



DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA ETÁRIA DE *CALLINECTES SAPIDUS* RATHBUN, 1896 OCORRENDO NA REGIÃO ESTUARINA DA LAGOA DOS PATOS, RS.

B.M.N. Fiussen

D.B. Fonseca

Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Itália, Km 8 s/n^o, 96201 - 900, Rio Grande, RS, Brasil. Telefone: 53 32336850 - b.mnf@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Lipofuscina, ou pigmento do envelhecimento, é um composto encontrado em células animais que resulta da degradação de organelas celulares danificadas (autofagocitose). O processo de formação de lipofuscina (lipofuscinogênese) está relacionado com a respiração aeróbica, pois deriva do estresse oxidativo decorrente do metabolismo celular (Sitte *et al.*, 2001). Como consequência a lipofuscina acumula - se, ao longo do tempo, nas células. Tal acúmulo é dependente da idade do animal e pode ser considerado um indicador de envelhecimento fisiológico.

Por ser um indicador de envelhecimento fisiológico, a quantificação de lipofuscina encontrada em tecidos pós - mitóticos, como por exemplo, o tecido nervoso, pode ser utilizada para determinação da idade. Neste caso, para uma padronização da nomenclatura a denominação apropriada para este pigmento é neurolipofuscina (Katz & Robison, 2002).

A quantificação de desse pigmento pode ser utilizada para determinar a idade de diversos animais, sendo este método aplicado com sucesso para populações de crustáceos (Fonseca & Sheehy, 2007). A informação sobre a idade é essencial para o entendimento da dinâmica de populações.

A espécie utilizada neste estudo é o siri - azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896. *Callinectes sapidus* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado desde a costa Atlântica da América do Norte até a margem sul da América do Sul, mais precisamente entre Massachusetts nos Estados Unidos e Venezuela, e entre Rio de Janeiro no Brasil e Buenos Aires na Argentina. Também, foi relatada a presença do siri na costa da Europa e do Japão (Santos 2007). Na região estuarina da Lagoa dos Patos, *Callinectes sapidus* apresenta uma ampla distribuição e possui grande importância comercial na região, pois é uma espécie capturada pela pesca artesanal. Esta atividade, caracterizada pelo uso de instrumentos simples e rústicos, tem grande importância econômico - social, já que esse recurso é responsável por aproximadamente metade de toda produção pesqueira da

região, e por todo abastecimento dos mercados locais. Durante a safra do camarão - rosa - *Farfantepenaeus paulensis* (Perez - Farfante, 1967) - (fevereiro a maio), a captura do siri - azul é um subproduto da pesca do peneídeo, enquanto que na entre - safra do camarão *C. sapidus* é uma espécie alvo da pesca desenvolvida dentro do estuário. Assim, a pesca artesanal, que é feita com finalidade de venda do produto, é uma atividade econômica comum da localidade, beneficiando moradores e indústrias (Ferreira, 2007).

É sabido que *C. sapidus* se distribui por todas as regiões da Lagoa dos Patos, desde as áreas mais profundas durante o inverno onde permanece enterrado, até as áreas rasas durante o verão quando acontece o acasalamento. No verão, as fêmeas ovíferas migram para o mar aberto, onde ocorre a desova das larvas na desembocadura do estuário. Após, as megalopas retornam para o estuário onde realizam várias mudas passando para a fase juvenil, quando se dispersam pela lagoa e encontram o lugar de desenvolvimento. Assim, os jovens continuam a fazer ecdises até chegarem à fase adulta, onde estão maduros sexualmente, podendo se reproduzir e completar o ciclo de vida. Até o momento, entende - se que este ciclo de vida completa - se em 2 - 3 anos.

A acumulação de neurolipofuscina já foi demonstrada em pedúnculos oculares e no gânglio supraesofágico ("cérebro") de *C. sapidus* (Pereira *et al.*, no prelo). Este estudo comprovou não haver uma diferença bilateral na acumulação de neurolipofuscina nestas estruturas. Além disso, observou - se uma fraca relação entre a quantidade de neurolipofuscina e o tamanho do animal.

Baseado no fato de que a quantificação de neurolipofuscina tem sido demonstrada útil para a determinação da idade de crustáceos e na observação que neurolipofuscina pode ser usada para este propósito na espécie *C. sapidus*, este trabalho tem como finalidade determinar a idade do siri - azul usando o método da neurolipofuscina, assim, contribuindo com tal dado para pesquisas futuras, utilizando - se esta metodologia, para o estudo da dinâmica de populações deste

portunídeo.

