. La prevalencia observada en los cortes histológicos de los cangrejos colectados en la costa de Puerto Madryn fue del 3% y del 2%, respectivamente, como se detalló en el “Capítulo II”. Se encontró una prevalencia más alta (del 51%) en los cangrejos recolectados en la playa

de Santa Isabel, donde cohabitan pulpos y cangrejos. La prevalencia fue mayor en cangrejos más grandes (Tabla 8).

**Tabla 8.** Prevalencia (%) del apicomplejo *Aggregata valdessensis* registrada en el cangrejo *Cyrtograpsus altimanus* en los diferentes tamaños examinados en la playa Santa Isabel, Patagonia, Atlántico sudoeste.

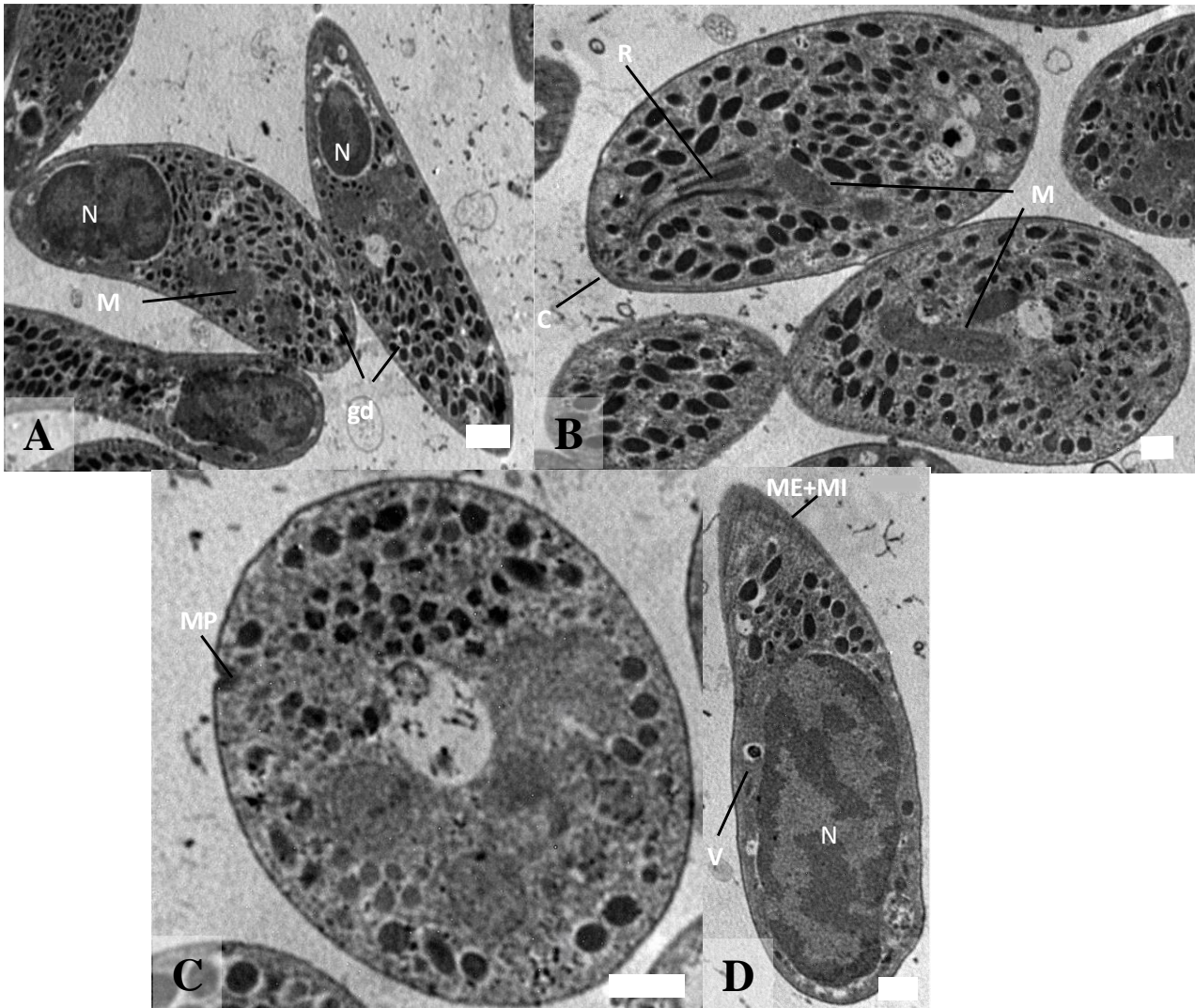
Ancho de caparazón (cangrejo) (mm)	N	Prevalencia %
6 - 8	10	40
9 - 10	14	43
11 - 13	13	54
14 -19	8	75

Se identificaron diferentes estadios de desarrollo de la merogonia en los cangrejos infectados mediante frotis frescos y observaciones histológicas al microscopio óptico. **Estadio uninucleado:** la célula que representa el estadio más temprano de la merogonia, presenta un núcleo central y se encuentra en la submucosa del intestino medio (Figura 24 A); la célula mide 32 x 25  $\mu\text{m}$  y el núcleo 5,9 x 4,4  $\mu\text{m}$ . **Meronte inmaduro:** grande, voluminoso, con merozoítos en un estadio temprana de desarrollo agrupados sin espacio visible entre ellos; se encuentran en el hemocele del hepatopáncreas (Figura 24 B). **Meronte maduro:** mide 92 x 71  $\mu\text{m}$  y contiene merozoítos completamente desarrollados que rodean una gran masa residual dispuesta radialmente con la apariencia de una “rosa”. Cada roseta mide 55 x 44  $\mu\text{m}$ , y se observan alrededor de 13 rosetas por meronte; se encuentran rodeando los túbulos del hepatopáncreas (Figura 24 C). Los merozoítos maduros dentro del meronte son vermiformes y miden 5,8 x 3  $\mu\text{m}$ , y sus núcleos son alargados, compactos, fuertemente teñidos y terminales en la célula (Figura 24 D). Los merontes maduros representaron el estadio más común y, cuando se observaron en frotis frescos, también se encontraron en la pared intestinal de los cangrejos (Figura 36).



**Figura 36.** Observación de in vivo de frotis del apicomplejo *Aggregata valdessensis* al microscopio óptico. Merontes maduros (flecha negra) **con** agrupaciones de merozoítos en forma de roseta (círculo) (asterisco). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

La ultraestructura de los merozoítos maduros exhibió el complejo apical característico del filo Apicomplexa (Figura 37), formado por un anillo polar, un conoide y roptrias. Se observó un núcleo cerca de la parte posterior (Figura 37 A). El conoide mostró la típica estructura de cono hueco en el extremo anterior de la célula, con dimensiones que van de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$  de altura y 0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 37 B). Se observaron roptrias homogéneas, originadas en la región del conoide y extendiéndose hacia la parte posterior del merozoíto, junto con la presencia de gránulos densos (Figura 37 B). Se observó una gran mitocondria, junto con vacuolas distribuidas. Además, se observó la presencia de un microporo en la parte anterior (Figura 37 C) y la presencia de una membrana externa e interna (Figura 37 D).



**Figura 37.** Ultraestructura de los merozoítos del apicomplejo *Aggregata valdessensis* del cangrejo nativos *Cyrtograpsus altimanus* observada mediante microscopía electrónica de transmisión. A) Sección longitudinal de merozoítos mostrando un núcleo alargado en posición terminal (N), gránulos densos (gd) y una mitocondria (M). B) Complejo apical mostrando conoide (C), anillo polar (P), roptrias (R) y una mitocondria (MI). C) Sección transversal mostrando microporo (MP). D) Sección longitudinal mostrando núcleo (N), membrana externa e interna (ME y MI) y vacuola (V). Barras de escala: 1  $\mu\text{m}$  (A); 0,5  $\mu\text{m}$  (B, C, D).

### Vías de Transmisión

#### **Infecciones experimentales**

Un ejemplar de *Cy. altimanus* y otro de *B. lilianae* resultaron infectados. En frotis frescos del intestino medio, observados bajo el microscopio óptico, se encontraron

esporozoítos libres y merontes inmaduros. Los ejemplares de *Carcinus* spp. no se infectaron.

### Análisis coproparasitológico

Los resultados del análisis coproparasitológico fueron positivos para los tres especímenes de *O. tehuetchus*. En las heces analizadas se contó un número variable de esporoquistes maduros, que osciló entre 60.000 y 240.000 por gramo de heces (Tabla 9).

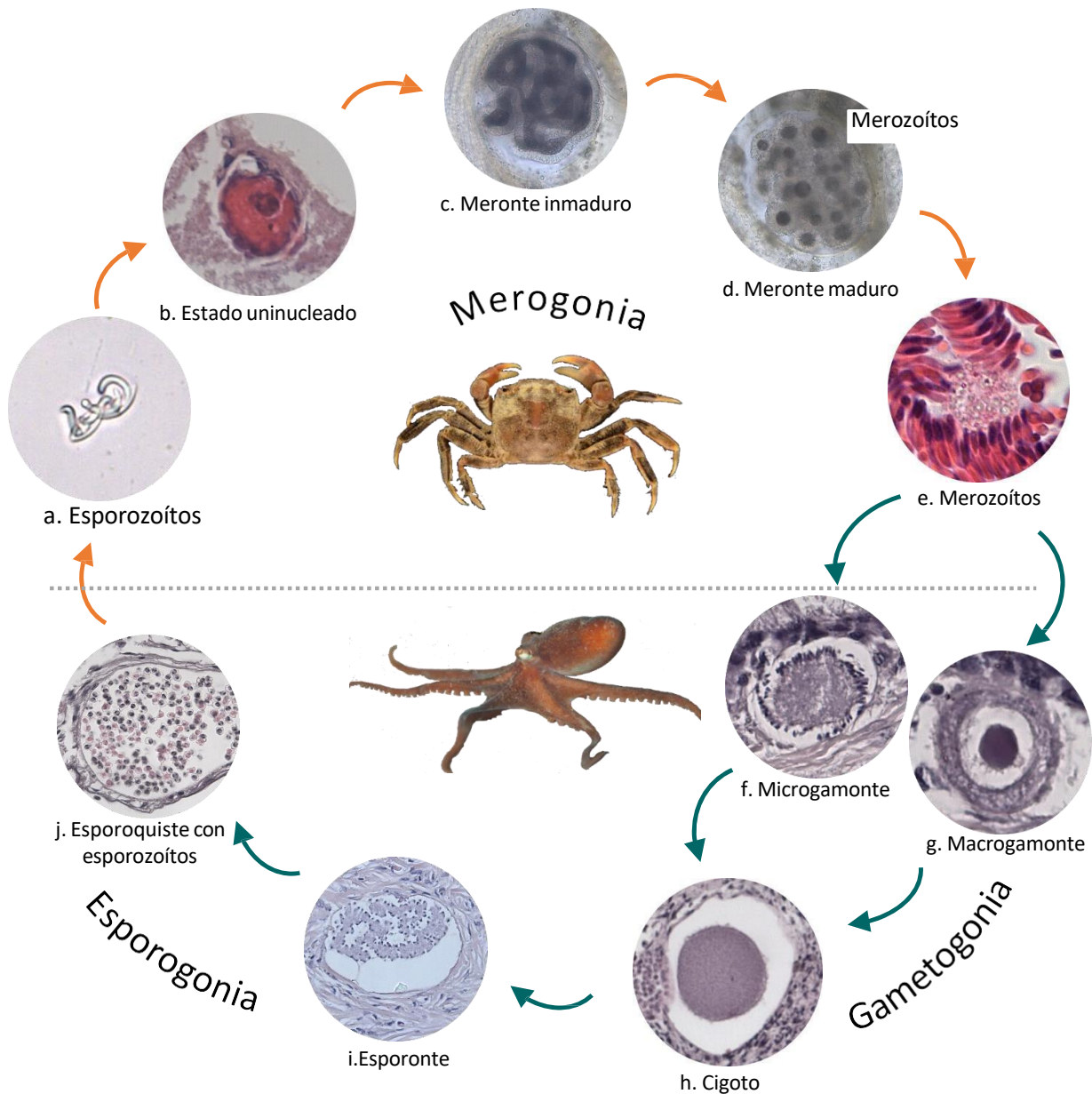
**Tabla 9.** Datos coproparasitológicos obtenidos de tres ejemplares del pulpito *Octopus tehuetchus*. Peso total del espécimen, peso del ciego disecado (g); S.g -1 (esporoquistes totales por gramo de heces, media  $\pm$  desviación estándar); TS ciego (esporoquistes totales por gramo de ciego).

Especimen	Peso total	Peso del ciego	S.g <sup>-1</sup> ( $\bar{x} \pm$ SE)	TS ciego x 10 <sup>6</sup>
1	55	0,236	77600 (96000)	189
2	56,4	0,154	61600 (41000)	270
3	76,4	0,226	241000 (85000)	247

### Ciclo de vida propuesto para *Aggregata valdessaensis*

El ciclo de vida de *A. valdessaensis* (Figura 38) puede iniciar por dos vías diferentes: los esporozoítos (a) ingresan en los cangrejos *Cyrtograpsus* spp. al consumir heces de cefalópodos o al alimentarse de hospedadores muertos, ambas rutas confirmadas en el presente estudio. Dentro del hospedador intermediario, los esporozoítos infectivos son liberados en el intestino, donde penetran en las células epiteliales durante el estadio uninucleado (b) y eventualmente se convierten en merontes. El meronte inmaduro (c) sigue divisiones mitóticas hasta su completa maduración (d), produciendo finalmente merozoítos (e) que permanecen en el celoma adheridos al tracto digestivo del cangrejo. Cuando *O. tehuetchus* se alimenta de cangrejos infectados, los merozoítos infectivos son liberados dentro del tracto digestivo del cefalópodo. La gametogonia es el primer proceso que involucra a las células epiteliales del ciego e intestino, produciendo microgamontes (f) y macrogamontes (g) que se fusionan para formar el cigoto (h). A continuación, ocurre la etapa de esporogonia; mediante divisiones meióticas que producen el

esporonte/espoblasto (i). Finalmente, después de la proliferación y maduración, los esporoquistes (j) se desarrollan completamente dentro de células hipertrofiadas del tracto digestivo (xenomas). La ruptura de los xenomas libera esporoquistes con heces; sin embargo, algunos xenomas permanecerían dentro del cefalópodo durante toda su vida. Eventualmente, los esporozoítos son consumidos por cangrejos y el ciclo continúa.



**Figura 38.** Ciclo de vida del apicomplejo *Aggregata valdensensis* en el Atlántico Sudoeste.

## Discusión

El apicomplejo *A. valdessensis* fue redescrito basándose en características morfológicas observadas mediante microscopios electrónico de barrido (MEB) y de transmisión (MET). Estos procedimientos complementaron las características fenotípicas previamente identificadas mediante secciones histológicas por Sardella et al. (2000). Se halló *A. valdessensis* en hospedadores intermediarios en la naturaleza, lo que condujo a la identificación de estadios merogónicos maduros en cangrejos de las especies *Cyrtograpsus* spp. Además, se confirmaron dos vías de transmisión del parásito: desde el hospedador definitivo hasta el intermediario, a través de infecciones experimentales alimentando crustáceos decápodos con intestinos de pulpo *O. tehuelchus* infectados, y mediante análisis coproparasitológicos de heces del pulpo. Se ha elucidado el ciclo de vida de *A. valdessensis*, marcando un avance significativo en la investigación de *Aggregata* y constituyendo el primer caso documentado en el Hemisferio Sur y el segundo a nivel mundial.

En el filo Apicomplexa, un "ooquiste" es una estructura resistente, con paredes gruesas, que contiene un número específico de esporoquistes (dependiendo de la especie), cada uno de los cuales a su vez contiene un número variable de esporozoítos (también dependiendo de la especie) (Seemann et al. 2012; Bush et al. 2021). Las especies del género *Aggregata* se caracterizan por la formación de una estructura en sus hospedadores definitivos, conocida hasta ahora como "ooquiste", que alberga un gran número de esporoquistes. Sin embargo, los esporoquistes se desarrollan dentro de las células epiteliales del tracto digestivo del cefalópodo, y no dentro del "ooquiste" en sí mismo. Dada la reciente reasignación de los Apicomplexa acuáticos a un nuevo clado, Marosporida (Mathur et al. 2021), se considera un momento oportuno para corregir el malentendido en relación con esta estructura; en lugar de ser una estructura de resistencia, constituye una hipertrofia en la célula infectada debido al desarrollo de un gran número de esporoquistes. Por lo tanto, se propone referirse a esta estructura como "xenoma". El término, derivado del griego (xeno = extranjero; soma = cuerpo), puede establecer un paralelo con la estructura formada por algunos Microsporidia que infectan peces y otros organismos acuáticos (Stentiford et al. 2014).

Se observó la presencia de un considerable número de xenomas en *O. tehuelchus*, visibles tanto en el intestino como en el ciego. A partir de la observación macroscópica y

el análisis de las características histopatológicas (Vázquez et al. 2023), se determinó que el sitio de infección era similar al previamente descrito para las especies de *Aggregata* (Mladineo & Bočina 2007; Gestal et al. 2010). No obstante, en el caso de *A. sinensis* y *A. octopiana*, solo en infecciones leves los xenomas se limitan al tracto digestivo, mientras que en infecciones de alta intensidad los xenomas se extienden más allá del tracto digestivo, afectando otros órganos (Ren & Zheng 2022; Gestal et al. 2002b).

En el presente estudio, las observaciones realizadas mediante MEB proporcionaron una mejor comprensión de la morfología, la topología de la superficie y el mecanismo de dehiscencia de los esporoquistes de *A. valdessensis*, los que mostraron ser esféricos, similares a los de *A. octopiana* (Tabla 7) (Colunga-Ramírez et al. 2021). Además, en las especies de *Aggregata* se han identificado cuatro tipos distintos de superficies en la pared del esporoquiste a través de observaciones por MEB: lisa en la mayoría de las especies, espinosa en *A. octopiana*, con proyecciones en *Aggregata polibraxiona* Colunga-Ramírez, Martínez-Aquino, Flores-López, Gestal, Azevedo & Castellanos-Martínez, 2021 y con protuberancias irregulares en *Aggregata aspera* Wang, Ren & Zheng, 2023 (Tabla 7) (Gestal et al. 1999; Colunga-Ramírez et al. 2021; Wang et al. 2023). Cabe destacar que, a pesar de la importancia de utilizar MEB, hasta la fecha, solo se ha llevado a cabo para cuatro de las 13 especies descritas (Tabla 7).

Los estudios al MET de los merozoítos encontrados en los cangrejos revelaron la presencia de un cono corto y abierto, de dimensiones similares a las observadas en *A. eberthi* (Gestal et al. 2002a). Sin embargo, a diferencia de *A. eberthi*, se observó la presencia de un microporo en la membrana de los merozoítos, además de tres roptrias distinguibles.

Aunque la mayoría de las especies del género *Aggregata* utilizan miembros de la familia Octopodidae como sus hospedadores definitivos, algunas también se han registrado en Sepiidae, Enteroctopodidae y Ommastrephidae (Tabla 7). En términos de especificidad, se ha observado que las especies de *Aggregata* muestran una marcada preferencia por el hospedador cefalópodo definitivo (Hochberg 1990). *Aggregata valdessensis* se encontró únicamente en un hospedador definitivo, lo cual concuerda con la mayoría de las especies de *Aggregata*, excepto por *A. sinensis* y *A. aspera*, que han sido halladas en dos hospedadores cefalópodos diferentes (Ren & Zheng 2022; Wang et

Según los resultados obtenidos en los cortes histológicos de los cangrejos provenientes de Puerto Madryn ("Capítulo II") y en las infecciones experimentales, se confirmaron los hospedadores intermediarios para *A. valdessensis*. Sin embargo, las bajas prevalencias de infección observadas en los experimentos pueden estar relacionadas con diversas fases del diseño experimental. Léger & Duboscq (1908) sugieren que el desarrollo completo de los esporozoítos en los cangrejos puede tardar al menos dos meses bajo condiciones óptimas, con los merontes apareciendo en etapas tardías del ciclo. En el experimento descrito en esta tesis, el período entre la ingestión de los esporozoítos y la disección fue de solo una semana, lo que podría no haber sido suficiente para que los parásitos alcanzaran etapas de infección detectables (merontes). Esta decisión de utilizar un período más corto se basó en la experiencia de Dobell (1925), quien estudió el ciclo de vida de *A. eberthi* en *S. officinalis* como hospedador definitivo, y realizó experimentos similares, en los cuales los cangrejos fueron sacrificados y examinados después de sólo 24 horas, obteniendo resultados positivos. Aunque Dobell (1925) trabajó con un hospedador diferente, sus experimentos demostraron que los esporozoítos podían ser detectados antes de completar su ciclo de desarrollo completo. Además, el tamaño muestral relativamente pequeño (16 *Cy. altimanus*, 16 *Carcinus* spp. y 18 *B. liliana*) podría haber limitado la probabilidad de detectar infecciones, especialmente si las tasas de infección son bajas, como se observó en la naturaleza. Por lo tanto, la combinación de un tiempo insuficiente para detectar el parásito y el tamaño muestral reducido podría explicar la baja prevalencia de infección observada.

En su hábitat natural, se encontró que *A. valdessensis* se encuentra exclusivamente en los cangrejos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, dentro de las 9 especies de crustáceos examinadas. Este hallazgo sugiere cierta especificidad hacia el hospedador intermediario, en contraste con observaciones previas en *A. eberthi* y *A. octopiana* (Gestal et al. 2002a). Las prevalencias de la infección variaron entre los cangrejos recolectados en la playa de Santa Isabel y en los recolectados en Puerto Madryn (51% y 2-3%, respectivamente) (ver "Capítulo II"). Las playas de Santa Isabel presentan una amplia extensión de zona intermareal rocosa y una mayor presencia de refugios para cangrejos y pulpos, por lo que es posible que las diferencias en las prevalencias entre sitios se deban a la coexistencia de ambos hospedadores para completar el ciclo de vida de *A. valdessensis*. Es relevante destacar que en la playa de Santa Isabel únicamente se recolectaron ejemplares de *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*,

por lo tanto, sería pertinente realizar un muestreo más exhaustivo que incluya una mayor diversidad de especies de crustáceos para evaluar la especificidad del hospedador intermediario en un sitio donde cohabiten.

Aunque Martorelli & Sardella (1997) describieron la etapa de merogonia de *Aggregata* sp. en crustáceos peneidos como *P. muelleri* y *A. longinaris*, se considera que estos crustáceos probablemente no sean los hospedadores intermediarios de *A. valdessensis*. Esta suposición se fundamenta en el hecho de que la ecología trófica es clave para determinar la composición de la fauna parasitaria de los cefalópodos (González et al. 2003). En este sentido, los pulpos juveniles habitan aguas más someras, incluyendo la zona intermareal, donde los camarones y crustáceos similares son poco comunes (Storero et al. 2013). Por el contrario, resulta más preciso afirmar que *O. tehuelchus* se infecta a través de hospedadores crustáceos bentónicos presentes en su hábitat cercano, como los cangrejos, mientras que los crustáceos mencionados por Martorelli & Sardella (1997) probablemente intervienen en el ciclo de vida de otra especie de *Aggregata*. Dado que el hospedador intermediario de *A. patagonica* sigue siendo desconocido, estudios moleculares adicionales que comparen etapas adultas en el pulpo colorado, *E. megalocyathus*, y merontes de estos camarones contribuirán a aclarar su identidad taxonómica y, posiblemente, a elucidar este ciclo de vida también.

