



Facultade de Veterinaria

Traballo de
Fin de Grao

Descrición anatómica e
histolóxica do mexillón de río
Margaritifera auricularia.

Descripción anatómica e
histolóxica del mejillón de río
Margaritifera auricularia.

Anatomical and histological
description of Giant Freshwater
Pearl Mussel *Margaritifera
auricularia*.

Uxía Rico Gómez

Grao en Veterinaria

Ano 2021

RESUMO

Margaritifera auricularia é unha das especies de bivalvos de auga doce máis ameazadas do noso país. Dende o ano 2013 a súa poboación experimentou un vertixinoso decrecemento por causas ata o momento aínda descoñecidas. A situación tan crítica na que se atopa esta especie demanda medidas de actuación urxentes que consigan revertir o seu risco inminente de extinción, para iso é necesario ampliar o coñecemento dispoñible sobre ela e así conseguir anticiparse a potenciais episodios de mortalidade que mingüen aínda máis as súas poboacións.

Neste traballo descríbense as características anatómicas e histolóxicas de *Margaritifera auricularia*, buscando proporcionar unha guía que sirva de axuda á hora de discernir entre individuos potencialmente sans ou enfermos en futuras avaliacións histopatolóxicas ou estudos de campo. Os resultados obtidos neste traballo, empregando diferentes tipos de tincións histolóxicas, suxiren que a súa estrutura é moi semellante á do resto dos bivalvos de auga doce, especialmente á dos membros da súa familia como *Margaritifera margaritifera*. Chama a atención o desenvolvemento do tecido muscular nos individuos considerados sans, puidendo ser un elemento a ter en conta á hora de realizar unha valoración inicial do estado sanitario dunha poboación. Non obstante certos achados, especialmente a nivel histolóxico, precisan de estudos adicionais para dilucidar a súa función, un dos máis importantes é a presenza de numerosas concrecións extracelulares de calcio dispersas por todo o corpo do animal seguindo a mesma distribución que o tecido conectivo.

PALABRAS CHAVE: *Margaritifera auricularia*, extinción, anatomía, histoloxía, calcio, estado sanitario.

RESUMEN

Margaritifera auricularia es una de las especies de bivalvos de agua dulce más amenazadas de nuestro país. Desde el año 2013 sus poblaciones han experimentado un acelerado decrecimiento por causas hasta el momento aún desconocidas. La situación tan crítica en la que se encuentra esta especie demanda medidas de actuación urgentes con las que tratar de eludir su riesgo inminente de extinción, para eso es necesario ampliar el conocimiento disponible sobre ella y así conseguir anticiparse a potenciales episodios de mortalidad masiva que mermen todavía más sus poblaciones.

En este trabajo se describen las características anatómicas e histológicas de *Margaritifera auricularia*, con el objetivo de proporcionar una guía que sirva de referencia a la hora de discernir entre individuos potencialmente sanos o enfermos en futuras evaluaciones

histopatológicas o estudios de campo. Los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando diferentes tipos de tinciones histológicas, sugieren que su estructura es muy similar a la del resto de bivalvos de agua dulce, especialmente a la de los miembros de su misma familia como *Margaritifera margaritifera*. Destaca el desarrollo del tejido muscular en los individuos considerados sanos, pudiendo constituir un elemento a evaluar a la hora de realizar una valoración inicial del estado sanitario de una población. No obstante, ciertos hallazgos, especialmente a nivel histológico, precisan de estudios adicionales que permitan dilucidar su funcionalidad, uno de los más destacados es la presencia de concreciones extracelulares de calcio dispersas por todo el cuerpo del animal siguiendo la misma distribución que el tejido conectivo.

PALABRAS CLAVE: *Margaritifera auricularia*, extinción, anatomía, histología, calcio, estatus sanitario.

ABSTRACT

Margaritifera auricularia is one of the most endangered freshwater mussel species in our country. Since 2013, its populations have experienced an accelerated decline due to unknown causes. The critical situation in which this species finds itself demands urgent action measures to try to avoid its imminent risk of extinction. In order to do so, it is necessary to increase the knowledge available on the species to anticipate potential episodes of mass mortality that could further reduce its populations.

In this paper we describe the anatomical and histological characteristics of *Margaritifera auricularia*, with the aim of providing a guide to help discern between potentially healthy or sick individuals in future histopathological evaluations or field studies. The results obtained in this work, using different types of histological stains, suggest that its structure is very similar to other freshwater mussels, especially members of the same family such as *Margaritifera margaritifera*. The development of muscle tissue in individuals considered healthy stands out, and may constitute an element to be evaluated when making an initial assessment of the health status of a population. However, certain findings, especially at the histological level, require additional studies to elucidate its functionality, one of the most notable being the presence of extracellular calcium concretions dispersed throughout the animal's body following the same distribution as the connective tissue.

KEY WORDS: *Margaritifera auricularia*, extinction, anatomy, histology, calcium, health status.

ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	5
1.1. Índice de figuras	5
1.2. Índice de táboas	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. Características dos uniónidos	6
2.1.1. Taxonomía e diversidade dentro da orde Unionida	6
2.1.2. Ciclo de vida.....	7
2.2. Importancia ecolóxica e económica	8
2.3. <i>Margaritifera auricularia</i>	10
2.4. Estado de conservación e principais ameazas de <i>Margaritifera auricularia</i> en España	12
3. OBXECTIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIÓNS.....	41
8. REFERENZAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. ÍNDICE

1.1. Índice de figuras

Figura 1. Principais especies da orde Unionida presentes no continente europeo.....	7
Figura 2. Ciclo de vida das especies da orde Unionida.....	8
Figura 3. Clasificación taxonómica de <i>Margaritifera auricularia</i>	11
Figura 4. Realización dos cortes transversais seriados da hemisección dereita dun dos exemplares recibidos.....	16
Figura 5. Esquema realizado sobre un dos individuos no cal indícase a localización aproximada de cada un dos cortes transversais efectuados durante o tallado.....	17
Figura 6. Imaxes da morfoloxía externa de <i>Margaritifera auricularia</i>	18
Figura 7. Imaxes histolóxicas do manto e borde do manto.....	20
Figura 8. Rexión posterior do corpo de <i>Margaritifera auricularia</i>	21
Figura 9. Imaxes histolóxicas do músculo abdutor.....	22
Figura 10. Comparación da aparencia externa dos músculos abdutores dos individuos A e B.....	22
Figura 11. Localización macroscópica da cavidade nefropericárdica e caracterización histolóxica das estruturas contidas nela.....	23
Figura 12. Estructuras posibles de visualizar en <i>Margaritifera auricularia</i> tras a retirada do manto.....	24
Figura 13. Aparencia externa e microscópica das demibranquias dos individuos non grávidos.....	24
Figura 14. Aparencia macroscópica e histolóxica das demibranquias dos individuos grávidos.....	26
Figura 15. Imaxes histolóxicas do pé.....	27
Figura 16. Comparación da aparencia macroscópica do pé do individuo A e C.....	28
Figura 17. Imaxes da estrutura externa e histolóxica dos palpos labiais.....	29
Figura 18. Imaxes das diferentes estruturas que compoñen o tracto dixestivo de <i>Margaritifera auricularia</i>	30
Figura 19. Imaxes histolóxicas da glándula dixestiva.....	31
Figura 20. Imaxes histolóxicas do tecido gonadal masculino e feminino.....	32
Figura 21. Histoloxía do tecido conectivo de Leydig.....	33
Figura 22. Imaxes histolóxicas dos gránulos mineralizados distribuídos por todo o corpo do animal.....	34

1.2. Índice de táboas

Táboa 1. Tincións histolóxicas empregadas neste estudo.....	17
---	----

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Características dos uniónidos

2.1.1. Taxonomía e diversidade dentro da orde Unionida

Ó igual que os bivalvos mariños, os bivalvos de auga doce presentan as características morfolóxicas comúns que os fan pertencer a esta clase. O seu corpo está recuberto por dúas valvas que protexen ao animal da desecación, fronte aos depredadores e actúan como sostén para os tecidos brandos (Lów, Molnár e Kriska, 2016). Caracterízanse por posuír simetría bilateral sen a existencia dunha bolsa visceral dorsal. Carecen dunha porción cefálica diferenciada e constan de branquias moi desenvolvidas con forma de lámina, razón pola cal tamén pódese denominar lamelibranquios (Cargnin-Ferreira e Sarasquete, 2008).

Na orde Unionida están englobadas a meirande parte das especies de bivalvos de auga doce, que representan un número moito máis reducido de especies en comparación cos bivalvos mariños. Actualmente estímase que existen ao redor de 9200 especies de bivalvos (National Oceanic and Atmospheric Administration [NOAA], 2021), das cales en torno a 800 son de auga doce (Bogan, 2008). Esta cifra atópase sometida a constante cambio, especialmente nos últimos anos, xa que había unha importante sobreestimación de especies dentro desta orde, chegándose a rexistrar ata 1500 especies (Graf, 2010). A maior parte foron reclasificadas ou renomeadas grazas aos avances significativos en taxonomía molecular (Graf e Cummings, 2007; Araujo, Toledo e Machordom, 2009; Prié, Puillandre e Bouchet, 2012; Lopes-Lima et al., 2018).

Presentan unha distribución mundial, coa única excepción da Antártida, e a súa orixe remóntase ao Triásico (Walker, Byrne, Hickey e Roper, 2001) o que indica que, pese a ser animais aparentemente simples, foron capaces de adaptarse aos continuos e notables cambios que experimentou a Terra dende a súa aparición (Graf e Cummings, 2007). A meirande parte dos membros desta orde son coñecidos de forma coloquial como mexillóns de río ou náíades, facendo referencia este último ás ninfas da mitoloxía grega encargadas da protección dos ríos, lagoas, pozos e outros lugares de auga doce (Soler, Araujo e Wantzen, 2018a).

Diferéncianse seis familias dentro da orde Unionida: Unionidae, Margaritiferidae, Hyriidae, Etheriidae, Mycetopodidae e Iridinidae. De todas elas a Unionidae é a que conta cun maior número de especies, representando un 85% do total (Soler et al., 2018a), mentres que Margaritiferidae con tan só 12 especies rexistradas é considerada a familia máis ameaza dentro da orde Unionida (Lopes-Lima et al., 2018). Isto é debido a que oito das súas 12 especies atópanse catalogadas pola Unión Internacional para a Conservación da Natureza (IUCN, 2021) como en perigo de extinción ou en perigo crítico de extinción.

Nun estudo realizado no ano 2018 (Lopes-Lima et al.) avaliáronse as características morfolóxicas e moleculares dos membros da familia Margaritiferidae e Unionidae, obtendo como resultado a reclasificación dalgunhas especies entre ambas familias, ademais da subdivisión da familia Margaritiferidae en catro clados en función da súa anatomía, distribución e ecoloxía.

Dentro da orde Unionida só dúas familias están presentes no continente europeo: Unionidae e Margaritiferidae, esta última representada unicamente por dúas especies, *Margaritifera margaritifera* e *Margaritifera auricularia* (Lopes-Lima et al., 2016) (Figura 1).

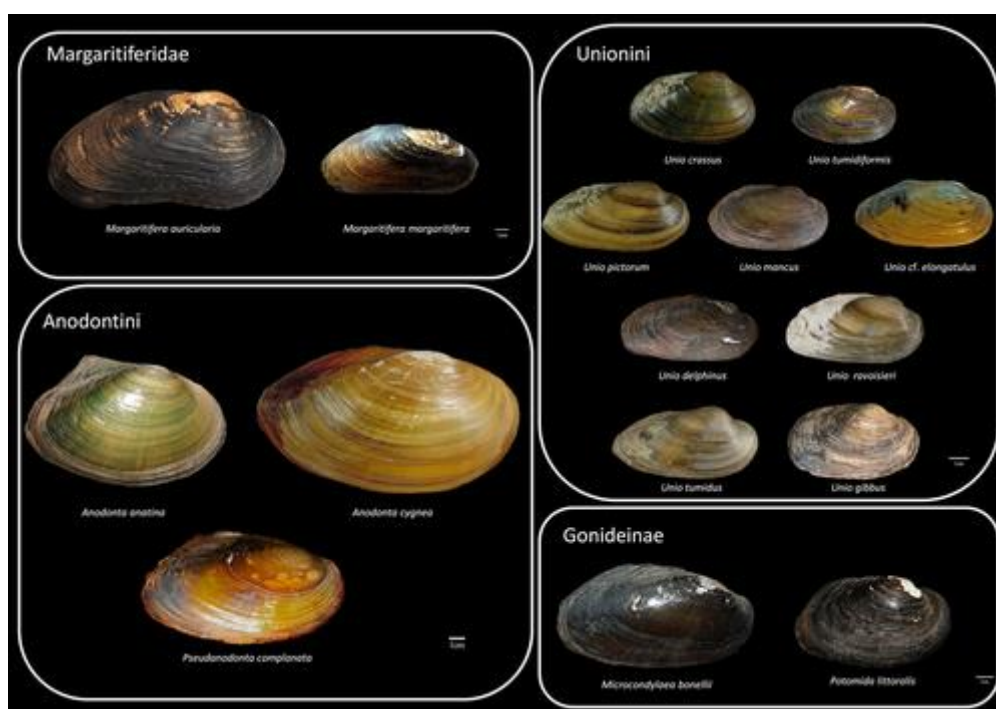


Figura 1: Principais especies da orde Unionida presentes no continente europeo. Imaxe obtida de Lopes-Lima et al., 2016.

2.1.2. Ciclo de vida

Nos uniiónidos a maior parte das especies son dioicas, é dicir, presentan só un dos dous sexos pero, incluso nestas poboacións, ocasionalmente rexístrase unha porcentaxe variable de individuos hermafroditas (Kat, 1983; Wu et al., 2017). Cando comeza a época reprodutiva, que varía para cada unha das especies, os machos liberan o esperma ao exterior a través do sifón exhalante. Unha femia próxima aspira os gametos, presentes na auga que filtra, mediante o sifón inhalante e ten lugar a fecundación nas súas branquias (Araujo, Bragado e Ramos, 2000; Zapater, Araujo, Álvarez, Nakamura e Alcántara, 2006; Soler et al., 2018a). Os embrións formados van permanecer nas branquias dos bivalvos adultos durante un período variable, no cal son incubados ata que alcanzan o desenvolvemento necesario para ser liberados en forma de gloquidios.

Gloquidio é o nome que reciben as fases larvárias dos uniónidos unha vez que sufriron un desenvolvemento completo nas branquias dos bivalvos adultos. Os gloquidios son liberados ao medio acuático, onde deben atinxir o corpo dun peixe, que actúa como hóspe intermediario, para sufrir unha derradeira metamorfose que dá lugar as formas xuvenís (Figura 2) (Soler et al., 2018a). Esta fase parasitaria no corpo dun peixe hóspe é un estadio obrigatorio, de producirse os uniónidos conseguirán completar o seu ciclo de vida e transformarse en bivalvos adultos (Marwaha et al., 2019).

Pero non todas as especies de peixes dispoñibles no hábitat son válidas para conseguir a metamorfose a formas xuvenís (López e Altaba, 2005), e incluso nalgunhas especies de uniónidos demostrouse a influencia da idade do hóspe como un factor condicionante para o enquistamento dos gloquidios (Marwaha et al., 2019).

Unha vez completouse o período de transformación dos gloquidios, que dá lugar aos xuvenís, estes son liberados xa coa mesma forma dun individuo adulto pero cun tamaño moito máis reducido. Caen ao fondo do río, onde se manteñen ancorados para poder alimentarse e continuar co seu crecemento. Isto é posible grazas a existencia do biso, uns filamentos proteicos provistos de gran adherencia producidos por glándulas localizadas a nivel do pé, entre as fibras musculares (Figura 2) (McCartney, 2021). A diferenza dos bivalvos mariños, nas especies da orde Unionida estas glándulas só están presentes nas formas xuvenís (Soler et al., 2018a), xa que os individuos adultos soterran parcialmente o seu corpo no substrato coa axuda do seu pé, moito máis robusto e grande que nas especies mariñas.

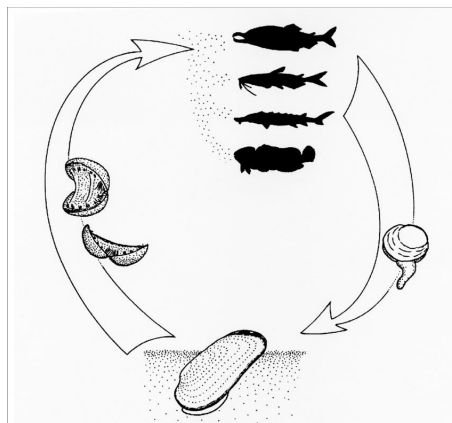


Figura 2: Ciclo de vida das especies da orde Unionida. Imaxe obtida de López e Altaba, 2005.

2.2. Importancia ecolóxica e económica

Ó igual que as náíades da mitoloxía grega, os mexillóns de auga doce desempeñan unha labor fundamental na conservación dos ecosistemas acuáticos.

Unha das funcións máis recoñecidas é a súa capacidade de purificación da auga, derivada do seu comportamento filtrador para a alimentación. O fitoplancto constitúe un dos seus principais alimentos e obtéñeno tanto da corrente de auga á que están expostos como do substrato no que se atopan soterrados (Vaughn, Nichols e Spooner, 2008). Mediante a captación destas partículas de natureza vexetal permiten que as características físico-químicas da auga mantéñanse estables, evitando o enturbamento (Chowdhury, Zieritz e Aldridge, 2016) e a eutrofización (Welker e Walz, 1998). Ademais permiten unha importante reciclaxe e circulación de nutrientes a través das súas deposicións en forma de feces e pseudofeces, tecidos brandos e cuncha, xunto coa súa capacidade de transformación de nutrientes (Strayer, 2014).

Os excrementos destes animais poden conter cantidades variables de carbono, nitróxeno ou fósforo, compoñentes fundamentais para o desenvolvemento dos produtores na cadea trófica. Estes non van beneficiar unicamente ao treito de río no que se asentan as poboacións de bivalvos, xa que tamén son desprazados río abaixo grazas ás correntes (Strayer, 2014). Ademais os nutrientes que constitúen a cuncha, os tecidos e as secrecións manteñen un fluxo constante co medio a través da liberación de produtos reprodutivos (esperma, gloquidios, etc.), mediante descomposición tras a morte do animal (Strayer, 2014) e por disolución paulatina da cuncha (Strayer e Malcom, 2007).

Tamén xogan un importante papel nos procesos de nitrificación e desnitrificación, conseguindo regular desta maneira a cantidade de nitróxeno dispoñible no medio en función das necesidades do ecosistema (Turek e Hoellein, 2015).

