



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

O efeito da variação crônica de salinidade sobre o acúmulo de
neurolipofuscina em juvenis de siri – azul *Callinectes sapidus*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raquel Machado Martins

Rio Grande – RS, Brasil
Abril de 2018

Bióloga: Raquel Machado Martins

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa

Coorientador: Prof. Dr. Duane Barros da Fonseca

Dedico:

À minha filha Júlia Martins, por ter sido a motivação!

AGRADECIMENTOS

O Muito obrigada mais carinhoso e especial vai para a pessoa que sempre acreditou e motivou minhas escolhas acadêmicas! Contigo André, divido mais uma grande conquista da minha vida! Somos mestres!

À minha filha Júlia peço desculpas pela ausência durante os últimos meses e te agradeço, pois graças ao teu nascimento retomei meus estudos e agora estou aqui, concluindo mais esta etapa tão importante na trajetória acadêmica.

Meu querido irmão Rodrigo obrigada pela paciência em me escutar, por muitas vezes “discutir” ciência comigo e por todas as palavras de motivação que me dissestes.

Agradeço às queridas Lígia e Ivonete, pelas orações e pelas palavras de conforto. Ao amigo Francis, pela tranquilidade e companheirismo. A “minha“ querida profe Cristina Zardo pelas palavras carinhosas, pela amizade, pelos conselhos e apoio desde a graduação. Certamente, vocês são parte deste sonho!

Obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa, por ter aceito o convite para a minha orientação, pela disponibilidade e pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e meu desenvolvimento científico.

Ao prof. Dr. Duane Barros da Fonseca, agradeço do fundo do coração, pela orientação, paciência e amizade. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas horas investidas para que tudo desse certo no final. Tenho certeza que ainda colheremos bons frutos do nosso trabalho! Se nada der certo...bora fazer cerveja! Obrigada, Duane! Fostes fundamental nesta conquista tão importante para mim!

Gostaria de agradecer aos professores que aceitaram o convite para compor a banca examinadora: Prof^{ra}. Dr^a. Silvana Allodi, Prof. Dr. Fábio Everton Maciel.

Obrigada pelo tempo dedicado, avaliação do trabalho e contribuições! Com certeza serão bem vindas e consideradas.

Muitíssimo obrigada ao amigo Guilherme, que vem compartilhando comigo esta jornada desde a graduação em 2011. A Lamia, parceira de choro nas derrotas e nas conquistas! E a Jéssica? Sempre com a “lente” do positivismo, com aquela gargalhada que alegra o dia e aquece o coração! Queridos, vocês foram fundamentais nestes últimos anos, obrigada, muito obrigada! Que venham os próximos... Com vocês, meus dias são muito felizes, conseguimos rir e driblar as adversidades. Obrigada amigos! Vocês são ótimos!

Luci querida amiga da vida toda... ou mais da metade dela!!! Obrigada, por sempre estar receptiva e entender minha ausência. Saiba que sinto saudades de estar contigo! Obrigada best! Vamos comemorar mais esta juntas!

Não poderia deixar de agradecer a minha parceira de patins e agora de trabalho, Jerusa. Jê, obrigada por escutar meus desabafos em relação aos estudos, por trocar ideias sobre os filhos, pelas comidinhas e chimas no Centro de Eventos e principalmente por ser a amiga mais parceira que a patinação me trouxe!

Aos colegas da salinha 1 (sem exceções). Gente, obrigada pelas conversas, risadas, cafés, chimas e todos os momentos legais que passamos durante estes 2 últimos anos! Obrigada especialmente ao Juliano Barreto por me auxiliar no laboratório durante as análises bioquímicas.

Agradeço à FURG, aos professores e equipe de técnicos do Programa de Pós - graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCF. Um super OBRIGADA ao técnico Mateus, pelas dicas e ajuda durante a manutenção do meu cultivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudo.

E finalmente, agradeço e responsabilizo o Prof. Dr. Elton Pinto Colares por hoje eu estar aqui vivendo este momento único na minha vida! Obrigada professor, por me apresentar a fisiologia de uma maneira tão simples e apaixonante capaz de desmitificar toda a complexidade deste grande mundo!!!

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho, meu mais sincero: Muito Obrigada!