Todas las clases de tamaño de cangrejos examinados en la playa de Santa Isabel estaban infectadas por *A. valdessensis* por encima del 40%. Esto sugiere que los pulpos acumulan parásitos a lo largo de su vida al alimentarse de cangrejos, ya que son capaces de hacerlo después de alcanzar los 3-4 meses de edad (comunicación personal Gustavo Mariluán). Por lo tanto, al seguir alimentándose de cangrejos a medida que crecen (Ré & Gómez-Simes 1992, Storero et al. 2016), los pulpos se infectan repetidamente. Esta dinámica podría explicar las altas prevalencias e intensidades de infección previamente reportadas en poblaciones naturales de *O. tehuelchus* (75%) (Vázquez et al. 2023). En el presente estudio, se realizó una infección experimental en cangrejos verdes invasores alimentándolos con un gran número de esporoquistes procedentes de *O. tehuelchus* infectados, pero el resultado fue negativo. Aunque Léger & Duboscq encontraron una especie no identificada de *Aggregata* en 1908, estudios posteriores no han logrado encontrar infecciones de *Aggregata* en el cangrejo verde (Gestal et al. 2002a; Bojko et al. 2021). Estos resultados confirman que el cangrejo verde, una especie invasora

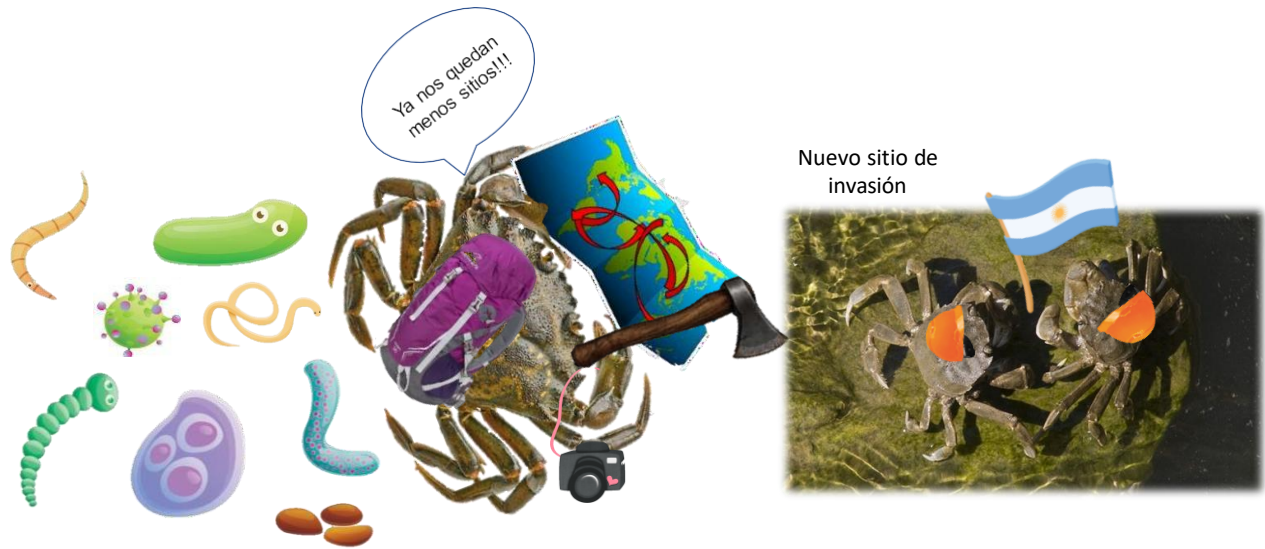
abundante en todo el mundo, no actúa como un hospedador intermediario del apicomplejo *Aggregata*.

El presente estudio corrobora la existencia de dos vías de infección distintas desde el hospedador intermediario, el cangrejo, al hospedador definitivo, el pulpo. Los cangrejos se alimentan tanto de los cuerpos muertos de pulpos como de sus heces, y esto se verificó mediante la infección experimental de cangrejos con intestinos de pulpo y un examen coproparasitológico. Este último hallazgo muestra que las heces contienen los xenomas (es decir, células epiteliales digestivas hipertrofiadas llenas de esporoquistes), que se desprenden del tracto digestivo del pulpo y son liberados. Dado el comportamiento carroñero de los cangrejos ambas estrategias podrían ser efectivas, ya que se basan en la disponibilidad de cuerpos muertos de pulpos y sus heces en el sustrato del fondo marino. Tal efectividad también explica la alta prevalencia del uso del hábitat de los hospederos intermediarios y definitivos.

A pesar de los avances significativos logrados en este estudio respecto a la comprensión del ciclo de vida y la morfología de *A. valdessensis*, es importante señalar la necesidad de futuros análisis moleculares para validar la identificación de las especies tanto en el pulpo como en el cangrejo. Estos análisis serían cruciales para confirmar que los especímenes hallados en ambos hospedadores (intermediario y definitivo) pertenecen a la misma especie, proporcionando una base más sólida para la investigación futura. Además, dichos estudios moleculares podrían contribuir a revelar detalles adicionales sobre la diversidad genética dentro de *A. valdessensis* y su relación con otras especies de *Aggregata*. Este enfoque complementario fortalecería aún más la comprensión de la biología y la ecología de este apicomplejo, abriendo el camino para investigaciones más detalladas sobre su distribución, impacto en los hospedadores y dinámica poblacional en los ecosistemas marinos.

## CAPÍTULO IV

### Interacciones hospedador-parásito en la invasión del cangrejo verde y sus implicancias en los cangrejos nativos de la costa patagónica



## Introducción

En los últimos años, las invasiones biológicas se han reconocido como factores claves en los cambios de la estructura y función de las comunidades. Sin embargo, gran parte de este reconocimiento se ha centrado en las comunidades de vida libre, con poco énfasis a la relación hospedador-parásito (Barnard et al. 2022). Las introducciones de especies exóticas son experimentos "naturales" que proporcionan oportunidades para estudiar la especificidad hospedadora y la colonización de hospedadores (Torchin et al. 1996).

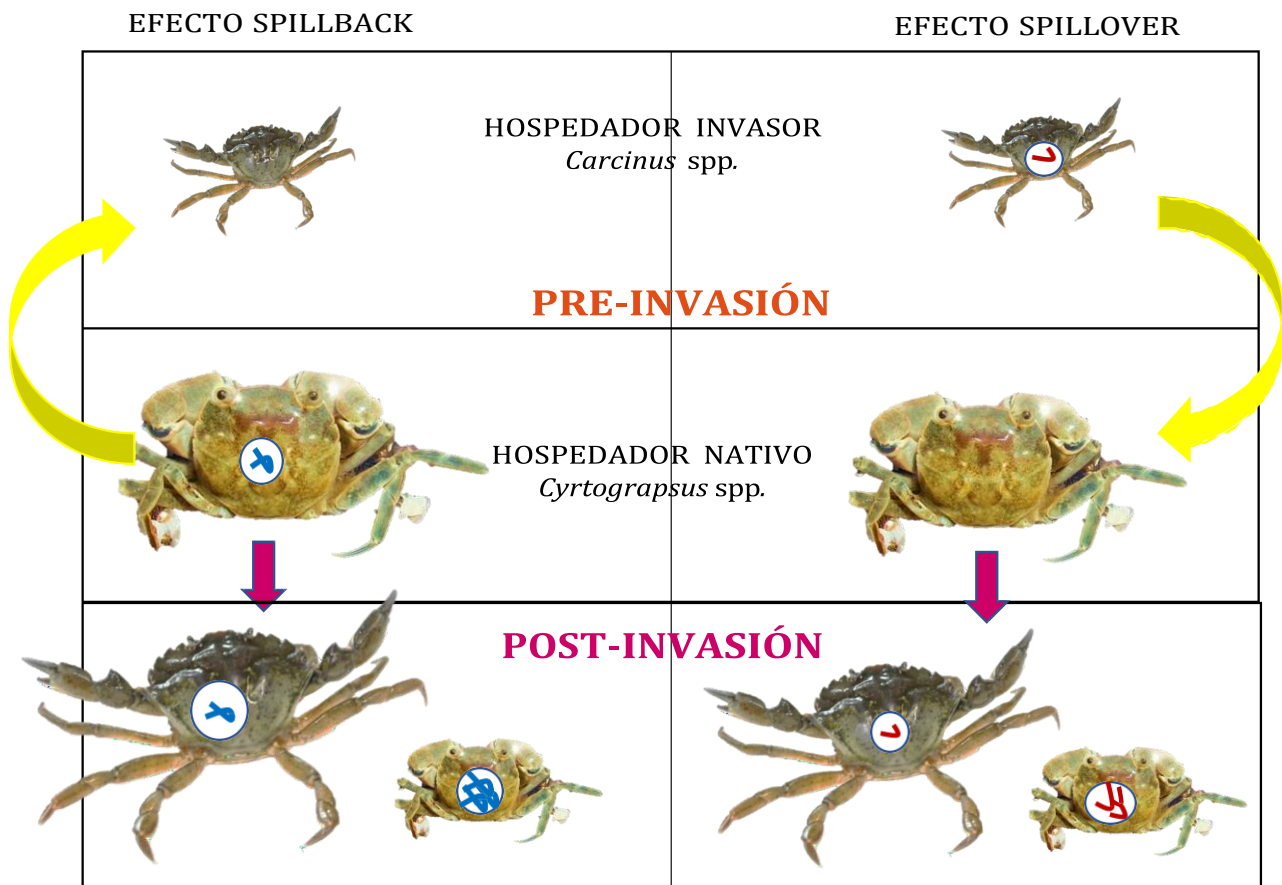
Las invasiones pueden alterar la dinámica hospedador-parásito mediante diversos mecanismos (Kelly et al. 2009; Goedknecht et al. 2016). Uno de éstos es la "hipótesis de la liberación de enemigos"; se refiere a la pérdida de "enemigos" que las especies invasoras tenían en su área de distribución de origen durante el proceso de introducción en una nueva área, incluyendo a los parásitos (Torchin et al. 2002; Blakeslee et al. 2013; Simmons 2014). Evadir la carga parasitaria puede conferir ventajas en aptitud o competitividad, favoreciendo el éxito reproductivo en una nueva área invadida (Torchin & Mitchell 2004; Torchin & Lafferty 2009; Blakeslee et al. 2013; Goedknecht et al. 2017b; Keogh et al. 2017). Por ejemplo, en el noreste de EE. UU., los cangrejos invasores como *Ca. maenas* y *Hemigrapsus sanguineus* (De Haan, 1835) han escapado de parásitos castradores que poseen en sus áreas de distribución de origen (Blakeslee et al. 2009). En ciertos casos, las especies invasoras logran eludir hasta un 67-100% de la diversidad de parásitos que presentaban en su lugar de origen (Blakeslee et al. 2013). El grado en que las especies escapan de sus parásitos suele depender del vector de introducción (medio por el cual la especie hospedadora es introducida), la distancia entre las regiones y la complejidad del ciclo de vida del parásito, así como del tiempo transcurrido desde la introducción (Prenter et al. 2004b; Torchin & Mitchell 2004; Blakeslee et al. 2013). Los barcos modernos, que emplean agua como lastre, representan una entrada común para la introducción de organismos no deseados. Principalmente transportan los estadios larvarios como polizones, lo que disminuye la probabilidad de que estén parasitados, debido a que las larvas no suelen estar infectadas (Torchin & Mitchell 2004; Blakeslee et al. 2013). Alternativamente, estos organismos pueden encontrar dificultades para establecerse debido a que las poblaciones fundadoras están compuestas por pocos organismos (Torchin et al. 2002; MacLeod et al. 2010). Sin embargo, este escape de los parásitos podría disminuir con el tiempo si los

vectores de introducción siguen activos y/o si las especies introducidas se convierten en hospedadores adecuados para los parásitos nativos (Torchin & Mitchell 2004; Torchin & Lafferty 2009; Goedknecht et al. 2016; Kroft & Blakeslee 2016).

La adquisición de parásitos nativos por parte de las especies invasoras, no solo aumentaría la carga parasitaria de la especie invasora, sino que también podría diluir el impacto en los hospedadores nativos, otorgándoles una ventaja durante las interacciones competitivas (Goedknecht et al. 2016). Esta adquisición está influenciada por la susceptibilidad de la especie invasora como hospedador (Kelly et al. 2009; Poulin et al. 2011). Cuando la especie invasora resulta en un hospedador adecuado para los parásitos, puede amplificar la población de parásitos, lo cual podría conducir a un aumento en las prevalencias e intensidades en las especies nativas (Goedknecht et al. 2016). A este mecanismo se lo conoce como “efecto spillback” (Figura 39). Las condiciones para que este efecto ocurra son las siguientes: 1) la especie invasora debe adquirir parásitos nativos, 2) la especie invasora debe ser un hospedador adecuado para los parásitos y amplificar la población de parásitos, 3) como resultado de esta amplificación, el parásito nativo debe reinfectar a la especie nativa (Kelly et al. 2009). Aunque hay numerosos reportes sobre la adquisición de parásitos nativos por parte de especies invasoras (Miller & Vincent 2006; Georgiev et al. 2014; Sheath et al. 2015; Lewicki et al. 2015), hay poca evidencia concluyente de una amplificación y/o reinfección real a especies nativas (Hershberger et al. 2010; Goedknecht et al. 2016). Alternativamente, las especies invasoras podrían no ser hospedadores adecuados para los parásitos nativos, sino que podrían interferir con los procesos de transmisión al eliminar las etapas infecciosas de los parásitos nativos en el ambiente (por ejemplo, a través de la depredación o al actuar como hospedadores aberrantes o accidentales) fenómeno conocido como interferencia en la transmisión o dilución de parásitos (Johnson & Thieltges 2010; Goedknecht et al. 2016).

Los parásitos también pueden introducirse conjuntamente con una especie invasora (Lymbery et al. 2014). Estos parásitos introducidos podrían cambiar de hospedador para utilizar a las especies nativas como hospedadores adecuados, y este fenómeno se lo denomina “efecto spillover” (Kelly et al. 2009; Goedknecht et al. 2016) (Figura 39). No solo aumentaría la carga de parásitos en las especies nativas, que ya lidian con su riqueza completa de parásitos, sino que también podría diluir los impactos del parásito introducido en su hospedador introducido. Este evento a menudo conduce a

enfermedades emergentes en los hospedadores nativos (Daszak et al. 2000). Se ha demostrado que los efectos “spillover” tienen fuertes repercusiones, tanto directas, es decir, causando mortalidades masivas (Harvell et al. 1999; Fey et al. 2015) e indirectas a través de efectos mediados por la densidad y, por lo tanto, pueden determinar los resultados de coexistencia de especies competidoras (Hatcher et al. 2006; Dunn et al. 2012). Además, hay casos en los que los parásitos co-introducidos logran establecerse y propagarse con su hospedador invasor, sin infectar a otras especies nativas (Goedknecht et al. 2016).



**Figura 39.** Diagrama conceptual de los efectos “spillback” y “spillover”, tomando como ejemplo a los cangrejos verdes invasores *Carcinus* spp. y a los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. El tamaño del cangrejo (hospedador) representa su tamaño poblacional, el círculo representa a la población de parásitos que varía en el tamaño (prevalencia) y número de parásitos (intensidad de infección). El efecto “spillback” (esquemático a la izquierda en la figura) ocurre cuando un hospedador invasor adquiere los parásitos de un hospedador nativo y actúa como un reservorio adicional, por lo cual la población del parásito incrementa y la población del hospedador nativo disminuye. El efecto “spillover” (esquemático a la derecha en la figura) ocurre cuando un hospedador invasor introduce una especie de parásito en un

ambiente donde existen hospedadores nativos susceptibles que se infectan con el parásito; la población de parásitos incrementa y la del crustáceo nativo disminuye. El diagrama es una adaptación de la Figura 1 en Kelly et al. (2009).

También es posible que una vez que los hospedadores infectados se trasladan, sus parásitos no encuentren hospedadores adecuados para completar su ciclo de vida en el nuevo entorno (Torchin et al. 2001; Blakeslee et al. 2013). Para infectar con éxito a un hospedador, un parásito debe encontrar primero su nueva especie de hospedador (filtro de encuentro) y superar cualquier barrera, como el sistema inmunológico del hospedador (filtro de compatibilidad) (Combes 2020).

Lo adecuado que resulte ser un hospedador puede variar entre especies de hospedadores y, a menudo, es el resultado de la coadaptación en escalas de tiempo evolutivas más largas (Telfer & Brown 2012). La falta de una historia coevolutiva a menudo puede hacer que las especies invasoras no sean hospedadores adecuados y, por lo tanto, es posible que no se produzca la adquisición de especies de parásitos nativos. Por ejemplo, la almeja invasora en Filipinas, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) no pudo infectarse artificialmente con el trematode nativo *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831), mientras que, en el berberecho común nativo, *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), la infección tuvo éxito (Dang et al. 2009). Las etapas infectivas del parásito de vida libre no pudieron atravesar el epitelio del bivalvo invasor y, por lo tanto, las bajas tasas de infecciones en el laboratorio y en el campo se debieron a una barrera del hospedador (Dang et al. 2009).

La colonización de nuevos hospedadores podría luego resultar en una serie de cambios en la prevalencia, abundancia y diversidad de parásitos en hospedadores introducidos y nativos en la región invadida a lo largo del tiempo (Wolff & Reise 2002; Krakau et al. 2006, Kelly et al. 2009, Johnson & Thielges 2010, Poulin 2011, Goedknecht et al. 2016). Dada la posibilidad de dinámicas de hospedador-parásito alteradas, es fundamental conocer la abundancia y diversidad de parásitos prevalentes a lo largo del tiempo en poblaciones de hospedadores introducidos y nativos (Barnard et al. 2022). Es importante tener en cuenta que la riqueza de parásitos de los hospedadores introducidos a menudo consiste en parásitos co-introducidos, pero también en parásitos nativos o previamente establecidos que han sido adquiridos por la especie introducida en el rango invasor (Torchin & Mitchell 2004). Estudios que comparan niveles de infección entre

hospedadores introducidos y nativos que compiten (Colautti et al. 2004; Torchin y Mitchell 2004), sugieren que la riqueza de parásitos, la prevalencia y la abundancia son, de hecho, a menudo más altas en especies de hospedadores nativos en comparación con la especie de hospedadores introducidos (Georgiev et al. 2007; Dang et al. 2009; Roche et al. 2010, Gendron et al. 2012).

Patógenos tales como virus, bacterias, hongos, microsporidios y nematodos, pueden ser utilizados para controlar las poblaciones invasoras de crustáceos (Ovcharenko et al. 2010; Stentiford et al. 2011). Debido a distribuciones generalizadas en comunidades invasoras y nativas, los trematodos han sido investigados en múltiples estudios que examinan la influencia de las introducciones de especies en comunidades de parásitos (Miura et al. 2006, Reisinger & Lodge 2016). Por ejemplo, Blakeslee et al. (2020a) examinaron el efecto de la introducción de hospedadores en comunidades de trematodos de familia Microphallidae en dos bahías de Terranova, Canadá, una invadida por el cangrejo verde europeo *Ca. maenas* y otra no. En ambas bahías se estudiaron cangrejos nativos de roca *Cancer irroratus* Say, 1817 y dos especies nativas de caracoles del género *Littorina* Férussac, 1822 para parásitos trematodos, además de *Ca. maenas*. Los mencionados autores hallaron parásitos de trematodos nativos utilizando al cangrejo invasor *Ca. maenas* como un hospedador intermediario adecuado, y la adición de este nuevo hospedador diluyó la abundancia de trematodos en los cangrejos nativos en la bahía invadida. Además, trabajos anteriores sobre *Ca. maenas* identificaron que la historia coevolutiva parásito-hospedador juega un papel importante en la prevalencia y abundancia de parásitos en términos de susceptibilidad diferencial a la infección por trematodos en áreas invadidas y originarias (Blakeslee et al. 2020b). Por lo tanto, el momento del contacto con un parásito es un factor que afecta la prevalencia y la abundancia de parásitos en comunidades hospedador-parásito, y es un aspecto importante a considerar al examinar invasiones históricas versus contemporáneas de hospedadores a regiones nuevas.

Los crustáceos se encuentran entre los grupos más exitosos de invasores acuáticos globales (Warren et al. 2023). El cangrejo invasor *Ca. maenas* está asociado con una amplia gama de fauna de simbiosis, tanto en sus áreas invadidas como de distribución de origen, albergando más de 80 simbiosis distintos (Bojko et al. 2021) (Ver apéndice I). Como se describió en “Introducción General y Capítulo I” *Carcinus* spp. han invadido recientemente las costas patagónicas. Tanto en sus regiones invadidas como en las áreas

de origen, el cangrejo está infectado por trematodes microfálidos que utilizan caracoles como primer hospedador intermediario y aves como hospedadores definitivos (Blakeslee et al. 2015).

En Patagonia, *Carcinus* spp. han sido encontrados libre de digeneos trematodes, como se detalla en el "Capítulo I". Por otro lado, los cangrejos nativos del género *Cyrtograpsus* spp. están infectados por el trematode digeneo *Maritrema madrynense* (Ver detalles en Capítulo II).

## Objetivos

- Evaluar si existen diferencias en la composición de las comunidades parasitarias (riqueza) de cada especie de cangrejo estudiada y en las características de las poblaciones parasitarias (prevalencia e intensidad media).
- Evaluar la susceptibilidad del cangrejo invasor al parásito digeneo, *Maritrema madrynense* (Microphallidae) mediante experimentos de exposición y cohabitación.
- Identificar cuáles de los parásitos que eventualmente se encuentren en el cangrejo verde son nativos y cuáles introducidos, a fin de determinar, sumado a los experimentos de infección, la existencia de efectos "spillover" y "spillback", utilizando, además, la información disponible en la bibliografía.

## Materiales y métodos

### Composición de las comunidades de simbioses

Se calculó la riqueza específica de simbioses total (incluyendo los macrosimbioses y microsimbioses hallados) como se describe en la sección de "Metodología general", para las cuatro especies de cangrejos estudiadas: *Carcinus* spp., *Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*. Además, se calculó la riqueza de simbioses diferenciando entre macrosimbioses y microsimbioses.

### Análisis estadísticos de los parámetros de infección y riqueza de simbioses

Se estudió la presencia o ausencia de los simbioses más prevalentes (prevalencia igual o superior al 3%) según la especie hospedadora (cangrejo invasor y cangrejos nativos, según corresponda), tal como se describe en la sección "Metodología general".

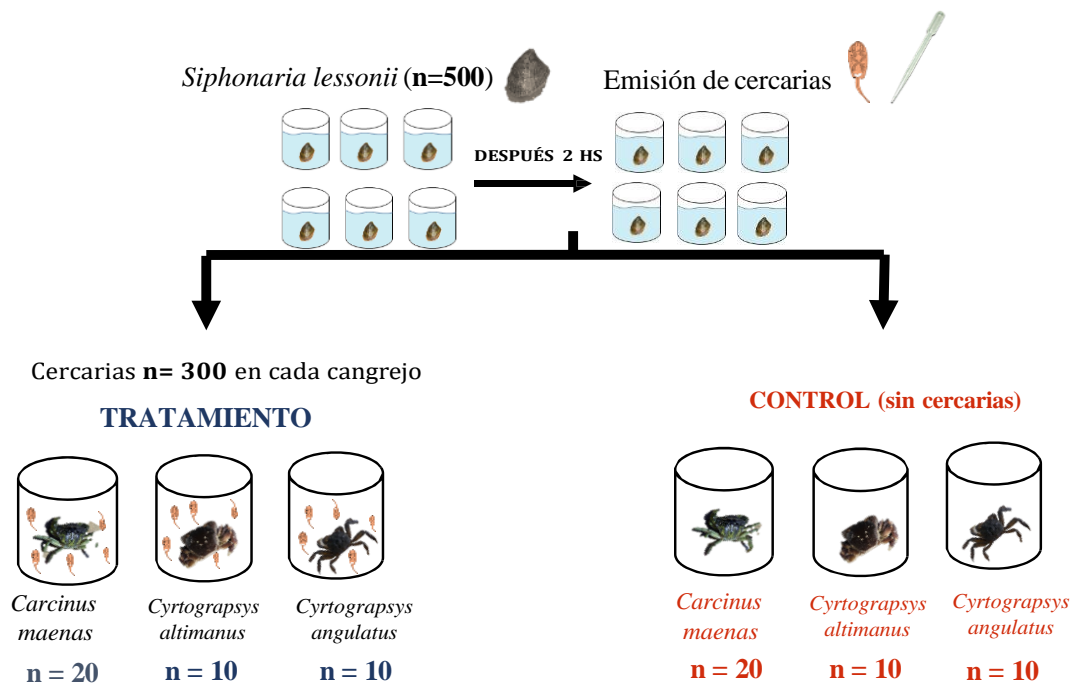
Se analizó la riqueza de simbioses en función de la especie de cangrejo. Los datos fueron analizados utilizando un modelo de regresión Poisson dentro de un marco de Modelo Lineal Generalizado (GLM) tal como se describe en la sección de "Metodología general".