OBJETIVOS

Determinar a estrutura etária do *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 da região estuarina da Lagoa dos Patos aplicando o método da neurolipofuscina.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Amostragem

Os animais utilizados para esta pesquisa foram coletados na Lagoa dos Patos através de arrastos feitos por pescadores da região. De cada amostra foi retirada uma subamostra, que constituiu uma porção aleatória da pesca total, para a quantificação de lipofuscina. Em laboratório, esses indivíduos capturados foram crioadestesiados, medidos (em mm), juntamente com a verificação do sexo e maturidade.

2 - Processamento Histológico

Foi feita a dissecação do gânglio supraesofágico que, seguidamente, foi colocado no fixador (formaldeído 10%) onde permaneceu por no máximo 96 h. A seguir, foi realizada a desidratação do tecido em seqüências de álcoois (70%, 85%, 95% e 100%) pelo tempo de 45 minutos em cada. Posteriormente, foi feita a diafanização da amostra, inclusão na parafina e, ainda, o emblocamento de uma maneira que permita o corte transversal do tecido para a observação lobo olfatório do gânglio supraesofágico (Pereira *et al.*, no prelo).

3 - Local usado para a estimativa da neurolipofuscina

No gânglio supraesofágico de crustáceos, em geral, a avaliação de neurolipofuscina é realizada em cortes da massa celular adjunta ao lobo olfatório do gânglio, o agregado 10. Em relação ao *Callinectes sapidus* o agregado 10 se encontra posteriormente ao lobo olfatório (Pereira *et al.*, no prelo). Os cortes na massa de células seguem a padronização estipulada na bibliografia, desse modo, foram feitos com 6 μm de espessura. A desparafinização das amostras foi feita em três imersões sucessivas de 2 minutos em cada xilol, em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas usando - se Entellan.

4 - Quantificação de neurolipofuscina

Uma das características dos grânulos de lipofuscina é a autofluorescência. Sob excitação verde (514 nm) lipofuscina emite comprimentos de onda na faixa do amarelo (550 nm) (Terman & Brunk, 1998).

As lâminas foram observadas num microscópio Olympus BX50 equipado com fluorescência sob excitação de 514 nm e sob magnificação total de 300x (usando - se objetiva de imersão). Depois de localizado o lobo olfatório, uma imagem do agregado 10 foi coletada por cada corte. Entre sete e quinze imagens foram capturadas por amostra.

Utilizando o programa GIMP foi realizada a quantificação de neurolipofuscina, em cada imagem, sendo calculada pela razão entre a área ocupada pelos grânulos e a área total de células. A quantidade de neurolipofuscina em cada amostra foi estimada através de uma média geométrica ponderada simples. Por convenção estereológica, este valor de neurolipofuscina foi expresso na unidade % de volume (% vol.).

Detalhes do procedimento podem ser vistos em Pereira *et al.*, (no prelo).

5 - Análise dos Dados

Os dados de largura de carapaça foram comparados através de um teste t.

Os dados de % vol. de neurolipofuscina foram divididos em intervalos de classe de 0,2% e foram construídos histogramas. A determinação dos grupos etários foi feita por decomposição modal, e a taxa anual de acumulação de neurolipofuscina foi estimada pela média dos incrementos na % vol. de neurolipofuscina entre os grupos etários (para detalhes do método, consultar Fonseca & Sheehy, 2007).

RESULTADOS

Um total de 57 animais foram analisados (17 fêmeas e 40 machos), com largura de carapaça variando entre 47,2 e 116,3 mm. A largura média da carapaça das fêmeas foi 79,3 \pm 15,2 mm (\pm d.p.), enquanto para os machos o valor foi 86,3 \pm 16,1 mm. Dentre as fêmeas, nove eram imaturas (69,5 \pm 15,0 mm) e oito eram adultas (90,3 \pm 3,4 mm). Para os machos, nove eram imaturos (67,3 \pm 15,9 mm) e 31 eram adultos (91,8 \pm 11,4 mm). Os animais adultos e imaturos analisados não apresentaram diferença significativa nas larguras da carapaça entre machos e fêmeas ($p = 0,51$ e $0,76$ para adultos e imaturos, respectivamente).