As náíades distribúense de forma irregular e dispersa ao longo do río, formando o que se coñece como leitos de bivalvos, constituídos por grandes cantidades de individuos e con gran diversidade de especies (Atkinson e Vaughn, 2015). Estes puntos están considerados como “hotspots” (Atkinson e Vaughn, 2015) xa que favorecen a proliferación doutro tipo de organismos como algas bentónicas e macroinvertebrados (Spooner e Vaughn, 2006), atraídos polo enriquecemento do substrato por parte dos bivalvos con grandes cantidades de nutrientes (Atkinson e Vaughn, 2015).

Outra das súas funcións máis destacadas é a capacidade de actuar como bioindicadores medioambientais, tanto a curto como a longo prazo (Vaughn, 2018). O seu carácter filtrador permite utilizalos como sentinelas para coñecer a calidade da auga mediante o análise da hemolinfa ou de tecidos brandos como o manto ou o pé (Newton e Cope, 2006; Fritts, Peterson, Hazelton e Bringolf, 2015). Os individuos xuvenís empréganse cada vez máis en estudos toxicolóxicos, xa que manifestan unha maior sensibilidade que os adultos a compostos nitróxenos como o amonio (Newton e Bartsch, 2007).

Ademais a súa cuncha tamén pode aportar gran cantidade de información, porque incluso tras a morte do animal esta sigue estando sometida ás alteracións físico-químicas do medio (Vaughn, 2018). Por exemplo, as liñas de crecemento, visibles externamente, permiten coñecer as variacións de temperatura ou do fluxo da auga, entre outros parámetros, que sufriu o medio acuático no que habitan (Schöne, Dunca, Mutvei e Norlund, 2004; Fritts, Fritts, Haag, DeBoer e Casper, 2017).

No pasado os bivalvos de auga doce tamén desempeñaron unha importante función socioeconómica. Para moitas culturas e comunidades eran unha fonte de alimento e coas súas cunchas facíanse xoias e outro tipo de elementos decorativos (Haag, 2012). Pero foi a mediados do século XIX cando estes animais convertéronse realmente nun motor económico importante grazas á industria das perlas e da fabricación de botóns a partir do nácar (Humphries e Winemiller, 2009).

Actualmente dado o estado de conservación no que se atopan a maior parte das especies desta orde, a explotación e consumo destes animais non está permitido, salvo certas excepcións como é o caso de China, onde a industria dos bivalvos de auga doce continúa sendo unha importante fonte de ingresos (Li e Li, 2009).

2.3. *Margaritifera auricularia*

M. auricularia é un bivalvo pertencente á orde Unionida descrito por primeira vez por Spengler en 1793. Porén, ata 1917 non se realizan os primeiros estudos sobre ela debido a que, ata esa data, non existiron rexistros de novos individuos vivos (Araujo e Ramos, 1998a). A partir de 1933 volve a non contabilizarse a presenza de exemplares vivos en España, o que leva a considerar a especie como extinta. Afortunadamente, en 1996 descóbrese unha poboación de 2000 individuos na cunca hidrográfica do río Ebro, en Aragón, e dous anos despois en Francia. A partir deste momento iníciáanse numerosos estudos que van permitir adquirir máis información acerca da bioloxía, ciclo de vida, distribución ou hábitat de *M. auricularia* (Araujo e Ramos, 2000).

Lopes-Lima et al. (2018) en base a estudos anatómicos e moleculares das especies incluídas dentro da familia Unionidae e Margaritiferidae, renomean a *M. auricularia* como *Pseudunio auricularius*. Actualmente non existe un consenso sobre que denominación é máis axeitada, é posible empregar calquera dos dous termos de forma correcta (Soler et al., 2018a). Neste traballo optouse por conservar a nomenclatura de *M. auricularia* por ser a máis coñecida.

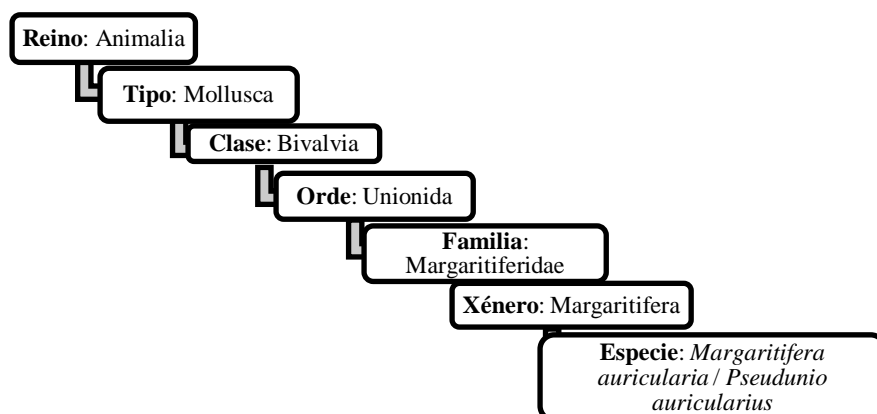


Figura 3: Clasificación taxonómica de *Margaritifera auricularia*. Figura adaptada de IUCN, 2021.

Só España e Francia conservan poboacións vivas desta especie. Noutros países como Italia, Alemaña e Inglaterra a súa presenza está documentada antes do século XIX, pero nunca volveron a ser atopados individuos vivos, polo que considérase extinta (Prié, Cochet e Philippe, 2011). Na actualidade as poboacións máis numerosas da Península Ibérica localízanse no Canal Imperial e o Canal de Tauste, pertencentes á cunca hidrográfica do río Ebro, na provincia de Aragón e Navarra respectivamente (Gómez e Araujo, 2008).

Observouse que *M. auricularia* presenta predilección polos puntos máis profundos do leito dos ríos, en torno aos 5-7 m (Araujo e Ramos, 2000), o que dificulta o seu estudo e observación en comparación con outras especies como *M. margaritifera*, que habita ríos pouco profundos (Araujo e Ramos, 2006; Soler et al., 2018a). Ademais a auga dos ríos nos que está presente son oligo-mesotróficas, ben oxigenadas e básicas, cunha concentración bastante elevada en minerais como o calcio, en torno a 150 ml/L (Araujo e Ramos, 2000).

Igual que o resto dos mexillóns de auga doce, *M. auricularia* distribúese de forma parcheada ao longo do río, en zonas que contan normalmente cun substrato de callao ou grava e, en menor medida, area (Araujo e Ramos, 2000). A súa esperanza de vida é moi longa, podendo alcanzar ata os 70 anos (Campo, Nakamura e Ginés, 2021), pero esta pode variar en función das características do medio no que se atopa o animal (Soler et al., 2018a). O feito de que sexa unha especie tan lonxeva implica a súa vez que o ritmo de crecemento é moi lento e que atinxen a madurez sexual a unha idade avanzada, o que pode supoñer un inconveniente á hora de garantir a súa supervivencia (Metcalf e Monaghan, 2003).

En canto ó ciclo de vida de *M. auricularia* este presenta as mesmas características que no resto dos membros da orde Unionida, pero con certas particularidades exclusivas da especie. Por unha banda descoñécese en que momento exacto ten lugar a fecundación, probablemente en xaneiro – comezos de febreiro en España, pero si se sabe que o período de liberación dos gloquidios

esténdese dende finais do inverno a comezos da primavera (febreiro-marzo) (Araujo e Ramos, 2000; Soler, Wantzen, Jugé, e Araujo, 2018b).

M. auricularia realiza unha liberación masiva de gloquidios que permanecen nadando libres no medio (Soler et al., 2018b) intentando atinxir os filamentos branquiais dun peixe hópode nun tempo máximo de 24 horas (Araujo e Ramos, 1998b; Araujo e Ramos, 2000). Igual que *M. margaritifera* consegue adherirse grazas á presenza duns dentes de pequeno tamaño situados no borde ventral das valvas (Araujo e Ramos, 1998b).

O seu hópode principal é o esturión común (*Acipenser sturio*), o único representante deste xénero endémico de España pero actualmente catalogado como extinto no río Ebro e en toda a Península (Araujo e Ramos, 2000; Gesner, Williot, Rochard, Freyhof e Kottelat, 2010). Debido a isto, foi necesario atopar outros potenciais hópodes para *M. auricularia*, descubrinto que o blenio de río (*Salaria fluviatilis*) ou o esturión siberiano (*Acipenser baerii*), especie alóctona introducida no río Ebro, tamén son capaces de acoller os gloquidios e permitir a súa metamorfose a formas xuvenís (Araujo, Bragado e Ramos, 2001; López e Altaba, 2005).

Este proceso de desenvolvemento tarda en completarse aproximadamente un mes (Araujo e Ramos, 2000; Araujo, Quirós e Ramos, 2003). Unha vez finalizado e cando a temperatura da auga aumenta en torno aos 16-20 °C, as formas xuvenís xa formadas e con menos de 1 mm de lonxitude, despréndense dos filamentos branquiais do peixe e caen ó leito do río, onde continuarán coa súa transformación a individuos adultos (Araujo e Ramos, 2000; Araujo, 2006).

Aínda que nos últimos anos a información dispoñible sobre esta especie aumentou considerablemente, especialmente a nivel do seu ciclo de vida, aínda quedan moitas incógnitas por resolver. No que se refire a coñecementos sobre a súa anatomía ou histoloxía os rexistros bibliográficos son moi escasos, contando unicamente con algunhas descrições moi recentes de estruturas como as branquias ou o tecido gonadal (Soler et al., 2018b; Grande, Araujo e Ramos, 2001)

2.4. Estado de conservación e principais ameazas de *Margaritifera auricularia* en España

Na actualidade está catalogada pola IUCN (Prié, 2021) como especie en perigo crítico de extinción, cun censo no último rexistro do ano 2020 de 100.000-200.000 exemplares adultos. Ademais está incluída no Anexo II (especies de fauna estritamente protexidas) do Convenio de Berna e no Anexo IV da directiva de hábitats (Directiva 92/43/CEE) (Nakamura et al., 2019).

A situación en España é especialmente preocupante. As poboacións de *M. auricularia* non deixan de descender pese aos múltiples esforzos realizados para a súa conservación. A aprobación do Decreto 187/2005 por parte do Goberno de Aragón, polo que se establece un

réxime de protección para *M. auricularia*, permite o comezo dun plan de recuperación mediante a cría en cativeiro. No 2018 o “Ministerio para la Transición Ecológica” decide incluír a *M. auricularia* como unha das sete especies en perigo crítico de extinción en España, o que favorece a creación de novos proxectos de recuperación para intentar salvar á especie do seu risco inminente de extinción (Orden TEC/1078/2018).

Unha das causas máis importantes que a conduciron a esta situación límite foi a extinción no río Ebro do esturión común (*Acipenser sturio*), hópede principal no seu ciclo reprodutivo (Araujo e Ramos, 2000). Dado a alta especificidade de hópede por parte desta especie e a necesidade obrigatoria de parasitar a outro animal para completar o seu desenvolvemento, a desaparición desta especie fixo diminuír exponencialmente o número de individuos de *M. auricularia* (Araujo e Ramos, 1998b; Araujo e Ramos, 2000). Ademais o blenio de río, ata o momento a especie autóctona coñecida máis adecuada para o desenvolvemento dos xuvenís, non conta cunha poboación moi numerosa no Canal Imperial. Nos últimos anos experimentou un forte decrecemento, en torno ao 50%, o que diminúe as posibilidades de que a maior parte dos gloquidios consigan atinxir as branquias dun peixe para completar o seu ciclo vital (Araujo, 2006; Araujo e Álvarez-Cobelas, 2016).

Outro factor que está influíndo negativamente na supervivencia da especie é a introdución de especies exóticas invasoras como a ameixa asiática (*Corbicula fluminea*) e o mexillón cebrado (*Dreissena polymorpha*), que actualmente supoñen un grave problema en toda a Península (Araujo, 2006; Pérez-Quintero, 2008; Campo et al., 2021). A ameixa asiática foi introducida no Canal Imperial no ano 2006 e a partir deste momento o seu número aumentou vertixinosamente, cunha densidade actual de 1010 individuos vivos de *C. fluminea* por metro cadrado fronte a 0.03 de náíades vivas. Estas cifras non distan moito das atopadas noutros lugares como o Canal de Tauste ou o río Ebro, aínda que neste último as poboacións de ameixa asiática distribúense dunha forma máis irregular e fragmentada, encontrándose principalmente nos puntos máis favorables nos que a corrente e o nivel da auga sexan estables. A dispersión descontrolada desta especie débese a que, a diferenza de náíades como *M. auricularia*, *C. fluminea* ten unha vida media curta, entre 5-6 anos, polo que o seu crecemento é rápido, atinxe a madurez sexual cedo e a súa prolificidade é elevada, ademais non precisa dun hópede para completar o seu desenvolvemento (Campo et al., 2021).

O principal problema asociado ás especies exóticas invasoras é a competencia de recursos coas especies autóctonas, xa que unha densidade tan alta de exemplares consume unha gran cantidade de alimento (Campo et al., 2021). Ademais poden causar graves danos como consecuencia dos seus requirimentos biolóxicos. Por exemplo, no caso de *C. fluminea* comprobouse que reduce a taxa de reprodución das náíades por filtración e dixestión dos

gloquidios (Modesto et al., 2019). No caso de *D. polymorpha* observouse que tende a adherirse á parte posterior das valvas doutros bivalvos, o que dificulta a expulsión de fluídos, gametos ou gloquidios polo sifón exhalante, así como o peche das valvas, puidendo incluso causar a morte dos animais por asfixia (Burlakova, Karatayev e Padilla, 2000).

A contaminación da auga e do substrato no que habita *M. auricularia* tamén é considerada como unha das principais ameazas desta especie. Nos últimos anos diversos estudos realizados no Canal Imperial, Canal de Tauste e río Ebro ao seu paso por Aragón, certificaron a presenza de metais pesados como ferro (Fe), cadmio (Cd), cobre (Cu), cinc (Zn) e arsénico (As), ademais de praguicidas e herbicidas procedentes da agricultura (Campo et al., 2021). Non se sabe ata que punto estes contaminantes teñen un efecto tóxico en *M. auricularia*, pero recentemente determinouse que parece manifestar máis resistencia a metais como o amonio ou cobre en comparación con outras náíades (Nakamura et al., 2020).

Outros factores que tamén poden contribuír no seu descenso son as obras de mantemento realizadas periodicamente nas canles ou a construción de presas no río, o que pode supoñer un estrés ambiental asociado ás fluctuacións no nivel de auga. Ademais, aínda que non supoña un problema na actualidade, a sobreexplotación que sufriron as náíades, especialmente a comezos do século XX, minguou moito as poboacións, causando incluso a súa desaparición en algúns puntos do río Ebro (Araujo e Ramos, 2000; Araujo, 2006; Campo et al., 2021).

Cómpre destacar que esta situación tan crítica na que se atopa *M. auricularia* viuse moi agravada a partir do ano 2013, no cal produciuse un episodio repentino de mortalidade masiva no Canal Imperial de Aragón. Comezou afectando ao tramo medio da canle e rapidamente estendeuse río abaixo, arrasando ó seu paso con todas as poboacións de náíades. Na actualidade non se coñece con exactitude a causa do suceso, pero dende o seu inicio a mortalidade dos bivalvos no Canal Imperial non deixou de aumentar, chegando a contabilizar nalgunhas mostraxes un 99.7% de individuos mortos (Campo et al., 2021). Como consecuencia deste episodio, o número de individuos de *M. auricularia* diminuíu exponencialmente, estimándose que dende o ano 2013 desapareceu arredor do 80% da poboación peninsular (Campo et al., 2021).

Por este motivo existe unha necesidade urxente de frear o rápido decrecemento que están experimentando as poboacións de *M. auricularia* residentes na Península Ibérica, co fin de tratar de evitar a súa desaparición do medio natural.

3. OBXECTIVOS

O obxectivo principal deste traballo é realizar unha descrición completa da morfoloxía de exemplares adultos de *M. auricularia*, mediante a avaliación macroscópica e histolóxica de individuos procedentes do medio natural. Deste xeito, este traballo poderá servir de base para futuros estudos histopatolóxicos que orienten sobre os posibles procesos fisiolóxicos ou patolóxicos que poidan estar implicados na conservación desta especie gravemente ameazada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realización deste estudo empregáronse catro exemplares de *M. auricularia* procedentes do Canal Imperial, en Aragón, e remitidos para o seu estudo ao Grupo de Anatomía Patolóxica Veterinaria (GAPAVET) da Universidade de Santiago de Compostela polo equipo que executa as accións do plan de recuperación de *M. auricularia*. Todos eles estaban desprovistos da cuncha cando foron recibidos, xa que para a súa fixación foi necesario que os desenxertaran das valvas.

Dos catro individuos recibidos, dous deles databan de febreiro do 2003 e foron atopados conxelados á beira do río, coincidindo este achado cun período de baixas temperaturas rexistradas nese ano. Os outros dous exemplares restantes recolléronse nos anos 2014 e 2017, con posterioridade a un episodio de alta mortalidade rexistrado no ano 2013.

Foron recibidos distribuídos en tres botes de plástico, con boca ancha, peche hermético e correctamente identificados. Os dous individuos recollidos no ano 2003 estaban fixados no mesmo bote, empregando como axente fixador etanol ao 70%. Foron denominados como A e D para a realización e recoñecemento dos cortes histolóxicos. Os dous botes restantes estaban provistos dun exemplar en cada un, denominados como B e C. O axente fixador utilizado para cada un deles foi diferente, sendo etanol ao 96% para o individuo B e formol ao 10% para o C.

Para o procesado das mostras realizáronse 30 cortes (+/- 3) transversais seriados da hemisección dereita de cada individuo, numerados de anterior a posterior (Figura 4). A hemisección esquerda foi reservada para a realización de futuros estudos. Sobre o seguinte esquema indícase, sobre a imaxe do exemplar A, a posición aproximada de cada un dos cortes efectuados (Figura 5). No tallado do resto de individuos conservouse a mesma numeración dos bloques das estruturas anatómicas de referencia, como son o fin do pé, inicio de músculo abductor anterior e posterior e boca.

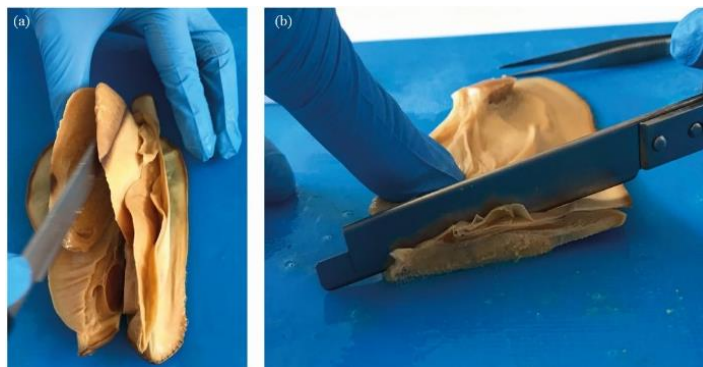


Figura 4. Realización dos cortes transversais seriados da hemisección dereita dun dos exemplares recibidos. (a) Realización do corte lonxitudinal pola liña media. (b) Realización dun corte transversal dunha hemisección.