Table of Contents

RESUMO	1
ABSTRACT	2
Listas de figuras.....	3
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Estuário da Lagoa dos Patos:.....	3
1.2 Características biológicas do siri azul: <i>Callinectes sapidus</i> Rathbun 1896	6
1.3 Lipofuscina – pigmento de idade – envelhecimento:	10
1.3 O efeito de variáveis ambientais no metabolismo e acúmulo de neurolipofuscina: ..	15
2. Objetivos:	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
Manuscrito: SALINITY VARIATION DOES NOT AFFECT NEUROLIPOFUSCIN ACCUMULATION IN JUVENILE OF <i>Callinectes sapidus</i>	20
Abstract:	21
1. Introduction:.....	22
2. Material and Methods:.....	24
2.1 Crab collection and acclimation.....	24
2.2 Experimental design	25
2.3 Determination of total metabolism	26
2.4 Biochemical dosages.....	26
2.5 Neurolipofuscin quantification.....	27 ²⁸
2.6 Statistical analyses	29
3. Results:.....	29 ³⁰
3.1 Oxygen Consumption	29 ³⁰
3.2 Reactive oxygen species (ROS) - Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP).....	30
3.3 Lipid peroxidation.....	30
3.4 Neurolipofuscin and Carapace width:	30
4. Discussion	30
4.1 Osmoregulation vs. Animal metabolic rate.....	31 ³²
4.2 Osmoregulation vs. ROS, ACAP, LPO, and neurolipofuscin accumulation	33 ³⁴
4.3 Neurolipofuscin accumulation in an oligohaline estuary – consequences on age determination methodology:.....	35
5. Conclusion.....	36 ³⁷
6. Acknowledgements.....	37
7. References.....	37
8. FIGURES	48
9. TABLES.....	51
10. FIGURE LEGENDS.....	51
2. DISCUSSÃO GERAL	52
3. CONCLUSÃO	57
4. REFERÊNCIAS:	58

RESUMO

A quantificação *in situ* de neurolipofuscina como método para determinação etária de crustáceos tem sido bastante utilizada, já que as espécies deste grupo tipicamente não preservam estruturas rígidas durante o processo de muda que sirvam para mensurar a idade cronológica. Neste sentido a lipofuscina tem sido uma ferramenta útil para aferição da idade fisiológica dos animais, devido a sua formação estar relacionada ao estresse oxidativo, sua natureza insolúvel e por caracteristicamente acumular-se em lisossomos secundários, em tecidos pós mitóticos. O entendimento de fatores ambientais afetando a acumulação de neurolipofuscina é restrito ao efeito da temperatura. Neste trabalho avaliamos o efeito da variação de salinidade no padrão de acumulação de neurolipofuscina (nLF), associados à parâmetros metabólicos (consumo de oxigênio total) e bioquímicos: espécies ativas de oxigênio (EAO), capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) e lipoperoxidação (LPO). No grupo controle, os siris foram mantidos no seu ponto isosmótico (800 mOsm, salinidade 26) durante 49 dias. No grupo tratamento, os animais inicialmente na salinidade 26, foram posteriormente sujeitos a mudanças semanais nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 49 dias, oscilando da salinidade 10 (250 mOsm) — choque hiposalino — para a salinidade 26. Os parâmetros bioquímicos – EAO, ACAP e LPO– foram determinados nos tempos 7, 14 e 49 dias, e o acúmulo de nLF quantificado aos 49 dias no gânglio. Com relação ao consumo total de oxigênio, não houve diferenças significativas entre os grupos controle e tratamento durante os tempos experimentais. Para análise de EAO, ACAP e LPO diferenças significativas também não foram registradas entre os grupos controles e tratamentos para cada tempo avaliado. O acúmulo de nLF não foi significativamente diferente entre controle e tratamento. Estes resultados indicam que o acúmulo de nLF não foi influenciado pelas variações de salinidade durante o tempo experimental, reforçando, portanto, a confiabilidade e aplicabilidade deste método para a determinação etária de crustáceos.

Palavras-chave: Lipofuscina; Variáveis ambientais; Estresse oxidativo; Determinação de idade .

ABSTRACT

In situ quantification of neurolipofuscin for age determination in crustaceans has been widely applied, as most of these animals do not hold permanent structures suitable for age grading. The accumulation of neurolipofuscin (nLF) can also be understood as a marker of physiological ageing, as its formation is linked to oxidative stress, and its cumulative and insoluble deposit is observed in secondary lysosomes of post mitotic tissues. The understanding of the effects of environmental variables on the accumulation of neurolipofuscin is restricted to temperature. In this study, we evaluated the effect of salinity variation on the nLF accumulation pattern, associated to metabolic parameters (total oxygen consumption) and biochemical parameters reactive oxygen species (ROS), antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and lipid peroxidation (LPO). For the control group, crabs were kept at isosmotic point (800 mOsm, salinity 26) for 49 days. For the treatment group, crabs acclimated at salinity 26 were subject to weekly variations at 7, 14, 21, 28, 35, and 49 days, from salinity 10 (250 mOsm) — hypo-saline shock — to salinity 26. At time 7, 14 and 49 days, all biochemical determinations were performed. At time 49 days, nLF accumulation was quantified in the brain of *Callinectes sapidus*. For the metabolic rate, no significant difference was found between control and treatment. For biochemical determinations (ROS, ACAP and LPO), no difference was found between control and treatments. nLF accumulation was not different between control and treatment. Results indicated that chronic responses of biochemical traits to salinity variations are not different between control and treatment, and that the accumulation of nLF did not differ between groups. Results found indicate that the accumulation of nLF is not affected by salinity variations, which contributes to the applicability and reliability of this methodology for crustaceans age determination.

Keywords: Age pigment; Environmental variables; Oxidative stress; Age determination.

Listas de figuras

Figura 1- Imagem via satélite da Lagoa dos Patos.

Figura 2- Lagoa dos Patos e suas unidades biológicas.

Figura 3- *Callinectes sapidus* – siri – azul.