### Infecciones experimentales

Durante la primavera y el verano de 2019, se recolectaron ejemplares de *Carcinus* spp., *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* de tamaño similar (12–24 mm de ancho de caparazón) en el intermareal de Puerto Madryn. Además, en este sitio también se recolectó a la lapa pulmonada, *S. lessonii*, ya que se conocía que la lapa alberga el digeneo trematode *M. madrynense* con una prevalencia de ~10 % en esta área (Bagnato et al. 2015). Se transportaron los cangrejos y las lapas vivos al laboratorio y se realizaron dos infecciones experimentales: "Exposición a cercarias" y "Experimento de cohabitación".

### **Exposición a cercarias**

Se colocaron individualmente aproximadamente 500 lapas *S. lessonii* en pequeños recipientes (50 ml) llenos de agua de mar filtrada (filtro de malla fina de 0,45 µm) (Figura 40). Después de 2 h a temperatura ambiente (18–20°C), las lapas se inspeccionaron bajo un estereomicroscopio en busca de cercarias emergidas. Se establecieron dos grupos: tratamiento y otro control, cada uno integrado por cangrejos de las especies *Carcinus* spp. (n=20), *Cy. altimanus* (n=10), y *Cy. angulatus* (n=10). Estos cangrejos fueron colocados individualmente en contenedores de 350 ml, los cuales estaban llenos de agua de mar y contaban con una adecuada aireación, manteniendo una temperatura constante de 4°C (Figura 40). En el grupo tratamiento se transfirieron aproximadamente 300 cercarias a cada cangrejo utilizando una pipeta Pasteur. En el grupo control se mantuvieron en las mismas condiciones, pero sin exposición a cercarias. Después de 72h, todos los cangrejos fueron sexados y disecados bajo un estereomicroscopio para detectar la presencia de metacercarias. Se calcularon las prevalencias e intensidades de infección.



**Figura 40.** Representación gráfica del experimento de exposición a cercarias.

### Experimento de cohabitación

Se realizaron dos réplicas, cada una con 20 especímenes de *Carcinus* spp., 16 cangrejos nativos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* (8 de cada especie) y 250 *S. lessonii*. Los cangrejos se colocaron en unidades de alojamiento separadas y etiquetadas, que consistían en pequeñas jaulas de plástico que permitían el flujo de agua y no impedían la circulación de las cercarias. Estas jaulas se sumergieron en un acuario de plástico grande (45L)  $\frac{3}{4}$  lleno con agua de mar filtrada y con aireación adecuada a temperatura ambiente. Las lapas *S. lessonii* se colocaron en el fondo del acuario y fueron sumergidas 3 veces al día para mejorar la emisión de cercarias (comunicación personal Florencia Cremonte). El grupo control estuvo formado por la misma cantidad de especímenes de cada especie en las mismas condiciones, pero sin lapas. Después de 72 h, las lapas se diseccionaron y examinaron bajo un estereomicroscopio para determinar la prevalencia de la infección. Los cangrejos fueron expuestos a los caracoles durante 72h después de un estudio previo (Blakeslee et al. 2015), que demostró que este período fue suficiente para infectar a los cangrejos y obtener una intensidad de infección moderada. Después de 72h, cada cangrejo se trasladó a un acuario plástico individual con agua de mar aireada durante 7 días. Durante ese tiempo, los cangrejos fueron alimentados con una dieta de lechuga de mar *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 (cada dos días) y el agua se cambió cada dos días.

Después del período de 7 días posterior a la exposición, todos los cangrejos fueron medidos, sexados, disecados y examinados bajo un estereomicroscopio para detectar la presencia y cantidad de metacercarias.

#### Análisis estadísticos de los experimentos

El recuento de metacercarias en las tres especies de cangrejos, evaluado en ambos experimentos y dentro de cada grupo, mostró valores que oscilaron entre cero y distribuciones cercanas a la normalidad. Esto se determinó mediante la visualización de gráficos *qqnorm* y las pruebas de Shapiro. Para comparar los grupos dentro de cada experimento, se aplicaron pruebas t. Los resultados se presentaron de manera gráfica mediante diagramas de caja elaborados con *ggplot2* en R, herramienta utilizada tanto para el análisis de datos como para la generación de gráficos (R Core Team 2019; Wickham & Wickham 2016).

## **Resultados**

#### Composición de las comunidades de simbioses

La riqueza específica de simbioses total para los cangrejos *Carcinus* spp. fue de 7 al igual que para los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp, y de 5 para el cangrejo *O. trimaculatus* (Tabla 10). La riqueza específica de macrosimbioses fue mayor en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. (Tabla 10), mientras que la riqueza específica de microsimbioses fue mayor en el cangrejo verde invasor (Tabla 10).

**Tabla 10.** Número de especímenes hallados de cada simbiote/número de especímenes de cangrejos examinados y riqueza de macrosimbiontes y microsimbiontes en el cangrejo verde invasor y en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus altimanus*, *Cyrtograpsus angulatus* y *Ovalipes trimaculatus*.

Simbiontes/Hospedador	<i>Carcinus</i> spp.	<i>Cyrtograpsus</i> <i>altimanus</i>	<i>Cyrtograpsus</i> <i>angulatus</i>	<i>Ovalipes</i> <i>trimaculatus</i>
<b>Macrosimbiontes</b>				
Trematode <i>Maritrema madrynense</i>	0/940	43/166	20/83	0/95
Acantocéfalo <i>Profilicollis chasmagnathi</i>	0/940	23/166	15/83	0/95
<i>Carcinonemertes</i> sp.	1/940	0/166	0/83	2/95
<b>Riqueza de macrosimbiontes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Microsimbiontes</b>				
Virus-like	26/190	0/91	0/53	5/95
Microorganismos procarióticos	2/190	3/91	8/53	16/95
Bacterias filamentosas	0/190	65/91	47/53	0/95
Levaduras like	0/190	0/91	0/53	3/95
Ciliados	8/190	23/91	19/53	17/95
Microsporidio <i>Agmasoma carcini</i>	4/250	0/91	0/53	0/95
<i>Haplosporidium</i> -like	11/190	7/91	6/53	0/95
<i>Mikrocytos</i> -like	3/190	0/91	0/53	0/95
Apicomplejo <i>Aggregata valdessensis</i>	0/190	2/91	2/53	0/95
<b>Riqueza de microsimbiontes</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>RIQUEZA TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>5</b>

### Análisis estadísticos

**Riqueza específica:** la riqueza específica total, así como la de macroparásitos y microparásitos, no mostró una variación significativa en función de la especie hospedadora ( $p > 0,05$ ).

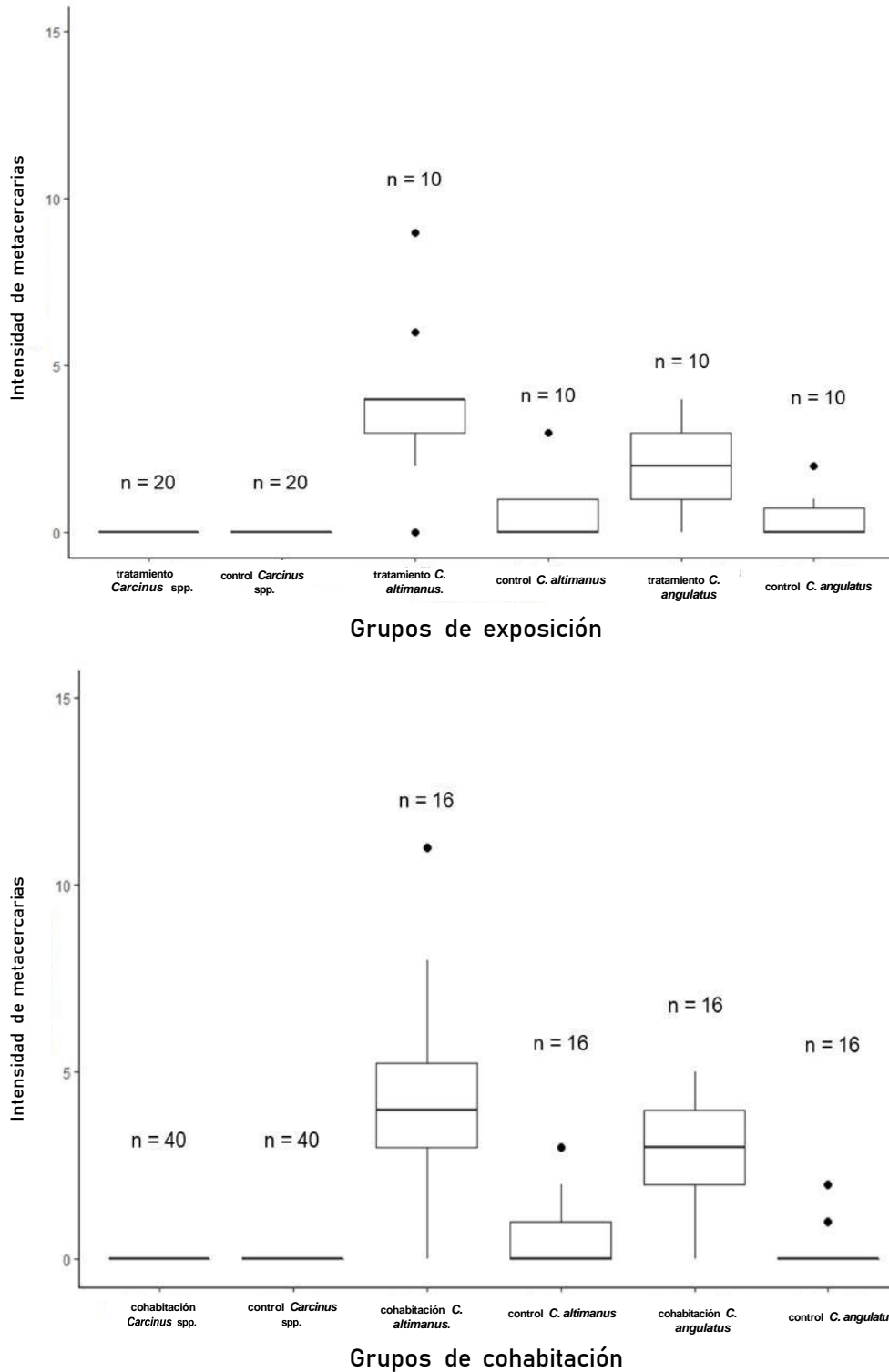
***Carcinonemertes* sp.:** la prevalencia de *Carcinonemertes* sp. no mostró una variación significativa en función de la especie hospedadora ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, el modelo sugiere que la variable especie no es un predictor relevante de la presencia del nemertino.

**Virus:** la prevalencia de virus varió significativamente según la especie hospedadora ( $\chi^2 = 5,0593$ ,  $p = 0,02449$ ). Específicamente, se encontró que la probabilidad de infección por virus es mayor en *Carcinus* spp. (odds ratio = 2,67,  $p = 0,0331$ ) en comparación con *O. trimaculatus*.

***Haplosporidium* sp.:** la prevalencia de *Haplosporidium* sp. no varió significativamente por la especie hospedadora ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, el modelo sugiere que la variable especie no es un predictor relevante de la presencia de este parásito.

#### Infecciones experimentales

*Carcinus* spp. no se infectó con *M. madrynense*, ni en los experimentos de exposición ni en el de cohabitación (Figura 41). Durante la “exposición a cercarias”, los cangrejos nativos *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* resultaron parasitados con metacercarias de *M. madrynense*, con una prevalencia e intensidad media de infección de 90% y 4,3 y 80% y 2,2; respectivamente. El grupo de control, *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus*, mostraron una prevalencia e intensidad de infección del 40% y 2,0, y del 23% y 1,5, respectivamente. Estos grupos fueron significativamente diferentes (*Cy. altimanus*: prueba t,  $P = 0,003$ ; *Cy. angulatus*: prueba t,  $P = <0,01$ ). El experimento de “cohabitación” reveló que la prevalencia de infección fue del 93% en *Cy. altimanus*, con una intensidad media de 4,7 metacercarias, y del 87% en *Cy. angulatus*, con una intensidad media de 3. En el grupo control, la prevalencia y la intensidad media para *Cy. altimanus* y *Cy. angulatus* fueron 37% y 1,8 y 19% y 1,6; respectivamente. Estos grupos también fueron significativamente diferentes (*Cy. altimanus*: t.test,  $P = <0,0001$ ; *Cy. angulatus*: t.test,  $P = <0,0001$ ). La prevalencia de infección de las lapas utilizadas en este experimento fue del 3%.



**Figura 41.** Diagramas de caja de los experimentos de exposición a cercarias (superior) y de cohabitación (inferior). Esta figura compara los grupos de tratamiento y control de ambos experimentos. Definiciones: la barra de diagrama de caja se refiere a la mediana; el recuadro se refiere a los percentiles 25°-75°, y los bigotes se refieren a los valores mínimo – máximo dentro del rango intercuartílico (IQR) de 1,5 × de los datos; puntos. Los puntos representan valores atípicos.

## Discusión

El presente estudio es el primero en comparar la riqueza y prevalencia de los simbioses presentes en el cangrejo verde invasor y en los cangrejos nativos (*Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*). El cangrejo verde invasor presenta una menor carga de macroparásitos en comparación con la fauna de simbioses en su área de distribución de origen. Además, esta reducción en la carga parasitaria se observa también en otras áreas donde ha establecido su presencia desde hace más tiempo (Blakeslee et al. 2009). En la Patagonia argentina se registró sólo un macrosimbionte, un nemertino del género *Carcinonemertes*. Sin embargo, la riqueza de microparásitos fue mayor en comparación con los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. y *O. trimaculatus*. Específicamente, *Carcinus* spp. presentó una riqueza de microparásitos de seis, incluyendo virus, microorganismos procariontes, ciliados, un microsporidio, un haplosporidio y *Mikrocytos* sp., mientras que en los nativos fue de cinco. Los experimentos indican que la población invasora de *Carcinus* spp. no es susceptible al parásito trematode microfálico nativo, *M. madrynense*. La exploración de posibles asociaciones simbioses-crustáceo invasor es vital para comprender mejor su influencia en la ecología de las enfermedades locales (Bojko et al. 2021).

Con la excepción del nemertino *Carcinonemertes* sp., los helmintos estuvieron ausentes en el cangrejo verde invasor. Sin embargo, los dos cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. compartieron dos taxones: un trematode (*M. madrynense*) y un acantocéfalo (*P. chasmagnathi*). Se conoce que el trematode *M. madrynense* tiene un ciclo de vida complejo que involucra caracoles, crustáceos y aves como hospedadores (Díaz & Cremonte 2010, Gilardoni et al. 2011; Bagnato et al. 2015). *Cyrtograpsus altimanus* ha sido registrado como el segundo hospedador intermediario en el ciclo de vida de este trematode; el hospedador final es la gaviota cocinera *L. dominicanus*, la cual se infecta al alimentarse del cangrejo con el estadio de metacercarias (Díaz & Cremonte 2010; Bagnato et al. 2015). Yorio et al. (2020) reportaron a *Ca. maenas* como presa de la gaviota cocinera; por lo tanto, se esperaba encontrar que el cangrejo verde estuviera infectado por el digeneo, ya que en sus áreas de origen y otros rangos de distribución como las costas del Pacífico y Atlántico de Estados Unidos y Canadá, presenta infecciones por parásitos de la misma familia. En sus áreas de distribución de origen, *Ca. maenas* se encuentra infectado por al menos cuatro especies de microfálicos,

*Microphallus primas* Jägerskiöld, 1908, *M. similis*, *Microphallus claviformis* (Brandes, 1889) y *Maritrema subdolum* Jägerskiöld, 1909 (Bojko et al. 2021). El trematode *M. simillis* se encontró en ambos lados del Atlántico y es uno de los parásitos más frecuentes que infectan a los cangrejos verdes en ambas regiones (Elner & Raffaelli 1980; Blakeslee et al. 2009). No está claro si el parásito trematode, *M. similis*, que infecta a *Ca. maenas* en el Este de América del Norte fue transportado desde Europa, adquirido del Este de América del Norte después de la introducción de *Ca. maenas*, una combinación de ambos, o si puede considerarse nativo debido a que la gaviota (hospedador aviar) puede migrar a este lugar y potencialmente transmitir el parásito (Blakeslee et al. 2015). Además, cabe mencionar que *M. similis* utiliza caracoles del género *Littorina* como primeros hospedadores intermediarios (James 1969), los cuales están presentes tanto en el área invadida como en la de distribución de origen, lo que facilita para completar su ciclo de vida.

En este estudio en particular, las infecciones experimentales de los cangrejos verdes con el trematode *M. madrynense* resultaron negativas. La falta de susceptibilidad puede explicarse porque no han tenido historia evolutiva con estos parásitos. Trabajos anteriores sobre *Ca. maenas* identificaron que la historia coevolutiva hospedador-parásito juega un papel importante en la prevalencia y abundancia de parásitos en términos de susceptibilidad diferencial a la infección por trematodes en áreas introducidas y de distribución de origen (Blakeslee et al. 2020b). Por lo tanto, el momento del contacto con un parásito es un factor clave que afecta la prevalencia y la abundancia de parásitos en comunidades hospedador-parásito, y es un aspecto importante a considerar al examinar invasiones históricas versus contemporáneas de hospedadores a regiones nuevas (Barnard et al. 2022).

Además del tiempo transcurrido desde la introducción, es crucial considerar el vector de introducción. La invasión de *Ca. maenas* en América del Norte a principios del siglo XIX probablemente se debió al transporte en lastre sólido en barcos provenientes del sudoeste de Europa (Carlton & Cohen 2003; Roman 2006). Esta invasión incluyó múltiples clases de edad de hospedadores, desde larvas hasta adultos (Blakeslee et al. 2013; Goedknecht et al. 2016), lo que posiblemente co-introdujo sus parásitos en el área invadida. Por otro lado, en las costas patagónicas, se cree que el cangrejo verde ingresó a través del agua de lastre (Hidalgo et al. 2005), con los organismos transportados principalmente en etapas larvales de desarrollo (Minchin et al. 2009), siendo menos

propensas a estar parasitadas (Torchin & Mitchell 2004). Sin embargo, Darling et al. (2008) cuestionan la hipótesis de que el agua de lastre sea el único vector responsable de introducir a *Ca. maenas* en Argentina, sino que sugieren que podría haber otro tipo de transporte que trajera otros estadios del organismo. Además, existe la posibilidad de que el agua de lastre de los barcos transporte no solo larvas, sino también juveniles y adultos de diversas especies marinas (Carlton, 1985), lo que sugiere una mayor diversidad de organismos que podrían ser introducidos involuntariamente en nuevos hábitats, aumentando así el riesgo de impactos negativos en los ecosistemas receptores. Las distancias entre el área invadida y la de origen son menores en la invasión del Atlántico Norte en comparación con la invasión en Argentina, que fue una invasión secundaria proveniente de Australia (Darling et al. 2008). Esto sugiere una mayor probabilidad de pérdida de parásitos en el caso de la invasión en Argentina.

Según Combes (2020), para que exista una asociación hospedador-parásito deben estar abiertos dos filtros: el de 'encuentro' (que ambas especies coexistan en tiempo y en espacio) y el de 'compatibilidad' (que el parásito sea capaz de infectar al hospedador y que el hospedador no lo elimine a través de su sistema inmune). En este caso, en la naturaleza, el filtro del encuentro está abierto, ya que están presentes los hospedadores necesarios para completar los ciclos de vida de ambos parásitos; sin embargo, el filtro de compatibilidad seguiría cerrado. En los experimentos de laboratorio se proporcionaron las etapas infecciosas del parásito trematode (cercarias) o el primer hospedador intermediario infectado, para evaluar la transmisión del trematode. Según nuestros resultados, podemos suponer que un filtro de compatibilidad cerrado evita que el parásito nativo explote al hospedador invasor, ya que los cangrejos verdes no resultaron infectados por el parásito trematode nativo en poblaciones experimentales ni en entornos naturales.

La única infección por un metazoo en el cangrejo invasor *Carcinus* spp. y en el cangrejo nativo *O. trimaculatus* fue un nemertino similar a *Carcinonemertes* sp. En América del Norte, una de las áreas de distribución invadidas por *Ca. maenas*, adquirió una infección por un nemertino, *C. epialti*, que es común en el cangrejo nativo *H. oregonensis* (Torchin et al. 1996). En 1995, la prevalencia de *C. epialti* en *Ca. maenas* fue significativamente menor que en *H. oregonensis* (11% versus 74%), pero un año después no hubo diferencia significativa entre las dos especies (79% versus 98%) (Torchin et al. 1996). Torchin et al. (1996) sugieren que pudo haber ocurrido transmisión

del nemertino *C. epialti* a través de la depredación en *H. oregonensis* infectado por *Ca. maenas*. En este estudio, las prevalencias de infección fueron bajas en ambos hospedadores ( $\leq 5\%$ ). Dado que solo un ejemplar del cangrejo invasor mostró signos de infección, es posible que ésta se haya adquirido en la costa patagónica. Sería necesario llevar a cabo un nuevo estudio para evaluar si estas prevalencias cambian con el tiempo, siendo esperable que aumenten. En un ensayo de acuario se ha observado la ocurrencia de depredación mutua entre *Carcinus* spp. y *O. trimaculatus* de tamaños diferentes (comunicación personal Mariano Malvé). Si este comportamiento es común en la naturaleza, podría facilitar la transmisión de este nemertino. Se podría plantear la hipótesis de que la presencia del nemertino en las costas patagónicas podría mitigar el impacto ocasionado por *Carcinus* spp. y actuar como un agente de control biológico (Kuris 2002), siempre y cuando este parásito pueda completar su ciclo de vida en el hospedador invasor y establecerse con altas prevalencias e intensidades en el medio natural. Sin embargo, la expansión de este nemertino en cangrejos verdes podría conllevar consecuencias adversas para las especies nativas, especialmente si se confirma que es un parásito nativo de la costa patagónica, dado su hallazgo en el cangrejo nativo, *O. trimaculatus*, causando un "efecto spillback". Se requiere realizar más muestreos, tanto en los cangrejos invasores como en los nativos, para poner a prueba estas hipótesis. En cualquier caso, es fundamental realizar análisis moleculares para determinar si se trata de la misma especie o de especies distintas.

Cabe destacar, la ausencia del parásito cirripedio castrador *Sacculina carcini*, dada la prevalencia relativamente alta en poblaciones del lugar de origen del cangrejo verde (Bojko et al. 2018). De hecho, este parásito no se ha registrado en ninguno de los sitios invadidos (Bojko et al. 2018, 2021). Esta reducción en la presión de infección puede beneficiar a las poblaciones de *Carcinus* spp. en las costas patagónicas. *S. carcini* ha sido reportado previamente como un posible agente de control biológico (Goddard et al. 2005). *Sacculina carcini* castra y parasita a su hospedador, lo que conlleva a un control biológico basado en patógenos. Sin embargo, una desventaja significativa radica en la falta de especificidad del hospedador, una limitación común de muchos agentes de control biológico (Goddard et al. 2005). Aún queda por determinar si el de éstos patógenos y parásitos tiene un efecto en el tamaño y el impacto de la población invasora. La ausencia de estas especies podría proporcionar una oportunidad para el control

biológico, después del análisis de la especificidad de hospedadores, supervivencia de hospedadores y comportamiento de hospedadores.

Se hallaron infecciones virales y presencia de bacterias, tanto en la especie invasora como en las especies nativas de cangrejos estudiadas. Sin embargo, resulta destacable que no se observaran infecciones similares a virus en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. Este hallazgo sugiere la posible existencia de diferencias en la susceptibilidad a las infecciones virales entre las distintas especies de cangrejos. Es importante señalar que las infecciones virales observadas tanto en el cangrejo verde invasor como en el cangrejo nativo *O. trimaculatus* comparten similitudes morfológicas entre sí y con el virus WSSV, aunque el cangrejo invasor presentó prevalencias más altas, siendo estas diferencias significativas, lo que podría indicar que este virus haya sido cointroducido junto con el invasor. Sin embargo, la morfología por sí sola no es suficiente para identificar taxonómicamente al virus, lo que enfatiza la importancia de llevar a cabo análisis moleculares y de microscopía electrónica de transmisión. Es importante destacar que la susceptibilidad por este virus ha demostrado variar entre los hospedadores de crustáceos (Bateman & Stentiford 2017). Martorelli et al. (2010, 2012) documentaron la presencia de este virus en crustáceos nativos de Argentina. La identificación de un virus similar al WSSV en *Carcinus* spp. podría disminuir la tasa de supervivencia del hospedador y, además, podría ser un posible agente de control para este crustáceo invasor, si bien se requieren estudios adicionales para identificar la especificidad hospedatoria y evaluar la eficacia de este enfoque. Dado que es necesario tener en cuenta que la transmisión de muchos virus puede ocurrir a través de canibalismo, coprofagia y alimentación bentónica (Bateman & Stentiford 2017), se puede sugerir que el canibalismo también puede llevar a que las prevalencias de infección aumenten en *O. trimaculatus*, dado que, como se mencionó anteriormente, existe depredación mutua entre estos cangrejos (comunicación personal Mariano Malvé).