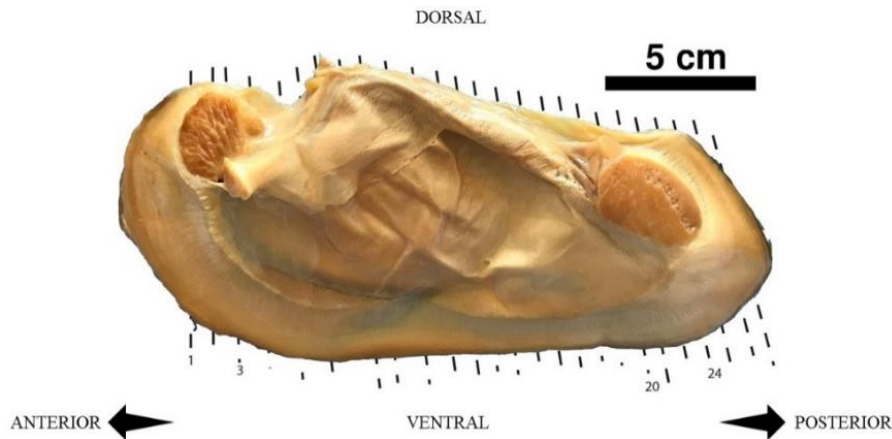


Figura 5. Esquema realizado sobre un dos individuos no cal indicase a localización aproximada de cada un dos cortes transversais efectuados durante o tallado.

Naquelas áreas de maior dureza, procedeuse á descalcificación dos cortes mediante a inmersión dos tecidos en Osteodec® durante 6 horas.

As mostras foron deshidratadas e incluídas en parafina, co obxectivo de formar os bloques a partir dos cales se obtiveron os cortes histolóxicos de 3 µm de grosor. Neste estudo as tincións empregadas para a descrición histolóxica dos tecidos de *M. auricularia* foron:

Hematoxilina e Eosina (H-E)	Ácido periódico de Schiff (PAS)	Tricrómico de Masson	Vermello Alizarina	Tinción de Perls
<ul style="list-style-type: none"> • Tinción rutinaria empregada na avaliación microscópica inicial de calquera tecido. (Gamble, 2008). 	<ul style="list-style-type: none"> □ • Identificación de carbohidratos ou glicoconxugados (Myers, Fredenburgh e Grizzle, 2008). 	<ul style="list-style-type: none"> □ • Visualización do tecido conectivo. (Jones, Bancroft e Gamble, 2008). 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección da presenza de calcio (Churukian, 2008). 	<ul style="list-style-type: none"> □ • Detección da presenza de ferro (Churukian, 2008).

Táboa 1. Tincións histolóxicas empregadas neste estudo.

Os cortes histolóxicos observáronse e fotografáronse os cortes empregando o microscopio óptico Olympus® BX51, equipado coa cámara dixital EP50.

5. RESULTADOS

Os catro exemplares estudados mostraron características anatómicas semellantes. Externamente presentaban o manto, unha estrutura composta por dous lóbulos que se estendían a ambos lados do animal envolvendo o seu corpo. Os lóbulos atopábanse unidos na parte dorsal e caían ventralmente, en forma dunha capa fina e translúcida que engrosábase e escurecíase na porción distal (Figura 6).

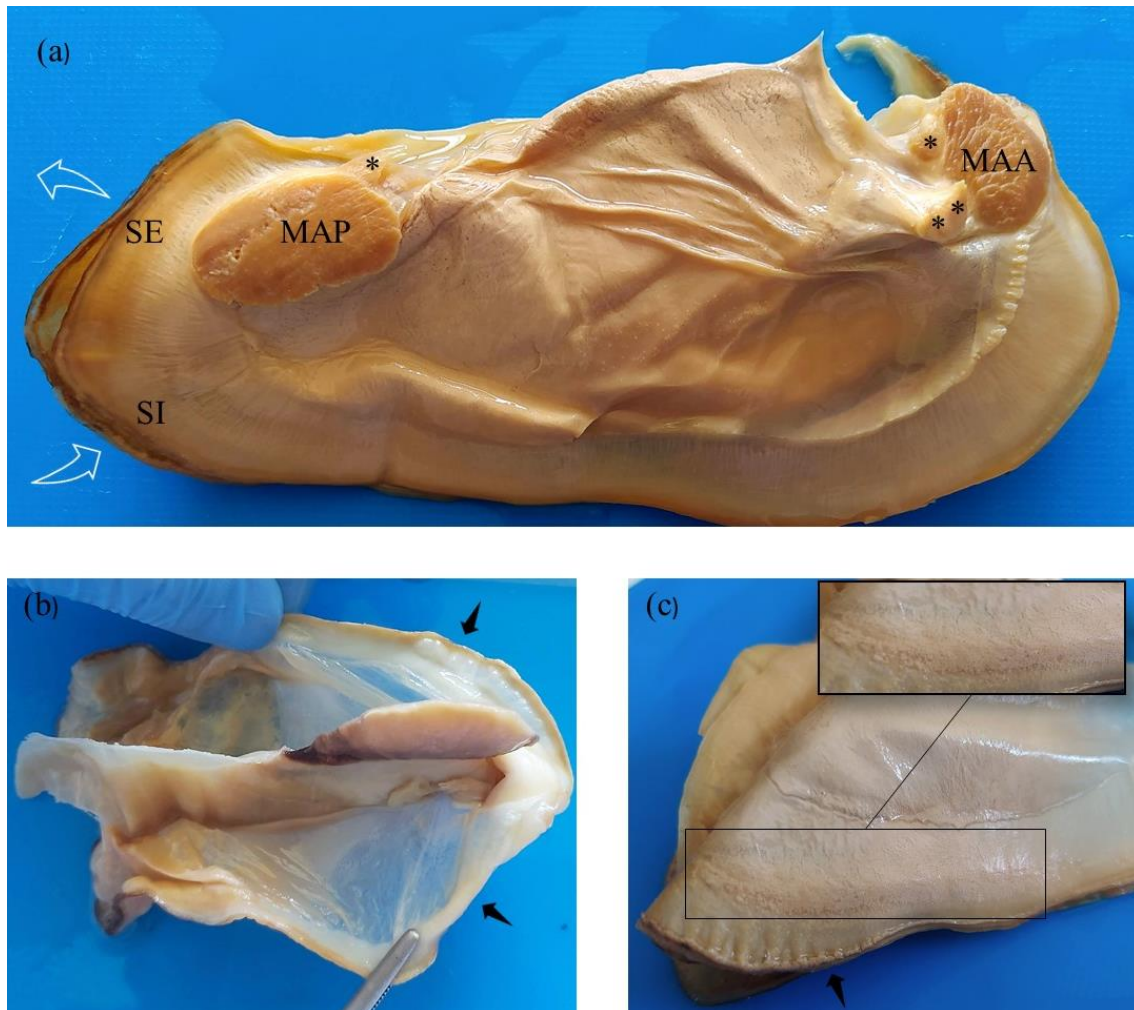


Figura 6. Imaxes da morfoloxía externa de *Margaritifera auricularia*. (a) Hemisección dereita dun dos individuos sobre a que se identificaban facilmente o manto e os músculos abdutores, protractores (**) e retractores (*). As frechas brancas simulan o fluxo de entrada e saída da auga a través dos sifóns inhalante e exhalante, respectivamente. (b) Vista ventral dun exemplar no cal estendíanse ambos lóbulos do manto (frechas negras) para a súa mellor visualización. (c) Enxerto da porción posterior ventral do manto na que se observaba macroscópicamente unha zona branquecina, rugosa e dura ó tacto con resistencia ó corte durante o tallado. Abreviaturas: MAA, músculo abdutor anterior; MAP, músculo abdutor posterior; SE, sifón exhalante; SI, sifón inhalante.

Histolóxicamente a súa estrutura non era uniforme ao longo de toda a súa lonxitude, con zonas de maior grosor e distinta organización dos tecidos, pero estaba composto principalmente por fibras musculares lisas, tecido conectivo laxo e senos hemolinfáticos (Figura 7b). As fibras musculares encontrábanse dispostas de forma lonxitudinal, formando fascículos de diversos

tamaños, a excepción da parte ventral onde o tecido muscular distribuíase de maneira desorganizada e irregular (Figura 7a, 7b). Ambas superficies posuían células caliciformes intercaladas entre un epitelio simple cilíndrico, que no caso da superficie interna era ciliado e apoiábase sobre unha membrana basal máis visible (Figura 7c, 7d).

O borde era o que presentaba unha morfoloxía máis diferenciada, dispoñéndose en tres pregas: a externa, en contacto directo coas valvas da cuncha, a media e a interna (Figura 7e). Cada unha delas tiña unhas características propias, tanto en tamaño e grosor coma no tipo de epitelio e de tecidos que as compoñían. A prega externa do manto, que nalgúns ocasións podía aparecer dividida en varias partes, posuía un epitelio simple cilíndrico. Nalgúns cortes era visible o periostraco, excretado a través da fenda que marcaba a transición entre a prega externa e a media, despois da cal producíase un cambio abrupto no tipo de epitelio. En histoloxía o periostraco aparecía como un fío refrinxente, de grosor variable, que ía rodeando externamente á prega externa do manto (Figura 7f).

A prega media caracterizábase por presentar dous epitelios diferentes. Por unha banda a cara lateral, adxacente á prega externa, mostraba un epitelio simple plano que se transformaba abruptamente á altura da cara medial nun epitelio simple cilíndrico (Figura 7g), o cal conservábase ao longo de toda a prega interna coa única diferenza que nesta última encontrábase ciliado (Figura 7h). Ademais, todo este epitelio dispoñíase formando dobreces que ían desaparecendo ao afastarse do borde do manto (Figura 7a, 7h). Baixo este epitelio simple cilíndrico eran visibles un gran número de células glandulares, cargadas con numerosos gránulos basófilos que vertían á cavidade paleal de forma intraepitelial, sen que existira un conduto aparente (Figura 7g). Estas células estendíanse dorsalmente, aínda que diminuindo o seu número de forma progresiva ata desaparecer.

Macroscópicamente podíase observar como a parte posterior e pigmentada do manto dobrábase formando dúas aberturas coñecidas como sifón inhalante, que ocupaba unha posición ventral, e exhalante, máis dorsal (Figura 6a, 8a). Ademais de estar pigmentado, o borde do manto na zona correspondente ao sifón inhalante non era liso, senón que presentaba papilas de pequeno tamaño (< 0.5 cm) cunha coloración abrancazada e forma arborescente (Figura 8a). A nivel histolóxico non se observaba ningunha diferenza estrutural con respecto ás outras zonas do manto xa descritas.

Dorsoposterior ó músculo abductor posterior, na rexión do sifón exhalante, era visible o ano que aparecía como unha pequena abertura de aproximadamente 3 mm con bordes sobresaíntes (Figura 8b).

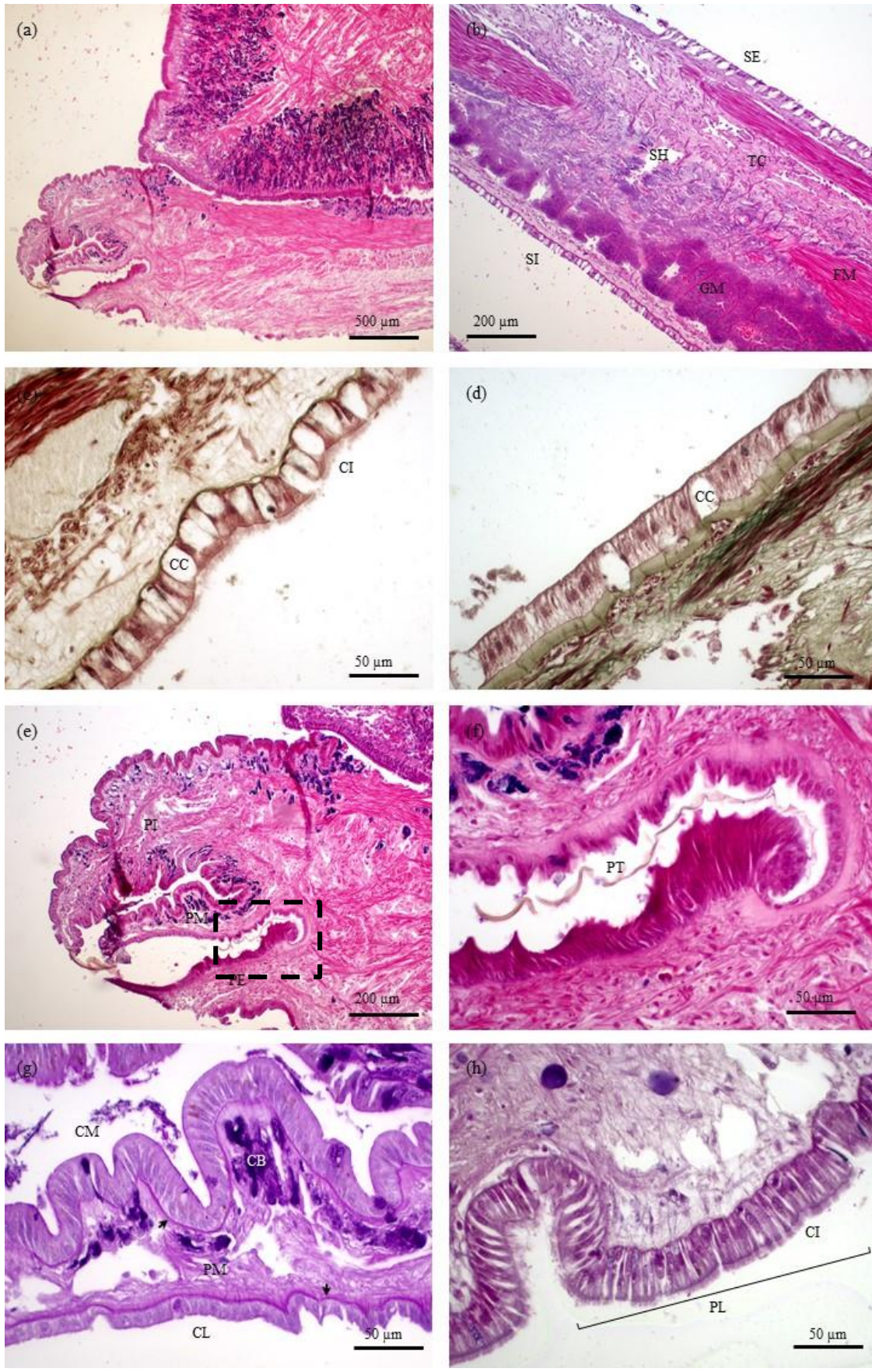


Figura 7. Pé de foto na páxina seguinte ➔

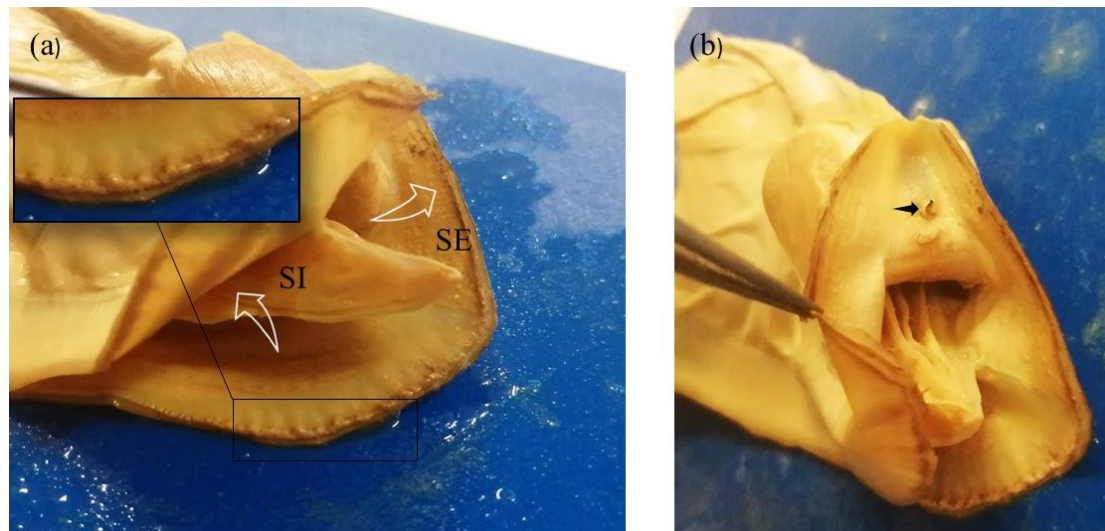


Figura 8. Rexión posterior do corpo de *Margaritifera auricularia*. (a) Imaxe macroscópica do sifón inhalante e exhalante, formados a partir da prega do manto na rexión posterior, e que permiten a entrada e saída da auga do corpo do animal (frechas brancas). Nesta porción o manto atopábase pigmentado e coa presenza de papilas de pequeno tamaño (<5 cm), forma arborescente e abrancazadas na zona do sifón inhalante (Enxerto). (b) Ano (frecha negra) sobresaíndo por riba do músculo abdutor posterior, na rexión do sifón exhalante. Abreviaturas: SE, sifón exhalante; SI, sifón inhalante.

O manto cubría practicamente a totalidade do corpo do animal, excepto os músculos abdutores anterior e posterior que sobresaían de forma simétrica e bilateral para poder inserirse á valva ipsilateral. O músculo abdutor anterior era lixeiramente máis pequeno e, adxacentes a súa marxe posterior, mostraba dous músculos fundamentais para os movementos de extensión e retracción do pé: o músculo protractor pedal, en posición ventral, e o músculo retractor pedal anterior, situado máis dorsal. Pola contra, o músculo abdutor posterior só estaba acompañado polo músculo retractor pedal posterior, localizado na marxe anterior (Figura 6a). Histolóxicamente ambos estaban constituídos por fibras musculares organizadas lonxitudinalmente en grandes fascículos (Figura 9).

Existía unha notable diferenza entre a aparencia externa dos músculos abdutores dos exemplares A e D con respecto aos individuos C e D. Nos primeiros eran de maior tamaño, máis robustos e sobresaíntes (Figura 10a), mentres que nos outros dous individuos mostrábanse menos desenvolvidos e cunha coloración branco-amarelenta (Figura 10b).