Figura 4- Ciclo de vida de *C.sapidus*.

Figura 5- Muda de *C.sapidus*.

Figura 6- Cérebro (A); Lobo olfatório (B); Grânulos de neurolipofuscina(C) em *C. sapidus*

Figura 7- Etapas da lipoperoxidação

MANUSCRITO:

Figure 1: Oxygen consumption of *Callinectes sapidus* exposed to salinity variations in diferentes times 7d, 14d and 49d. Data are expressed as means \pm standard error ($p > 0.05$).

Figure 2: Lipid hydroperoxide levels – at t7, t14 and t49 - in the brain of juveniles of *Callinectes sapidus* exposed to two salinity regimes (Control, constant; Treatment, varying). Data are expressed as means \pm standard error. Different letters means statistical significance ($p < 0.05$).

Figure 3: Neurolipofuscin concentration in MC 10 of *Callinectes sapidus* submitted to salinity variations during 49 days. Data are expressed as means \pm standard error. Different letters means statistical significance ($p < 0.05$).

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estuário da Lagoa dos Patos:

Os estuários são ecossistemas costeiros semifechados que recebem aporte de águas salgadas devido a conexão direta com o mar que é diluída devido a mistura com água doce oriunda de áreas terrestres (Odum, 1986). A estrutura morfológica de um estuário confere um padrão de circulação de água capaz de reter uma riqueza de nutrientes que favorece o desenvolvimento de uma rica fauna e flora nestes locais (Tagliani, 1999).

Situada na planície costeira do estado do Rio Grande do Sul, a Lagoa dos Patos (Fig. 1), tem conexão com o oceano Atlântico através dos municípios de Rio Grande e São José Norte (Villwoeck e Tomazzeli, 1998).



Figura1: Imagem via satélite da Lagoa dos Patos
Fonte: <https://photojournal.jpl.nasa.gov/catalog/PIA03444>

Com a superfície de 10.227 km² a Lagoa dos Patos recebe águas de uma bacia hidrográfica com 201.626 km² de extensão, no qual ocorre o desague de águas vindas

dos rios da bacia do Sudeste a partir da drenagem da Lagoa Mirim pelo Canal de São Gonçalo. A lagoa está dividida em cinco unidades biológicas Segundo Asmus (1998): Lago Guaíba, enseada de Tapes, Lagoa do Casamento, corpo central lagunar e o estuário (Fig. 2).

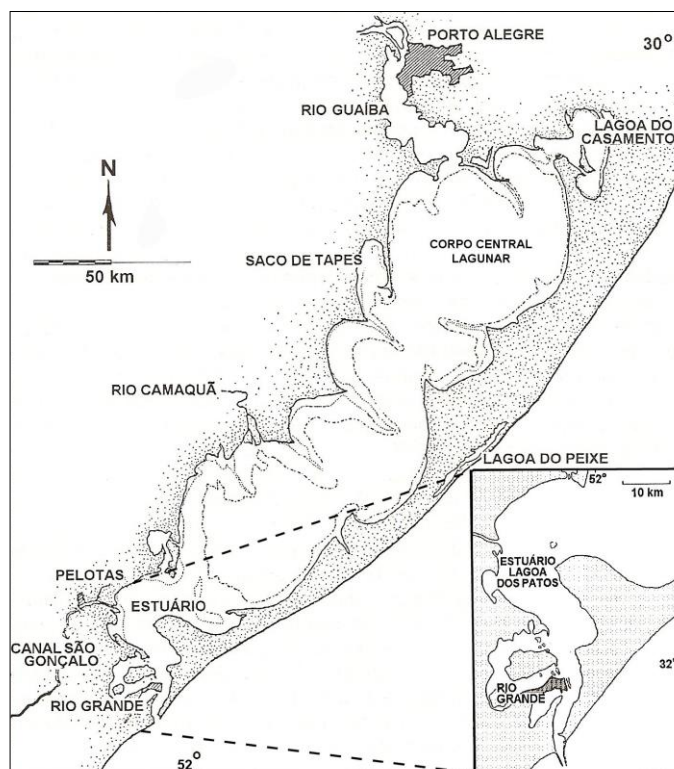


Figura 2: Lagoa dos Patos e suas unidades biológicas.

Fonte: Schwochow e Zamboni (2007)

O estuário da Lagoa dos Patos ocupa uma área de aproximadamente 963,8 km², sendo este valor aproximadamente um décimo da área total da lagoa (Bonilha, 1996). De acordo com Castelo (1995), este estuário apresenta dois ambientes ecologicamente distintos, denominados como enseadas rasas e regiões de áreas abertas. As enseadas rasas ou sacos, são áreas mais protegidas, com profundidade aproximada de 50 cm, baixa hidrodinâmica e uma alta biomassa de organismos bentônicos. Em contrapartida, as regiões de áreas abertas apresentam profundidade média de 2m e baixa biomassa de organismos bentônicos (Bemvenuti et al., 1978).

