



# QUANTIFICAÇÃO DO PIGMENTO DE ENVELHECIMENTO LIPOFUSCINA NO SIRI AZUL (CALLINECTES SAPIDUS) CULTIVADO EM LABORATÓRIO

Deise Azevedo Longaray, Cátia Rodrigues Pereira & Duane Barros Fonseca

FURG, Departamento de Oceanografia, Laboratório de Crustáceos Decápodos.

## INTRODUÇÃO

Pigmentos de desgaste ou de envelhecimento (lipofuscina) têm sido demonstrados úteis no estudo do processo de envelhecimento, para determinação de idades e para o entendimento da dinâmica de populações de crustáceos, particularmente em espécies de importância comercial (Fonseca & Sheehy, no prelo).

Desde o estabelecimento do método confiável para quantificação de lipofuscina, baseado na análise de lâminas histológicas, informações têm sido acumuladas neste campo de pesquisa. Estudos sobre o potencial uso de lipofuscina como ferramenta para a determinação etária, demonstraram relações significativas entre a quantidade de lipofuscina em tecidos nervosos (neurolipofuscina) e a idade cronológica (Belchier *et al.*, 1998).

Dentre as espécies de braquiúros que ocorrem na região estuarina da Lagoa dos Patos, o siri azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 é a que tem maior relevância econômica.

A despeito da importância econômica, parâmetros dos processos de reprodução, crescimento e mortalidade são pouco entendidos para populações desta região. A informação da idade dos animais é básica para o entendimento da dinâmica populacional de uma espécie.

## OBJETIVO

Estabelecer a relação entre idade cronológica e volume de neurolipofuscina em *C. sapidus* cultivado em laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os juvenis de *Callinectes sapidus* foram coletados no Estuário da Lagoa dos Patos entre final de agosto e início de setembro de 2006, através de arrasto utilizando-se uma rede de renfro. Foram

coletados aproximadamente 170 animais.

Em laboratório, os animais foram separados em tanques de acordo com seu estágio de desenvolvimento, que variou de juvenil III (J III) a juvenil VII (J VII), para poderem assim ser cultivados. A identificação do estágio foi feita através do trabalho de Barutot *et al.* (2001).

Os animais foram mantidos em laboratório, a uma salinidade da água de 27 e temperatura 25°C. Primeiramente, os animais foram cultivados em massa em tanques grandes (50 litros) e depois, devido à mortalidade e desenvolvimento, passaram a ser cultivados em tanques menores (15 e 3 litros). A alimentação dos animais consistiu de *nauplii* recém eclodidos de *Artemia* sp. e pequenos pedaços de camarão.

Para posterior análise e quantificação de neurolipofuscina, foram feitas, num intervalo de 200 dias, cinco amostragens. Para cada animal amostrado, foi calculada a sua idade presumida que consistiu do tempo transcorrido até o estágio de desenvolvimento juvenil no dia da coleta em campo (Barutot *et al.*, 2001), adicionado ao tempo que o animal permaneceu em cultivo. Após dissecação para a remoção do cérebro, este órgão foi fixado em formalina a 10% e após 48 horas no fixador, o cérebro foi processado histologicamente para emblocamento em parafina. A quantificação de neurolipofuscina *in situ* foi realizada no gânglio supraesofageal (“cérebro”), especificamente na massa celular “agregado 10”, associada ao lobo olfatório.

Após seguir o protocolo padrão de desidratação e emblocamento, as amostras foram seccionadas em um micrótomo (6 mm). Os cortes obtidos foram colocados em uma lâmina histológica e após a secagem, estas foram montadas com lamínulas utilizando-se Entellan®.

Em seguida, as lâminas histológicas foram observadas através de um microscópio equipado com fluorescência, utilizando uma objetiva de

imersão (100X). Depois de identificada a área de interesse para a quantificação de lipofuscina, uma imagem por cada corte foi capturada.

A quantificação de lipofuscina, em cada imagem, é calculada pela razão entre a área ocupada pelos grânulos e a área total de células. A média para cada amostra (i.e., todas as imagens de uma amostra) é calculada por uma média geométrica ponderada (Sheehy *et al.*, 1998). Os resultados deste estudo são apresentados no formato média  $\pm$  erro padrão.

## RESULTADOS

Neurolipofuscina foi observada na massa celular “agregado 10” de todas as amostras e a quantificação foi feita em 20 animais (LC variando entre 8,18 e 27 mm), com idade presumida entre 146 e 203 dias. A quantidade de neurolipofuscina nesses animais variou entre 0,125 e 0,435 % (0,199  $\pm$  0,013 %).

## DISCUSSÃO

Considerando que os animais trazidos para o cultivo em laboratório estavam entre os estágios juvenil III e VII, pode-se afirmar que estes siris constituem um grupo etário que recrutou no final do verão e outono. Deste modo, estes animais pertencem ao grupo etário 0+, com uma quantidade média de neurolipofuscina igual a 0,199%. Por outro lado, siris adultos coletados em campo, com LC médio de 81  $\pm$  2,37 mm (N = 35) acumularam neurolipofuscina no gânglio supraesofageal entre 0,24 e 1,47 % vol. (Pereira, 2006). A comparação dos dados da presente investigação com os de adultos coletados em campo (maiores e teoricamente mais velhos) sugere uma acumulação dependente da idade.

## CONCLUSÃO

A acumulação idade-dependente de neurolipofuscina é (Katz & Robison, 2002) é considerada uma característica marcante no processo natural do envelhecimento. Deste modo, o acúmulo de neurolipofuscina é entendido como um índice de envelhecimento fisiológico (Porta, 2002). A idade-dependência sugerida na presente investigação é a primeira evidência experimental que a quantificação de neurolipofuscina pode ser usada como uma ferramenta para a determinação da idade de *C. sapidus* vivendo no ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barutot, R.A., Vieira, R.R.R. & Rieger, P.J. (2001). Desenvolvimento juvenil de *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Crustacea: Decapoda: Portunidae), em laboratório, a partir de megalopas coletadas no plâncton. *Comun. Mus. Tecnol, Sér. Zool.* 14, 23-42.
- Belchier, M., Edsman, L., Sheehy, M. R. J. & Shelton, P.M.J. (1998). Estimating age and growth in long-lived temperate freshwater crayfish using lipofuscin. *Freshwater Biol.* 39, 439-446.
- Fonseca, D.B. & Sheehy, M.R.J. (No prelo). Does size matter? A cautionary experiment on overoptimism in length-based bioresource assessment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
- Katz, M.L. & Robison, W.G. (2002). What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34, 169-184
- Pereira, C.R. (2006). Acumulação do pigmento do envelhecimento neurolipofuscina em *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda, Portunidae). Monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, FURG, Rio Grande, 27 p.
- Porta, E.A. (2002). Pigments in aging: an overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959, 57-65.
- Sheehy, M.R.J., Caputi, N., Chubb, C & Belchier, M. (1998). Use of lipofuscin for resolving age cohorts of western rock lobster (*Panulirus cygnus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 925-936.