Figura 7. Imaxes histolóxicas do manto e borde do manto. (a) Pé e borde do manto. H-E. (b) Sección intermedia do manto na que se observaba o epitelio da superficie externa e interna, xunto cos demais compoñentes da súa estrutura. H-E. (c) Epitelio simple cilíndrico ciliado da superficie interna do manto cun gran número de células caliciformes intercaladas. Tricrómico de Masson. (d) Epitelio simple cilíndrico da superficie externa. Tricrómico de Masson. (e) Borde do manto coas tres pregas que constituían a súa estrutura. O recadro de liñas discontinuas marca a localización da fenda intermedia entre a prega externa e media, observada a maiores aumentos na imaxe (f) H-E. (f) Fenda intermedia entre a prega externa e media a través da cal excretábase o periostraco. H-E. (g) Prega media caracterizada pola diferenza abrupta no tipo de epitelio entre a cara medial e lateral, ambos apoiados sobre unha fina membrana basal (frechas negras). Eran visibles células basófilas subepiteliais en cantidade variable. PAS. (h) Epitelio simple cilíndrico ciliado da prega interna do manto, disposto formando plicas ao longo de toda a súa extensión. H-E. Abreviaturas: CB, células basófilas; CC, célula caliciforme; CI, cilios; CL, cara lateral; CM, cara medial; FM, fibras musculares; GM, gránulos mineralizados; PE, prega externa; PI, prega interna; PL, plica; PM, prega media; PT, periostraco; SE, superficie externa; SH, seno hemolinfático; SI, superficie interna; TC, tecido conectivo. ◀

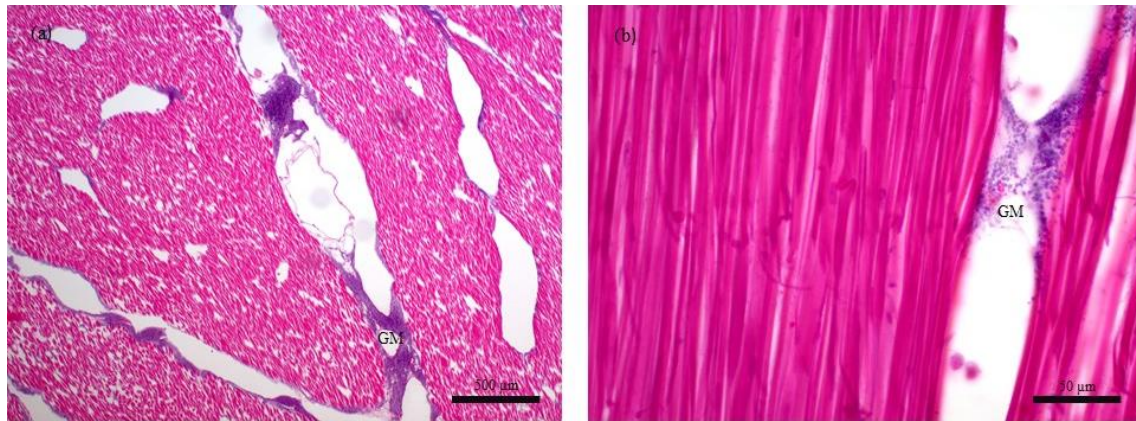


Figura 9. Imaxes histolóxicas do músculo abdutor. (a) Gran cantidade de fibras musculares organizadas formando fascículos separados entre si por un perimio de tecido conectivo, entre o que se visualizaban gránulos basófilos mineralizados de pequeno tamaño. H-E. (b) Disposición lonxitudinal das fibras musculares no músculo abdutor. H-E. Abreviaturas: GM, gránulos mineralizados.

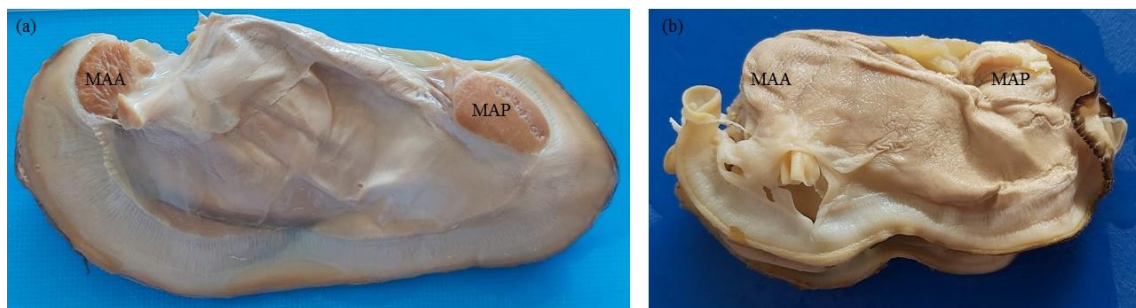


Figura 10. Comparación da aparencia externa dos músculos abdutores dos individuos A e B. (a) Exemplar A, no que se observaban uns músculos abdutores de gran tamaño, robustos e sobresaíntes. (b) Músculos abdutores pouco desenvolvidos e cunha coloración branco-amarelenta do exemplar B.

Externamente tamén era visible a cavidade nefropericárdica, situada na rexión máis dorsal do animal, baixo a bisagra (Figura 11a). a nivel histolóxico si foi posible caracterizar gran parte das estruturas. Por un lado eran visibles os metanefridios, constituídos por un epitelio simple cúbico apoiado sobre unha fina membrana basal e disposto formando túbulos irregulares sen unha organización estrutural ben definida. As súas células eran moi eosinófilas e presentaban no seu interior gránulos cunha coloración pardo-avermellada (Figura 11b, 11c). Por outra banda, o corazón aparecía como un conxunto de fibras musculares dispersas, entre as que se atopaban grandes cantidades de gránulos basófilos e algún hemocito (Figura 11b). Atravesando a cavidade nefropericárdica tamén era visible o recto, que continuaba o seu traxecto dorsal ao músculo abdutor posterior para desembocar no sifón exhalante (Figura 11a).

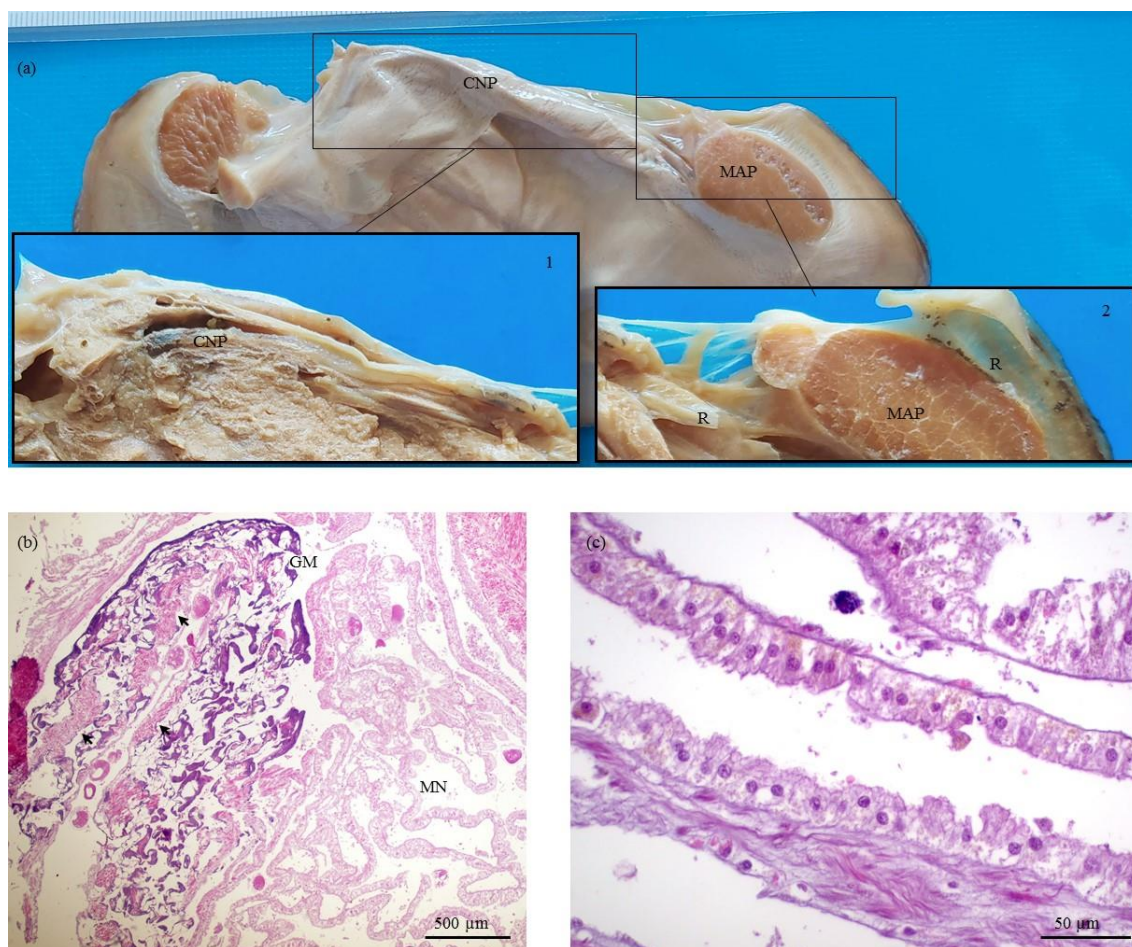


Figura 11. Localización macroscópica da cavidade nefropericárdica e caracterización histolóxica das estruturas contidas nela. (a) Enxerto da cavidade nefropericárdica (1) e da traxectoria do recto sobre o músculo abdutor posterior para desembocar na zona do sifón exhalante (2). (b) Imaxe histolóxica da cavidade nefropericárdica sobre a que se distinguían os metanefridios, formando túbulos irregulares sen organización aparente, e as fibras musculares do corazón (frechas negras) rodeadas por gran cantidade de gránulos extracelulares basófilos. H-E. (c) Epitelio simple cúbico dos metanefridios, composto por células cunha coloración pardo-avermellada apoiadas sobre unha fina membrana basal. H-E. Abreviaturas: CNP, cavidade nefropericárdica; GM, gránulos mineralizados; MAP, músculo abdutor posterior; MN, metanefridios; R, recto.

Baixo os lóbulos do manto encontrábanse as branquias, compostas por dous pares de demibranquias, externa e interna, situadas a ambos lados do pé estendéndose dende detrás dos palpos labiais ata os sifóns (Figura 12). Macroscópicamente, eran estruturas abrancazadas, pouco brillantes e opacas, nas que a demibranquia interna era visiblemente máis grande que a externa (Figura 13a). Porén esta descrición cambiaba nos exemplares grávidos, nos cales aparecían máis espesas e cremosas, cunha coloración amarelo-alaranxada (Figura 12, 14a).

Histolóxicamente cada demibranquia estaba formada por dúas lamelas, unha ascendente e outra descendente, unidas entre si por unións interlamelares irregulares e dispersas compostas por tecido conectivo e fibras musculares (Figura 13b, 14b, 14c). Tamén eran visibles vasos sanguíneos e senos hemolinfáticos, máis pequenos e irregulares, vascularizando as branquias (Figura 13b, 13c). Perpendiculares a estas unións encontrábanse os tubos de auga, revestidos

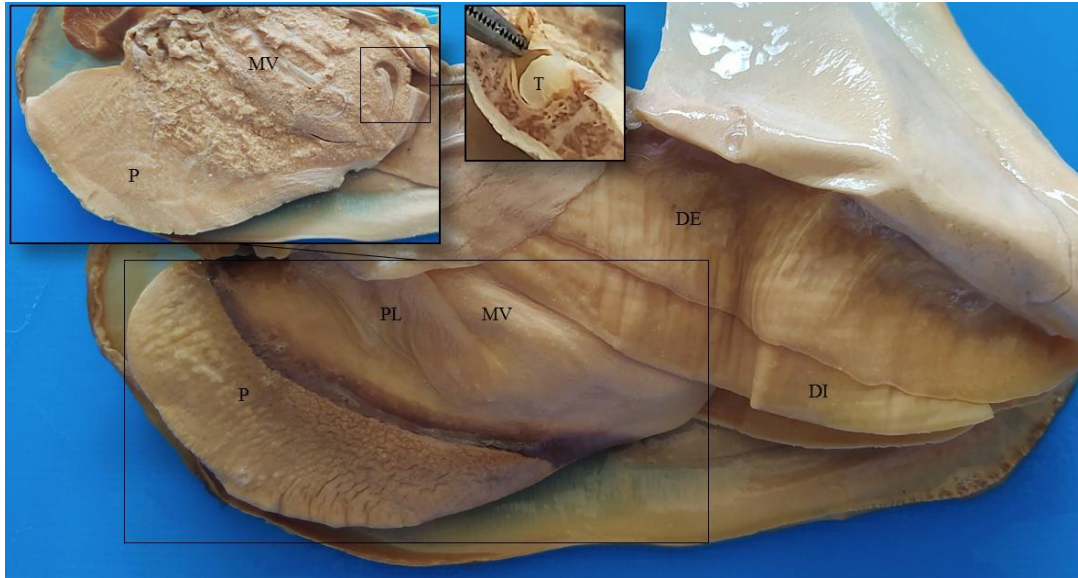


Figura 12. Estructuras posibles de visualizar en *Margaritifera auricularia* tras a retirada do manto. Os enxertos mostran o pé, masa visceral e tifflosol tras o corte saxital dun dos individuos. Abreviaturas: DE, demibranquia externa; DI, demibranquia interna; MV, masa visceral; P, pé; PL, palpos labiais; T, tifflosol.

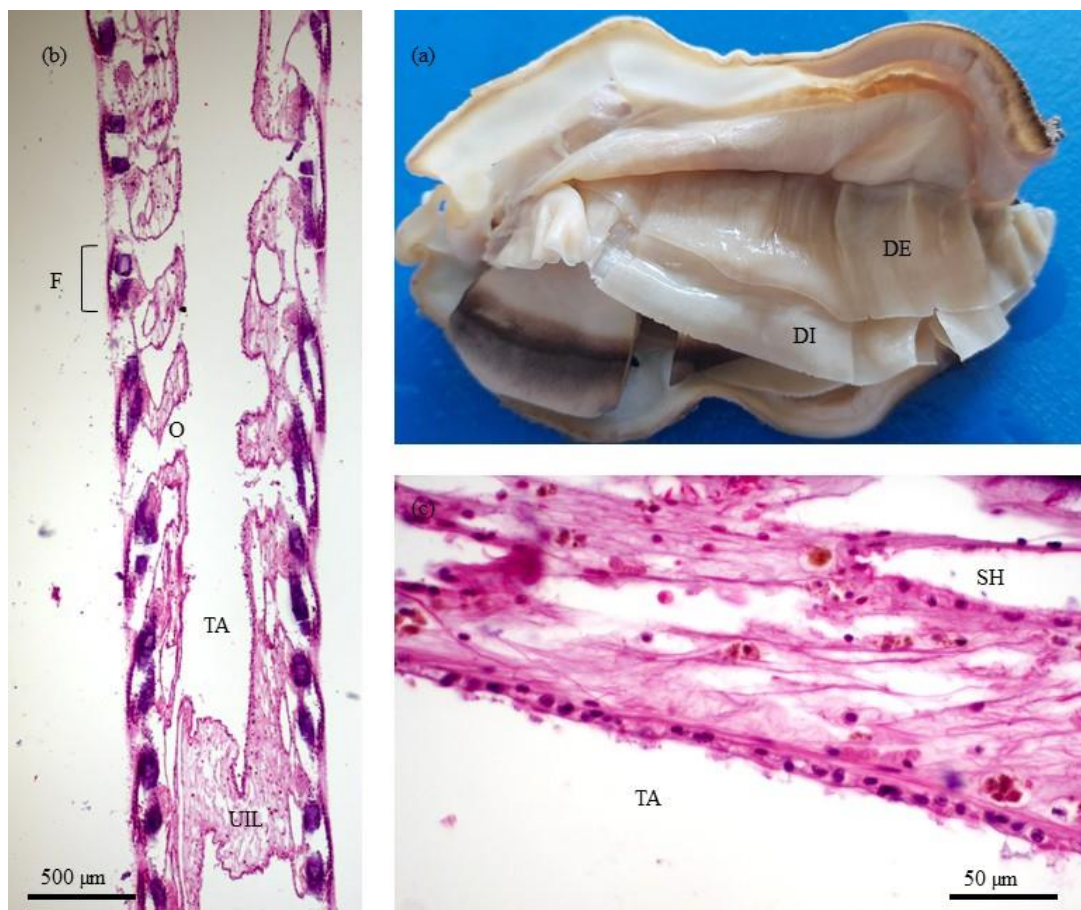


Figura 13. Aparencia externa e microscópica das demibranquias dos individuos non grávidos. (a) Aspecto das demibranquias dun dos exemplares cunha coloración abrancazada, pouco brillante e opacas. (b) Estructura da demibranquia dun dos individuos na cal podíase discernir cada unha das súas partes. H-E. (c) Tubos de auga revestidos por un epitelio simple plano. H-E. Abreviaturas: DE, demibranquia externa; DI, demibranquia interna; F, filamento branquial; O, ostia; SH, seno hemolinfático; TA, tubos de auga; UIL, unión interlamelar.

por un epitelio simple plano (Figura 13b, 13c) e comunicados directamente coa cavidade paleal a través das ostias (Figura 13b).

As lamelas de *M. auricularia* estaban constituídas por filamentos dispostos de forma paralela e formados por células columnares ciliadas, distinguíndose ademais dous tipos de cilios en función do seu tamaño e localización. Na parte máis apical atopábanse os cilios frontais, máis pequenos, mentres que en ambos costados encontrábanse os cilios laterais, moi longos, permitindo o contacto cos cilios do filamento colateral. A súa vez, cada filamento presentaba dous pilares na porción basal, que actuaban como soporte da estrutura e estaban compostos por un material moi basófilo e acelular positivo a vermello Alizarina (Figura 14e, 14f).

Nos individuos grávidos observouse que a organización das demibranquias sufría unha importante modificación. Os tubos de auga dilatábanse considerablemente para acoller ás formas larvárias do mexillón, adoptando unha forma máis regular e organizada (Figura 14c). Ademais, as células epiteliais que os recubrían adquirían unha morfoloxía cúbica, aparecían provistas de cilios e con células caliciformes intercaladas (Figura 14d). As unións interlamelares despregábanse e alongábanse, distendendo para iso as súas fibras musculares. (Figura 14c).

Pese a que a demibranquia externa era de menor tamaño, observouse que posuía unha maior densidade de larvas con respecto á interna (Figura 14c). Non se detectou a presenza de ningún gloquidio ben desenvolvido, próximo a liberación, pero si larvas que comezaban a mostrar unha morfoloxía semellante, con esa forma de dobre “C” característica, e un tamaño medio de 91 x 85 μm (Figura 14g, 14h).

Ao retirar o manto, ademais das branquias, o pé e os palpos labiais quedaban expostos integramente (Figura 12).

O pé era un órgano de gran tamaño, situado na parte ventral do animal e constituído principalmente por fibras musculares dispostas en diversas direccións, que externamente conferíanlle un aspecto rugoso e firme (Figura 12, 15a). Encontrábase unido á masa visceral e presentaba unha zona pigmentada que marcaba a separación entre ambos (Figura 12, 15c).