En cuanto a las bacterias halladas en todas las especies de cangrejo del presente estudio, aún no se ha determinado taxonómicamente a que especie pertenecen; sin embargo, los datos metagenómicos detallados en el capítulo I proporcionan candidatos para investigaciones futuras. Se han documentado infecciones procarióticas en los cangrejos verdes *Carcinus* spp. en sus áreas de distribución de origen (Hauton et al. 1997; Bonami & Pappalardo 1980; Eddy et al. 2007), y dada las similitudes en la

morfología y patología sugieren la posibilidad de que estas infecciones hayan sido cointroducidas en Argentina.

Este estudio identificó un nuevo patógeno microsporidiano, *A. carcini* en los cangrejos verdes *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii*. Este microsporidio podría haber sido adquirido de la fauna de crustáceos nativos debido a su ausencia en poblaciones ampliamente muestreadas en el área de distribución de origen (Bojko et al. 2018; 2021). Darling et al. (2008) proponen que la población de cangrejo verde en la costa patagónicas es una invasión secundaria, ellos demostraron que los individuos encontrados en Argentina estaban genéticamente más relacionados con poblaciones de Australia, donde también han sido introducidos (Fulton & Grant 1900; Young & Elliot 2019). Sin embargo, el cangrejo verde en Australia no ha sido examinado para detectar parásitos microsporidios. La baja prevalencia de infección y la información en general de este grupo de parásitos, sugieren que el microsporidio ocasiona una patología grave, causando mortalidad y una enfermedad emergente en los cangrejos verdes en la costa patagónica. Actualmente, no hay evidencia disponible para confirmar si *A. carcini* es un parásito nativo de las costas patagónicas o si fue introducido. Para estudios futuros, es importante considerar si *A. Carcini* podría representar un riesgo para las especies nativas o, si el parásito se obtuvo en el área invadida (adquisición de patógenos). Si fue un parásito cointroducido, se abren interrogantes sobre la vía de invasión de *A. carcini*. Finalmente, es crucial evaluar las implicaciones de la infección en el comportamiento y la mortalidad, lo cual podría determinar si *A. carcini* posee el potencial para controlar los tamaños poblacionales de *Carcinus* spp. en la costa patagónica. La ruta de transmisión es un factor clave en la evolución de la virulencia y las relaciones hospedador-parásito (Ebert & Herre 1996). La transmisión horizontal es el modo más común en los microsporidios (Dunn & Smith et al. 2001). Por lo tanto, explorar la dinámica de transmisión de *A. carcini* a través de experimentos de infección en las poblaciones del cangrejo invasor, así como su posible impacto en los cangrejos nativos, resulta relevante. Estos experimentos no solo podrían revelar la dinámica de transmisión del microsporidio, sino también proporcionar información valiosa sobre la susceptibilidad y resistencia a la infección por este microsporidio entre las poblaciones de cangrejos invasores y las especies nativas de crustáceos.

Aunque tradicionalmente se ha considerado que los moluscos son los hospedadores más diversos para los parásitos haplosporidios, cada vez hay más

registros que sugieren la importancia de los crustáceos como hospedadores (Stentiford et al. 2013). La observación de infecciones idénticas en el cangrejo invasor *Carcinus* spp. y los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp., junto con la similitud entre las esporas encontradas en estos crustáceos y las halladas en *S. lessonii* y *S. lateralis* por *H. patagon* en Puerto Deseado, Santa Cruz (Di Giorgio et al. 2014), plantea interrogantes sobre la transmisión de estos parásitos entre diferentes especies y la posibilidad de ciclos de vida compartidos entre moluscos y crustáceos (Shields et al. 2015). Aunque la mayoría de los taxones de Haplosporidia producen esporas, el estado transmisible sigue siendo desconocido y no se han establecido ciclos de vida para ningún miembro del orden (Shields et al. 2022). El destino de las esporas después de ser liberadas del hospedador sigue siendo desconocido, incluso para el haplosporidio mejor estudiado, *Haplosporidium nelsoni* Haskin, Stauber & Mackin, 1966 (Carnegie & Burreson 2012). Este descubrimiento de infecciones en el cangrejo invasor podría sugerir la posibilidad de que *Carcinus* spp. actúe como portador, reservorio u hospedador alternativo debido a su comportamiento carroñero. Además, Stentiford et al. (2013) consideran a estos parásitos como impulsores de la mortalidad en las poblaciones de *Ca. maenas*, dado que el parásito es letal en individuos infectados. Si esta misma situación se presenta en las poblaciones invasoras de *Carcinus* spp. en la costa patagónica, podría considerarse como un método de control biológico para esta especie invasora. A pesar de su importante importancia económica y su efecto dramático en el estado de salud de los invertebrados acuáticos, los haplosporidios siguen siendo un grupo significativamente poco estudiado, con una representación relativamente escasa dentro de las bases de datos genómicas públicas (Stentiford et al. 2013). La realización de análisis moleculares es clave para continuar con este estudio y evaluar si el patógeno está presente en las costas y fue introducido por el invasor o si ya estaba presente en las especies nativas de la costa patagónica. Aunque es probable que sea un parásito nativo de las costas patagónicas, su presencia en ambas especies nativas de *Cyrtograpsus* spp., con prevalencias que alcanzaron el 40% en *Cy. angulatus*, respalda esta hipótesis.

El apicomplejo *A. valdessensis* se halló en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp., mientras que no se detectaron estas infecciones en el cangrejo invasor *Carcinus* spp. El sitio donde se observó una mayor prevalencia de este apicomplejo en las especies nativas presenta un intermareal rocoso sometido a un fuerte oleaje (Schillizzi et al. 2004; 2005), donde no se hallaron ejemplares de *Carcinus* spp., pero sí abundantes cangrejos nativos

*Cyrtograpsus* spp. y la presencia de pulpitos *O. tehuelchus*. *Carcinus* spp. parece ser incapaz de prosperar en costas expuestas a las olas (Hampton & Griffiths 2007), lo cual podría explicar la ausencia en este sitio y la falta de infección por *A. valdensesis*. Sin embargo, dado que las infecciones experimentales resultaron negativas, es posible que la ausencia de infecciones por el apicomplejo en el cangrejo invasor se deba a la falta de historia coevolutiva del cangrejo invasor con este parásito, similar a lo que ocurre con los helmintos, los cuales solo fueron hallados en los cangrejos nativos. Esto sugiere que *Carcinus* spp. podría estar presentando un "filtro de compatibilidad" cerrado, es decir, su sistema inmunitario elimina al agente infeccioso y/o sus características fisiológicas podrían no ser compatibles con el parásito (Combes 2020).

El potencial impacto de los simbioses de *Carcinus* spp. en la fauna nativa en la costa patagónica es preocupante. El cangrejo invasor ha impactado negativamente sobre la fauna nativa patagónica a través de la competencia y la depredación (Márquez et al. 2023); nuestros resultados indican que este invasor también está infectado con patógenos que podrían afectar a la pesca de los recursos pesqueros a nivel local. Algunas especies podrían plantear un problema significativo para la fauna nativa, si el cangrejo verde actúa como reservorio; permitiendo que los números de patógenos se acumulen y se derramen de nuevo en las poblaciones nativas. Tales ejemplos han sido observados anteriormente (Kelly et al. 2009).

El cangrejo verde invasor parece tener un conjunto reducido de parásitos en su área invadida en la costa patagónica (reducción de parásitos), principalmente de macroparásitos, similar a observaciones en otros sitios donde ha invadido, como en América del Norte. La mayoría de los estudios que han encontrado evidencia de escape y liberación de parásitos en áreas donde se ha introducido el cangrejo verde se han centrado principalmente en macroparásitos metazoos (Torchin et al., 2002; Blakeslee et al., 2009, 2013). Sin embargo, el trabajo de Bojko et al. (2018) en Canadá y el Reino Unido demostró que, al incluir microparásitos en los análisis de diversidad de parásitos, *Ca. maenas* era hospedador de numerosos taxones de parásitos y simbioses marinos en las poblaciones introducidas en Canadá, con una riqueza de microparásitos de hasta ocho especies (ver Apéndice I). Esto concuerda con nuestro estudio, donde la riqueza de microparásitos fue relativamente alta en comparación con los macroparásitos, con seis grupos identificados. Además, esta riqueza fue mayor que en las especies de cangrejos nativos examinadas en el presente estudio (*Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O.*

*trimaculatus*), donde se encontraron cinco grupos de microparásitos. En comparación, en el área de origen de Europa, la riqueza de parásitos del cangrejo verde es considerablemente mayor, con 39 grupos identificados. Por otro lado, en la costa Este de Estados Unidos, donde el cangrejo verde ha estado introducido durante aproximadamente 200 años (Grosholz & Ruiz 1996), la riqueza de microparásitos es de solo dos taxones (ver Apéndice I). Esta baja riqueza se podría deber a la falta de estudios específicos, lo cual puede haber llevado a una subestimación de la riqueza de microparásitos en esta región.

Es posible que los microparásitos con ciclo de vida simple se adquieran más fácilmente en regiones invadidas o sean más propensos a ser transportados con hospedadores introducidos que los macroparásitos, especialmente aquellos con ciclos de vida complejos que requieren varios hospedadores. Otra posibilidad es que los macroparásitos, debido a su historia coevolutiva más prolongada con sus hospedadores, hayan desarrollado mecanismos de resistencia más efectivos. Trabajos recientes han demostrado que los hospedadores con una larga historia de coevolución y presiones selectivas por parte de los parásitos tienden a desarrollar resistencia al parasitismo, mientras que los hospedadores "ingenuos" bajo baja presión parasitaria pueden relajar sus defensas, haciéndolos más susceptibles a la infección cuando se encuentran nuevamente con los mismos parásitos (Keogh et al., 2017; Blakeslee et al., 2020a). Esta diferencia en la coevolución y la presión selectiva podría explicar por qué los macroparásitos presentan una mayor resistencia en comparación con los microparásitos.

La histología emerge como el método más sensible para detectar una amplia variedad de patógenos y para proporcionar una visión exhaustiva de la fauna de simbioses en cangrejos, permitiendo una evaluación integral de la salud con relativa facilidad (Stentiford et al. 2005). La microscopía óptica, incluyendo la histología y el material preparado en húmedo, puede proporcionar identificación visual de varios grupos de patógenos (Bojko et al. 2013), lo que ofrece una base sólida para la aplicación de otras herramientas. Además, la histología se revela como una herramienta sumamente útil para un diagnóstico general de la salud de los cangrejos (Bojko et al. 2017). La falta de estudios previos sobre este enfoque en cangrejos invasores y nativos en América Latina resalta la originalidad de esta investigación, siendo el primer estudio en la región en utilizar histología para examinar la diversidad de simbioses en estos

crustáceos. Este trabajo pionero enfatiza la importancia de la histología como una herramienta esencial para comprender la ecología y la dinámica de las poblaciones de cangrejos, estableciendo así una base para futuras investigaciones en la región.

El presente constituye el primer estudio en comparar la diversidad de simbioses entre el cangrejo verde invasor y los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. y *O. trimaculatus* en la costa patagónica. Los resultados de este trabajo revelan que el cangrejo verde invasor exhibió un mayor número de microparásitos en comparación con los nativos. Sin embargo, también se observó una diversidad reducida de simbioses en el cangrejo invasor en relación con su área **de distribución de origen**, lo que sugiere la posibilidad de una reducción o incluso un escape de parásitos. La detección de nuevos patógenos en los cangrejos invasores, como el microsporidio *A. carcini*, plantea interrogantes sobre su impacto potencial en los ecosistemas costeros y en las poblaciones nativas. Además, la presencia de infecciones virales y bacterianas resalta la importancia de evaluar la susceptibilidad a las enfermedades entre diferentes especies de cangrejos. Estas complejas interacciones entre hospedadores y patógenos subrayan la necesidad de llevar a cabo una investigación adicional para comprender mejor estas relaciones ecológicas y su implicación en la salud y la dinámica poblacional tanto de los cangrejos invasores como de las especies nativas. Se necesitan más estudios para comprender mejor la relación ecológica entre estos simbioses y sus hospedadores, los patrones de perfil de simbioses en todas las estaciones del año y hábitats, y cómo difieren en todo el rango geográfico de *Carcinus* spp.

# CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES

## GENERALES

Este estudio abarcó el análisis de los simbioses presentes en los cangrejos verdes invasores *Carcinus* spp. y de los cangrejos nativos (*Cy. altimanus*, *Cy. angulatus* y *O. trimaculatus*) en la costa patagónica. Representa el primer análisis exhaustivo histopatológico del cangrejo verde en su área de distribución invadida en Argentina, y es el segundo estudio de este tipo en áreas invadidas por esta especie, siendo el primero en América del Norte en América del Norte. A pesar de la expansión de estos cangrejos a otros territorios como Australia, Japón y África, la investigación histopatológica en estos lugares es escasa o inexistente. La mayoría de los estudios se han centrado en los macroparásitos metazoos.

La presencia de *Ca. aestuarii*, junto a su especie hermana *Ca. maenas*, fue confirmada en el presente trabajo de tesis. Los patógenos y parásitos observados fueron identificados mediante histología, y en algunos casos se complementaron con microscopía electrónica, diagnósticos moleculares, secuenciación del genoma, metagenómica y análisis filogenéticos.

Se ha identificado una diversidad de grupos de simbioses presentes tanto en el cangrejo verde invasor como en los cangrejos nativos del género *Cyrtograpsus* spp. y el cangrejo nadador nativo *O. trimaculatus*. La riqueza de simbioses para cada hospedador fue de siete en el invasor, al igual que en los cangrejos del género *Cyrtograpsus*, y de cinco en el cangrejo nadador *O. trimaculatus*. Los simbioses identificados abarcaron desde virus hasta metazoos, ampliando así el espectro conocido en estos hospedadores.

El cangrejo verde invasor presentó una liberación de macroparásitos, hallándose sólo al nemertino *Carcinonemertes* sp. a diferencia de los cangrejos nativos (*Cyrtograpsus* spp.) que presentaron infecciones por el trematode *M. madrynense* y el acantocéfalo *P. chasmagnathi*. Además, los cangrejos verdes no se infectaron con *M. madrynense* en las infecciones experimentales, posiblemente debido a la ausencia de una historia coevolutiva con estos parásitos. A pesar de la presencia de los hospedadores necesarios para completar el ciclo de vida, el filtro de compatibilidad parece impedir que los parásitos nativos infecten al cangrejo invasor.

Tanto *Carcinus* spp. como el cangrejo nativo *O. trimaculatus* presentaron infecciones por nemertinos del género *Carcinonemertes*, con prevalencias bajas. La adquisición de infecciones por estos nemertinos en áreas invadidas se observó en América del Norte, y podría ser similar a lo observado en Patagonia. Esto resalta la necesidad de futuros estudios para evaluar cambios en prevalencias y el impacto potencial de la depredación mutua de cangrejos en la transmisión de parásitos. Considerando que es probable que este nemertino ya estuviera presente en la costa patagónica, existe la posibilidad de que su presencia en cangrejos invasores actúe como un agente de control biológico. Sin embargo, este efecto podría tener consecuencias adversas para las especies nativas debido a un posible "efecto spillback". Se requieren análisis moleculares para confirmar la identidad exacta del nemertino y evaluar estas hipótesis.

El estudio revela infecciones virales tanto en el cangrejo verde invasor (*Carcinus* spp.) como en el cangrejo nativo *O. trimaculatus*, pero no en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp., sugiriendo diferencias en la susceptibilidad entre estas especies. Las infecciones virales observadas, similares al virus del síndrome de la mancha blanca WSSV, son más prevalentes en el cangrejo invasor, lo que podría indicar una coinroducción del virus junto con el invasor. Se necesitan análisis moleculares y de microscopía electrónica para realizar una identificación precisa. Estos hallazgos subrayan la importancia de investigar con mayor profundidad para evaluar el uso potencial del virus como un agente de control biológico.

Se registraron bacterias en todas las especies de cangrejo analizadas, pero aún no se ha determinado su taxonomía específica. Dado que se han documentado infecciones bacterianas en cangrejos verdes *Carcinus* spp. en sus áreas de distribución de origen, y considerando las similitudes morfológicas, existe la posibilidad de que estas infecciones hayan sido introducidas en Argentina junto con la especie invasora. Esto destaca la importancia de estudiar el microbiota asociada a especies invasoras para comprender mejor su impacto en los ecosistemas receptores. Los datos metagenómicos proporcionados en el estudio podrían servir como base para investigaciones futuras sobre la identificación taxonómica de las bacterias encontradas en los cangrejos. Estos datos podrían ayudar a determinar la composición y la diversidad del microbiota asociada a estas especies de crustáceos.

Se identificó un nuevo patógeno del grupo de los microsporidios, *A. carcini* en los cangrejos verdes *Ca. maenas* y *Ca. aestuarii*. Su ausencia en poblaciones originarias de *Carcinus* spp. sugiere una posible adquisición de la fauna de crustáceos nativos. Futuras investigaciones son necesarias para determinar su origen, evaluar su riesgo para las especies locales y su potencial como agente de control biológico. Se plantea la posibilidad de utilizar *A. carcini* para controlar la población invasora de *Carcinus* spp., aunque esto requiere una evaluación exhaustiva de las implicaciones en el comportamiento y la mortalidad de los cangrejos verdes invasores. Es crucial explorar la dinámica de transmisión de *A. carcini* y su impacto en cangrejos nativos mediante experimentos de infección en poblaciones invasoras y nativas para entender mejor la susceptibilidad y resistencia a la infección por este microsporidio.

La observación de infecciones causadas por haplosporidios idénticas tanto en cangrejos invasores como en los cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. plantea interrogantes sobre la transmisión de estos parásitos entre especies diferentes. Si estos parásitos haplosporidios resultan letales para los individuos infectados, como se ha sugerido en poblaciones originarias de *Ca. maenas*, su presencia en las poblaciones invasoras de *Carcinus* spp. en la costa patagónica podría considerarse como un método potencial de control biológico para esta especie invasora. La observación de estos parásitos en ambas especies de cangrejos nativos *Cyrtograpsus* spp. apunta a un posible origen nativo en las costas patagónicas; sin embargo, se requieren análisis moleculares adicionales para confirmarlo.

En esta tesis se elucidó por primera vez en el Hemisferio Sur un ciclo de vida para el género *Aggregata*, siendo el segundo a nivel mundial. Además, se identificó y proporcionó una nueva descripción del apicomplejo *A. valdessensis* en hospedadores intermediarios en su hábitat natural, específicamente cangrejos de las especies *Cyrtograpsus* spp. La alta prevalencia e intensidad de infecciones en los cangrejos sugiere una acumulación de parásitos a lo largo de la vida del pulpo al alimentarse de ellos. A pesar de los avances en la comprensión del ciclo de vida y la morfología de *A. valdessensis*, se enfatiza la necesidad de análisis moleculares futuros para validar la identificación tanto en pulpos como en cangrejos, crucial para investigaciones posteriores. No se halló el apicomplejo en el cangrejo verde invasor *Carcinus* spp., sugiriendo diferencias en la susceptibilidad a la infección entre especies. Los resultados negativos de infecciones experimentales en *Carcinus* spp. sugieren un sistema

inmunitario más eficaz o características fisiológicas que lo hacen menos susceptible, posiblemente debido a una historia coevolutiva con el parásito, similar a lo observado con helmintos, lo que sugiere una mayor susceptibilidad en cangrejos nativos debido a su interacción continua con el parásito.

Este estudio demuestra que hay reducción y/o pérdida de macroparásitos en *Carcinus* spp., mientras que la diversidad de microparásitos en este cangrejo invasor es mayor que en las especies nativas examinadas, aunque estas diferencias no alcanzan significancia estadística. Se plantea que los microparásitos podrían ser más fácilmente adquiridos en regiones invadidas o tener una mayor probabilidad de ser transportados junto con hospedadores introducidos que los macroparásitos, posiblemente debido a las características de sus ciclos de vida y su adaptabilidad a ambientes nuevos o con diferentes condiciones ecológicas. A pesar de presentar una mayor riqueza de microparásitos, el cangrejo invasor exhibió una diversidad reducida de simbioses en comparación con su área de distribución de origen, sugiriendo una posible disminución o escape de parásitos en el nuevo entorno invadido. Este trabajo pionero subraya la importancia de la histología como una herramienta esencial para comprender la ecología y la dinámica de las poblaciones de cangrejos. Además, establece una base para futuras investigaciones en la región, sugiriendo que la histología podría ser una herramienta valiosa para estudios posteriores sobre la salud y la ecología de los cangrejos en América Latina.

La detección de nuevos patógenos en *Carcinus* spp. plantea interrogantes sobre su impacto potencial en los ecosistemas costeros y en las poblaciones nativas. Específicamente, la presencia del microsporidio *A. carcini* y otras infecciones virales y bacterianas sugiere la necesidad de evaluar la susceptibilidad a las enfermedades entre diferentes especies de cangrejos.

Las complejas interacciones entre hospedadores y patógenos resaltan la necesidad de llevar a cabo investigaciones adicionales para comprender mejor estas relaciones ecológicas y su implicación en la salud y la dinámica poblacional, tanto de los cangrejos invasores como de las especies nativas. Esto incluye estudios para comprender mejor la relación ecológica entre estos simbioses y sus hospedadores, las características distintivas de la composición y abundancia de simbioses en todas las estaciones y hábitats, y cómo difieren en todo el rango geográfico del cangrejo verde invasor.

La expansión del rango de distribución de los cangrejos verdes hacia el norte de la Patagonia plantea preocupaciones sobre el posible impacto en las especies nativas y en la industria pesquera. La presencia de la especie invasora *Ca. aestuarii* confirmada en la presente tesis, junto con la ya establecida *Ca. maenas* y posibles híbridos, agrega complejidad al problema. La falta de información sobre la ruta de introducción y la posible hibridación subraya la necesidad de una investigación más detallada. La oportunidad de estudiar la dinámica de esta invasión y los aspectos patológicos asociados con *Ca. aestuarii* es crucial para comprender y gestionar adecuadamente esta situación. La evaluación del riesgo de transmisión de patógenos y la investigación sobre el perfil patológico de *Ca. aestuarii* son áreas que requieren mayor atención y estudio.

Es importante comprender las interacciones entre los cangrejos invasores y las especies nativas, así como la necesidad de abordar las implicaciones ecológicas y de salud asociadas con la introducción de nuevas especies y patógenos en los ecosistemas costeros.

## Apéndice I

Patógenos, parásitos y especies comensales que se han observado en simbiosis con los cangrejos verdes *Carcinus* spp. entre los años 1800 y 2024.