Os fatores abióticos responsáveis pela manutenção da hidrodinâmica e

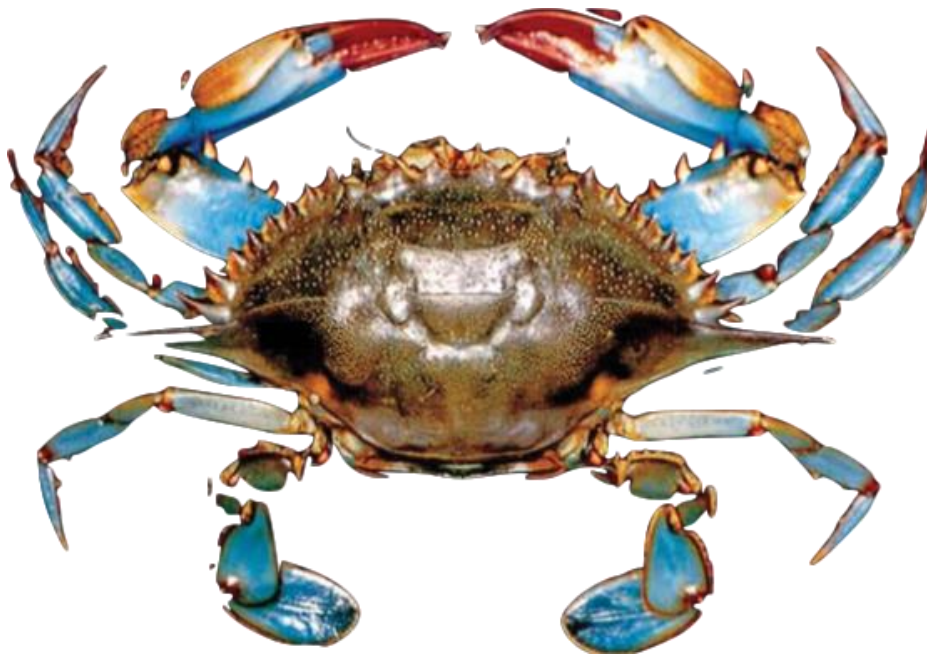
desenvolvimento da vida no estuário são a salinidade, temperatura e o vento. Segundo Garcia (1998), os ventos que sopram ao longo do eixo principal nordeste (NE) - sudoeste (SW) do corpo da lagoa, são responsáveis pelo perfil de circulação, nível e quantidade de água oceânica que nela se mistura. De acordo com Moller e Fernandes (2009), a interface estuário - oceano é diretamente influenciada por fatores meteorológicos como passagens de sistemas frontais e precipitação pluvial. É sabido que quaisquer alterações destes regimes tendem a modificar o padrão de entrada de água marinha no estuário bem como a vazão e conseqüentemente, estas alterações tendem a modificar a salinidade da região (D’Incao, 1991). Marques (1994) diz que as situações mais frequentes nesta área são: as enchentes, com entrada de água marinha no estuário, devido a predominância de ventos do quadrante Sul: sudoeste (SW), sul (S), sudeste (SE) e leste (E) (ação isolada); e situações de vazante, em que ocorre uma intensa saída de água doce ou mixohalina com a ação predominante dos ventos do quadrante Norte: nordeste (NE) que pode atuar de forma isolada ou combinada com chuvas.

Devido a toda sua dinâmica e características, o estuário da Lagoa dos Patos é habitat para algumas espécies de crustáceos decápodes inclusive o siri-azul *Callinectes sapidus* (Manzoni e D’Incao, 2007), modelo biológico escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

1.2 Características biológicas do siri azul: *Callinectes sapidus* Rathbun 1896

O siri – azul (Fig. 3) apresenta distribuição geográfica ampla que compreende a costa Atlântica da América do Norte até a margem sul da América do Sul sendo encontrado em áreas de Massachusetts (Estados Unidos) até Venezuela e do Rio de Janeiro até Buenos Aires (Argentina) (Santos, 2007). Esta espécie representa um

recurso pesqueiro de grande importância econômica na costa Atlântica dos Estados Unidos e da América Central. Na região Sul do Brasil, a captura comercial do siri-azul ocorre no estado de Santa Catarina. No estado do Rio Grande do Sul estas capturas ocorrem como subprodutos da pesca artesanal de peixes e camarões (Ferreira e D’Incao, 2008). Animais adultos e juvenis desta espécie possuem hábitos alimentares carnívoro e detritívoro, sendo considerado um predador chave por controlar a abundância de outras espécies devido ao consumo de organismos da infauna e epifauna (Oliveira et al., 2006).