Figura 14. *Aparencia macroscópica e histolóxica das demibranquias dos individuos grávidos. (a) Vista ventral dun individuo grávido con demibranquias de coloración amarelo-alaranxada, máis espesas e cremosas. (b) Sección transversal de ambas demibranquias que permitía visualizar a súa estrutura interna, a cal conservaba a mesma conformación a nivel histolóxico. (c) Demibranquia externa e interna dun dos individuos, nas que se observaba unha dilatación manifesta dos tubos de auga con presenza de gran cantidade de gloquidios na demibranquia externa. H-E. (d) Epitelio simple cúbico ciliado dos tubos de auga. H-E. (e) Estrutura dos filamentos branquiais, compostos por células columnares provistas con cilios máis pequenos na rexión apical e máis longos lateralmente. Cada un apoiábase sobre dous pilares constituídos por un material moi basófilo e acelular. H-E. (f) Filamento branquial. Tricrómico de Masson. (g) Gloquideos coa súa forma de “C” característica. H-E. (h) Gloquideos rodeados por un fio de tecido conectivo. Tricrómico de Masson. Abreviaturas: CI, cilios; CIF, cilios frontais; CIL, cilios laterais; DE, demibranquia externa; DI, demibranquia interna; G, gloquidios; L, lamelas; O, ostia; TC, tecido conectivo; UIL, unións interlamelares. ➡*

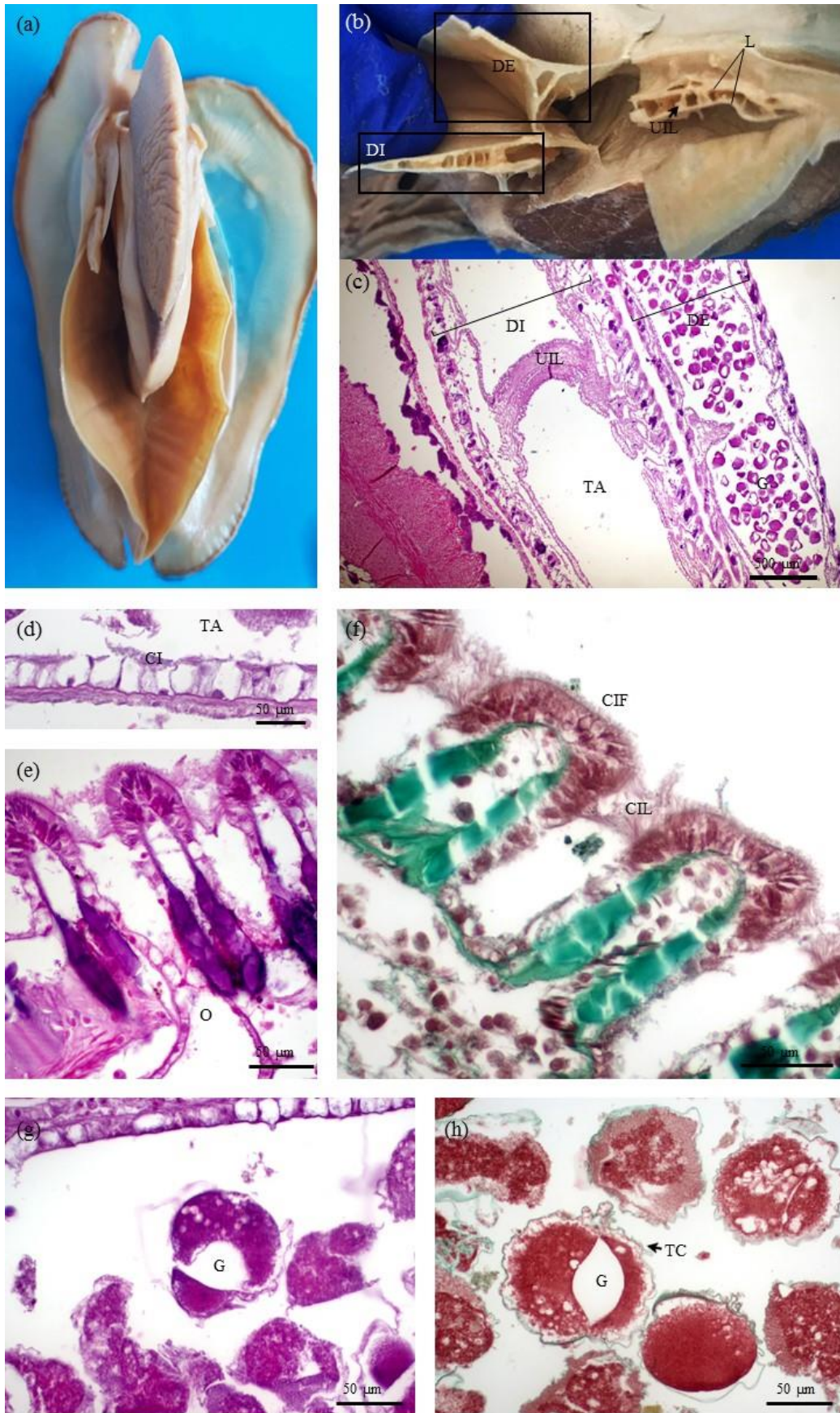


Figura 14. Pé de foto na páxina anterior ←

Ademais toda a súa estrutura estaba recuberta por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado que distribuíase formando plicas de diferentes tamaños (Figura 15b). As mesmas células glandulares basófilas xa descritas na prega interna do manto eran visibles tamén no pé, pero nunha proporción moito maior, penetrando en profundidade no tecido muscular (Figura 7g, 15a, 15d, 15e, 15f). O seu número ía diminuíndo ao aproximarse á zona pigmentada, ata desaparecer completamente a nivel da masa visceral.

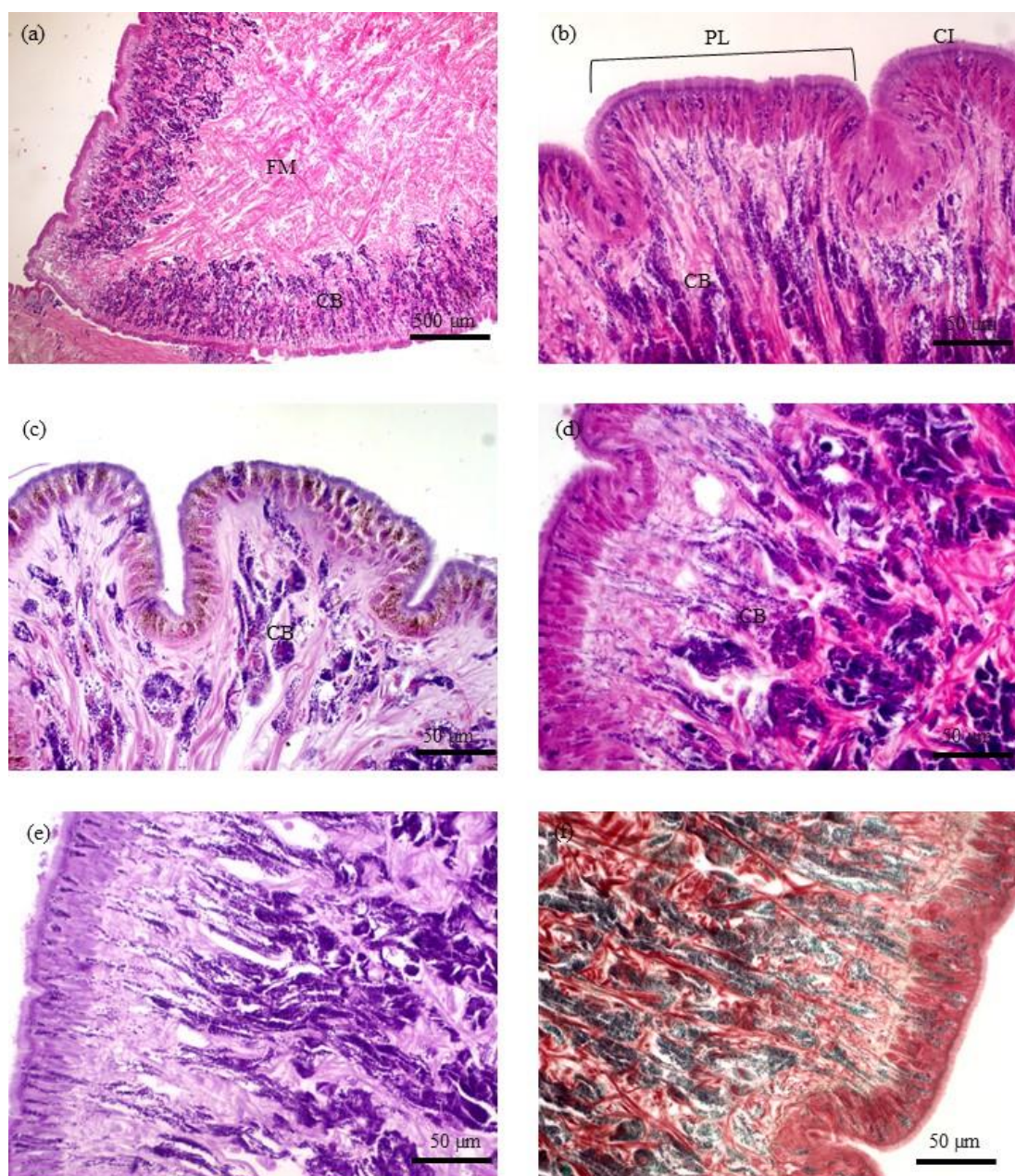


Figura 15. Imaxes histolóxicas do pé. (a) Pé, composto por fibras musculares dispostas en diversas direccións e gran cantidade de células glandulares basófilas, distribuídas baixo o epitelio e incluso penetrando en profundidade entre as fibras musculares. H-E. (b) Epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado do pé disposto formando plicas. H-E. (c) Epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado pigmentado. H-E. (d) Células glandulares con gránulos citoplasmáticos moi basófilos que vertían á cavidade paleal sen que existira un conduto aparente. H-E. (e) Células glandulares con gránulos citoplasmáticos moi basófilos. PAS. (f) Células glandulares con gránulos citoplasmáticos moi basófilos. Tricrómico de Masson. Abreviaturas: CB, células basófilas; CI, cilios; FM, fibras musculares; PL, plica.

Igual que acontecía cos músculos abdutores, as características externas do pé diferían moito entre os individuos A e D e os exemplares B e C. Mentres que o pé dos primeiros presentaba unha aparencia prominente e moi musculada (Figura 16a), nos outros dous exemplares era de pequeno tamaño, pouco musculado e flácido (Figura 16b).



Figura 16. Comparación da aparencia macroscópica do pé do individuo A e C. (a) Pé moi musculado e cunha aparencia prominente do exemplar “A”. (b) Pé de pequeno tamaño, pouco musculado e flácido do exemplar “C”.

En canto ós palpos labiais estes atopábanse na rexión anterior, caudais á boca e pousados sobre a masa visceral, coa estrutura dunha fina lámina dobrada sobre si mesma. Tratábase dun órgano simétrico, polo que existía un a cada lado do animal, recollendo as partículas en suspensión filtradas polas demibranquias hemilaterais (Figura 12, 17a). A nivel histolóxico presentaba unha estrutura moi característica, por un lado a superficie interna, orientada cara ó canle que formaba ao pregarse, mostraba un epitelio simple columnar densamente ciliado, que dispoñíase formando plicas regulares (Figura 17b, 17d). Pola contra, a superficie externa era lisa, sen pregas, e presentaba un epitelio simple cúbico entre o cal atopábanse dispersas un número reducido de células caliciformes (Figura 17c).

O resto dos órganos que conformaban o aparello dixestivo, así como o tecido gonadal tanto masculino como feminino, atopábanse dentro da masa visceral. Macroscopicamente neste estudo non foi posible discriminar cada unha das estruturas, coa excepción do tiflosol que aparecía como unha estrutura abrancazada, semiríxida e con forma de ferradura situada na parte posterior da masa visceral (Figura 12). A boca tamén era visible externamente, pero non formaba parte da masa visceral. Tratábase dunha abertura que actuaba como porta de entrada ao tracto dixestivo para as partículas seleccionadas nos palpos labiais, delimitada polo músculo abductor anterior, os palpos labiais e a masa visceral (Figura 18a).

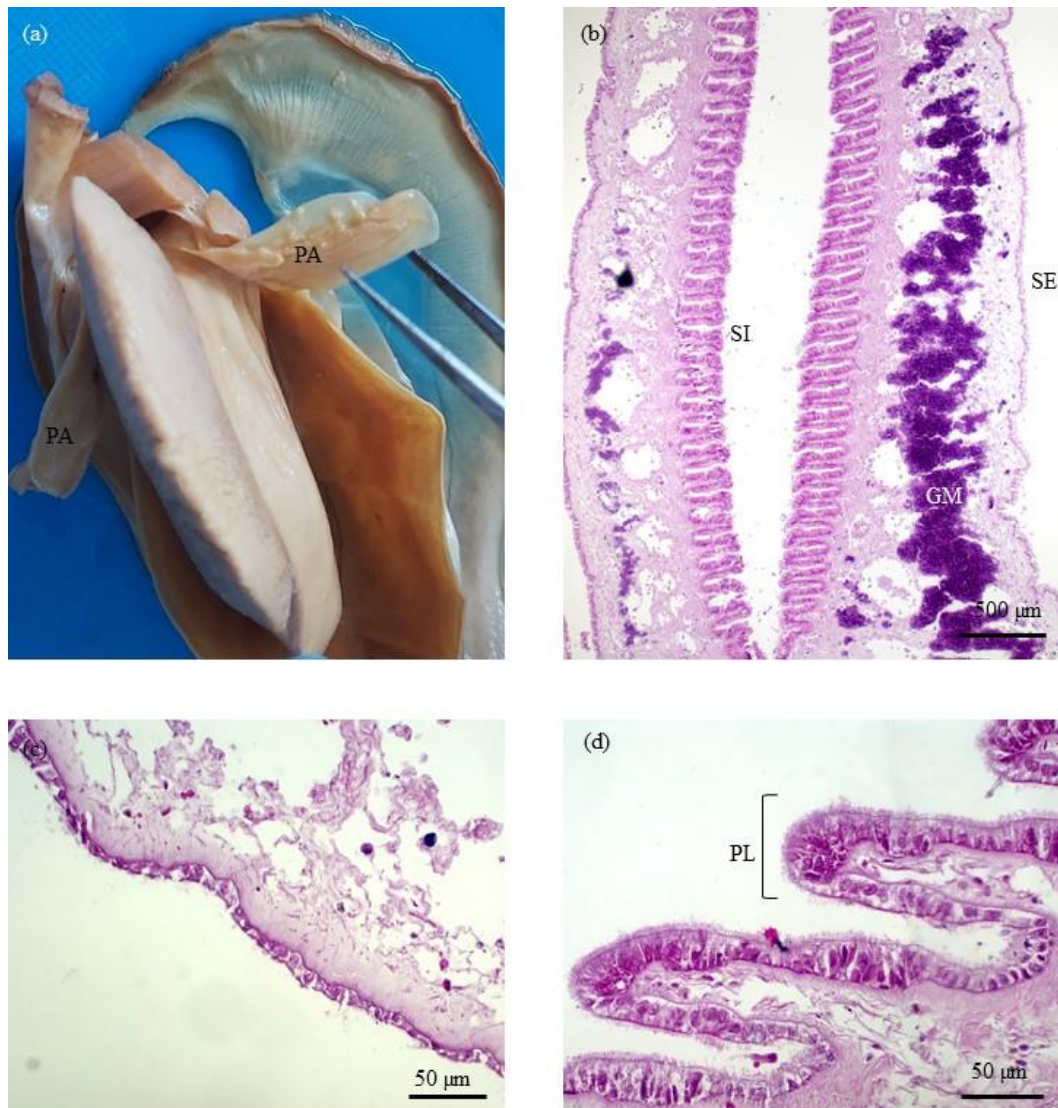


Figura 17. Imaxes da estrutura externa e histolóxica dos palpos labiais. (a) Vista ventral dun dos exemplares indicando a posición, simétrica e bilateral, dos palpos labiais. (b) Imaxe histolóxica dun dos palpos que mostraba a notable diferenza entre as características do epitelio da superficie externa e interna, atopándose nesta última formando plicas regulares de gran tamaño ao longo de toda a súa extensión. H-E. (c) Epitelio simple cúbico da superficie externa. H-E. (d) Superficie interna dos palpos constituída por un epitelio simple cilíndrico ciliado disposto formando plicas regulares. H-E. Abreviaturas: CI, cilios; GM, gránulos mineralizados; SE, superficie externa; SI, superficie interna; PA, palpos labiais; PL, plica.

Histolóxicamente o tubo dixestivo de *M. auricularia* estaba recuberto en toda a súa extensión por un epitelio simple cilíndrico ciliado, aínda que cada unha das diferentes partes que o compoñían mostraba certas particularidades (Figura 18b, 18c). Por unha banda, o esófago, situado entre a glándula dixestiva e o istmo do manto, conta cun epitelio disposto sobre unha lámina propia de tecido conectivo de elevado grosor (Figura 18d, 18e). En contrapartida, o intestino caracterízase pola presenza do tiflosol, que en histoloxía obsérvase como unha estrutura proxectada cara ó interior do lumen intestinal, composta por tecido conectivo e un gran número de senos hemolinfáticos (Figura 18f). Porén no presente estudo non foi posible discernir todas as partes que compoñen o tubo dixestivo, como é o caso do estilo cristalino.