Hospedador <i>Carcinus</i> spp.	Simbionte	Grupo de parásito	Área de distribución	Referencias
<i>Carcinus maenas</i>	Virus-like	virus	nativa	Vago (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	Virus-like órgano Y	virus	nativa	Chassard-Bouchaud et al. (1976), Bonami (1976)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Nudivirus</i> (CmNV)	virus	nativa e invadida (Canadá)	Bojko et al.(2018); Bonami (1976); Johnson (1983); Stentiford & Feist (2005); Bateman et al.(2021)
<i>Carcinus maenas</i>	Enfermedad hemocitopénica (virus 'Bang')	virus	nativa	Johnson (1983); Bang (1971); Bang (1974) Hoover (1976); Hoover & Bang (1976); Hoover & Bang (1978)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Buyanvirus</i>	virus	nativa	Bojko et al. (2019)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Mininucleovirus</i>	virus	nativa	Subramaniam et al. (2020)
<i>Carcinus maenas</i>	Virus en forma de bastón (RV-CM) (también conocido como virus B)	virus	nativa e invadida (EEUU)	Bazin et al. (1974), Johnson (1988)
<i>Carcinus aestuarii</i>	Virus Retroviridae	virus	nativa	Mari & Bonami (1986); (1988a, b); Montanié et al. (1993a); Mari & Bonami (1987)
<i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Buyanvirus</i>	virus	nativa	Bang (1971); (1974); Hoover & Bang (1978)
<i>Carcinus aestuarii</i>	Virus baciliforme Tau.	virus	nativa	Pappalardo & Bonami (1979); (1986)
<i>Carcinus aestuarii</i>	Virus Parvoviridae	virus	nativa	Mari & Bonami (1988a)
<i>Carcinus maenas</i>	Infección bacteriana no identificada	bacterias	invadida (EEUU)	Spindler-Barth (1976)
<i>Carcinus maenas</i>	Enfermedad necrótica negra	desconocido	nativa e invadida (Canadá)	Perkins (1967); Comely & Ansell (1989a)
<i>Carcinus maenas</i>	Enfermedad lechosa (varias bacterias)	bacterias	nativa e invadida (Canadá)	Bojko et al. (2018), Eddy et al. (2007)
<i>Carcinus aestuarii</i>	Rickettsia-like	bacteria	nativa	Bonami & Pappalardo (1980)
<i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	bacteria	nativa	Pappalardo & Boemare (1982)
<i>Carcinus maenas</i>	Levadura- like	hongo	nativa	Davies et al. (2020b)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Arudinula</i> sp.	desconocido	nativa	Léger & Duboscq (1905)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Abelspora portucalensis</i>	microsporidio	nativa	Azevedo (1987)
<i>Carcinus maenas</i> <i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Ameson pulvis</i> (= <i>Nosema pulvis</i> )	microsporidio	nativa e invadida (Canadá)	Bojko et al. (2018) Vivares & Sprague (1979); Vivarès et al. (1976)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Thelohania maenadis</i>	microsporidio	nativa	Vivarès & Cuq (1981)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Nematopsis portunidarum</i>	apicomplejo	nativa	Sprague & Couch (1971)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Myxosporidia</i> sp.	microsporidio	nativa	Cuénot (1895)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Nosema spelotremae</i> (en <i>Microphallus similis</i> )	microsporidio hiperparásito	nativa	Sprague & Couch (1971)

<i>Carcinus maenas</i>	<i>Nadelspora carcini</i>	microsporidio	nativa	Bojko et al. (2018), Stentiford et al.(2013a)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Parahepatospora carcini</i>	microsporidio	invadida (Canadá)	Bojko et al. (2017a)
<i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Ormieresia carcini</i>	microsporidio	nativa	Vivarès et al. (1977)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Hematodinium perezii</i>	dinoflagelado	nativa e invadida (Canadá)	Bojko et al. (2018); Hamilton et al. (2009); Stentiford & Feist (2005)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Haplosporidium littoralis</i>	haplosporidio	nativa	Stentiford et al. (2004); Stentiford et al.(2013b).
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Haplosporidium carcini</i>	haplosporidio	nativa	Davies et al. (2020a)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Haplosporidium cranc</i>	haplosporidio	nativa	Davies et al. (2020a)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Neoparamoeba</i> sp.	Ameba	nativa e invasiva	Bojko et al. (2018)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Anophrys maggii</i>	ciliado	nativa	Couch (1983)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Foettingeria</i> sp.	ciliado	nativa	Chatton & Lwoff (1935)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Foliculina viridis</i>	ciliado	nativa	Sprague & Couch (1971)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Gymnodinioides inkystans</i>	ciliado	nativa	
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Phthorophrya insidiosa</i>	Hiperparásito ciliado	nativa	
<i>Carcinus menas</i>	<i>Phthorophrya fallax</i>	Hiperparásito ciliado	nativa	
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Synophrya hipertrophica</i>	ciliado	nativa	
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Zoothamnium hidrobiae</i>	ciliado	nativa	Crothers (1968)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Aggregata eberthi</i>	apicomplejo	nativa	Porchet-Henneré & Richard (1970)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Fecampia erythrocephala</i>	plateelminto	nativa	Kuris et al. (2002)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Cercaria esmasculans</i>	trematode	nativa	James (1969)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Distomum</i> sp.	trematode	nativa	von Linstow (1878)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Maritrema subdolum</i>	trematode	nativa	Deblock & Stam (1960); Deblock (1975)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Levinseniella carcinidis</i>	trematode	nativa	Rankin (1939)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Megalophallus carcini</i>	trematode	nativa	Prévot & Deblock (1970)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Maritrema portucalensis</i>	trematode	nativa	Pina et al. (2011)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Microphallus bittii</i>	trematode	nativa	Prévot & Deblock (1970)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Microphallus primas</i>	trematode	nativa	Deblock & Tran Van Ky (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Microphallus similis</i>	trematode	nativa e inavsora (EEUU)	Stunkard (1956);Bojko et al. (2018); Deblock & Tran Van Ky (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Renicola (=Cercaria) roscovita</i>	trematode	nativa	James (1969)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Calliobothrium ventricillatum</i>	cestode	nativa	Monticelli (1890)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Eutetrarhynchus ruficollis</i>	cestode	nativa	Vivares (1971)
<i>Carcinus maenas</i>	Larvas tetrafilideas	cestode	nativa	Vivares (1971)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Ascarophis morrhuae</i>	nematode	nativo	Petter (1970)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Enoplus comunis</i>	nematode	nativa	Frith (1976)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Filaria</i> sp.	nematode	nativa	von Linstow (1878)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Monhystrera disjuncta</i>	nematode	nativa	Vranken et al. (1991)

<i>Carcinus maenas</i>	<i>Proleptus robustus</i>	nematode	nativa	Zetlmeisl et al. (2011)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Proleptus obtusus</i>	nematode	nativa	
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Viscosia glabra</i>	nematode	nativa	Austen & Widdicombe (1998)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Carcinonemertes carcinophila</i>	nemertino	Nativa	Crothers (1968); Comely & Ansell (1989b)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Carcinonemertes epialti</i>	nemertino	invadida (EEUU)	Torchin et al. (1996)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Profilicollis (=Polymorphus) botulus</i>	acantocéfalo	nativa e invadida	Liat & Pike (1980, Bojko et al. (2018)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Janua pagenstecheri</i>	gusano poliqueto	nativa	Crothers (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Pomatoceros triqueter</i>	gusano poliqueto	nativa	Crothers (1968)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Spirorbis tridentatus</i>	gusano poliqueto	nativa	Crothers (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Alcyonidium sp.</i>	briozoo	nativa	Richard1 (1899)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Electra pilosa</i>	briozoo	nativa	McIntosh (1865)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Triticella koreni</i>	briozoo	nativa	Duerden (1893)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Balanus balanus</i>	percebe	nativa	Hartnoll (1963)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Balanus crenatus</i>	percebe	nativa	Richard (1899); Heath (1976)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Chelonibia patula</i>	percebe	nativa	Richard (1899)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Chirona hameri</i>	percebe	nativa	Richard (1899)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Elminio modesto</i>	percebe	nativa	Crothers (1966), Heath (1976)
<i>Carcinus maenas</i> <i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Sacculina carcini</i>	crustáceo rizocéfalo	nativa	Boschma (1972); Øksnebjerg (2000)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Veruca stroemia</i>	percebe	nativa	Richard (1899)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Heterolaophonte stroemii</i>	copépodo	nativa	Apóstolov (2014)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Portunion maenadis</i>	isópodo	nativa	Bourdon (1963)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Priapion fraisei</i>	isópodo	nativa	Goudswaard (1985); Choy (1987)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Mytilus edulis</i>	mejillón	nativa	Giard & Bonnier (1887)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Ascidia scabra</i>	tunicado	nativa	Crothers (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Botrylloides leachi</i>	tunicado	nativa	Crothers (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Botryllus schlosseri</i>	tunicado	nativa	Crothers (1966)
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Molgula manhattensis</i>	tunicado	nativa	Crothers (1966)

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aagaard, A., Warman, C. G., & Depledge, M. H. (1995). Tidal and seasonal changes in the temporal and spatial distribution of foraging *Carcinus maenas* in the weakly tidal littoral zone of Kerteminde Fjord, Denmark. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 165-172.
- Aagaard, A. (1996). In situ variation in heart rate of the shore crab *Carcinus maenas* in relation to environmental factors and physiological condition. *Marine Biology*, 125, 765-772.
- Abbott, C. L. (2014). Evolution: hidden at the end of a very long branch. *Current Biology*, 24(7), R271-R273.
- Agresti, A. (2012). *Categorical data analysis* (Vol. 792). John Wiley & Sons.
- Alda, P., La Sala, L., Marcotegui, P., & Martorelli, S. R. (2011a). Parasites and epibionts of grapsid crabs in Bahía Blanca estuary, Argentina. *Crustaceana*, 84(5-6), 559-571.
- Alda, M. D. P. (2011b). Estadios larvales de digeneos parásitos de *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835) en el estuario de Bahía Blanca (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Alda, P., Bonel, N., Hechinger, R. F., & Martorelli, S. R. (2013). *Maritrema orensense* and *Maritrema bonaerense* (Digenea: Microphallidae): descriptions, life cycles, and comparative morphometric analyses. *Journal of Parasitology*, 99(2), 218-228.
- Altizer, S., Ostfeld, R. S., Johnson, P. T. J., Kutz, S., & Harvell, C. D. (2013). Climate change and infectious diseases: From evidence to a predictive framework. *Science*, 341(6145), 514-519.
- Anderson, R. M., & May, R. M. (1981). The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 291(1054), 451-524. <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0162>
- Anton, A., Geraldi, N. R., Lovelock, C. E., Apostolaki, E. T., Bennett, S., Cebrian, J., ... & Duarte, C. M. (2019). Global ecological impacts of marine exotic species. *Nature Ecology & Evolution*, 3(5), 787-800.
- Apostolov, A. (2014). Contribution to the study of marine harpacticoid fauna (Crustacea, Copepoda) of Iceland. *ZooNotes*, 62, 1-5.

- Arundell, K. L., Dubuffet, A., Wedell, N., Bojko, J., Rogers, M. S., & Dunn, A. M. (2019). *Podocotyle atomon* (Trematoda: Digenea) impacts reproductive behaviour, survival and physiology in *Gammarus zaddachi* (Amphipoda). *Diseases of Aquatic Organisms*, 136(1), 51-62.
- Atherley, N. A., Dennis, M. M., & Freeman, M. A. (2020). Two species of *Carcinonemertes* Coe, 1902 (Nemertea: Carcinonemertidae) infesting the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae), in Saint Kitts, West Indies. *Journal of Crustacean Biology*, 40(6), 933-942.
- Austen, M. C., & Widdicombe, S. (1998). Experimental evidence of effects of the heart urchin *Brissopsis lyrifera* on associated subtidal meiobenthic nematode communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 222(1-2), 219-238.
- Azevedo, C. (1987). Fine structure of the microsporidan *Abelspora portucalensis* gen. n., sp. n. (Microsporida) parasite of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1), 83-92.
- Bagnato, E., Gilardoni, C., Di Giorgio, G., & Cremonte, F. (2015). A checklist of marine larval trematodes (Digenea) in molluscs from Argentina, Southwestern Atlantic coast. *Check List*, 11(4), 1706-1706.
- Bang, F. B. (1971). Transmissible disease, probably viral in origin, affecting the amebocytes of the European shore crab, *Carcinus maenas*. *Infection and Immunity*, 3(4), 617-623.
- Bang, F. B. (1974). Pathogenesis and autointerference in a virus disease of crabs. *Infection and Immunity*, 9(6), 1057-1061.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.
- Barnard, R. B., Moore, C. S., Keogh, C. L., & Blakeslee, A. M. (2022). If you encyst: evidence of parasite escape and host-switching among three co-occurring crabs. *Marine Ecology Progress Series*, 697, 67-80.

- Bateman, K. S., Hicks, R. J., & Stentiford, G. D. (2011). Disease profiles differ between non-fished and fished populations of edible crab (*Cancer pagurus*) from a major commercial fishery. *ICES Journal of Marine Science*, *68*(10), 2044-2052.
- Bateman, K. S., Tew, I., French, C., Hicks, R. J., Martin, P., Munro, J., & Stentiford, G. D. (2012). Susceptibility to infection and pathogenicity of White Spot Disease (WSD) in non-model crustacean host taxa from temperate regions. *Journal of Invertebrate Pathology*, *110*(3), 340-351.
- Bateman, K. S., & Stentiford, G. D. (2017). A taxonomic review of viruses infecting crustaceans with an emphasis on wild hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, *147*, 86-110.
- Bateman, K. S., Kerr, R., Stentiford, G. D., Bean, T. P., Hooper, C., Van Eynde, B., ... & van Aerle, R. (2021). Identification and full characterisation of two novel crustacean infecting members of the family Nudiviridae provides support for two subfamilies. *Viruses*, *13*(9), 1694.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., ... & Bolker, M. B. (2015). Package 'lme4'. *Convergence*, *12*(1), 2.
- Battini, N., & Bortolus, A. (2020). A major threat to a unique ecosystem. *Frontiers in Ecology & the Environment*, *18*(1), 1. <https://doi.org/10.1002/fee.2131>
- Battini, N., & Bravo, G. (2021). Unexpected meal: first record of predation upon a potentially neurotoxic sea slug by the European green crab *Carcinus maenas*. *New Zealand Journal of Zoology*, *48*(2), 166-173.
- Bazin, F., Monsarrat, P., Bonami, J. R., Croizier, G., Meynadier, G., Quiot, J. M., & Vago, C. (1974). Particules virales de type Bacilovirus observées chez le crabe *Carcinus maenas*. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, *38*(2), 205-208.
- Behrens Yamada, S., & Gillespie, G. E. (2008). Will the European green crab (*Carcinus maenas*) persist in the Pacific Northwest? *ICES Journal of Marine Science*, *65*(5), 725-729.
- Behrens Yamada, S. B., Thomson, R. E., Gillespie, G. E., & Norgard, T. C. (2017). Lifting barriers to range expansion: The European green crab *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) enters the Salish Sea. *Journal of Shellfish Research*, *36*(1), 201-208.

- Berben, A., Stephens, N. C., Gonzalez-Cueto, J., Velasquez, Y., Quiroga, S., González, M. T., & Baeza, J. A. (2023). The effect of the egg-predator *Carcinonemertes conanobrieni* on the reproductive performance of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *BMC Zoology*, *8*(1), 6.
- Best, K., McKenzie, C. H., & Couturier, C. (2017). Reproductive biology of an invasive population of European green crab, *Carcinus maenas*, in Placentia Bay, Newfoundland. *Management of Biological Invasions*, *8*(2), 247.
- Blakeslee, A. M., Keogh, C. L., Byers, J. E., Lafferty, A. M. K. K. D., & Torchin, M. E. (2009). Differential escape from parasites by two competing introduced crabs. *Marine Ecology Progress Series*, *393*, 83-96.
- Blakeslee, A. M. H., Fowler, A. E., & Keogh, C. L. (2013). Marine invasions and parasite escape: updates and new perspectives. En M. Lesser (Ed.), *Advances in Marine Biology* (Vol. 66, pp. 87–169). Academic Press.
- Blakeslee, A. M., Keogh, C. L., Fowler, A. E., & Griffen, B. D. (2015). Assessing the effects of trematode infection on invasive green crabs in Eastern North America. *PLoS ONE*, *10*(6), e0128674.
- Blakeslee, A. M. H., Barnard, R. B., Matheson, K., & McKenzie, C. H. (2020a). Host-switching among crabs: species introduction results in a new target host for native parasites. *Marine Ecology Progress Series*, *636*, 91-106.
- Blakeslee, A. M. H., Ruocchio, M., Moore, C. S., & Keogh, C. L. (2020b). Altered susceptibility to trematode infection in native versus introduced populations of the European green crab. *Aquatic Invasions*, *15*, 177-195.
- Bland, J. A., & Brock, T. D. (1973). The marine bacterium *Leucothrix mucor* as an algal epiphyte. *Marine Biology*, *23*, 283-292.
- Bland, C. E., & Amerson, H. V. (1974). Occurrence and distribution in North Carolina waters of *Lagenidium callinectes* Couch, a fungal parasite of blue crab ova. *Chesapeake Science*, *15*(4), 232-235.
- Bodammer, J. E., & Sawyer, T. K. (1981). Aufwuchs protozoa and bacteria on the gills of the rock crab, *Cancer irroratus* Say: A survey by light and electron microscopy 1: Protozoa and bacteria on crab gills. *Journal of Protozoology*, *28*(1), 35-46.
- Boeger, W. A., Pie, M. R., Vicente, V., Ostrensky, A., Hungria, D., & Castilho, G. G. (2007). Histopathology of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, *78*(1), 73-81.

- Bojko, J., Clark, F., Bass, D., Dunn, A. M., Stewart-Clark, S., Stebbing, P. D., & Stentiford, G. D. (2017). *Parahepatospora carcini* n. gen., n. sp., a parasite of invasive *Carcinus maenas* with intermediate features of sporogony between the Enterocytozoon clade and other Microsporidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, *143*, 124-134.
- Bojko, J., Stebbing, P. D., Dunn, A. M., Bateman, K. S., Clark, F., Kerr, R. C., ... & Stentiford, G. D. (2018). Green crab *Carcinus maenas* symbiont profiles along a North Atlantic invasion route. *Diseases of Aquatic Organisms*, *128*(2), 147-168.
- Bojko, J., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Stentiford, G. D., & Behringer, D. C. (2019). Genomic and developmental characterisation of a novel bunyavirus infecting the crustacean *Carcinus maenas*. *Scientific Reports*, *9*(1), 12957.
- Bojko, J., Burgess, A. L., Baker, A. G., & Orr, C. H. (2021). Invasive non-native crustacean symbionts: diversity and impact. *Journal of Invertebrate Pathology*, *186*, 107482.
- Bojko, J., McCoy, K. A., & Blakeslee, A. M. (2022). '*Candidatus* Mellornella promiscua' n. gen. n. sp. (Alphaproteobacteria: Rickettsiales: Anaplasmataceae): an intracytoplasmic, hepatopancreatic, pathogen of the flatback mud crab, *Eurypanopeus depressus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *190*, 107737.
- Bojko, J., Frizzera, A., Vázquez, N., Taylor, G., Rand, V., & Cremonte, F. (2023). Comparative genomics for *Agmasoma* sp. (Microsporidia) parasitising invasive *Carcinus aestuarii* and *Carcinus maenas* in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, *198*, 107908.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.
- Bonami, J. R. (1976). Viruses from crustaceans and annelids: our state of knowledge. In *Proc. int. Colloq. Invertebr. Pathol* (Vol. 1, pp. 20-23).
- Bonami, J. R., & Pappalardo, R. (1980). Rickettsial infection in marine crustacea. *Experientia*, *36*(2), 180-181. <https://doi.org/10.1007/BF01953773>
- Bonami, J. R., & Zhang, S. (2011). Viral diseases in commercially exploited crabs: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *106*(1), 6-17.
- Boschi, E. E. (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). *Boletín del Instituto de Biología Marina, Mar del Plata (Argentina)*, *6*, 1-99.

- Boschi, E. E. (1979). Geographic distribution of Argentinian marine decapod crustaceans. *Bulletin of the Biological Society of Washington*, 3(1), 134-143.
- Boschi, E. E., & Gavio, M. A. (2005). On the distribution of decapod crustaceans from the Magellan Biogeographic Province and the Antarctic region. *Scientia Marina*, 69(S2), 195-200.
- Boschma, H. (1972). On the occurrence of *Carcinus maenas* (Linnaeus) and its parasite *Sacculina carcini* Thompson in Burma, with notes on the transport of crabs to new localities. *Zoologische Mededelingen*, 47(11), 145-155.
- Bourdon, R. (1967). Données complémentaires sur les épicarides et les rhizocéphales de Roscoff. *Bulletin de l'Académie de la Société Lorraines des Science*, 6, 279-286.
- Bower, S. M., & Meyer, G. R. (2002). Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. *Canadian Journal of Zoology*, 80(6), 1055-1068.
- Braga, R., Van der Molen, S., Rodriguez, Y. E., Fernández-Giménez, A. V., Battini, N., Rosas, C., & Ortiz, N. (2022). Morphophysiological responses of *Octopus tehuelchus* juveniles during the transition period between endogenous and exogenous feeding. *Aquaculture*, 556, 738269.
- Bratley, J., Elner, R. W., Uhazy, L. S., & Bagnall, A. E. (1985). Metazoan parasites and commensals of five crab (Brachyura) species from eastern Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 63(9), 2224-2229.
- Bryan-Walker, K., Leung, T. L., & Poulin, R. (2007). Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology*, 152, 687-695.
- Budria, A., & Candolin, U. (2014). How does human-induced environmental change influence host-parasite interactions? *Parasitology*, 141(4), 462-474.
- Burki, F., Corradi, N., Sierra, R., Pawlowski, J., Meyer, G. R., Abbott, C. L., & Keeling, P. J. (2013). Phylogenomics of the intracellular parasite *Mikrocytos mackini* reveals evidence for a mitosome in Rhizaria. *Current Biology*, 23(16), 1541-1547.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 575-583.

- Bush, A. O., Fernández, J. C., Esch, G. W., & Seed, J. R. (2021). *Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites* (2nd ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781139176465>
- Carlton, J. T., & Geller, J. B. (1991). Nonindigenous Marine Organisms. *Chemical Physics Letters*, 179, 53.
- Carlton, J. T., & Geller, J. B. (1993). Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science*, 261(5117), 78-82.
- Carlton, J. T. (1996). Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biological Conservation*, 78(1-2), 97-106.
- Carlton, J. T., & Cohen, A. N. (2003). Episodic global dispersal in shallow water marine organisms: the case history of the European shore crabs *Carcinus maenas* and *C. aestuarii*. *Journal of Biogeography*, 30(12), 1809-1820.
- Carman, K. R., & Dobbs, F. C. (1997). Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microscopy Research And Technique*, 37(2), 116-135.
- Carnegie, R. B., & Bureson, E. M. (2012). *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni*. In *Fish parasites: pathobiology and protection* (pp. 92-108). CABI Publishing Oxfordshire, UK.
- Castellanos-Martínez, S., Pérez-Losada, M., & Gestal, C. (2013). Molecular phylogenetic analysis of the coccidian cephalopod parasites *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Apicomplexa: Aggregatidae) from the NE Atlantic coast using 18S rRNA sequences. *European Journal of Protistology*, 49(3), 373-380.
- Chalkowski, K., Lepczyk, C. A., & Zohdy, S. (2018). Parasite ecology of invasive species: conceptual framework and new hypotheses. *Trends in Parasitology*, 34(8), 655-663.
- Chang, Y. S., Peng, S. E., Wang, H. C., Hsu, H. C., Ho, C. H., Wang, C. H., ... & Kou, G. H. (2001). Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. *Marine Biotechnology*, 3, 163-171.
- Chang, A. L., Blakeslee, A. M., Miller, A. W., & Ruiz, G. M. (2011). Establishment failure in biological invasions: a case history of *Littorina littorea* in California, USA. *PLoS ONE*, 6(1), e16035.

- Chassard-Bouchaud, C., Hubert, M., & Bonami, J. R. (1976). Particules d'allure virale associées à l'organe Y du crabe *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série D*, 282(20), 1565-1566.
- Chatton, E. (1935). Les cilies apostomes. I. Aperçu historique et general etude monographique des genres et des especes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 77, 1-453.
- Chisholm, J. R., & Smith, V. J. (1994). Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 74(4), 979-982.
- Choy, S. (1987). First record of *Priapion fraissei* (Giard & Bonnier, 1886) (Isopoda, Epicaridea, Entoniscidae) from the British Isles. *Crustaceana*, 52(2), 206-208.
- Clark, M. E., Wolcott, T. G., Wolcott, D. L., & Hines, A. H. (1999). Intraspecific interference among foraging blue crabs *Callinectes sapidus*: interactive effects of predator density and prey patch distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 178, 69-78.
- Clotilde-Ba, F. L., & Toguebaye, B. S. (2001). Infection of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) (crustacea, decapoda, penaeidae) by *Agmasoma penaei* (microspora, thelohaniidae) in Senegal, West Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 21, 157-159.
- Coe, W. R. (1902). The nemertean parasites of crabs. *The American Naturalist*, 36(426), 431-450.
- Cohen, A. N., Carlton, J. T., & Fountain, M. C. (1995). Introduction, dispersal and potential impacts of the green crab *Carcinus maenas* in San Francisco Bay, California. *Marine Biology*, 122, 225-237.
- Colautti, R. I., Ricciardi, A., Grigorovich, I. A., & MacIsaac, H. J. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters*, 7(8), 721-733.
- Colunga-Ramírez, G. E., Martínez-Aquino, A., Flores-López, C. A., et al. (2021). *Aggregata polibraxiona* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 (Mollusca: Cephalopoda) from the Gulf of California, Mexico. *European Journal of Protistology*, 81, 125825.
- Combes, C. (2001). *Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press.