Callinectes sapidus apresenta dimorfismo sexual de tamanho, onde os maiores animais observados são machos. Estes machos grandes são animais dominantes, reprodutivamente ativos, que tem vantagem, devido ao seu maior tamanho e ao maior tamanho de seus quelípodos na "captura" de fêmeas no abraço reprodutivo (Jivoff 1997; Jivoff & Hines 1998). A área amostrada não constitui uma área típica de reprodução na região estuarina na Lagoa dos Patos. Portanto, os maiores machos não são encontrados nesta região e isto explica a inexistência de uma diferença significativa na largura da carapaça entre machos e fêmeas adultos.

Considerando a estrutura etária, o histograma dos dados de neurolipofuscina indica uma distribuição polimodal. A decomposição desta distribuição demonstra a existência de um grupo etário com 0,5% vol. de neurolipofuscina, um segundo grupo etário com 0,9% vol. de neurolipofuscina e o terceiro grupo etário com 1,5% vol. de neurolipofuscina. A maioria dos animais analisados (60%) está no primeiro grupo etário. Considerando o incremento na % vol. de neurolipofuscina, pode - se inferir uma taxa de acumulação de aproximadamente 0,5% por grupo etário, ou seja, 0,5% ao ano.

Convertendo - se as estimativas de neurolipofuscina para idade, obteve - se a distribuição etária da amostra. O siri mais velho coletado tinha 3,8 anos (3 anos e 10 meses) (97,1 mm LC), ao passo que o siri mais jovem tinha 5 meses. Quinze por cento dos animais analisados tinham idade igual ou maior que três anos enquanto 17% dos animais tinham menos de um ano de vida. A maioria dos animais amostrados (52%) tinha idades variando entre um e dois anos de vida.

Os dados obtidos com o método da neurolipofuscina demonstram a ocorrência de animais mais velhos do que três anos.

Até o momento, assumia - se que a idade máxima de indivíduos de *C. sapidus* era em torno de três anos. Os dados do presente estudo demonstram que esta informação está provavelmente incorreta. O animal mais velho (macho adulto) coletado tinha 97,1 mm de largura da carapaça, tamanho este inferior aos maiores observados em campo. Por outro lado, os resultados também demonstram uma das principais vantagens do método da neurolipofuscina que é a sua falta de relação direta com o tamanho do animal. O maior animal coletado (macho adulto: 116,3 mm) teve idade estimada em 1,7 anos (1 ano e oito meses). Deste modo, diferenças na taxa de crescimento individual não afetam a taxa de acumulação de neurolipofuscina, pois esta acumulação é um índice de envelhecimento fisiológico.

CONCLUSÃO

Conclusão

Este estudo demonstrou que o método da neurolipofuscina pode ser utilizado para a determinação da estrutura etária de *C. sapidus*. Além disso, foi demonstrado que a longevidade máxima do siri - azul anteriormente assumida (três anos) é provavelmente uma subestimativa, haja vista que 15% dos animais analisados tinham idade igual ou maior que três anos.

Agradecimentos

A Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (Programa Pólos) pelo apoio para a aquisição de equipamentos que foram utilizados para a execução deste projeto.

REFERÊNCIAS

- Ferreira, L.S. Pesca artesanal do siri - azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Crustacea: Decapoda: Portunidae) no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Instituto de Oceanografia, Rio Grande, R.S., FURG. 2007, 100p.
- Fonseca, D.B., Sheehy, M.R.J. Does size matter? A cautionary experiment on overoptimism in length - based biore-source assessment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64: 996 - 1008, 2007.
- Jivoff, P. Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 193: 368 - 380, 1997.
- Jivoff, P., Hines, A.H. Female behaviour, sexual competition and mate guarding in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Anim. Behav.* 55: 589 - 603, 1998.
- Katz, M.L., Robison, W.G. What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescentlysosomal storage bodies. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34: 169 - 184, 2002.
- Pereira, C.R., D'Incao, F., Fonseca, D.B. Bilateral comparison of *in situ* neurolipofuscin accumulation in *Callinectes sapidus* caught in the wild. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, no prelo.
- Santos, C.R.M. Biogeografia, sistemática e filogenia de Portunidae Rafinesque, 1815 do Oceano Atlântico Ocidental (Crustacea, Decapoda): ênfase em *Callinectes* Stimpson, 1860 e *Portunus*
- Weber, 1795. Instituto de Oceanografia, Rio Grande, R.S., FURG. 2007, 296 p.
- Sitte, N., Merker, K., Grune, T. Von Zglinicki, T. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 36: 475 - 486, 2001.
- Terman, A., Brunk, U.T. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106: 265 - 276, 1998.