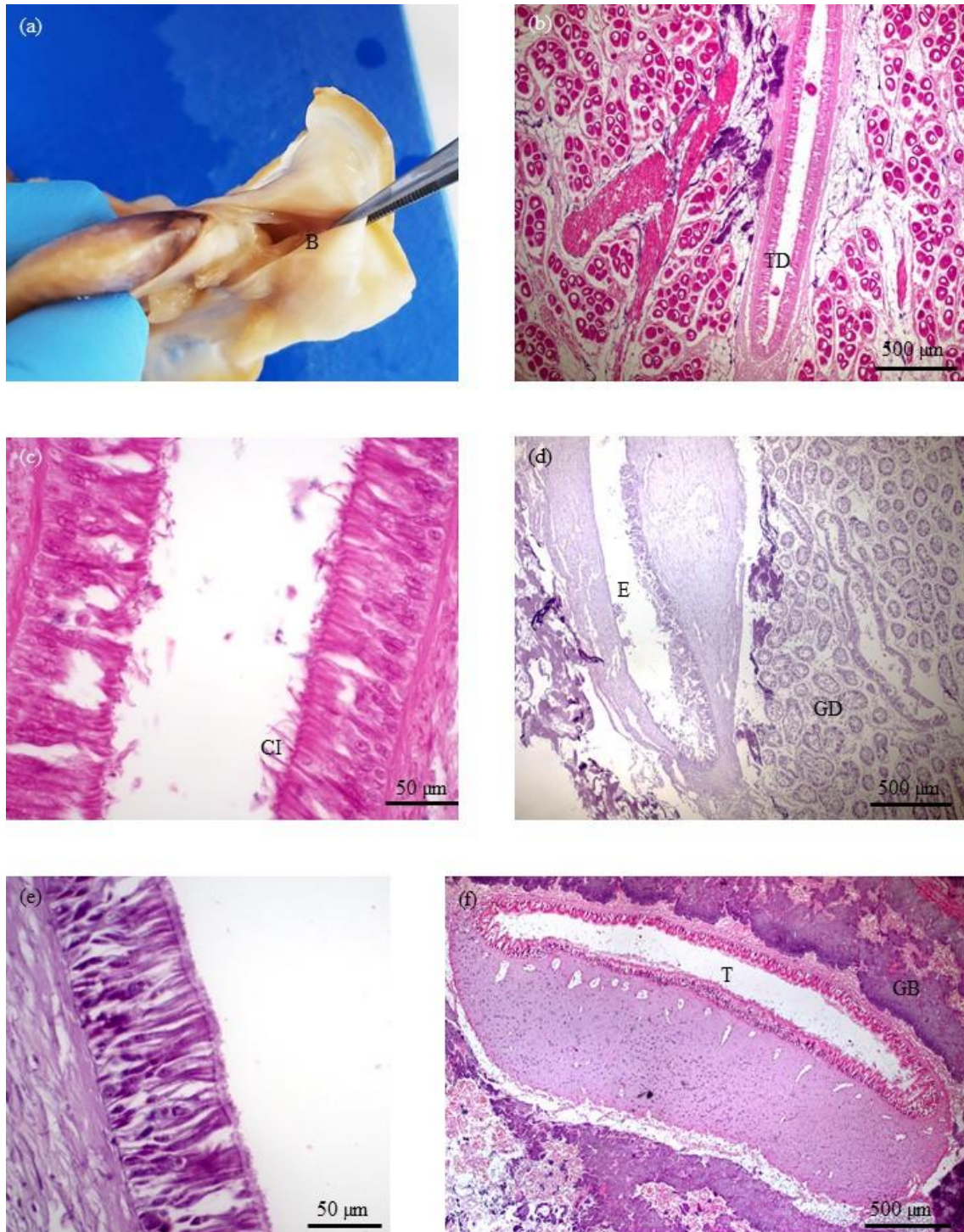


Figura 18. Imaxes das diferentes estruturas que compoñían o tracto dixestivo de *Margaritifera auricularia*. (a) Visualización macroscópica da boca nun dos exemplares. (b) Imaxe histolóxica dun segmento do tubo dixestivo composto por un epitelio simple cilíndrico ciliado apoiado sobre unha membrana basal de grosor moderado. H-E. (c) Epitelio simple cilíndrico ciliado presente en todo o tubo dixestivo de *Margaritifera auricularia*. H-E. (d) Esófago, situado entre a glándula dixestiva e o istmo do manto e caracterizado por estar disposto sobre unha membrana basal de elevado grosor. H-E. (e) Epitelio simple cilíndrico ciliado do esófago. H-E. (f) Tiflosol. H-E. Abreviaturas: B, boca; CI, cilios; E, esófago; GB, gránulos basófilos; GD, glándula dixestiva; T, tiflosol; TD, tubo dixestivo.

A glándula dixestiva ocupaba unha gran parte da masa visceral, e presentaba unha morfoloxía moi fácil de recoñecer a histoloxía. Pese a que presentaba gran cantidade de cambios autolíticos, isto non impediu o recoñecemento dos seus principais compoñentes, os túbulos e os acinis glandulares (Figura 19a). Nestes últimos distinguíanse células moi basófilas e cunha morfoloxía irregular mesturadas entre células vesiculares que contaban con gran cantidade de vacúolos no seu interior (Figura 19c). Porén, as características dos túbulos asemellábanse máis ás do resto do tubo dixestivo, xa que estaban formados por células columnares densamente ciliadas apoiadas sobre unha fina membrana basal (Figura 19b).

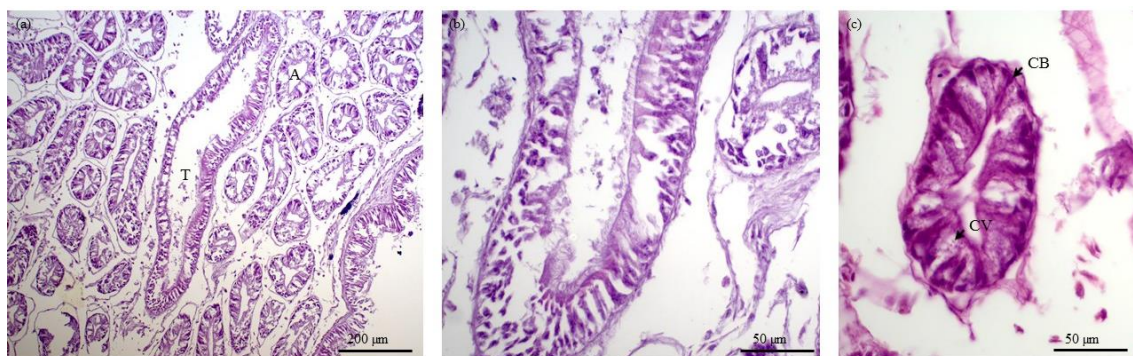


Figura 19. Imaxes histolóxicas da glándula dixestiva. (a) Glándula dixestiva composta por acinis glandulares e túbulos de tamaño variable. H-E. (b) Túbulo da glándula dixestiva composto por un epitelio simple cilíndrico ciliado apoiado sobre unha fina membrana basal. H-E. (c) Acini da glándula dixestiva sobre o que se distinguían dous tipos celulares: células basófilas e células con vacúolos no seu interior. H-E. Abreviaturas: A, acinis; CB, células basófilas; CV, células vacuolizadas.

Ademais de albergar todos estes órganos, unha gran parte da masa visceral estaba ocupada polo tecido gonadal, que ocupaba toda a zona posterior-ventral da masa visceral e a parte mediodorsal do pé. Dos catro individuos examinados dous mostraban gametos maduros formados, en ambos casos tanto masculinos coma femininos, agrupados en folículos delimitados por unha capa de células escamosas, arredor das cales eran visibles gránulos eosinófilos de diferentes tamaños que resultaban positivos á tinción PAS (Figura 20a, 20c, 20d).

Os oocitos eran células de gran tamaño (69.35-93.5 µm de longo), de forma esférica ou poliédrica, cun citoplasma moi eosinófilo e un núcleo central (Figura 20c). Cada oocito atopábase separado do resto por un fío de tecido conectivo que lle outorgaba unha aparencia trabecular ao folículo (Figura 20d), e que en algúns dos gloquidios presentes nas demibranquias aparecía envolvendo de forma excéntrica á fase larvaria (Figura 20h).

Os gametos masculinos atopados nestes individuos eran fundamentalmente espermatozoides, non sendo visibles formas inmaturas. Eran células moi basófilas, cunha forma ovalada e un tamaño medio de 2.55-3 µm de longo, provistos dunha cola eosinófila, fina e alongada (Figura 20b). Ademais, inmersos entre os folículos masculinos e femininos eran visibles os

gonadóforos, facilmente identificables por posuír unha membrana basal de gran espesor (Figura 20a).

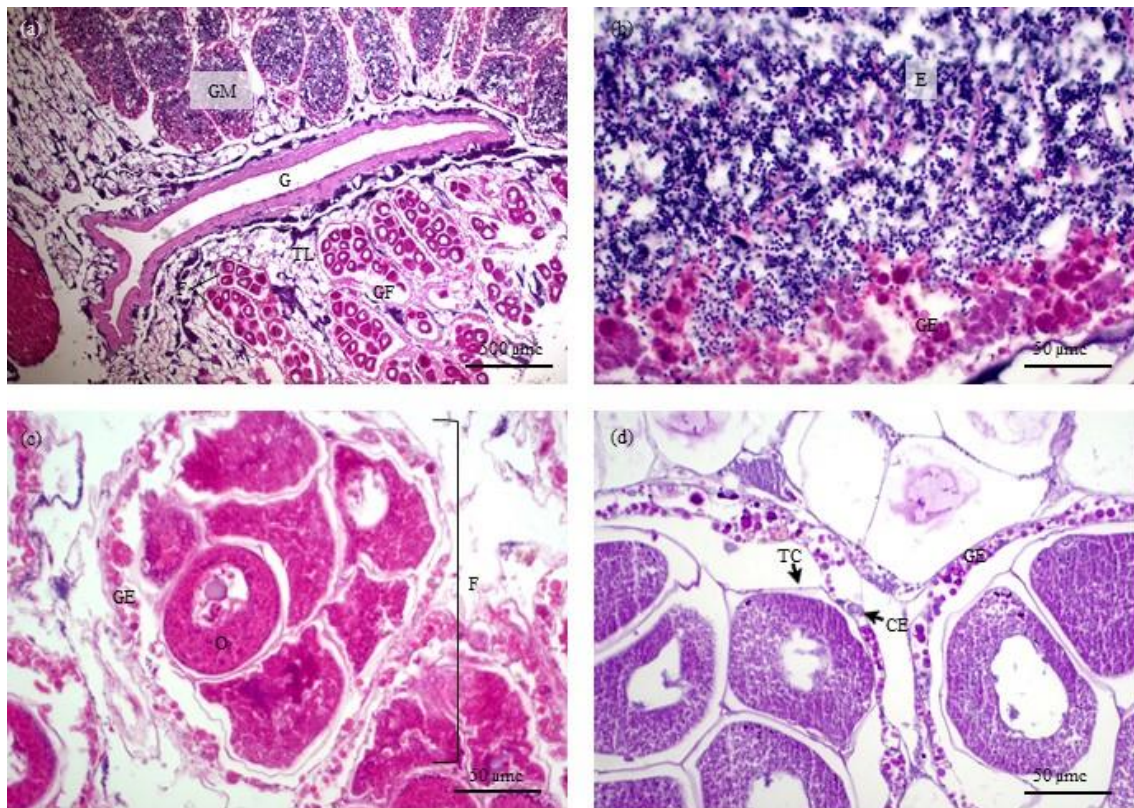


Figura 20. Imaxes histolóxicas do tecido gonadal masculino e feminino. (a) Folículos con oocitos e espermatozoides embebidos en tecido conectivo de Leydig e separados entre si por un gonadóforo cunha grossa membrana basal. H-E. (b) Espermatozoides e os gránulos eosinófilos que os rodeaban. H-E. (c) Oocitos agrupados nun folículo rodeado por gránulos eosinófilos de diferentes tamaños. Un deles conservaba a morfoloxía característica, redondeada e cun núcleo central de gran tamaño. H-E. (d) Oocitos rodeados por gránulos PAS positivos e incluídos dentro de folículos delimitados por células escamosas. PAS. Abreviaturas: CE, células escamosas; E, espermatozoides; F, folículos; G, gonadóforo; GE, gránulos eosinófilos; GF, gametos femininos; GM, gametos masculinos; O, oocito; TC, tecido conectivo; TL, tecido de Leydig.

Todas as estruturas da masa visceral encontrábanse rodeadas polo tecido conectivo de Leydig, que posuía unhas características moi particulares. A diferenza do tecido conectivo areolar presente noutros tecidos, o tecido de Leydig estaba formado por células cun núcleo excéntrico e un citoplasma que non se tinguíu con ningunha das tincións empregadas, carecía de substancia amorfa e fibras de coláxeno, e as súas células dispoñíanse de maneira contigua, formando unha rede (Figura 21a, 21b). Nos espécimes nos que non hai formación de gametos, o tecido gonadal atópase substituído por este tecido.

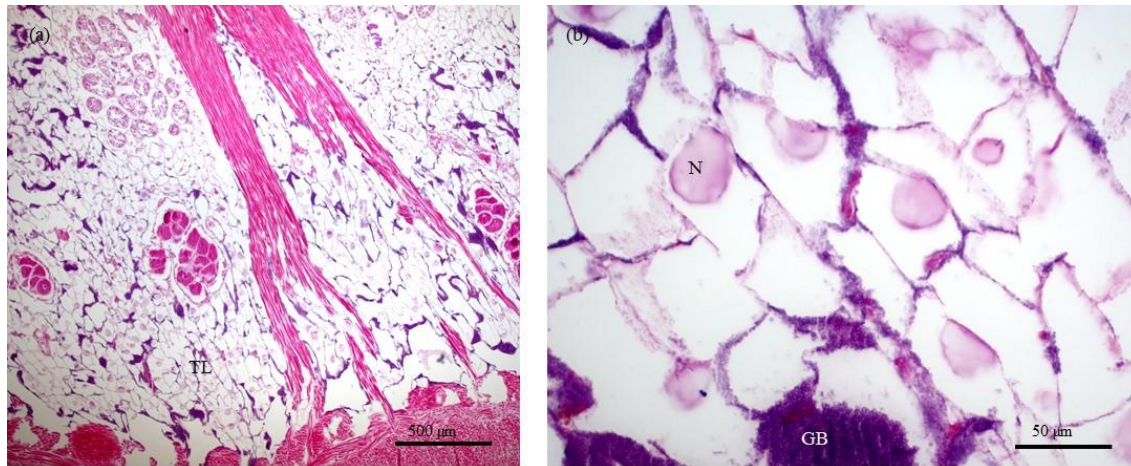


Figura 21. Histoloxía do tecido conectivo de Leydig. (a) Tecido de Leydig rodeando as estruturas presentes na masa visceral. H-E. (b) Células do tecido de Leydig compostas por un núcleo excéntrico de gran tamaño e dispostas de forma contigua, formando unha rede. Entre elas visualizábanse gránulos basófilos de tamaño variable. H-E. Abreviaturas: GB, gránulos basófilos; N, núcleo; TL, tecido de Leydig.

Ademais, seguindo o mesmo patrón de distribución que o tecido conectivo, atopáronse gránulos extracelulares basófilos de tamaño variable formando grandes agrupacións por todo o corpo do animal (Figura 22a, 22e). Nalgúns exemplares incluso era posible distinguir unha estrutura “en capas de cebola”, é dicir, varias capas alternas concéntricas nas que era perceptible a transición entre elas (Figura 22b). En certas localizacións da rexión posterior, como á nivel do manto ou músculo abdutor posterior, estes gránulos perdían a súa aparencia esférica ben delimitada e formaban grandes concrecións que ao corte ofrecían resistencia e provocaban a rotura dos tecidos adxacentes (Figura 22c, 22d).

Estes gránulos extracelulares foron atopados en numerosas estruturas de todos os exemplares analizados, entre as que destacaban o manto, a masa visceral, palpos labiais, músculo abdutor e baixo o epitelio corporal. Nalgunhas delas eran incluso identificables macroscópicamente, cun aspecto granulado, branquecino e rugoso ao tacto, coincidindo coas zonas de resistencia ao corte durante o tallado (Figura 6c). Para determinar a presenza de mineralización nesas áreas realizouse unha tinción vermello Alizarina, a cal permitiu confirmar a presenza de calcio como un dos principais compoñentes destas formacións tan características (Figura 22c, 22d). Así mesmo, realizouse a tinción de Perls para a detección de ferro, obtendo aparentemente resultados negativos.

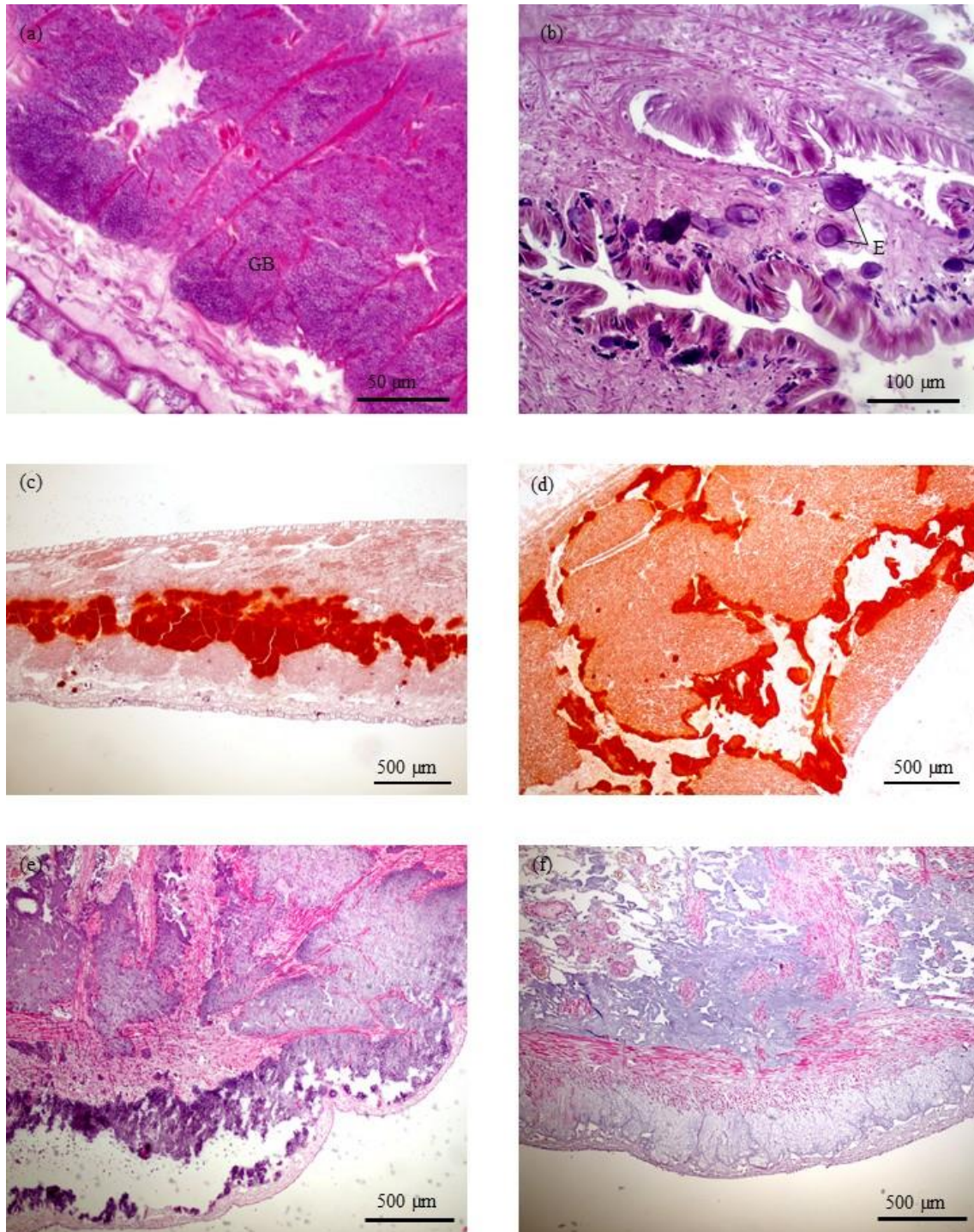


Figura 22. Imaxes histolóxicas dos gránulos mineralizados distribuídos por todo o corpo do animal. (a) Gránulos extracelulares basófilos ocupando a rexión baixo o epitelio corporal. H-E. (b) Esferas mineralizadas na prega media do borde do manto sobre as cales distinguíanse varias capas alternas concéntricas. H-E. (c) Manto. Vermello Alizarina. (d) Músculo abductor posterior. Vermello Alizarina. (e e f) Comparación da mesma rexión anatómica nun corte non descalcificado (e) e un descalcificado (f). O lugar ocupado polas concrecións mineralizadas (e) tras un proceso de descalcificación aparecía baleiro e cunha morfloxía tisular mellor conservada (f). H-E. Abreviaturas: E, esferas; GB, gránulos basófilos.