- Combes, C. (2020). The art of being a parasite. In *The Art of Being a Parasite*. University of Chicago Press.
- Comely, C. A., & Ansell, A. D. (1989a). The incidence of *Carcinonemertes carcinophila* (Kolliker) on some decapod crustaceans from the Scottish West Coast. *Ophelia*, 30(3), 225-233.
- Comely, C. A., & Ansell, A. D. (1989b). The occurrence of black necrotic disease in crab species from the west of Scotland. *Ophelia*, 30(2), 95-112.
- Compton, T. J., Leathwick, J. R., & Inglis, G. J. (2010). Thermogeography predicts the potential global range of the invasive European green crab (*Carcinus maenas*). *Diversity and Distributions*, 16(2), 243-255.
- Conkerton, H., Thiet, R., Tyrrell, M., Medeiros, K., & Smith, S. (2017). Selection and availability of shellfish prey for invasive green crabs [*Carcinus maenas* (Linneaus, 1758)] in a partially restored back-barrier salt marsh lagoon on Cape Cod, Massachusetts. *Journal of Shellfish Research*, 36(1), 189-199.
- Cordone, G., Lozada, M., Vilacoba, E., Thalinger, B., Bigatti, G., Lijtmaer, D. A., ... & Galván, D. E. (2022). Metabarcoding, direct stomach observation and stable isotope analysis reveal a highly diverse diet for the invasive green crab in Atlantic Patagonia. *Biological Invasions*, 24(9), 2633-2654. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02795-9>
- Couch, J. A. (1983). Diseases caused by Protozoa. In A. J. Provenzano (Ed.), *The Biology of Crustacea, Pathobiology* (Vol. 6, pp. 79-111). Academic Press.
- Crofton, H. D. (1971). A quantitative approach to parasitism. *Parasitology*, 62(2), 179-193
- Crothers, J. H. (1966). *Dale Fort marine fauna* (Vol. 2). Field Studies Council.
- Crothers, J. H. (1968). The biology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). 2. The life of the adult crab. *Field Stud.*, 2, 579-614.
- Cuculescu, M., Hyde, D., & Bowler, K. (1998). Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*. *Journal Of Thermal Biology*, 23(2), 107-110.
- Cuénot, L. (1895). Etudes physiologiques sur les crustaces decapods. *Archives de Biologie et des Sciences*, 13, 245-303.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Bald, J., Jude, F., Raymond, N., Lanceleur, L., ... & Caill-Milly, N. (2009). Testing the enemy release hypothesis: trematode parasites in the

- non-indigenous Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Hydrobiologia*, 630, 139-148.
- Darling, J. A., Bagley, M. J., Roman, J. O. E., Tepolt, C. K., & Geller, J. B. (2008). Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology*, 17(23), 4992-5007.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- Davies, C. E., Batista, F. M., Malkin, S. H., Thomas, J. E., Bryan, C. C., Crocombe, P., ... & Rowley, A. F. (2019). Spatial and temporal disease dynamics of the parasite *Hematodinium* sp. in shore crabs, *Carcinus maenas*. *Parasites & Vectors*, 12, 1-15.
- Davies, C. E., Bass, D., Ward, G. M., Batista, F. M., Malkin, S. H., Thomas, J. E., ... & Rowley, A. F. (2020a). Diagnosis and prevalence of two new species of haplosporidians infecting shore crabs *Carcinus maenas*: *Haplosporidium carcini* n. sp., and *H. cranc* n. sp. *Parasitology*, 147(11), 1229-1237.
- Davies, C. E., Malkin, S. H., Thomas, J. E., Batista, F. M., Rowley, A. F., & Coates, C. J. (2020b). Mycosis is a disease state encountered rarely in shore crabs, *Carcinus maenas*. *Pathogens*, 9(6), 462.
- Davis, M. A. (2009). *Invasion Biology*. Oxford University Press.
- de la Barra, P., Botto, F., Iribarne, O., & Narvarte, M. (2018). Patterns of habitat partitioning for the portunid crab *Ovalipes trimaculatus* in coastal Patagonian waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 213, 92-97.
- de la Barra, P., Iribarne, O., & Narvarte, M. (2019). Combining fishers' perceptions, landings and an independent survey to evaluate trends in a swimming crab data-poor artisanal fishery. *Ocean & Coastal Management*, 173, 26-35.
- de Rivera, C. E., Hitchcock, N. G., Teck, S. J., Steves, B. P., Hines, A. H., & Ruiz, G. M. (2007). Larval development rate predicts range expansion of an introduced crab. *Marine Biology*, 150, 1275-1288.
- Deblock, S., & Stam, A. B. (1960). Notes et informations. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 35(4), 672-675.
- Deblock, S., & Van Ky, P. T. (1966). Contribution à l'étude des Microphallidae Travassos, 1920 (Trematoda)-XII. Espèces d'Europe occidentale. Création de *Sphairiotrema* nov. gen.; Considérations diverses de systématique (à propos des collections de Microphallidés du British Museum de Londres et du Musée

- d'Histoire Naturelle de Göteborg-Suède). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 41(1), 23-60.
- Deblock, S. (1975). Contribution à l'étude des Microphallidae Travassos, 1920 (Trematoda)-XXXI.-De la condensation des cycles évolutifs chez les Microphallidés, à propos de *Maritrema oocysta* (Lebour, 1907). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 50(5), 579-589.
- Di Giorgio, G., Gilardoni, C., & Ituarte, C. (2014). Pathology of *Haplosporidium patagon* affecting siphonariid gastropods in Patagonia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112(1), 59-67.
- Diaz, J. I., & Cremonte, F. (2010). Development from metacercaria to adult of a new species of *Maritrema* (Digenea: Microphallidae) parasitic in the kelp gull, *Larus dominicanus*, from the Patagonian coast, Argentina. *Journal of Parasitology*, 96(4), 740-745.
- Dima, J. B. (2013). Procesamiento integral de las especies patagónicas de cangrejos marinos de valor comercial *Ovalipes trimaculatus* y *Platyxanthus patagonicus* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Dobell, C. (1925). The life-history and chromosome cycle of *Aggregata eberthi* [Protozoa: Sporozoa: Coccidia]. *Parasitology*, 17(1), 1-136.
- Drinkwin, J., Pleus, A., Therriault, T., Talbot, R., Grason, E. W., McDonald, P. S., Adams, J., Hass, T., & Litle, K. (2018). Salish Sea Transboundary Action Plan for Invasive European Green Crab. *Puget Sound Partnership*.
- Duerden, J. E. (1893). On some new and rare Irish Polyzoa. *Proceedings of the Royal Irish Academy (1889-1901)*, 3, 121-136.
- Dunn, A. M., & Smith, J. E. (2001). Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection*, 3(5), 381-388.
- Dunn, A. M., Torchin, M. E., Hatcher, M. J., Kotanen, P. M., Blumenthal, D. M., Byers, J. E., ... & Perkins, S. E. (2012). Indirect effects of parasites in invasions. *Functional Ecology*, 26(6), 1262-1274.
- Dunn, A. M., & Hatcher, M. J. (2015). Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. *Trends in Parasitology*, 31(5), 189-199.

- Eash-Loucks, W. E., Kimball, M. E., & Petrinc, K. M. (2014). Long-term changes in an estuarine mud crab community: evaluating the impact of non-native species. *Journal of Crustacean Biology*, 34(6), 731-738.
- Ebert, D., & Herre, E. A. (1996). The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today*, 12(3), 96-101.
- Eddy, F., Powell, A., Gregory, S., Nunan, L. M., Lightner, D. V., Dyson, P. J., ... & Shields, R. J. (2007). A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas* molecular pathology and epidemiology. *Microbiology*, 153(9), 2839-2849.
- Edwards, M., Coates, C. J., & Rowley, A. F. (2019). Host Range of the Mikrocytid parasite *Paramikrocytos canceri* in decapod crustaceans. *Pathogens*, 8(4), 252.
- Elnor, R. W., & Raffaelli, D. G. (1980). Interactions between two marine snails, *Littorina rudis* Maton and *Littorina nigrolineata* Gray, a predator, *Carcinus maenas* (L.), and a parasite, *Microphallus similis* Jägerskiöld. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 43(2), 151-160.
- Elton, C. S. (1958). The invasion of continents. En C. S. Elton (Ed.), *The ecology of invasions by animals and plants* (pp. 50-76). Boston, MA: Springer US.
- Ens, N. J., Harvey, B., Davies, M. M., Thomson, H. M., Meyers, K. J., Yakimishyn, J., ... & Gerwing, T. G. (2022). The Green Wave: reviewing the environmental impacts of the invasive European green crab (*Carcinus maenas*) and potential management approaches. *Environmental Reviews*, 30(2), 306-322.
- Eriksson, S., & Edlund, A. M. (1977). On the ecological energetics of 0-group *Carcinus maenas* (L.) from a shallow sandy bottom in Gullmar Fjord, Sweden. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30(3), 233-248.
- Etchegoin, J. A., & Martorelli, S. R. (1997). Description of a new species of *Maritrema* (Digenea: Microphallidae) from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina) with notes on its life cycle. *Journal of Parasitology*, 83(4)709-713.
- Falk-Petersen, J., Bøhn, T., & Sandlund, O. T. (2006). On the numerous concepts in invasion biology. *Biological Invasions*, 8, 1409-1424.
- Farley, C. A., Wolf, P. H., & Elston, R. A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (gn), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin*, 86(3), 581-593.

- Feigenbaum, D. L. (1975). Parasites of the commercial shrimp *Penaeus vannamei* Boone and *Penaeus brasiliensis* Latreille. *Bulletin of Marine Science*, 25(4), 491-514.
- Fell, J. W. (1993). Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2(3), 174-180.
- Fey, S. B., Siepielski, A. M., Nusslé, S., Cervantes-Yoshida, K., Hwan, J. L., Huber, E. R., ... & Carlson, S. M. (2015). Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4), 1083-1088.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). *The state of world fisheries and aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>
- Frith, D. W. (1976). Animals associated with sponges at North Hayling, Hampshire. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 58(4), 353-362.
- Frizzera, A., Bojko, J., Cremonte, F., & Vázquez, N. (2021). Symbionts of invasive and native crabs in Argentina: The most recently invaded area on the Southwestern Atlantic coastline. *Journal of Invertebrate Pathology*, 184, 107650.
- Fulton, S. W., & Grant, F. E. (1900). Note on the occurrence of the European crab, *Carcinus maenas*, Leach. *Port Phillip. Victorian Naturalist*, 27, 147-148.
- Gallardo, B., Clavero, M., Sánchez, M. I., & Vilà, M. (2016). Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. *Global Change Biology*, 22(1), 151-163.
- Gates, A. R., Shearer, M., Williams, J. A., & Hawkins, L. E. (2018). Infection with cerebral metacercariae of microphallid trematode parasites reduces reproductive output in the gammarid amphipod *Gammarus insensibilis* (Stock 1966) in UK saline lagoons. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(6), 1391-1400.
- Gee, J. M., Warwick, R. M., Davey, J. T., & George, C. L. (1985). Field experiments on the role of epibenthic predators in determining prey densities in an estuarine mudflat. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 21(3), 429-448.
- Gehrels, H. B. (2016). A study of green crab (*Carcinus maenas*) interactions, cannibalism, and a first approach to model the effects of harvesting on its populations. Master's thesis, University of Prince Edward Island.

- Gehrels, H., Tummon Flynn, P., Cox, R., & Quijón, P. A. (2017). Effects of habitat complexity on cannibalism rates in European green crabs (*Carcinus maenas* Linnaeus, 1758). *Marine Ecology*, *38*(5), e12448.
- Geller, J. B., Walton, E. D., Grosholz, E. D., & Ruiz, G. M. (1997). Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Molecular Ecology*, *6*(10), 901-906.
- Gendron, A. D., Marcogliese, D. J., & Thomas, M. (2012). Invasive species are less parasitized than native competitors, but for how long? The case of the round goby in the Great Lakes-St. Lawrence Basin. *Biological Invasions*, *14*, 367-384.
- Georgiev, B. B., Sánchez, M. I., Vasileva, G. P., et al. (2007). Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* spp.) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Parasitology Research*, *101*, 1647-1655.
- Georgiev, B. B., Angelov, A., Vasileva, G. P., Sánchez, M. I., Hortas, F., Mutafchiev, Y., ... & Green, A. J. (2014). Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitologica*, *59*, 380-389.
- Gestal, C., Abollo, E., & Pascual, S. (1999). Evaluation of a method for isolation and purification of sporocysts of the cephalopod coccidian parasite *Aggregata* Frenzel, 1885 (Apicomplexa: Aggregatidae). *Iberus*, *17*(2), 115-121.
- Gestal, C., Guerra, A., Abollo, E., & Pascual, S. (2000). *Aggregata sagittata* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a coccidian parasite from the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Mollusca: Cephalopoda). *Systematic Parasitology*, *47*, 203-206.
- Gestal, C., Guerra, A., Pascual, S., & Azevedo, C. (2002a). On the life cycle of *Aggregata eberthi* and observations on *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae) from Galicia (NE Atlantic). *European Journal of Protistology*, *37*(4), 427-435.
- Gestal, C., Abollo, E., & Pascual, S. (2002b). Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *50*(1), 45-49.
- Gestal, C., Nigmatullin, C. M., Hochberg, F. G., Guerra, A., & Pascual, S. (2005). *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* in the SW Atlantic Ocean and some general remarks on *Aggregata* spp. in cephalopod hosts. *Systematic Parasitology*, *60*, 65-73.

- Gestal, C., Pascual, S., & Hochberg, F. G. (2010). *Aggregata bathytherma* sp. nov. (*Apicomplexa: Aggregatidae*), a new coccidian parasite associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91(3), 237-242.
- Giard, A., & Bonnier, J. (1887). Contributions à l'étude des Bopyriens (Vol. 5). Imprimerie L. Danel.
- Gilardoni, C., Di Giorgio, G., Bagnato, E., & Cremonte, F. (2019). Survey of trematodes in intertidal snails from Patagonia, Argentina: New larval forms and diversity assessment. *Journal of Helminthology*, 93(3), 342-351.
- Gilardoni, C., Etchegoin, J., Diaz, J. I., Ituarte, C., & Cremonte, F. (2011). A survey of larval digeneans in the commonest intertidal snails from Northern Patagonian coast, Argentina. *Acta Parasitologica*, 56, 163-179.
- Glude, J. B. (1955). The effects of temperature and predators on the abundance of the soft-shell clam, *Mya arenaria*, in New England. *Transactions of the American Fisheries Society*, 84(1), 13-26.
- Goddard, J. H., Torchin, M. E., Kuris, A. M., & Lafferty, K. D. (2005). Host specificity of *Sacculina carcini*, a potential biological control agent of the introduced European green crab *Carcinus maenas* in California. *Biological Invasions*, 7, 895-912.
- Goedknecht, M. A., Feis, M. E., Wegner, K. M., Luttkhuizen, P. C., Buschbaum, C., Camphuysen, K. C., ... & Thieltges, D. W. (2016). Parasites and marine invasions: ecological and evolutionary perspectives. *Journal of Sea Research*, 113, 11-27.
- Goedknecht, M. A., Havermans, J., Waser, A. M., Luttkhuizen, P. C., Velilla, E., Camphuysen, K. C., ... & Thieltges, D. W. (2017a). Cross-species comparison of parasite richness, prevalence, and intensity in a native compared to two invasive brachyuran crabs. *Aquatic Invasions*, 12(2).
- Goedknecht, M. A., Schuster, A. K., Buschbaum, C., Gergs, R., Jung, A. S., Luttkhuizen, P. C., ... & Thieltges, D. W. (2017b). Spillover but no spillback of two invasive parasitic copepods from invasive Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to native bivalve hosts. *Biological Invasions*, 19, 365-379.
- González, A. F., Pascual, S., Gestal, C., Abollo, E., & Guerra, A. (2003). What makes a cephalopod a suitable host for parasites? The case of Galician waters. *Fisheries Research*, 60(1), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(02)00129-8)

- González, S. T. (2016). Influence of a trematode parasite (*Microphallus turgidus*) on grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) response to refuge and predator presence. *Journal of Parasitology*, 102(6), 646-649.
- González-Cueto, J., Quiroga, S., & Norenburg, J. (2014). A shore-based preliminary survey of marine ribbon worms (Nemertea) from the Caribbean coast of Colombia. *ZooKeys*, 439, 83–108.
- Goudswaard, P. C. (1985). Onderzoek naar het voorkomen van *Portunion maenadis* en *Priapion fraissei* (Isopoda: Epicaridea) in het Nederlandse kustgebied. *Zoologische Bijdragen*, 32(1), 1-15.
- Grosholz, E. D., & Ruiz, G. M. (1996). Predicting the impact of introduced marine species: lessons from the multiple invasions of the European green crab *Carcinus maenas*. *Biological Conservation*, 78(1-2), 59-66.
- Grosholz, E. D., Ruiz, G. M., Dean, C. A., Shirley, K. A., Maron, J. L., & Connors, P. G. (2000). The impacts of a nonindigenous marine predator in a California bay. *Ecology*, 81(5), 1206-1224.
- Grosholz, E. D., & Ruiz, G. M. (2003). Biological invasions drive size increases in marine and estuarine invertebrates. *Ecology Letters*, 6(8), 700-705.
- Grosholz, E., Lovell, S., Besedin, E., & Katz, M. (2011). Modeling the impacts of the European green crab on commercial shell fisheries. *Ecological Applications*, 21(3), 915-924.
- Hadlock, R. P. (1980). Alarm response of the intertidal snail *Littorina littorea* (L.) to predation by the crab *Carcinus maenas* (L.). *Biological Bulletin*, 159(2), 269-279.
- Haefner Jr, P. A., & Spacher, P. J. (1985). Gill meristics and branchial infestation of *Ovalipes stephensoni* (Crustacea, Brachyura) by *Synophrya hypertrophica* (Ciliata, Apostomida). *Journal Of Crustacean Biology*, 5(2), 273-280.
- Hameed, A. S., Charles, M. X., & Anilkumar, M. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 183(3-4), 207-213.
- Hamilton, K. M., Shaw, P. W., & Morritt, D. (2009). Prevalence and seasonality of *Hematodinium* (Alveolata: Syndinea) in a Scottish crustacean community. *ICES Journal of Marine Science*, 66(9), 1837-1845.
- Hampton, S. L., & Griffiths, C. L. (2007). Why *Carcinus maenas* cannot get a grip on South Africa's wave-exposed coastline. *African Journal of Marine Science*, 29(1), 123-126.

- Hanks, R. W. (1961). Chemical control of the green crab, *Carcinus maenas* (L.). In Proceedings of the *National Shellfish Association*, 52, 75-86.
- Hartig, F. (2018). DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. R Package version 0.2.0.
- Hartikainen, H., Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Berney, C., Feist, S. W., Longshaw, M., ... & Bass, D. (2014). Mikrocytids are a broadly distributed and divergent radiation of parasites in aquatic invertebrates. *Current Biology*, 24(7), 807-812.
- Hartnoll, R. G. (1963, November). The biology of Manx spider crabs. In Proceedings of the zoological Society of London (Vol. 141, No. 3, pp. 423-496). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Harvell, C. D., Kim, K., Burkholder, J. M., Colwell, R. R., Epstein, P. R., Grimes, D. J., ... & Vasta, G. R. (1999). Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285(5433), 1505-1510.
- Hatcher, M. J., Dick, J. T., & Dunn, A. M. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9(11), 1253-1271.
- Hatcher, M. J., Dick, J. T., & Dunn, A. M. (2012). Disease emergence and invasions. *Functional Ecology*, 26(6), 1275-1287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02031.x>
- Hauton, C., Williams, J. A., & Hawkins, L. E. (1997). The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 211(1), 115-128.
- Heath, D. J. (1976). The distribution and orientation of epizoic barnacles on crabs. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 59(1), 59-67.
- Hershberger, P. K., van der Leeuw, B. K., Gregg, J. L., Grady, C. A., Lujan, K. M., Gutenberger, S. K., ... & Parsley, M. J. (2010). Amplification and transport of an endemic fish disease by an introduced species. *Biological Invasions*, 12, 3665-3675.
- Hidalgo, F. J., Barón, P. J., & Orensanz, J. M. (2005). A prediction come true: the green crab invades the Patagonian coast. *Biological Invasions*, 7, 547-552.
- Hidalgo, F. J., Silliman, B. R., Bazterrica, M. C., & Bertness, M. D. (2007). Predation on the rocky shores of Patagonia, Argentina. *Estuaries and Coasts*, 30, 886-894.
- Hines, A. H., Haddon, A. M., & Wiechert, L. A. (1990). Guild structure and foraging impact of blue crabs and epibenthic fish in a subestuary of Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 67, 105-126.

- Hochberg, F. G. (1983). The parasites on cephalopods: A review. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44, 109-145.
- Hochberg, F. G. (1990). Diseases of Mollusca: Cephalopoda. En O. Kinne (Ed.), *Diseases of marine animals. Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata* (Vol. 3, pp. 47-202). Biologische Anstalt, Hamburg.
- Hoover, K. L. (1976). *The effect of a virus infection on the hemocyte population in Carcinus maenas* (Sc. D. Thesis). Johns Hopkins University, 158 pages.
- Hoover, K. L., & Bang, F. B. (1976). Histopathological effects of a virus infection in the shore crab, *Carcinus maenas*. In *Proceedings of the 1st International Colloquium on Invertebrate Pathology* (pp. 310-311). Kingston, Ontario.
- Hoover, K. L., & Bang, F. B. (1976). Histopathological effects of a virus infection in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Proceedings of the 1st International Colloquium on Invertebrate Pathology*, Kingston, Ontario, 310-311.
- Hoover, K. L., & Bang, F. B. (1978). Immune mechanisms and disease response in a virus disease of *Carcinus*. In *Viruses in the Environment* (Vol. 26, pp. 515-525).
- Howard, D. W., Lewis, E. J., Keller, B. J., & Smith, C. S. (2004). *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*; NOAA Technical Memorandum NOS NCCOC. Oxford, UK: NOAA.
- Howard, B. R., Francis, F. T., Côté, I. M., & Therriault, T. W. (2019). Habitat alteration by invasive European green crab (*Carcinus maenas*) causes eelgrass loss in British Columbia, Canada. *Biological Invasions*, 21(12), 3607-3618.
- Huchin-Mian, J. P., Small, H. J., & Shields, J. D. (2018). The influence of temperature and salinity on mortality of recently recruited blue crabs, *Callinectes sapidus*, naturally infected with *Hematodinium perezii* (Dinoflagellata). *Journal of Invertebrate Pathology*, 152, 8-16.
- Hudson, D. A., & Lester, R. J. (1992). Relationships between water quality parameters and ectocommensal ciliates on prawns (*Penaeus japonicus* Bate) in aquaculture. *Aquaculture*, 105(3-4), 269-280.
- Hudson, P., & Greenman, J. (1998). Competition mediated by parasites: biological and theoretical progress. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 387-390.