**Figura 3: *Callinectes sapidus* – siri – azul. Escala: 1cm.
Fonte: Maryland Department of Natural Resources.**

O ciclo de vida de *C. sapidus* (Fig. 4) é influenciado pela variação salina. O acasalamento geralmente ocorre em zonas de baixa salinidade do estuário, enquanto a maturação e a eclosão dos ovos ocorrem em regiões com salinidades mais elevadas (Cargo, 1958). Durante a fase de megalopa, os indivíduos são passivamente levados para regiões estuarinas. O assentamento das megalopas ocorre geralmente em substratos cobertos com vegetação que fornecem abrigo contra a predação e são fonte

de alimento sendo regiões frequentemente sujeitas a baixa salinidade. O desenvolvimento dos juvenis ocorre em regiões mesohalinas do estuário (Seeliger et. al., 1997). O desenvolvimento ocorre entre a primavera e o verão, no outono os animais iniciam a migração para áreas mais profundas do estuário (Calliari et. al., 1997). Nestas regiões os adultos podem experimentar salinidades altas, mesmo com períodos moderados de pluviosidade e alta vazão que traz água doce para o estuário (Asmus, 1997). Os adultos são capazes de procurar regiões com águas mais próximas de seu ponto isosmótico à partir da salinidade 26 (Williams, 1974).

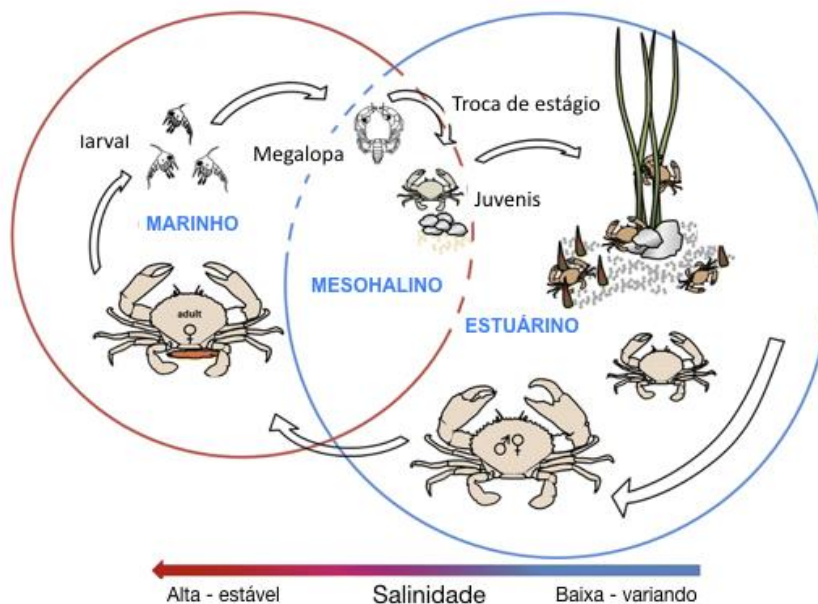


Figura 4: Ciclo de vida adaptado de ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/Life-cycleshowing-ontogenetic-shift-between-the-inshore-estuarine-and_fig2_273028366.

A capacidade de lidar com a flutuação de salinidade é uma importante estratégia para o estabelecimento e manutenção da espécie em ecossistemas de estuários (Péqueux, 1995). De acordo com os mecanismos que os animais apresentam para lidar com as flutuações de salinidade do meio aquático, eles podem ser classificados de duas

formas: os eurialinos, capazes de tolerar uma ampla faixa de salinidade e por outro lado, os estenoalinos, que toleram uma estreita faixa de concentração osmótica do meio externo (Péqueux, 1995). *Callinectes sapidus* é uma espécie caracteristicamente eurialina, capaz de tolerar amplas faixas de variações de salinidade do meio, além de ser uma espécie hiperosmorreguladora em salinidades baixas e osmoconformadora em águas à partir da salinidade 26 onde alcança seu ponto isosmótico (Williams, 1974).

Caracteristicamente, os crustáceos possuem um exosqueleto rígido que embora lhes confira proteção contra predadores e resistência mecânica, é um fator limitante e restritivo ao crescimento. Desta forma, para que seja possível o incremento em tamanho, estes animais possuem um mecanismo de muda ou ecdise sucessivas, seguidas por estágios de intermudas (Hartnoll, 1982). Para *C. sapidus* em torno de 30 mudas ocorrem durante o ciclo de vida que tem duração aproximada entre 3 e 4 anos (Rodrigues e D’Incao, 2008), incluindo as mudanças ocorridas durante os estágios larvais (Van Engel, 1958). Neste processo, a cada muda, o tegumento rígido é perdido e durante este momento ocorre um grande crescimento em tamanho do animal em um curto espaço temporal, antes que o novo exoesqueleto seja completamente endurecido (Hartnoll, 1982). Durante este processo os animais ficam bastantes frágeis e suscetíveis a predação e canibalismo, porque seu esqueleto ainda não está rígido e não é capaz de lhe conferir proteção. O processo de muda é complexo e consiste em diversas mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (Chang, 1985). O ciclo de muda é controlado principalmente pela atuação de dois hormônios: hormônio inibidor da muda (MIH) e ecdisona, que são produzidos e estimulados pela atuação conjunta do sistema nervoso e endócrino (neuroendócrino) impulsionados por estímulos endógenos e exógenos que desencadeiam o processo de crescimento neste grupo.