6. DISCUSIÓN

Ata o ano 1996 *M. auricularia* era unha especie considerada extinta (Araujo e Ramos, 2000). Isto explica que a información dispoñible sobre ela sexa limitada e que coñecementos tan esenciais, como a descrición anatómica ou histolóxica da súa estrutura, posúan rexistros bibliográficos moi escasos (Grande, Araujo e Ramos, 2001; Soler et al., 2018a; Soler et al., 2018b). A través desta avaliación anatómica e histolóxica de individuos sans de *M. auricularia* búscase proporcionar información de referencia que sirva de base á hora de realizar estudos histopatolóxicos da especie, axudando a identificar máis facilmente os achados patolóxicos que poidan aparecer.

Porén, o seu estado de conservación non facilita as labores de investigación, xa que ao estar catalogada como especie en perigo crítico de extinción (Prié, 2021) non é posible sacrificar individuos sans para o seu estudo. Por este motivo, pese a que este traballo está realizado cun número moi reducido de individuos, o valor de cada un deles dende un punto de vista científico é moi elevado.

Dos catro exemplares empregados neste estudo, o A e o D foron os que proporcionaron a meirande parte da información, xa que eran os que se atopaban en mellor estado. Ambos tiñan en común que a súa aparencia externa era robusta e brillante, provistos de músculos abdutores moi prominentes, firmes, rosados e grandes, destacando sobre o corpo do animal. Chamaba especial atención as grandes dimensións do pé, moi musculado e cun gran grosor ao observarse dende unha vista ventral. Todas estas características anatómicas non estaban presentes nos individuos que en histoloxía manifestaban unha morfoloxía tisular máis alterada e difícil de valorar, que a súa vez eran os mesmos procedentes do Canal Imperial unha vez comezado o episodio de mortalidade masiva no ano 2013.

En base a estas observacións, pódense suxerir estas características externas, especialmente do tecido muscular en músculos abdutores e pé, como modelo á hora de realizar unha distinción macroscópica rápida entre individuos potencialmente sans ou enfermos.

Neste estudo non se conseguiu realizar esta mesma correlación a nivel histolóxico, debido ó elevado grao de alteración que manifestaban os tecidos dos exemplares mostreados coincidindo co episodio de alta mortalidade. Non foi posible definir se isto era debido a un proceso patolóxico antemortem ou a un proceso postmortem de autólise e putrefacción derivado dunha fixación tardía dos individuos. Tamén é posible que se atoparan alterados como consecuencia da utilización dun axente fixador inadecuado para unha boa conservación dos tecidos, como foi o caso do alcohol.

Porén, en todos os exemplares, a nivel histolóxico era posible apreciar gránulos extracelulares basófilos de tamaño variable que seguían a mesma distribución que o tecido conectivo, aparecendo no intersticio de practicamente todos os órganos do animal, aínda que nunha proporción variable. Non se sabe cal é a súa función pero a súa presenza foi descrita anteriormente para varias especies desta orde, como *Anodonta grandis*, *Elliptio crassidens* (Silverman, Steffens e Dietz, 1985), *Hyridella depressa*, *Velesunio ambiguus* (Byrne, 2000; Colville e Lim, 2003) ou *M. margaritifera* (Pekkarinen, 1997). Igual que no caso destas especies os gránulos observados en *M. auricularia* estaban compostos principalmente por calcio, para os cales obtívose unha resposta positiva á tinción vermello Alizarina. Algúns estudos tamén describían a presenza variable de Fe na súa composición (Pekkarinen, 1997; Byrne, 2000), razón pola cal optouse por realizar unha tinción de Perls obténdose resultados negativos. Pero para coñecer con exactitude o perfil mineral das concrecións extracelulares sería necesario realizar probas específicas, como por exemplo microanálise de raios X (Byrne, 2000) ou espectrometría, que permitirían indagar máis información sobre a natureza e función das calcificacións.

O feito de que se atopen en varias especies, e tanto nos animais considerados sans como nos procedentes do río tras o episodio de mortalidade, permite considerar este achado como algo fisiolóxico, que tal vez desempeñe unha función específica no animal. Por exemplo, Silverman et al. (1985) describían que en especies como *Anodonta grandis*, *Elliptio crassidens*, *Ligumia subrostrata* e *Carunculina texasensis* as concrecións extracelulares de calcio localizábanse principalmente nas branquias, entre os filamentos e os tubos de auga, representando entre un 20-60% do peso seco do órgano. Neste estudo explicaban a súa presenza como unha fonte de calcio para a formación da cuncha dos gloquidios, xa que compararon a proporción entre individuos en época reprodutiva con aqueles que non o estaban, obtendo grandes diferenzas.

No caso de *M. auricularia* esta hipótese non toma moito peso, xa que a proporción de material mineralizado en individuos grávidos e non grávidos é moi semellante, ademais de que as branquias xunto co pé son os puntos nos que menos concrecións extracelulares foron atopadas, estando totalmente ausentes neste último. Porén, estes achados coinciden coa distribución descrita para *M. margaritifera* (Pekkarinen, 1997), *Hyridella depressa* e *Velesunio ambiguus* (Byrne, 2000; Colville e Lim, 2003). Créese que nestas especies as branquias non son unha localización preferente para as calcificacións porque non colaboran como fonte de calcio para a formación da cuncha dos gloquidios.

Noutros estudos valorouse a posibilidade de que forme parte dun proceso de detoxificación, mediante o secuestro e precipitación en forma de carbonato cálcico de diferentes oligoelementos ou metais pesados presentes no medio (Jeffrey e Simpson, 1984; Byrne, 2000).

Tamén se cree que poden estar relacionadas cos procesos de biomineralización propios do animal, principalmente a formación continua da súa cuncha. Isto asóciase co seu sistema de absorción de calcio de alta eficacia, polo que teñen que ser capaces de reter o máximo calcio posible debido a que moitos deles habitan en medios cunha baixa concentración (Byrne, 2000). Porén, no caso de *M. auricularia* non parece unha hipótese probable debido a que caracterízase por habitar en medios de augas duras, con altas concentracións de calcio, aínda que pode ser un mecanismo que lles axude a sobrevivir e seguir formándose de forma constante pese a que a calidade da auga poida variar (Grande et al., 2001).

Son necesarios máis estudos para poder esclarecer a causa da formación destas concrecións extracelulares calcificadas, e determinar se a súa elevada proporción se debe a un proceso fisiolóxico ou patolóxico. Cómpre destacar que, entre os catro individuos empregados neste estudo, a concentración dos gránulos extracelulares era máis elevada nos exemplares procedentes do Canal Imperial despois do episodio masivo de mortalidade. Estes resultados suxiren que o seu incremento pode estar relacionado cun estado de enfermidade.

Con respecto á descrición histolóxica do resto das estruturas que constitúen o corpo de *M. auricularia* foi posible visualizar practicamente todas nos individuos considerados sans, aínda que con certas limitacións derivadas dos cambios de autólise.

No borde distal do manto observáronse as tres pregas xa descritas noutras especies como *Velesunio ambiguus* ou *Hyridella depressa*, cada unha delas asociada cunha función específica (Colville e Lim, 2003). A prega externa atribúeselle a función secretora do periostraco, que é a capa pigmentada e máis externa da cuncha dos bivalvos composta principalmente por unha proteína denominada conquiolina (Lów et al., 2016). Por outra banda, a prega media asóciase cunha función sensorial, mentres que a prega interna atribúeselle unha función muscular (Colville e Lim, 2003).

Tanto a prega interna coma o resto da superficie interna do manto contan cun epitelio simple cilíndrico ciliado. Créese que a presenza de cilios, só nesta porción, é debida a que colaboran, mediante o seu movemento constante, na entrada de auga e partículas en suspensión ao interior da cavidade paleal para participar no intercambio gaseoso e na alimentación do animal (Lów et al., 2016).

Ademais dos cilios, nesta porción do manto chama á atención a existencia de células cargadas con gránulos moi basófilos que verten á cavidade paleal. Algúns autores denomináronas como células violeta pola súa aparencia histolóxica (McElwain e Bullard, 2014). Aparecen nun número reducido na prega interna do manto pero cunha densidade moi elevada no pé. Non se coñece exactamente cal é a súa función pero en bivalvos mariños, nos que tamén están descritas,

asóciase fundamentalmente co modo de vida do animal. En especies infaunales, é dicir, aquelas que viven soterradas no substrato total ou parcialmente, como é o caso de *M. auricularia*, créese que poden desempeñar unha función lubricante axudando ao individuo a soterrar o seu corpo, e incluso participar na formación das pseudofeces (Park, Lee, Lee e Kim, 2012). Tamén é posible que desempeñen unha función protectora mediante a secreción de substancias mucosas que eviten a erosión do epitelio en contacto co substrato, algo que en especies como *M. auricularia* pode ser de gran relevancia ao habitar en fondos de gran dureza con callao ou grava.

No pé, ademais das células violeta, destaca a presenza dun epitelio densamente ciliado que forma plicas ao longo de toda a súa extensión. Créese que a súa función tamén está relacionada co modo de vida e as características do medio no que habitan os animais. En estudos realizados con bivalvos mariños como *Tegillarca granosa*, especie de zonas intermareais que non soterra completamente o seu corpo, asóciase a existencia destas pregas cunha posible función de ancoraxe ao substrato (Lee, Lee, Park e Shin, 2012).

En canto a presenza de cilios sobre o epitelio do pé, estes foron descritos tanto en especies mariñas como *Tegillarca granosa* (Lee et al., 2012), *Mercenaria mercenaria* (Eble, 2001) ou *Gomphina veneriformis* (Park et al., 2012), e en bivalvos de auga doce como *Villosa nebulosa*, *Fusconaia cerina* (McElwain e Bullard, 2014) ou incluso na propia *M. auricularia* durante a súa fase xuvenil (Araujo, Cámara e Ramos, 2002). Créese que a súa función consiste en evitar a entrada de partículas estrañas á cavidade paleal e expulsar substancias mucosas fora do corpo do animal (Lee et al., 2012).

Por outra banda, unha das estruturas máis singulares e complexas dos moluscos bivalvos, especialmente de auga doce, son as branquias. Na súa estrutura só se atoparon un mesmo tipo de filamentos distribuídos de forma contigua ao longo da lamela, sen formación de plicas, e os cilios laterais de cada un deles atopáronse entrelazados co filamento paralelo. Este tipo de disposición denomínase homorrábdica filibranquia (Knight, Morris, Todd, Howard e Ball, 2014) é e a mesma que atopamos noutros bivalvos como *Mytilus edulis* (Cannuel, Beninger, McCombie e Boudry, 2009).

Dos catro exemplares examinados os que mellor gardaban a arquitectura tisular das branquias eran o A e o D, individuos que ademais atopábanse grávidos e posuían unha gran cantidade de gloquidios. Os outros dous exemplares non posuían larvas, pero a morfoloxía das súas branquias, ao igual que a do resto dos tecidos, estaba moi alterada, con gran cantidade de cambios autolíticos, o que incluso pode estar enmascarando cambios patolóxicos.

Debido a isto non foi posible realizar unha comparación morfolóxica completa e precisa entre as características das demibranquias en individuos grávidos e non grávidos. Porén, a estrutura observada nos exemplares empregados neste estudo coincide coa descrición realizada por Soler et al. (2018b) sobre a morfoloxía das branquias de *M. auricularia*.

Os dous exemplares grávidos foron recollidos durante o mes de febreiro, o que explica a presenza de gloquidios no interior das branquias (Araujo e Ramos, 2000; Soler et al., 2018b), cun tamaño medio de 91 x 85 μm . En base a estudos previos (Araujo e Ramos, 1998b; Soler et al., 2018b) considérase que o tamaño medio dos gloquidios de *M. auricularia* no momento da liberación é de 127-155 μm , o que quere dicir que os observados neste estudo estaban aproximadamente no último terzo do seu desenvolvemento. Non é posible determinar con exactitude o tempo restante para a súa liberación, xa que non se coñece nin o momento exacto da fecundación nin o crecemento diario do gloquidio no marsupio.

En canto ás gónadas de *M. auricularia*, tanto os oocitos como os espermatozoides atopábanse organizados en folículos, rodeados a súa vez por gránulos PAS positivos, coincidindo coa descrición feita por Grande et al. (2001) nun estudo previo. Non se sabe con exactitude cal é a súa función pero asóciase cunha labor equivalente á zona pelúcida en mamíferos, de soporte físico e nutrición dos gametos (Cargnin-Ferreira e Sarasquete, 2008).

Parece ser unha especie hermafrodita, ou polo menos eses son os rexistros dos individuos presentes no Canal Imperial de Aragón (Zapater et al., 2006). É posible polo tanto que se trate ben dun animal estritamente hermafrodita (Grande et al., 2001) ou que tal vez sexa capaz de desenvolver ambos sexos como estratexia de supervivencia ante un tamaño reducido da poboación, tal como foi reportado para *M. margaritifera* (Bauer, 1987).

Outros órganos como, por exemplo, as diferentes partes do tracto dixestivo, só foron posibles de identificar mediante histoloxía. Isto posiblemente é debido ao elevado tempo de fixación ao que estiveron sometidos os exemplares, provocando a retracción dos tecidos por deshidratación. No caso de tratarse de individuos frescos, sería posible discernir o percorrido do tubo dixestivo na masa visceral (Lów et al., 2016), pero neste caso macroscópicamente só era facilmente identificable o tiflosol.

Todo o tracto dixestivo presentaba as mesmas características básicas, un epitelio simple cilíndrico ciliado que favorece o tránsito do alimento ao longo de toda a súa extensión. Igual que acontece en mamíferos, o epitelio do aparello dixestivo é doado que sufra modificacións ou se perda, o que en algúns segmentos como o estómago supuxo un inconveniente á hora de valorar con detalle a estrutura. Incluso algunhas partes como o estilo cristalino foron imposibles

de observar, aínda que isto posiblemente sexa debido a que desaparece ás poucas horas dende que se produce a morte dos animais (Lów et al., 2016).

As estruturas que compoñen a cavidade nefropericárdica, igual que no caso do tracto dixestivo, só foron visibles mediante histoloxía. Nalgunhas como o corazón é moi difícil a súa identificación debido a que está formado por fibras musculares dispersas sen unha clara organización (Cargnin-Ferreira e Sarasquete, 2008).

Despois do vertixinoso decrecemento que experimentaron as súas poboacións no ano 2013 foi plausible a necesidade de comezar a valorar novos métodos de investigación, compatibles coa supervivencia dos exemplares. As técnicas pouco invasivas, empregadas noutras especies de medicina veterinaria, cumprirían este obxectivo, permitindo coñecer a situación sanitaria das poboacións e así tratar de evitar importantes episodios de mortalidade.

Para outras especies de bivalvos de auga doce como *Elliptio complanata* (Gustafson et al., 2005a) ou *Elliptio crassidens* (Fritts et al., 2015) están descritas técnicas non letais de extracción de hemolinfa a partir dos músculos abdutores. A hemolinfa é o fluído equivalente ó sangue en animais vertebrados, polo que a súa monitorización permite coñecer o contido en nutrientes, gases, metabolitos e outras substancias circulantes polo corpo do animal. Este método demostrouse de utilizade na valoración do estado sanitario e a presenza de patóxenos en bivalvos mariños (Gustafson et al., 2005b). Os estudos realizados en ambas especies de bivalvos de auga doce demostraron que este procedemento, ademais de non implicar a morte dos individuos, non afectaba ó seu crecemento posterior ou a súa supervivencia (Gustafson et al., 2005a; Fritts et al., 2015).

Neste estudo, ao contar ca dispoñibilidade de catro individuos mortos, foi posible recorrer a técnicas histolóxicas que, ata a actualidade, son as únicas que nos permiten realizar unha descrición microscópica pormenorizada das características tisulares da especie.

Porén, nos últimos anos, estanse aplicando novas técnicas para o estudo da anatomía dos moluscos bivalvos como a microtomografía computarizada. Ao tratarse dun método non invasivo permite obter imaxes de alta resolución con moita precisión dos tecidos, conservando as dimensións e localizacións exactas das estruturas que o compoñen (Machado, Passos, e Giribet, 2019).

7. CONCLUSIÓNS

En función dos resultados obtidos neste traballo pódense acadar as seguintes conclusións:

1. Foi posible definir as características anatómicas e histolóxicas de individuos adultos de *M. auricularia*, que non distan moito das de outros membros da orde Unionida, especialmente das especies da familia Margaritiferidae.
2. As técnicas histopatolóxicas poden ser de gran valor para a monitorización do estado de saúde das poboacións de *M. auricularia*.
3. O desenvolvemento do tecido muscular era moito maior nos individuos considerados sans que nos procedentes do Canal Imperial tras o episodio de mortalidade.
4. En todos os exemplares atopáronse grandes cantidades de gránulos extracelulares de calcio que seguían a mesma distribución que o tecido conectivo.

8. REFERENZAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, R. (2006). *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793). En J. R. Verdú e E. Galante (Eds.), *Libro Rojo de los Invertebrados de España* (pp.304-306). Madrid: Dirección General para la Biodiversidad, Ministerio de Medio Ambiente.