- Hughes, R. N., & Elner, R. W. (1979). Tactics of a predator, *Carcinus maenas*, and morphological responses of the prey *Nucella lapillus*. *Journal of Animal Ecology*, 48, 65–78.
- Hulme, P. E. (2015). Invasion pathways at a crossroad: policy and research challenges for managing alien species introductions. *Journal of Applied Ecology*, 1418-1424.
- Humes, A. G. (1942). The morphology, taxonomy, and bionomics of the nemertean genus *Carcinonemertes*, 18, no. 4. *Illinois Biological Monographs; v. 18, no. 4*.
- Hunter, E., & Naylor, E. (1993). Intertidal migration by the shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Ecology-Progress Series*, 101, 131-131.
- IPBES. (2019). Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. In: Díaz, S., Settele, J., Brondízio, E. S., et al. (Eds.), IPBES secretariat. Bonn, Germany, p. 56.
- Iribarne, O., Martinetto, P., Schwindt, E., Botto, F., Bortolus, A., & Borboroglu, P. G. (2003). Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 167-182.
- IUCN Global Invasive Species Database. (2023). *IUCN Global Invasive Species Database*. <https://www.iucngisd.org/gisd>
- National Oceanographic and Atmospheric Administration (NOAA). 2023. Green crab detected in Alaska for the first time. NOAA Fisheries website, 24 August 2022. [www.fisheries.noaa.gov/feature-story/green-crab-detected-alaska-first](http://www.fisheries.noaa.gov/feature-story/green-crab-detected-alaska-first)
- time#:~:text=The%20green%20crab%20has%20been,eelgrass%20and%20salt%20marsh%20habitats.
- James, B. L. (1969). The Digenea of the intertidal prosobranch, *Littorina saxatilis* (Olivi). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 7(1), 273-316.
- Jensen, K. T., & Jensen, J. N. (1985). The importance of some epibenthic predators on the density of juvenile benthic macrofauna in the Danish Wadden Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 89(2-3), 157-174.
- Jensen, G. C., McDonald, P. S., & Armstrong, D. A. (2002). East meets west: competitive interactions between green crab *Carcinus maenas*, and native and introduced

- Johnson, P. W., Sieburth, J. M., Sastry, A., Arnold, C. R., & Doty, M. S. (1971). *Leucothrix mucor* infestation of benthic crustacea, fish eggs, and tropical algae 1. *Limnology and Oceanography*, 16(6), 962-969.
- Johnson, P. T. (1976). A herpeslike virus from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(3), 419-420.
- Johnson, P. T. (1983). Diseases caused by viruses, rickettsiae, bacteria, and fungi. *The Biology of the Crustacea Pathobiology*, 6, 2-78.
- Johnson, P. T. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: hemocyte-infecting species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 5(1), 11-22
- Johnson, P. T. J., & Thieltges, D. W. (2010). Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 961-970.
- Jones, S., Carrasco, N. K., Perissinotto, R., & Vosloo, A. (2016). Association of the epibiont *Epistylis* sp. with a calanoid copepod in the St Lucia Estuary, South Africa. *Journal of Plankton Research*, 38(6), 1404-1411.
- Kanchanaphum, P., Wongteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., ... & Flegel, T. W. (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(1), 1-7.
- Katoh, K., & Toh, H. (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 26(15), 1899-1900.
- Keane, R. M., & Crawley, M. J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 164-170.
- Kelley, A. L., de Rivera, C. E., & Buckley, B. A. (2011). Intraspecific variation in thermotolerance and morphology of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*, on the west coast of North America. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 409(1-2), 70-78.
- Kelley, A. L., de Rivera, C. E., Grosholz, E. D., Ruiz, G. M., Yamada, S. B., & Gillespie, G. (2015). Thermogeographic variation in body size of *Carcinus maenas*, the European green crab. *Marine Biology*, 162, 1625-1635.
- Kelly, D. W., Paterson, R. A., Townsend, C. R., Poulin, R., & Tompkins, D. M. (2009). Parasite spillback: a neglected concept in invasion ecology? *Ecology*, 90(8), 2047-2056.

- Keogh, C. L., Miura, O., Nishimura, T., & Byers, J. E. (2017). The double edge to parasite escape: invasive host is less infected but more infectable. *Ecology*, *98*(9), 2241–2247.
- Khan, R. A. (1990). Parasitism in marine fish after chronic exposure to petroleum hydrocarbons in the laboratory and to the Exxon Valdez oil spill. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *44*(5), 759-763.
- Klassen, G., & Locke, A. (2007). *A biological synopsis of the European green crab, Carcinus maenas*. Fisheries and Oceans Canada. Moncton, NB, Canada. pp. 1–75.
- Kolluru, G. R., Green, Z. S., Vredevoe, L. K., Kuzma, M. R., Ramadan, S. N., & Zosky, M. R. (2011). Parasite infection and sand coarseness increase sand crab (*Emerita analoga*) burrowing time. *Behavioural Processes*, *88*(3), 184-191.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Brzeziński, M., Niemczynowicz, A., & Zalewski, A. (2018). High parasite infection level in non-native invasive species: it is just a matter of time. *Ecography*, *41*(8), 1283-1294.
- Kon, T., Isshiki, T., Miyadai, T., & Honma, Y. (2011). Milky hemolymph syndrome associated with an intranuclear bacilliform virus in snow crab *Chionoecetes opilio* from the Sea of Japan. *Fisheries Science*, *77*, 999-1007.
- Krakau, M., Thielges, D. W., & Reise, K. (2006). Native parasites adopt introduced bivalves of the North Sea. *Biological Invasions*, *8*, 919-925.
- Kroft, K. L., & Blakeslee, A. M. (2016). Comparison of parasite diversity in native panopeid mud crabs and the invasive Asian shore crab in estuaries of northeast North America. *Aquatic Invasions*, *11*(3).
- Kuris, A. M., & Wickham, D. E. (1987). Effect of nemertean egg predators on crustaceans. *Bulletin of Marine Science*, *41*(2), 151-164.
- Kuris, A. M., Blau, S. F., Paul, A. J., Shields, J. D., & Wickham, D. E. (1991). Infestation by brood symbionts and their impact on egg mortality of the red king crab, *Paralithodes camtschatica*, in Alaska: geographic and temporal variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *48*(4), 559-568.
- Kuris, A. M. (1993). Life cycles of nemerteans that are symbiotic egg predators of decapod Crustacea: adaptations to host life histories. In *Advances in Nemertean Biology: Proceedings of the Third International Meeting on Nemertean Biology, Y Coleg Normal, Bangor, North Wales, August 10–15, 1991* (pp. 1-14). Springer Netherlands.

- Kuris, A. M., Torchin, M. E., & Lafferty, K. D. (2002). *Fecampia erythrocephala* rediscovered: prevalence and distribution of a parasitoid of the European shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82(6), 955-960.
- Kuris, A. M. (2002). Biological control of the European green crab, *Carcinus maenas*: a progress report. In *California Conference on Biological Control III, University of California at Davis, USA, 15-16 August, 2002* (pp. 66-70). Center for Biological Control, College of Natural Resources, University of California.
- Kuris, A. M., Lafferty, K. D., & Torchin, M. E. (2005). Biological control of the European green crab, *Carcinus maenas*: natural enemy evaluation and analysis of host specificity. En Hoddle, M. S. (Ed.), *Second International Symposium on Biological Control of Arthropods* (pp. 102–115). Riverside, California: University of California
- Labbé, A. (1985). *Aggregata eberthi* in *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda): Biological and ecological aspects. *Parasitology Research*, 71(4), 373-384.
- Lagrange, C. (2017). Impacts of crustacean invasions on parasite dynamics in aquatic ecosystems: A plea for parasite-focused studies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(3), 364-374.
- Larsson, J. I. R. (1987). On *Haplosporidium gammari*, a parasite of the amphipod *Rivulogammarus pulex*, and its relationships with the phylum Ascetospora. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 159–169.
- Latham, A., & Poulin, R. (2002). Field evidence of the impact of two acanthocephalan parasites on the mortality of three species of New Zealand shore crabs (Brachyura). *Marine Biology*, 141, 1131-1139.
- Lee, S. K., Lee, S. H., Kim, H. K., & Song, S. J. (2020). A Report of *Carcinus aestuarii* (Decapoda: Brachyura: Carcinidae) from Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 36(4), 420-423.
- Lefèvre, T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Missé, D., Poulin, R., & Thomas, F. (2009). The ecological significance of manipulative parasites. *Trends In Ecology & Evolution*, 24(1), 41-48.
- Léger, L., & Duboscq, O. (1905). Les Eccrinides, nouveau groupe de végétaux inférieurs, parasites des Arthropodes. *Bulletin de l'Association Française Pour l'Avancement des Sciences*, 28, 331-332.

- Léger, L., & Duboscq, O. (1906). L'évolution d'une *Aggregata* de la seiche chez le *Portunus depurator* Leach. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 60, 1001.
- Léger, L., & Duboscq, O. (1908). L'évolution schizogonique de l'*Aggregata (Eucoccidium) eberthi* (Labbé). *Archive Protistenkunde*, 12, 44–108
- Leignel, V. S. J. H., Stillman, J. H., Baringou, S., Thabet, R., & Metais, I. (2014). Overview on the European green crab *Carcinus* spp. (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 9129-9144.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., & Herve, M. (2021). Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means (R package version 1.5. 1.) [Computer software]. The Comprehensive R Archive Network. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> (accessed on 27 September 2022).
- Levine, N. D. (1985). Phylum II. Apicomplexa. In J. J. Lee, S. H. Hutner, & E. C. Bovee (Eds.), *Illustrated Guide to the Protozoa* (p. 322). Society of Protozoologists.
- Lewicki, K. E., Huyvaert, K. P., Piaggio, A. J., Diller, L. V., & Franklin, A. B. (2015). Effects of barred owl (*Strix varia*) range expansion on *Haemoproteus* parasite assemblage dynamics and transmission in barred and northern spotted owls (*Strix occidentalis caurina*). *Biological Invasions*, 17, 1713-1727.
- Liat, L. B., & Pike, A. W. (1980). The incidence and distribution of *Profilicollis botulus* (Acanthocephala), in the eider duck, *Somateria mollissima*, and in its intermediate host the shore crab, *Carcinus maenas*, in north east Scotland. *Journal of zoology*, 190(1), 39-51.
- Linstow, O. (1878). *Compendium der helminthologie*. Hahn'sche buchhandlung.
- Lockwood, J. L., Hoopes, M. F., & Marchetti, M. P. (2013). *Invasion Ecology*. John Wiley & Sons.
- Lodge, D. M., Williams, S., MacIsaac, H. J., Hayes, K. R., Leung, B., Reichard, S., ... & McMichael, A. (2006). Biological invasions: recommendations for US policy and management. *Ecological Applications*, 16(6), 2035-2054.
- Lorenti, E., Rodríguez, S. M., Cremonte, F., D'Elía, G., & Diaz, J. I. (2018). Life cycle of the parasite *Profilicollis chasmagnathi* (Acanthocephala) on the Patagonian coast of Argentina based on morphological and molecular data. *Journal of Parasitology*, 104(5), 479-485.

- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). *100 of the world's worst invasive alien species: A selection from the Global Invasive Species Database*. Invasive Species Specialist Group of the Species Survival Commission of the World Conservation Union. 12, 523-527.
- Lu, C. C., Tang, F. J., Yoichiro, U., Kou, G. H., & Chen, S. N. (1997). Yeast infection in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Taiwan. *Acta Zool Taiwan*, 8, 34-45.
- Lymbery, A. J., Morine, M., Kanani, H. G., Beatty, S. J., & Morgan, D. L. (2014). Co-invaders: the effects of alien parasites on native hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 171-177.
- Lynch, B. R., & Rochette, R. (2009). Spatial overlap and interaction between sub-adult American lobsters, *Homarus americanus*, and the invasive European green crab *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369(2), 127-135.
- M 'intosh, W. C. (1865). The trematode larva and *Ascaris* of the *Carcinus moenas*. *Journal of Cell Science*, 2(19), 201-204.
- Mabin, C. A., Wilson, J. R., Le Roux, J. J., Majiedt, P., & Robinson, T. B. (2020). The first management of a marine invader in Africa: The importance of trials prior to setting long-term management goals. *Journal of Environmental Management*, 261, 110213.
- MacLeod, C. J., Paterson, A. M., Tompkins, D. M., & Duncan, R. P. (2010). Parasites lost—do invaders miss the boat or drown on arrival? *Ecology Letters*, 13(4), 516-527.
- Malvé, M. E., Rivadeneira, M. M., & Gordillo, S. (2020). Northward range expansion of the European green crab *Carcinus maenas* in the SW Atlantic: A synthesis after ~20 years of invasion history. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.11.04.368761>
- Marchand, J., & Sprague, V. (1979). Ultrastructure of *Minchinia cadomensis* sp. n. (Haplosporida), parasite of the decapod *Rhithropanopeus harrisi* tridentatus Maitland in the Caen canal to the sea (Calvados France). *Journal of Protozoology*, 26, 179-185.
- Marcogliese, D. J. (1995). Comparison of parasites of mummichogs and sticklebacks from brackish and freshwater ponds on Sable Island, Nova Scotia. *American Midland Naturalist*, 333-343.

- Mari, J., & Bonami, J. R. (1986). Les infections virales du crabe *Carcinus mediterraneus* Czerniavski, 1984. In C. P. Vivarès, J. R. Bonami, & E. Jasper (Eds.), *Pathology in marine aquaculture* (pp. 283-293). European Aquaculture Society Special Publication, 9. Bredene, Belgium.
- Mari, J., & Bonami, J. R. (1987). A reolike virus of the Mediterranean shore crab *Carcinus mediterraneus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 3, 107-112. <https://doi.org/10.3354/dao003107>
- Mari, J., & Bonami, J. R. (1988a). The W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: A reovirus disease. *Journal of General Virology*, 69(3), 561-571. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-3-561>
- Mari, J., & Bonami, J. R. (1988b). PC84, a parvo-like virus from the crab *Carcinus mediterraneus*: Pathological aspects, ultrastructure of the agent, and first biochemical characterization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 51(2), 145-156. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90037-7)
- Márquez, F., Zabala, S., Bökenhans, V., Cumplido, M., Espinosa, F., Bigatti, G., & Averbuj, A. (2024). Predation of the invasive green crab *Carcinus maenas* on the edible snail *Buccinastrum deforme*, targeted as the most important nearshore marine gastropod fishery from Patagonia, Argentina. *Regional Studies in Marine Science*, 69, 103299.
- Martelli, A. (2018). Evaluación del desarrollo de las etapas tempranas del ciclo de vida del cangrejo nadador *Ovalipes trimaculatus* (de Hann 1833) y su aplicación en acuicultura (Tesis de doctorado en Biología). Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.
- Martin, L. B., Hawley, D. M., & Ardia, D. R. (2011). An introduction to ecological immunology. *Functional Ecology*, 25(1), 1-4.
- Martorelli, S. R., Overstreet, R. M., & Jovonovich, J. A. (2010). First report of viral pathogens WSSV and IHNV in Argentine crustaceans. *Bulletin of Marine Science*, 86(1), 117-131.
- Martorelli, S. R., Alda, P., Marcotegui, P., Montes, M. M., & La Sala, L. F. (2012). New locations and parasitological findings for the invasive shrimp *Palaemon macrodactylus* in temperate southwestern Atlantic coastal waters. *Aquatic Biology*, 15(2), 153-157.

- Matheson, K., McKenzie, C. H., Gregory, R. S., Robichaud, D. A., Bradbury, I. R., Snelgrove, P. V. R., & Rose, G. A. (2016). Linking eelgrass decline and impacts on associated fish communities to European green crab *Carcinus maenas* invasion. *Marine Ecology Progress Series*, 548, 31-45.
- Mathur, V., Kwong, W. K., Husnik, F., et al. (2021). Phylogenomics identifies a new major subgroup of apicomplexans, *Marosporida* class nov., with extreme apicoplast genome reduction. *Genome Biology and Evolution*, 13(2).
- McCook, L. J., & Chapman, A. R. O. (1993). Community succession following massive ice-scour on a rocky intertidal shore: recruitment, competition and predation during early, primary succession. *Marine Biology*, 115, 565-575.
- McDermott, J. J., & Gibson, R. (1993). *Carcinonemertes pinnotheridophila* sp. nov. (Nemertea, Enopla, Carcinonemertidae) from the branchial chambers of *Pinnixa chaetoptera* (Crustacea, Decapoda, Pinnotheridae): description, incidence and biological relationships with the host. In *Advances in Nemertean Biology: Proceedings of the Third International Meeting on Nemertean Biology, Y Coleg Normal, Bangor, North Wales, August 10–15, 1991* (pp. 57-80). Springer Netherlands.
- McDonald, P. S., Jensen, G. C., & Armstrong, D. A. (2001). The competitive and predatory impacts of the nonindigenous crab *Carcinus maenas* (L.) on early benthic phase Dungeness crab *Cancer magister* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 258(1), 39-54.
- McGeoch, M. A., Butchart, S. H., Spear, D., Marais, E., Kleynhans, E. J., Symes, A., ... & Hoffmann, M. (2010). Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. *Diversity and Distributions*, 16(1), 95-108.
- Messing, R. H., & Wright, M. G. (2006). Biological control of invasive species: solution or pollution? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(3), 132-140.
- Meyers, T. R. (1990). Diseases caused by protistans. In O. Kinne (Ed.), *Diseases of Marine Animals*, Vol. III, *Diseases of Crustacea* (pp. 350–368). *Biologische Anstalt Helgoland*, Hamburg, Germany.
- Meyers, T. R., Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1994). A dinoflagellate-like parasite in Alaskan spot shrimp *Pandalus platyceros* and pink shrimp *P. borealis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 71–76.

- Miller, M. P., & Vincent, E. R. (2008). Rapid natural selection for resistance to an introduced parasite of rainbow trout. *Evolutionary Applications*, 1(2), 336-341.
- Minchin, D., Gollasch, S., Cohen, A. N., Hewitt, C. L., & Olenin, S. (2009). Characterizing vectors of marine invasion. In *Biological invasions in marine ecosystems: Ecological, management, and geographic perspectives* (pp. 109-116). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Miura, O., Kuris, A. M., Torchin, M. E., Hechinger, R. F., & Chiba, S. (2006). Parasites alter host phenotype and may create a new ecological niche for snail hosts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1592), 1323-1328.
- Mladineo, I., & Bočina, I. (2007). Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 261-264.
- Monticelli, F. S. (1890). Elenco degli elminti studiati a Wimereux nella primavera del 1889. *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique*, 22(ser. 4), 417-444.
- Moore, J., & Gotelli, N. J. (1990). *A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: A critical look at the manipulation hypothesis*. In C. J. Barnard & J. M. Behnke (Eds.), *Parasitism and host behaviour* (pp. 193-233). Taylor and Francis.
- Morales-Covarrudias, M. S., Lozano-Olvera, R. Y., & Hernandez-Silva, A. J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia Camarones*, 5, 33-39.
- Moroff, T. (1908). Die bei den Cephalopoden vorkommenden *Aggregata*-Arten als Grundlage einer kritischen Studie über die Physiologie des Zellkerns. Gustav Fischer.
- Moser, J. R., Álvarez, D. A. G., Cano, F. M., Garcia, T. E., Molina, D. E. C., Clark, G. P., ... & López, J. H. (2012). Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326, 9-14.
- Mouritsen, K. N., & Poulin, R. (2002). Parasitism, community structure and biodiversity in intertidal ecosystems. *Parasitology*, 124(7), 101-117.

- Mydlarz, L. D., Jones, L. E., & Harvell, C. D. (2006). Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1), 251-288
- Narasimhamurti, C. C. (1979). The eimeriid *Aggregata kudo* n. sp. from *Sepia elliptica*. *Angewandte Parasitologie*, 20(3), 154-158.
- Narvarte, M., González, R., & Filippo, P. (2007). Artisanal mollusk fisheries in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina): An appraisal of the factors contributing to unsustainability. *Fisheries Research*, 87(1), 68-76.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology And Evolution*, 32(1), 268-274.
- Nickol, B. B. (1985). Epizootiology. In D. W. T. Crompton & B. B. Nickol (Eds.), *Biology of the Acanthocephala* (pp. 307-346). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2019). Retrieved from & [https://www.oie.int/index.php?xml:id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_koi\\_herpesvirus.htm](https://www.oie.int/index.php?xml:id=2439&L=0&htmfile=chapitre_koi_herpesvirus.htm)
- Øksnebjerg, B. (2000). The Rhizocephala (Crustacea: Cirripedia) of the Mediterranean and Black seas: Taxonomy, biogeography, and ecology. *Israel Journal of Zoology*, 46(1), 1-102
- Olivier, S. R., Kreibohm de Paternoster, I., & Bastida, R. (1966). Estudios biocenóticos en las costas de Chubut (Argentina) I. Zonación biocenológica de Puerto Pardelas (Golfo Nuevo). *Boletín del Instituto de Biología Marina, Mar del Plata*, (10), 74 pp.
- Orensanz, J. M., Schwindt, E., Pastorino, G., Bortolus, A., Casas, G., Darrigran, G., ... & Vallarino, E. A. (2002). No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic. *Biological Invasions*, 4, 115-143.
- Ortiz, N., & Ré, M. E. (2011). The eggs and hatchlings of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(3), 705-713.
- Ovcharenko, M. O., Bacela, K., Wilkinson, T., Ironside, J. E., Rigaud, T., & Wattier, R. A. (2010). *Cucumispora dikerogammari* n. gen. (Fungi: Microsporidia) infecting the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*: a potential emerging disease in European rivers. *Parasitology*, 137(2), 191-204.

- Paine, R. T. (1966). Food web complexity and species diversity. *The American Naturalist*, 100(910), 65-75.
- Paine, R. T. (1974). Intertidal community structure: experimental studies on the relationship between a dominant competitor and its principal predator. *Oecologia*, 15, 93-120.
- Pappalardo, R., & Boemare, N. (1982). An intracellular *Streptococcus*, causative agent of a slowly developing disease in the Mediterranean crab, *Carcinus mediterraneus*. *Aquaculture*, 28(3-4), 283-292. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90028-5)
- Pappalardo, R., Mari, J., & Bonami, J. R. (1986).  $\tau$  (tau) virus infection of *Carcinus mediterraneus*: histology, cytopathology, and experimental transmission of the disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47(3), 361-368.
- Pejchar, L., & Mooney, H. A. (2009). Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(9), 497-504.
- Perkins, E. J. (1967). Some aspects of the biology of *Carcinus maenas* (L.). *Trans. Dumfriesshire and Galloway Natural History and Antiquarian Society, Series 3*. 44, 46-56.
- Perkins, F. O. (1975). Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab, *Panopeus herbstii*. *Marine Fisheries Review*, 37(6), 46-60.
- Petter, A. J. (1970). Quelques spirurides de poissons de la région nantaise. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 45(1), 31-46.
- Pina, S., Russell-Pinto, F., & Rodrigues, P. (2011). Description of *Maritrema portucalensis* sp. nov. (Digenea, Microphallidae) parasite of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda) from Aveiro estuary, northern Portugal. *Acta Parasitologica*, 56, 377-384.
- Poirier, L. A., Symington, L. A., Davidson, J., St-Hilaire, S., & Quijón, P. A. (2017). Exploring the decline of oyster beds in Atlantic Canada shorelines: potential effects of crab predation on American oysters (*Crassostrea virginica*). *Helgoland Marine Research*, 71, 1-14.
- Porchet-Henneré, E., & Richard, A. (1970). Structure fine des microgamètes d'*Aggregata eberthi* Labbe. *Protistologica*, 6, 71-81.
- Poulin, R. (1997). Species richness of parasite assemblages: evolution and patterns. *Annual review of Ecology and Systematics*, 28(1), 341-358.
- Poulin, R. (2011). *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton university press.

- Poynton, S. L., Reimschuessel, R., & Stoskopf, M. K. (1992). *Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from two species of octopus (Mollusca: Octopodidae) from the eastern North Pacific Ocean. *The Journal of Protozoology*, *39*(1), 248-256
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T., & Dunn, A. M. (2004a). Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(7), 385-390.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T., Riddell, G. E., & Dunn, A. M. (2004b). Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. *Water Research*, *38*(12), 2847-2850.
- Prévot, G., & Deblock, S. (1970). Contribution à l'étude des Microphallidae Travassos 1920. Trematoda XX. *Megalophallus carcini* n. sp., adulte expérimental d'une métacercarie de *Carcinus maenas* Pennant. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *45*(2), 213-222.
- Pyšek, P., Hulme, P. E., Simberloff, D., Bacher, S., Blackburn, T. M., Carlton, J. T., ... & Richardson, D. M. (2020). Scientists' warning on invasive alien species. *Biological Reviews*, *95*(6), 1511-1534.
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Råberg, L., Graham, A. L., & Read, A. F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1513), 37-49.
- Rankin, J. S. (1939). Studies on the trematode family Microphallidae Travassos, 1921. I. The genus *Levinseniella* Stiles and Hassall, 1901, and description of a new genus, *Cornucopula*. *Transactions of the American Microscopical Society*, *58*(4), 431-447.
- Ré, M. E., & Gómez Simes, E. (1992). Hábitos alimentarios del pulpo (*Octopus tehuelchus*). I. Análisis cuali-cuantitativos de la dieta en el intermareal de Puerto Lobos, Golfo San Matías (Argentina). *Frente Marítimo*, *11*, 119-128.
- Ré, M. E. (1998). *Pulpos octopódidos (Cephalopoda, Octopodidae)*. In J. L. Gutiérrez & M. R. Spivak (Eds.), *Fauna de agua dulce de Argentina* (pp. 145-160). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Reece, K. S., Siddall, M. E., Stokes, N. A., & Burrenson, E. M. (2004). Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *Journal of Parasitology*, *90*(5), 1111-1122.