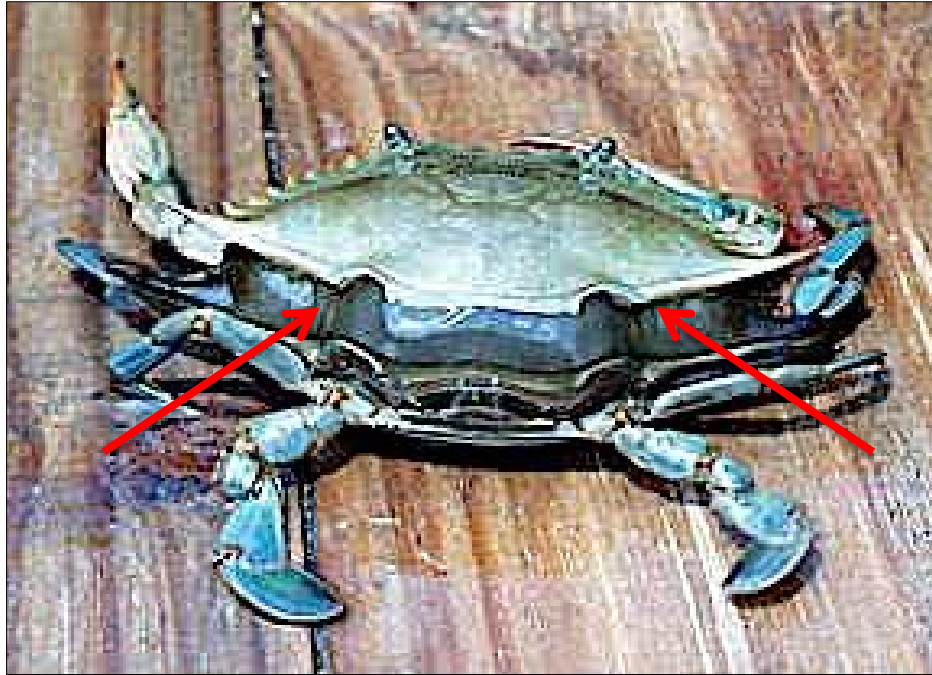


Figura 5: Muda de *C. sapidus*. As setas indicam o rompimento do exoesqueleto durante o processo de ecdise.

O fato dos crustáceos sofrerem muda e não preservarem nenhuma estrutura rígida tradicional como em outros grupos de animais torna a determinação etária imprecisa. A utilização de metodologias como análise modal de crescimento direto são utilizadas, mas não são totalmente eficientes por não refletir fielmente a idade cronológica dos indivíduos, devido ao padrão de crescimento, dimorfismo sexual e condições ambientais (Hartnoll, 2001). Desta forma, uma outra ferramenta que atualmente vem sendo utilizada para ajudar a identificar a idade de crustáceos é o método de quantificação de lipofuscina.

1.3 Lipofuscina – pigmento de idade – envelhecimento:

A lipofuscina (LF) (Fig. 6) consiste em estoques de corpos auto fluorescentes que se acumulam em lisossomos de alguns tecidos durante o envelhecimento (Katz e

Robison, 2002). Também chamada de pigmento de envelhecimento ou de desgaste, a lipofuscina – é um material insolúvel constituído por proteínas danificadas devido a oxidação e também por resíduos da degradação de lipídeos sendo o componente protéico composto por uma série de aminoácidos variados e os resíduos da degradação lipídica constituídos principalmente por triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídeos (Brunk e Terman, 2002).

Sua origem é o lisossomo, organela no qual ocorre a degradação de biomoléculas e até mesmo outras organelas, como mitocôndrias, em um ambiente ácido com o pH inferior a 4,5 (Terman, 2001). Entretanto nem todo material é possível de ser degradado conseqüentemente levando a formação de grânulos do pigmento lipofuscina (Terman, 2001). Além disso, a composição molecular e os mecanismos pela qual é formada pode diferir entre as espécies, tanto quanto de tecido para tecido. Como demonstrado no trabalho de Jolly et al. (1995), além da presença de proteínas e lipídeos também foi observada a presença de um pequeno percentual de metais como ferro, alumínio, zinco, cálcio e manganês, além de carboidratos, constituindo de 4 a 7% do conteúdo de lipofuscina em músculo cardíaco bovino.

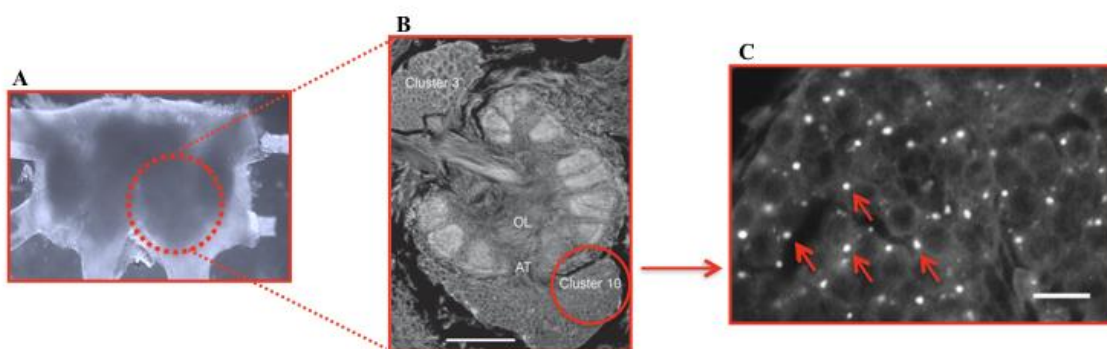


Figura 6: (A) Gânglio cerebri de *C. Sapidus* (B) Cluster 10 associado ao lobo olfatório (C) grânulos de lipofuscina localizados no citoplasma de neurônios de projeção associados ao lobo olfatório. Microscopia de fluorescência. Escala 10µm