Araujo, R. e Álvarez-Cobelas, M. (2016). Influence of flow diversions on giant freshwater pearl mussel populations in the Ebro river, Spain. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26(6), 1145-1154. doi:10.1002/aqc.2622

Araujo, R., Bragado, D. e Ramos, M. A. (2000). Occurrence of glochidia of the endangered *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and other mussel species (Bivalvia: Unionoidea) in drift and on fishes in an ancient channel of the Ebro river. *Archiv Für Hydrobiologie*, 148(1), 147-160. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/325644609_Occurrence_of_glochidia_of_the_endangered_Margaritifera_auricularia_SPENGLER_1793_and_other_mussel_species_Bivalvia_Unionoidea_in_drift_and_on_fishes_in_an_ancient_channel_of_the_Ebro_River_Spain

Araujo, R., Bragado, D. e Ramos, M. A. (2001). Identification of the river blenny, *Salaria fluviatilis*, as a host to the glochidia of *Margaritifera auricularia*. *Journal of Molluscan Studies*, 67(1), 128-129. doi:10.1093/mollus/67.1.128

Araujo, R., Cámara, N. e Ramos, M. A. (2002). Glochidium metamorphosis in the endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793): A histological and scanning electron microscopy study. *Journal of Morphology*, 254(3), 259-265. doi:10.1002/jmor.10031

Araujo, R., Quirós, M. e Ramos, M. A. (2003). Laboratory propagation and culture of juveniles of the endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793). *Journal of Conchology*, 38(1), 53-60. Recuperado de http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es/CV/rafa_PDF_2/J_Conch_Lab_propagation.pdf

Araujo, R. e Ramos, M. A. (1998a). *Margaritifera auricularia* (Unionoidea, Margaritiferidae), the giant freshwater pearl mussel rediscovered in Spain. *Graellsia*, 54, 129-130. doi:10.3989/graellsia.1998.v54.i0.354

Araujo, R. e Ramos, M. A. (1998b). Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Spengler 1793) (Bivalvia, Unionoidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1375), 1553-1559. doi:10.1098/rstb.1998.0309

- Araujo, R. e Ramos, M. A. (2000). Status and conservation of the giant european freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Conservation*, 96(2), 233-239. doi:10.1016/S0006-3207(00)00075-6
- Araujo, R. e Ramos, M. A. (2006). *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). En J. R. Verdú e E. Galante (Eds.), *Libro Rojo de los Invertebrados de España* (pp.307-310). Madrid: Dirección General para la Biodiversidad, Ministerio de Medio Ambiente.
- Araujo, R., Toledo, C. e Machordom, A. (2009). Redescription of *Unio gibbus* Spengler, 1793, a west palaeartic freshwater mussel with hookless glochidia. *Malacologia*, 51(1), 131-141. doi:10.4002/040.051.0109
- Atkinson, C. L. e Vaughn, C. C. (2015). Biogeochemical hotspots: Temporal and spatial scaling of the impact of freshwater mussels on ecosystem function. *Freshwater Biology*, 60(3), 563-574. doi:10.1111/fwb.12498
- Bauer, G. (1987). Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*, 56(2), 691-704. doi:10.2307/5077
- Bogan, A. E. (2008). Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 139-147. doi:10.1007/978-1-4020-8259-7_16
- Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y. e Padilla, D. K. (2000). The impact of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on Unionid bivalves. *International Review of Hydrobiology*, 85(5-6), 529-541. doi:10.1002/1522-2632(200011)85:5/6<529::AID-IROH529>3.0.CO;2-O
- Byrne, M. (2000). Calcium concretions in the interstitial tissues of the australian freshwater mussel *Hyridella depressa* (Hyriidae). *Geological Society, London, Special Publications*, 177(1), 329-337. doi:10.1144/GSL.SP.2000.177.01.21
- Campo, J. G., Nakamura, K. e Ginés, E. (2021). Desaparece la principal población de *Margaritifera auricularia* en España. *Quercus*, 419, 22-29.
- Cannuel, R., Beninger, P. G., McCombie, H. e Boudry, P. (2009). Gill development and its functional and evolutionary implications in the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *The Biological Bulletin*, 217(2), 173-188. doi:10.1086/BBLv217n2p173
- Cargnin-Ferreira, E. e Sarasquete, C. (2008). *Histofisiología de moluscos bivalvos marinos*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Chowdhury, G. W., Zieritz, A. e Aldridge, D. C. (2016). Ecosystem engineering by mussels supports biodiversity and water clarity in a heavily polluted lake in Dhaka, Bangladesh. *Freshwater Science*, 35(1), 188-199. doi:10.1086/684169

Churukian, C. J. (2008). Pigments and Minerals. En J. D. Bancroft e M. Gamble (Eds.), *Theory and practice of histological techniques* (pp.233-260). Philadelphia: Churchill Livingstone ELSEVIER.

Colville, A. E. e Lim, R. P. (2003). Microscopic structure of the mantle and palps in the freshwater mussels *Velesunio ambiguus* and *Hyridella depressa* (Bivalvia: Hyriidae). *Molluscan Research*, 23(1), 1-20. doi:10.1071/MR02014

Cummings, K. S. e Graf, D. L. (2015). Class Bivalvia. En J. H. Thorp e D. C. Rogers (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater invertebrates* (pp.423-506). Boston: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-385026-3.00019-X

Decreto 187/2005, de 26 de septiembre, por el que se establece un Régimen de Protección para la *Margaritifera Auricularia* y se aprueba el Plan de Recuperación. *Boletín Oficial de Aragón*. Zaragoza, 7 de octubre de 2005, núm. 120, pp. 12031-12041.

Eble, A. F. (2001). Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 31, 117-220. doi:10.1016/S0167-9309(01)80032-6

Fritts, A. K., Fritts, M. W., Haag, W. R., DeBoer, J. A. e Casper, A. F. (2017). Freshwater mussel shells (Unionidae) chronicle changes in a North American river over the past 1000 years. *Science of the Total Environment*, 575, 199-206. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.225

Fritts, A. K., Peterson, J. T., Hazelton, P. D. e Bringolf, R. B. (2015). Evaluation of methods for assessing physiological biomarkers of stress in freshwater mussels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(10), 1450-1459. doi:10.1139/cjfas-2014-0564

Gamble, M. (2008). The Hematoxylin and Eosin. En J. D. Bancroft e M. Gamble (Eds.), *Theory and practice of histological techniques* (pp.121-134). Philadelphia: Churchill Livingstone ELSEVIER.

Gesner, J., Williot, P., Rochard, E., Freyhof, J. e Kottelat, M. (2010). *Acipenser sturio*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2010: e.T230A13040963. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-1.RLTS.T230A13040963.en>

Gómez, I. e Araujo, R. (2008). Channels and ditches as the last shelter for freshwater mussels: The case of *Margaritifera auricularia* and other naiads inhabiting the mid Ebro river basin, Spain. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18(5), 658-670. doi:10.1002/aqc.860

- Graf, D. L. (2010). Funeral for the nouvelle école-iana generic names introduced for freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 159(1), 1-23. doi:10.1635/053.159.0101
- Graf, D. L. e Cummings, K. S. (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies*, 73(4), 291-314. doi:10.1093/mollus/eym029
- Grande, C., Araujo, R. e Ramos, M. A. (2001). The gonads of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and *M. margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies*, 67(1), 27-36. doi:10.1093/mollus/67.1.27
- Gustafson, L. L., Stoskopf, M. K., Bogan, A. E., Showers, W., Kwak, T. J., Hanlon, S. e Levine, J. F. (2005a). Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(2), 159-165. doi:10.3354/dao065159
- Gustafson, L. L., Stoskopf, M. K., Showers, W., Cope, G., Eads, C., Linnehan, R., . . . Levine, J. F. (2005b). Reference ranges for hemolymph chemistries from *Elliptio complanata* of north carolina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(2), 167-176. doi:10.3354/dao065167
- Haag, W. R. (2012). *North American freshwater mussels: Natural history, ecology, and conservation*. New York: Cambridge University Press. Recuperado de https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/books/2012/books_2012_haag_001.pdf
- Humphries, P. e Winemiller, K. O. (2009). Historical impacts on river fauna, shifting baselines, and challenges for restoration. *BioScience*, 59(8), 673-684. doi:10.1525/bio.2009.59.8.9
- International Union for Conservation of Nature. (2021). *The International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species*. Recuperado de <https://www.iucnredlist.org/species/12798/168840343>
- Jeffree, R. e Simpson, R. D. (1984). Radium-226 is accumulated in calcium granules in the tissues of the freshwater mussel, *Velesunio angasi*: Support for a metabolic analogue hypothesis?. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 79(1), 61-72. doi:10.1016/0300-9629(84)90708-4
- Jones, M. L., Bancroft, J. D. e Gamble, M. (2008). Connective Tissues and Stains. En J. D. Bancroft e M. Gamble (Eds.), *Theory and practice of histological techniques* (pp.135-160). Philadelphia: Churchill Livingstone ELSEVIER.

- Kat, P. W. (1983). Sexual selection and simultaneous hermaphroditism among the Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Journal of Zoology*, 201(3), 395-416. doi:10.1111/j.1469-7998.1983.tb04284.x
- Knight, R. I., Morris, N. J., Todd, J. A., Howard, L. E. e Ball, A. D. (2014). Exceptional preservation of a novel gill grade in large C retaceous inoceramids: Systematic and palaeobiological implications. *Palaeontology*, 57(1), 37-54. doi:10.1111/pala.12046
- Lee, J. S., Lee, Y. G., Park, J. J. e Shin, Y. K. (2012). Microanatomy and ultrastructure of the foot of the infaunal bivalve *Tegillarca granosa* (Bivalvia: Arcidae). *Tissue and Cell*, 44(5), 316-324. doi:10.1016/j.tice.2012.04.010
- Li, J. e Li, Y. (2009). Aquaculture in China--freshwater pearl culture. *World Aquaculture*, 40(1), 60-62. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301612025>
- Lopes-Lima, M., Bolotov, I. N., Aldridge, D. C., Fonseca, M. M., Gan, H. M., Gofarov, M. Y., . . . Varandas, S. (2018). Expansion and systematics redefinition of the most threatened freshwater mussel family, the Margaritiferidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 98-118. doi:10.1016/j.ympev.2018.04.041
- Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D. C., Araujo, R., Bergengren, J., . . . Zogaris, S. (2016). Conservation status of freshwater mussels in Europe: State of the art and future challenges. *Biological Reviews*, 92(1), 572-607. doi:10.1111/brv.12244
- López, M. A. e Altaba, C. R. (2005). Fish host determination for *Margaritifera auricularia* (Bivalvia: Unionoida): Results and implications. *Bollettino Malacologico*, 41(9-12), 89-98. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/329481494_Fish_host_determination_for_Margaritifera_auricularia_Bivalvia_Unionoida_results_and_implications
- Lów, P., Molnár, K. e Kriska, G. (2016). *Atlas of animal anatomy and histology*. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-3-319-25172-1
- Machado, F. M., Passos, F. D. e Giribet, G. (2019). The use of micro-computed tomography as a minimally invasive tool for anatomical study of bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186(1), 46-75. doi:10.1093/zoolinnean/zly054
- Marwaha, J., Aase, H., Geist, J., Stoeckle, B. C., Kuehn, R. e Jakobsen, P. J. (2019). Host (*Salmo trutta*) age influences resistance to infestation by freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidia. *Parasitology Research*, 118(5), 1519-1532. doi:10.1007/s00436-019-06300-2

- McCartney, M. A. (2021). Structure, function and parallel evolution of the bivalve byssus, with insights from proteomes and the zebra mussel genome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1825). doi:10.1098/rstb.2020.0155
- McElwain, A. e Bullard, S. A. (2014). Histological atlas of freshwater mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia*, 57(1), 99-239. doi:10.4002/040.057.0104
- Metcalfe, N. B. e Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: Perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, 38(9), 935-940. doi:10.1016/s0531-5565(03)00159-1
- Modesto, V., Castro, P., Lopes-Lima, M., Antunes, C., Ilarri, M. e Sousa, R. (2019). Potential impacts of the invasive species *Corbicula fluminea* on the survival of glochidia. *Science of the Total Environment*, 673, 157-164. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.043
- Myers, R. B., Fredenburgh, J. L. e Grizzle, W. E. (2008). Carbohydrates. En J. D. Bancroft e M. Gamble (Eds.), *Theory and practice of histological techniques* (pp.161-186). Philadelphia: Churchill Livingstone ELSEVIER.
- Nakamura, K., Cañete, J., Vijuesca, D., Guillén, N., Sosa, C., Mesquita-Joanes, F., . . . Sorribas, V. (2020). Sensitivity of *Pseudunio auricularius* to metals and ammonia: First evaluation. *Hydrobiologia*, 848, 1-16. doi:10.1007/s10750-020-04277-z
- Nakamura, K., Elbaile, E., Salinas, C., Mesquita-Joanes, F., Sousa, R., Guerrero-Campo, J., . . . de Blas, I. (2019). Captive breeding of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and its conservation importance. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(10), 1771-1784. doi:10.1002/aqc.3209
- National Oceanic and Atmospheric Administration. (2021). *What is a bivalve mollusk?*. Recuperado de <https://oceanservice.noaa.gov/facts/bivalve.html>
- Newton, T. J. e Bartsch, M. R. (2007). Lethal and sublethal effects of ammonia to juvenile *Lampsilis mussels* (Unionidae) in sediment and water-only exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10), 2057-2065. doi:10.1897/06-245R.1
- Newton, T. J. e Cope, W. G. (2006). Biomarker responses of unionid mussels to environmental contaminants. En J. L. Farris e J. H. Van Hassel (Eds.), *Freshwater bivalve ecotoxicology* (pp.257-284). Boca Raton: CRC Press. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/280293233_Biomarker_Responses_of_Unionid_Mussels_to_Environmental_Contaminants

Orden TEC/1078/2018, de 28 de septiembre, por la que se declara la situación crítica de *Cistus heterophyllus subsp. carthaginensis*, *Lanius minor*, *Margaritifera auricularia*, *Marmaronetta angustirostris*, *Mustela lutreola*, *Pinna nobilis* y *Tetrao urogallus cantabricus* en España, y se declaran de interés general las obras y proyectos encaminados a la recuperación de dichos taxones. Boletín oficial del estado. Madrid, 17 de octubre de 2018, núm. 251, pp. 100677-100679

Park, J. J., Lee, J. S., Lee, Y. G. e Kim, J. W. (2012). Micromorphology and ultrastructure of the foot of the equilateral Venus *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *CellBio*, 1, 11-16. doi:10.4236/cellbio.2012.11002

Pekkarinen, M. e Valovirta, I. (1997). Histochemical and X-ray studies on tissue concretions and shell of *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus). *Journal of Shellfish Research*, 16(1), 169-177. Recuperado de https://archive.org/details/cbarchive_54500_histochemicalandxraystudiesont1981/page/n3/mode/2up

Pérez-Quintero, J. C. (2008). Revision of the distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1744) in the Iberian peninsula. *Aquat Invasions*, 3(3), 355-358. doi:10.3391/ai.2008.3.3.13

Prié, V. (2021). *Pseudunio auricularius*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2021*: e.T12798A168840343. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T12798A168840343.en>

Prié, V., Cochet, G. e Philippe, L. (2011). *Plan national d'actions en faveur de la grande mulette, Margaritifera auricularia: 2012-2017*. Paris: Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/258241596_Plan_National_d'Actions_en_faveur_de_la_Grande_Mulette_Margaritifera_auricularia_-_2012-2017

Prié, V., Puillandre, N. e Bouchet, P. (2012). Bad taxonomy can kill: Molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 405(8), 1-18. doi:10.1051/kmae/2012014

Schöne, B. R., Dunca, E., Mutvei, H. e Norlund, U. (2004). A 217-year record of summer air temperature reconstructed from freshwater pearl mussels (*M. margaritifera*, Sweden). *Quaternary Science Reviews*, 23(16-17), 1803-1816. doi:10.1016/j.quascirev.2004.02.017

- Silverman, H., Steffens, W. L. e Dietz, T. H. (1985). Calcium from extracellular concretions in the gills of freshwater unionid mussels is mobilized during reproduction. *Journal of Experimental Zoology*, 236(2), 137-147. doi:10.1002/jez.1402360204
- Soler, J., Araujo, R. e Wantzen, K. M. (2018a). *The Giant Freshwater Pearl Mussel (Margaritifera auricularia) Handbook Volume 1 – Synopsis on the current literature*. University of Tours, France: CNRS UMR CITERES, LIFE+ project 13BIO/FR/001162 “Conservation of the Giant Freshwater Pearl Mussel (*Margaritifera auricularia*) in Europe“. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/335715743_The_Giant_Freshwater_Pearl_Mussel_Margaritifera_auricularia_Handbook_Volume_1_-Synopsis_on_the_current_scientific_literature
- Soler, J., Wantzen, K. M., Jugé, P. e Araujo, R. (2018b). Brooding and glochidia release in *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) (Unionoida: Margaritiferidae). *Journal of Molluscan Studies*, 84(2), 182-189. doi:10.1093/mollus/eyy008
- Spooner, D. E. e Vaughn, C. C. (2006). Context-dependent effects of freshwater mussels on stream benthic communities. *Freshwater Biology*, 51(6), 1016-1024. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01547.x
- Strayer, D. L. (2014). Understanding how nutrient cycles and freshwater mussels (Unionoida) affect one another. *Hydrobiologia*, 735(1), 277-292. doi:10.1007/s10750-013-1461-5
- Strayer, D. L. e Malcom, H. M. (2007). Shell decay rates of native and alien freshwater bivalves and implications for habitat engineering. *Freshwater Biology*, 52(8), 1611-1617. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01792.x
- Turek, K. A. e Hoellein, T. J. (2015). The invasive asian clam (*Corbicula fluminea*) increases sediment denitrification and ammonium flux in 2 streams in the midwestern USA. *Freshwater Science*, 34(2), 472-484. doi:10.1086/680400
- Vaughn, C. C. (2018). Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia*, 810(1), 15-27. doi:10.1007/s10750-017-3139-x
- Vaughn, C. C., Nichols, S. J. e Spooner, D. E. (2008). Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(2), 409-423. doi:10.1899/07-058.1
- Walker, K. F., Byrne, M., Hickey, C. W. e Roper, D. S. (2001). Freshwater mussels (Hyriidae) of Australasia. En G. Bauer e K. Wächtler (Eds.), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida* (pp. 5-31). Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-3-642-56869-5_2

Welker, M. e Walz, N. (1998). Can mussels control the plankton in rivers?—a planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. *Limnology and Oceanography*, 43(5), 753-762. doi:10.4319/lo.1998.43.5.0753

Wu, D., Shi, J., Peng, K., Sheng, J., Wang, J., Wang, B. e Hong, Y. (2017). Structural characteristics of gonadal development and hermaphroditic phenomenon in freshwater pearl mussel, *Sinohyriopisis schlegelii* (*Hyriopisis schlegelii*). *Tissue and Cell*, 49(3), 440-446. doi:10.1016/j.tice.2017.04.003

Zapater, M., Araujo, R., Álvarez, R. M., Nakamura, K. e Alcántara, M. (2006). *Las almejas de agua dulce en aragón: Margaritifera auricularia y otros bivalvos*. Zaragoza: Serie Especies. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Recuperado de <https://www.aragon.es/documents/20127/674325/09-2-ALMEJAS.pdf/99e01393-2779-356a-bc51-24f7178ee5ba>