- Reise, K. (1978). Experiments on epibenthic predation in the Wadden Sea. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 31, 55-101.
- Reisinger, L. S., & Lodge, D. M. (2016). Parasites alter freshwater communities in mesocosms by modifying invasive crayfish behavior. *Ecology*, 97(6), 1497-1506.
- Ren, J., & Zheng, X. (2022). *Aggregata sinensis* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite from *Amphioctopus fangsiao* and *Octopus minor* (Mollusca: Octopodidae) in the Western Pacific Ocean. *Parasitology Research*, 121(1), 373-381.
- Retamal, M. A. (1981). Catálogo ilustrado de los crustáceos decápodos de Chile. *Gayana Zoológica*, 44, 7-110.
- Richard, J. (1899). Essai sur les parasites et les commensaux des Crustacés. *Archives de parasitologie*, 2, 548-595.
- Ripley, B. D. (2002). *Modern applied statistics with S*. Springer. New York, NY, USA.
- Robaldo, R. B., Monserrat, J., Cousin, J. C. B., & Bianchini, A. (1999). Effects of metacercariae (Digenea: Microphallidae) on the hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda: Grapsidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(2), 153-157.
- Roche, D. G., Leung, B., Franco, E. F. M., & Torchin, M. E. (2010). Higher parasite richness, abundance and impact in native versus introduced cichlid fishes. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1525-1530.
- Rodríguez, S. M., Diaz, J. I., & D'Elía, G. (2017). Morphological and molecular evidence on the existence of a single estuarine and rocky intertidal acanthocephalan species of *Profilocollis* Meyer, 1931 (Acanthocephala: Polymorphidae) along the Atlantic and Pacific coasts of southern South America. *Systematic Parasitology*, 94(4), 527-533.
- Rohde, K. (1982). *Ecology of Marine Parasites*. University of Queensland Press: St. Lucia, Australia.
- Rohde, K. (2005). Crustacean parasites. *Marine Parasitology*, 123-169.
- Rojas, F. O. (2014). Revisión de la distribución geográfica del género *Cyrtograpsus* en Argentina. *Bioma*, 20, 56-61
- Roman, J. (2006). Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273, 2453-2459.

- Ropes, J. W. (1968). The feeding habits of the green crab, *Carcinus maenas* (L.). *Fishery Bulletin*, 67(2), 183-203.
- Rosson, M. A., Williams, P. J., Comeau, M., Mitchell, S. C., & Apaloo, J. (2006). Agonistic interactions between the invasive green crab, *Carcinus maenas* (Linnaeus) and juvenile American lobster, *Homarus americanus* (Milne Edwards). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 329(2), 281-288.
- Roy, H. E., Hesketh, H., Purse, B. V., Eilenberg, J., Santini, A., Scalera, R., ... & Dunn, A. M. (2017). Alien pathogens on the horizon: Opportunities for predicting their threat to wildlife. *Conservation Letters*, 10(4), 477-484.
- Ryazanova, T. V., Eliseikina, M. G., & Kukhlevsky, A. D. (2020). First record of new rickettsia-like organism in the blue king crab *Paralithodes platypus* from the Sea of Okhotsk: distribution, morphological evidence and genetic analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 170, 107325.
- Sánchez-Carnero, N. B., Góngora, M. E., Álvarez, M., & Parma, A. M. (2022). La pesca artesanal en Argentina. Caminando las costas del país (1ª ed.). Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
- Santos, C., & Bueno, S. L. (2001). Prevalence and mean intensity of infestation by *Carcinonemertes carcinophila imminuta* (Nemertea: Carcinonemertidae) in the gills of *Callinectes danae* and *Callinectes ornatus* (Decapoda: Portunidae) from São Sebastião, Brazil. *Hydrobiologia*, 456, 65-71.
- Sardella, N. H., & Re, M. E. (1988). Coccidian parasitosis by the genus *Aggregata* in Patagonian coastal octopuses. I. *Aggregata* sp. in *Octopus tehuelchus* D'Orbigny. *Physis, Seccion A*, 46, 51-60.
- Sardella, N. H., & Martorelli, S. R. (1997). Occurrence of Merogony of *Aggregata* Frenzel 1885 (*Apicomplexa*) in *Pleoticus muelleri* and *Artemesia longinaris* (*Crustacea: Natantia*) from Patagonian Waters (Argentina). *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(3), 198-202.
- Sardella, N. H., Ré, M. E., & Timi, J. T. (2000). Two new *Aggregata* species (*Apicomplexa: Aggregatidae*) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (*Mollusca: Octopodidae*) in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology*, 86(5), 1107-1113.

- Sawyer, C. A., Biglari, S. D., & Thompson, S. S. (1984). Internal end temperature and survival of bacteria on meats with and without a polyvinylidene chloride wrap during microwave cooking. *Journal of Food Science*, 49(3), 972-974.
- Schillizzi, R., Gelos, E. M., & Spagnuolo, J. (2004). Procesos de retracción de los acantilados patagónicos entre la desembocadura de los ríos Negro y Chubut. Argentina. *Revista de la Asociación Argentina de Sedimentología*, 11(1), 17-26.
- Schillizzi, R., Spagnuolo, J., Gelós, E. M., & Aliotta, S. (2005). Presencia y evolución de grandes bloques en la costa de Punta Colorada, Golfo San Matías, Argentina. *Geoacta*, 30.
- Schuwerack, P. M., Lewis, J. W., & Jones, P. W. (2001). Pathological and physiological changes in the South African freshwater crab *Potamonautes warreni* Calman induced by microbial gill infestations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(4), 269-279.
- Schwindt, E., Carlton, J. T., Orensanz, J. M., Scarabino, F., & Bortolus, A. (2020). Past and future of the marine bioinvasions along the Southwestern Atlantic. *Aquatic Invasions*, 15(1).
- Seebens, H., Schwartz, N., Schupp, P. J., & Blasius, B. (2016). Predicting the spread of marine species introduced by global shipping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(20), 5646-5651.
- Seemann, E., Kurth, T., & Entzeroth, R. (2012). Insight into the ultrastructural organisation of sporulated oocysts of *Eimeria nieschulzi* (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitology Research*, 111, 2143-2147.
- Sheath, D. J., Williams, C. F., Reading, A. J., & Britton, J. R. (2015). Parasites of non-native freshwater fishes introduced into England and Wales suggest enemy release and parasite acquisition. *Biological Invasions*, 17, 2235-2246.
- Shields, J. D., & Kuris, A. M. (1988). Temporal variation in abundance of the egg predator *Carcinonemertes epialti* (Nemertea) and its effect on egg mortality of its host, the shore crab, *Hemigrapsus oregonensis*. In *Recent Advances in Nemertean Biology: Proceedings of the Second International Meeting on Nemertean Biology, Tjärnö Marine Biological Laboratory, August 11–15, 1986* (pp. 31-38). Springer Netherlands.
- Shields, J. D., Okazaki, R. K., & Kuris, A. M. (1990). Brood mortality and egg predation by the nemertean, *Carcinonemertes epialti*, on the yellow rock crab, *Cancer*

- anthonyi*, in southern California. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(7), 1275-1281.
- Shields, J. D., & Kuris, A. M. (1990). *Carcinonemertes wickhami* n. sp. (Nemertea), a symbiotic egg predator from the spiny lobster *Panulirus interruptus* in southern California, with remarks on symbiont-host adaptations. *Fishery Bulletin*, 88(2), 279-287.
- Shields, J. D. (2012). The impact of pathogens on exploited populations of decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 211-224.
- Shields, J. D., Williams, J. D., & Boyko, C. B. (2015). Parasites and diseases of Brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 639-774). Brill.
- Shields, J. D., Rowley, A. F., Coates, C. J., & Whitten, M. M. (2022). Parasites of crustaceans. In *Invertebrate Pathology* (pp. 458-502)
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1972). Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta (Vol. 4). Distrito Federal, México: Trillas.
- Sigurdsson, G. M., & Rochette, R. (2013). Predation by green crab and sand shrimp on settling and recently settled American lobster postlarvae. *Journal of Crustacean Biology*, 33(1), 10-14.
- Silliman, B. R., & Bertness, M. D. (2002). A trophic cascade regulates salt marsh primary production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10500-10505.
- Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., ... & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(1), 58-66.
- Simmons, K. R. (2014). Evidence of the enemy release hypothesis: parasites of the Lionfish Complex (*Pterois volitans* and *P. miles*) in the Western North Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. Nova Southeastern University Oceanographic Center, Tesis de maestría.
- Simpson, L. A. (2018). *Carcinonemertes conanobrieni*: A Nemertean Parasite Infecting the Caribbean Spiny Lobster, *Panulirus argus*: Species Description, Host-Use, and Effect on Host Reproductive Health. Clemson University.
- Small, H. J., Neil, D. M., Taylor, A. C., & Coombs, G. H. (2005). Identification and partial characterisation of metalloproteases secreted by a *Mesanophrys*-like ciliate

- parasite of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(3), 225-231.
- Smith, A. L., Hamilton, K. M., Hirschle, L., Wootton, E. C., Vogan, C. L., Pope, E. C., ... & Rowley, A. F. (2013). Characterization and molecular epidemiology of a fungal infection of edible crabs (*Cancer pagurus*) and interaction of the fungus with the dinoflagellate parasite *Hematodinium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 783-793.
- Somboonna, N., Mangkalanan, S., Udompetcharaporn, A., Krittanai, C., Sritunyalucksana, K., & Flegel, T. W. (2010). Mud crab susceptibility to disease from white spot syndrome virus is species-dependent. *BMC Research Notes*, 3, 1-12.
- Spindler-Barth, M. (1976). A bacterial infection in the common shore crab *Carcinus maenas* and the fiddler crab *Uca pugilator*. *Mar. Biol.*, 36(1), 1-4.
- Spivak, E. D. (1997). Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investigaciones Marinas*, 25, 105-120.
- Sprague, V. (1963). Revision of genus *Haplosporidium* and restoration of genus *Minchinia* (Haplosporidia, Haplosporidiidae). *Journal of Protozoology*, 10, 263-266.
- Sprague, V., & Couch, J. (1971). An annotated list of protozoan parasites, hyperparasites, and commensals of decapod Crustacea. *The Journal of Protozoology*, 18(3), 526-537.
- Stachowicz, J. J., Whitlatch, R. B., & Osman, R. W. (1999). Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. *Science*, 286(5444), 1577-1579.
- Stentiford, G. D., Evans, M., Bateman, K., & Feist, S. W. (2003). Co-infection by a yeast-like organism in *Hematodinium*-infected European edible crabs *Cancer pagurus* and velvet swimming crabs *Necora puber* from the English Channel. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54(3), 195-202.
- Stentiford, G. D., Feist, S. W., Bateman, K. S., & Hine, P. M. (2004). Haemolymph parasite of the shore crab *Carcinus maenas*: pathology, ultrastructure and observations on crustacean haplosporidians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(1), 57-68.

- Stentiford, G. D., & Feist, S. W. (2005). A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. *Journal of Invertebrate Pathology*, *88*(2), 136-146.
- Stentiford, G. D., Bonami, J. R., & Alday-Sanz, V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, *291*(1-2), 1-17.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Dubuffet, A., Chambers, E., & Stone, D. M. (2011). *Hepatospora eriocheir* (Wang and Chen, 2007) gen. et comb. nov. infecting invasive Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, *108*(3), 156-166.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Feist, S. W., Chambers, E., & Stone, D. M. (2013a). Plastic parasites: extreme dimorphism creates a taxonomic conundrum in the phylum Microsporidia. *International Journal for Parasitology*, *43*(5), 339-352.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Stokes, N. A., & Carnegie, R. B. (2013b). *Haplosporidium littoralis* sp. nov.: a crustacean pathogen within the Haplosporida (Cercozoa, Ascetosporea). *Diseases of Aquatic Organisms*, *105*(3), 243-252.
- Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Feist, S. W., Oyarzún, S., Uribe, J. C., Palacios, M., & Stone, D. M. (2014). *Areospora rohanae* n. gen. n. sp. (Microsporidia; Areosporiidae n. fam.) elicits multi-nucleate giant-cell formation in southern king crab (*Lithodes santolla*). *Journal of Invertebrate Pathology*, *118*, 1-11.
- Stephenson, W., & Rees, R. (1968). A revision of the genus *Ovalipes* Rathbun, 1898 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Records of the Australian Museum*, *27*, 213-261
- Storero, L. P., & Narvarte, M. A. (2013). Coccidian infection may explain the differences in the life history of octopus host populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, *114*(3), 222-225.
- Storero, L. P., Botto, F., Narvarte, M. A., & Iribarne, O. O. (2016). Influence of maturity condition and habitat type on food resources utilization by *Octopus tehuelchus* in Atlantic Patagonian coastal ecosystems. *Marine Biology*, *163*, 1-10.
- Stunkard, H. W. (1956). *Studies on parasites of the green crab, Carcinus maenas*. *Journal of Parasitology*, *42*(2), 159-162. <https://doi.org/10.2307/3274052>

- Subramaniam, K., Behringer, D. C., Bojko, J., Yutin, N., Clark, A. S., Bateman, K. S., ... & Waltzek, T. B. (2020). A new family of DNA viruses causing disease in crustaceans from diverse aquatic biomes. *MBio*, *11*(1), e01028-20.
- Tan, E. B. P., & Beal, B. F. (2015). Interactions between the invasive European green crab, *Carcinus maenas* (L.), and juveniles of the soft-shell clam, *Mya arenaria* L., in eastern Maine, USA. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, *462*, 62-73.
- Team, R. C. (2020). A language and environment for statistical computing [Internet]. *R Foundation for Statistical Computing*.
- Telfer, S., & Bown, K. (2012). The effects of invasion on parasite dynamics and communities. *Functional Ecology*, *26*(6), 1288-1299.
- Tepolt, C. K., & Somero, G. N. (2014). Master of all trades: thermal acclimation and adaptation of cardiac function in a broadly distributed marine invasive species, the European green crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology*, *217*(7), 1129-1138.
- Thieltges, D. W., & Goedknecht, M. A. (2023). Ecological consequences of parasite invasions. In M. M. R. P. Peeler & M. E. D. Smith (Eds.), *Parasites and biological invasions* (pp. 100-114). CABI.
- Thomas, F., Renaud, F., Rousset, F., Cézilly, F., & Meeuûs, T. D. (1995). Differential mortality of two closely related host species induced by one parasite. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *260*(1359), 349-352.
- Thompson, A. B. (1985). Analysis of *Profilocollis botulus* (Acanthocephala: Echinorhynchidae) burdens in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Animal Ecology*, 595-604.
- Thresher, R., Proctor, C., Ruiz, G., Gurney, R., MacKinnon, C., Walton, W., ... & Bax, N. (2003). Invasion dynamics of the European shore crab, *Carcinus maenas*, in Australia. *Marine Biology*, *142*, 867-876.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (1996). Infestation of an introduced host, the European green crab, *Carcinus maenas*, by a symbiotic nemertean egg predator, *Carcinonemertes epialti*. *Journal of Parasitology*, *82*(3), 449-453.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2001). Release from parasites as natural enemies: increased performance of a globally introduced marine crab. *Biological Invasions*, *3*, 333-345.

- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2002). Parasites and marine invasions. *Parasitology*, *124*(7), 137-151.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J., & Kuris, A. M. (2003). Introduced species and their missing parasites. *Nature*, *421*(6923), 628-630.
- Torchin, M. E., & Mitchell, C. E. (2004). Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *2*(4), 183-190.
- Torchin, M. E., & Lafferty, K. D. (2009). Escape from parasites. In G. Rilov & J. A. Crooks (Eds.), *Biological invasions in marine ecosystems* (Ecological Studies, Vol. 204, pp. 203-214). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79236-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79236-9_11)
- Torres, P. J., & González-Pisani, X. (2016). Primer registro del cangrejo verde, *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), en Golfo Nuevo, Argentina: un nuevo límite norte de distribución en costas patagónicas. *Ecología Austral*, *26*(2), 134-137.
- Urrutia, A., Bass, D., Ward, G., Ross, S., Bojko, J., Marigomez, I., & Feist, S. W. (2019). Ultrastructure, phylogeny and histopathology of two novel haplosporidians parasitising amphipods, and importance of crustaceans as hosts. *Diseases of Aquatic Organisms*, *136*(1), 87-103.
- Vago, C. (1966). A virus disease in Crustacea. *Nature*, *209*(1290), 13-34.
- Varela-Mejías, A., & Peña-Navarro, N. (2016). Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. *Agronomía Mesoamericana*, *27*(1), 73-80.
- Vázquez, N., Rodríguez, F., Ituarte, C., Klaich, J., & Cremonte, F. (2010). Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green alga *Coccomyxa parasitica* in the Argentinean Patagonian coast. *Journal of Invertebrate Pathology*, *105*(3), 254-260.
- Vázquez, N., Glasinovich, N., Ortiz, N., Gestal, C., Pontones, J., Gilardoni, C., & Cremonte, F. (2023). Host-parasite relationship *Octopus tehuelchus*-*Aggregata valdessensis* in Patagonian coast, southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Invertebrate Pathology*, *201*, 107993.
- Vilcinskis, A. (2015). Pathogens as biological weapons of invasive species. *PLOS Pathogens*, *11*(4), e1004714.
- Vinuesa, J. H. (2005). Distribución de crustáceos decápodos y estomatópodos del golfo San Jorge, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *40*(1), 7-21.

- Vinuesa, J. H. (2007). Molt and reproduction of the European green crab *Carcinus maenas* (Decapoda: Portunidae) in Patagonia, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 55(Suppl. 1), 49–54.
- Violante-González, J., Monks, S., Quiterio-Rendon, G., García-Ibáñez, S., Larumbe-Morán, E., & Rojas-Herrera, A. A. (2016). Life on the beach for a sand crab (*Emerita rathbunae*) (Decapoda, Hippidae): parasite-induced mortality of females in populations of the Pacific sand crab caused by *Microphallus nicolli* (Microphallidae). *Zoosystematics and Evolution*, 92(2), 153-161.
- Visse, M. (2007). Detrimental effect of peritrich ciliates (*Epistylis* sp.) as epibionts on the survival of the copepod *Acartia bifilosa*. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology. Ecology*, 56(3), 173-178.
- Vivares, C. P. (1971). Etude des parasites des crustacés décapodes brachyours: németes et larves de cestodes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 46(1), 1-9.
- Vivarès, C.-P., Loubes, C., & Bouix, G. (1976). Recherches cytochimiques approfondies sur les Microsporidies parasites du Crabe vert de la Méditerranée, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 51(1), 1-14.
- Vivares, C. P., & Sprague, V. (1979). The fine structure of *Ameson pulvis* (Microspora, Microsporida) and its implications regarding classification and chromosome cycle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 33(1), 40-52.
- Vivarès, C. P., & Cuq, J. L. (1981). Physiological and metabolic variations in *Carcinus mediterraneus* (Crustacea: Decapoda) parasitized by *Thelohania maenadis* (Microspora: Microsporida): an ecophysiological approach. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(1), 38-46.
- von Linstow, O. (1878). *Compendium der Helminthologie* (Vol. 1). Hahn'sche Buchhandlung.
- Vossbrinck, C. R., & Debrunner-Vossbrinck, B. A. (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural, and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica*, 52(1/2), 131-142. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.024>
- Vranken, G., Vanderhaeghen, R., & Heip, C. (1991). Effects of pollutants on life-history parameters of the marine nematode *Monhystera disjuncta*. *ICES Journal of Marine Science*, 48(3), 325-334.

- Walton, W. C., MacKinnon, C., Rodriguez, L. F., Proctor, C., & Ruiz, G. M. (2002). Effect of an invasive crab upon a marine fishery: green crab, *Carcinus maenas*, predation upon a venerid clam, *Katelysia scalarina*, in Tasmania (Australia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(2), 171-189.
- Wang, L., Ren, J., & Zheng, X. (2023). Morphological and molecular analysis of *Aggregata aspera* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) in *Amphioctopus ovulum* and *Amphioctopus marginatus* (Mollusca: Cephalopoda) from the Western Pacific Ocean. *European Journal of Protistology*, 88, 125957.
- Warman, C. G., Reid, D. G., & Naylor, E. (1993). Variation in the tidal migratory behaviour and rhythmic light-responsiveness in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73(2), 355-364.
- Warren, D. A., Bacela-Spychalska, K., Grabowski, M., & Bojko, J. (2023). Parasite Invasions and Impact Potential. *Parasites and Biological Invasions*, 15, 77.
- Welsh, P. C., & Sizemore, R. K. (1985). Incidence of bacteremia in stressed and unstressed populations of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 420-425.
- Wickham, D. E. (1978). A new species of *Carcinonemertes* (Nemertea: Carcinonemertidae) with notes on the genus from the Pacific Coast. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 91, 197-202.
- Wickham, D. E. (1979). Predation by the nemertean *Carcinonemertes errans* on eggs of the Dungeness crab *Cancer magister*. *Marine Biology*, 55, 45-53.
- Wickham, D. E. (1980). Aspects of the life history of *Carcinonemertes errans* (Nemertea: Carcinonemertidae), an egg predator of the crab *Cancer magister*. *Biological Bulletin*, 159(1), 247-257.
- Wickham, D. E., Roe, P., & Kuris, A. M. (1984). Transfer of nemertean egg predators during host molting and copulation. *Biological Bulletin*, 167(2), 331-338.
- Wickham, D. E. (1986). Epizootic infestations by nemertean brood parasites on commercially important crustaceans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(11), 2295-2302.
- Wickham, H., & Wickham, H. (2016). *Data analysis* (pp. 189-201). Springer International Publishing.

- Williams, S. L., Davidson, I. C., Pasari, J. R., Ashton, G. V., Carlton, J. T., Crafton, R. E., ... & Zabin, C. J. (2013). Managing multiple vectors for marine invasions in an increasingly connected world. *BioScience*, 63(12), 952-966. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.12.5>
- Winters, A. D., & Faisal, M. (2014). Molecular and ultrastructural characterization of *Haplosporidium diporeiae* n. sp., a parasite of *Diporeia* sp. (Amphipoda, Gammaridea) in the Laurentian Great Lakes (USA). *Parasites & Vectors*, 7, 1-9.
- Wolff, W. J., & Reise, K. (2002). Oyster imports as a vector for the introduction of alien species into northern and western European coastal waters. In *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management* (pp. 193-205). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Yamada, S. B., & Boulding, E. G. (1996). The role of highly mobile crab predators in the intertidal zonation of their gastropod prey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 204(1-2), 59-83.
- Yanet, F. S., Fidel Angel, N. F., Guillermo, N., et al. (2017). Comparison of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections in patients with presumptive malabsorption. *Journal of Parasitic Diseases*, 41, 718-722.
- Yeomans, W. D., Chabb, J. C., & Sweeting, R. A. (1997). Use of protozoa communities for pollution monitoring. *Parassitologia*, 39, 201-212.
- Yorio, P., Suárez, N., Kasinsky, T., Pollicelli, M., Ibarra, C., & Gatto, A. (2020). The introduced green crab (*Carcinus maenas*) as a novel food resource for the opportunistic kelp gull (*Larus dominicanus*) in Argentine Patagonia. *Aquatic Invasions*, 15(1), 140-159.
- Young, A. M., & Elliott, J. A. (2019). Life history and population dynamics of green crabs (*Carcinus maenas*). *Fishes*, 5(1), 4.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis* (5th ed.). Pearson Prentice Hall: New Jersey.
- Zetlmeisl, C., Hermann, J., Petney, T., Glenner, H., Griffiths, C., & Taraschewski, H. (2011). Parasites of the shore crab *Carcinus maenas* (L.): implications for reproductive potential and invasion success. *Parasitology*, 138(3), 394-401.