De acordo com Katz & Robison (2002), a lipofuscina tem três características que a definem: (1) Acumulam-se no interior de lisossomos secundários; (2) sob a excitação ultravioleta ou azul emite autofluorescência de cor amarela e; (3) acumula-se ao longo da vida dos organismos. Os grânulos de LF acumulam-se principalmente em tecidos pós-mitóticos, como por exemplo, o tecido neural - onde é denominada neurolipofuscina – e em miócitos cardíacos (Brunk e Terman, 2002). Em crustáceos o tecido nervoso é utilizado para estudo de lipofuscina, principalmente regiões com maior atividade do cérebro como as massas celulares associadas ao lobo olfatório (OLMC) e o agregado A da *medulla terminalis* (MT – A), região esta encontrada no pedúnculo ocular (Tully, 2002; Belchier, 1998). Por não se dividirem, as células pós-mitóticas continuam acumulando LF ao longo da vida dos organismos. Por este motivo, quando o organismo é longevo, ou seja, mais velho, uma maior quantidade de LF acumulada pode ser observada (Brunk e Terman, 2002; Terman, 2001).

Diversos trabalhos tentam explicar o aumento de acúmulo de lipofuscina em células animais ao longo do tempo. Há evidências que o estresse oxidativo tem papel relevante na taxa de formação de LF e que as defesas antioxidantes demonstram ter o efeito contrário, prevenindo a formação de agregados de grânulos (Terman e Brunk, 1998). Alguns autores sugerem que o acúmulo dos grânulos esteja relacionado com o envelhecimento, ou seja, com a falha dos mecanismos envolvidos na proteção antioxidante das próprias células (Katz e Robison, 1986). De acordo com Brunk et al. (1992), um dos fatores que corrobora com a formação de lipofuscina pode ser o balanço entre dois processos: a produção de espécies reativas de oxigênio que oxidam outras moléculas e o processo de degradação de moléculas oxidadas no interior de lisossomos. No entanto, os autores afirmam que o processo de formação de lipofuscina é resultado não apenas de um fator, mas sim de vários, sendo a ineficiência da ação antioxidante

considerada fundamental dentro deste processo.

Segundo Sies (1991) a definição para estresse oxidativo é de que esse é o produto de um desequilíbrio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor do primeiro. No entanto, uma série de dados a respeito de vias de sinalização, testes antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo levam a uma definição mais atual, que o define como uma perturbação na sinalização e controle do estado redox (Jones, 2006).

Durante o processo de respiração aeróbica o oxigênio consumido é utilizado como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial. O gradiente eletroquímico, entre as membranas mitocondriais, gerado por este transporte é a fonte de energia para o processo de fosforilação oxidativa com consequente geração de adenosina trifosfato (ATP). Ainda sim, a redução do oxigênio à água não é 100% eficiente e culmina com a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($HO\cdot$) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Estas moléculas, altamente reativas, podem oxidar biomoléculas (Storey 1996). De acordo com Sohal (2000) a taxa mitocondrial de produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 e a quantidade acumulada de danos às macromoléculas, tais como proteínas, DNA e lipídios aumentam com a idade e têm ocorrência em uma grande variedade de espécies filogeneticamente diversas. De acordo com a Teoria do Envelhecimento baseada em Radicais Livres (Harman, 1956) a produção de EAO está relacionada com a produção de danos que vão se acumulando com o tempo, os quais acarretam em falhas nos processos biológicos que culminam no envelhecimento.

A interação das EAO com moléculas como ácidos graxos polinsaturados (PUFA's – sigla em inglês) levam a danos oxidativos, como a peroxidação lipídica – sendo alvos preferenciais das espécies ativas de oxigênio os lipídeos de membranas biológicas (Storey, 1996). Peroxidação lipídica – (LPO) é definida como uma série de

eventos bioquímicos produzidos pela ação das EAO sobre os lipídios constituintes das membranas celulares (fase de iniciação) formando como produtos principalmente, a saber: radical alquila ($L\bullet$), alxila, ($LO\bullet$) e peroxila ($LOO\bullet$) (Fig. 6).

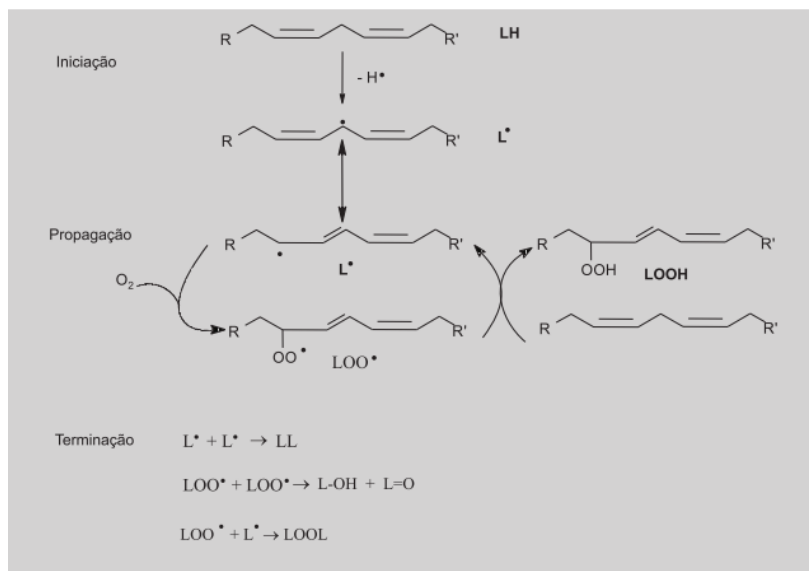


Figura 7: Etapas da lipoperoxidação e os principais produtos formados: lipídio (LH), radical alquila ($L\bullet$), alxila, ($LO\bullet$), ($LOOH$) hidroperóxidos e peroxila ($LOO\bullet$). Fonte: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 37, n. 3, set./dez., 2001.

Estes processos podem ser auto-amplificados (propagação), levando a produção de maiores quantidades de lipídios peroxidados. Estes produtos podem resultar em danos na estrutura celular, falhas nos mecanismos de trocas metabólicas e em condições extremas podem levar a célula a morte (Benzie, 1996). Segundo Sohal e Allen (1986) a formação de lipofuscina é uma consequência do processo de LPO.

Desta forma, considerando os fatores que levam a formação de LF, é possível considerá-la como subproduto metabólico resultante do estresse oxidativo que culmina em danos oxidativos como a peroxidação lipídica, que se acumula no interior de tecidos pós-mitóticos - como o tecido neural. Devido a esta característica, a LF - especificamente a neurolipofuscina - tem sido utilizada como uma ferramenta na determinação etária de artrópodes (Fonseca et al., 2005). Levando em consideração que

o processo de acúmulo de LF é produto do metabolismo, variáveis que interfiram na taxa metabólica dos organismos poderiam ocasionar variação no acúmulo deste pigmento.

1.3 O efeito de variáveis ambientais no metabolismo e acúmulo de neurolipofuscina:

Em ambientes estuarinos, variáveis abióticas tais como temperatura e salinidade podem mudar drasticamente através de escalas espaciais e temporais. Deste modo, estas mudanças levam os animais a utilizarem mecanismos regulatórios/compensatórios para a manutenção do seu meio interno, alterando a fisiologia do animal em respostas a tais variações (Prosser et al., 1991). O trabalho realizado com *C. sapidus* que avaliou o perfil da taxa metabólica sob o efeito da temperatura, (Robert e Gray 1972) observou que animais aclimatados durante quatorze dias em temperaturas constantes (10°C e 20°C) não apresentaram diferenças significativas no consumo de oxigênio durante as condições experimentais. No entanto, quando os animais de ambos os grupos foram transferidos para uma temperatura intermediária (15°C), foi registrado aumento no consumo de oxigênio durante as primeiras três horas. Após este tempo a taxa metabólica dos animais dos dois grupos experimentais se iguala e se mantém estável, sugerindo que o tempo de três horas é suficiente para aclimação à temperatura para esta espécie.

A salinidade é um fator ambiental que afeta de forma direta a fisiologia dos organismos que habitam ambientes aquáticos e portanto, é um fator ecológico de importância considerável (Gonzalez, 2012). O trabalho de Pereira e D’Incao (2011) demonstrara que a salinidade no estuário da Lagoa dos Patos oscila durante os meses do ano, podendo ser observados valores que variam entre zero e trinta. De acordo com Bulger et al. (1998), a salinidade é um fator que influencia a fisiologia de vertebrados

e invertebrados, como ocorre com os crustáceos. No trabalho realizado por Leffler (1975) com juvenis de *Callinectes sapidus*, foi demonstrado que animais aclimatados a salinidade 50 e posteriormente submetidos a choques hipo salinos apresentaram significativo aumento da sua taxa metabólica, enquanto que animais aclimatados em salinidade que variavam entre zero e cinquenta, não apresentaram a mesma resposta.

A necessidade de utilização de mecanismos osmorregulatórios, frente a variações bruscas de salinidade levam a alterações na taxa metabólica e são induzidos por uma série de respostas comportamentais e fisiológicas (Mantel e Farmer, 1983). Diretamente, o processo de osmorregulação envolve diversas estratégias para a manutenção do volume celular, sendo a regulação anisomótica do fluido extracelular (RAFE) um mecanismo que demanda energia, já que é mantido pela atividade da enzima Na^+K^+ ATPase. Esta enzima é responsável por gerar a principal força motriz para os sistemas transportadores de íons das células ricas em mitocôndrias (Péqueux, 1995). Organismos eurialinos que enfrentam condições hipo salinas, tendem a ter uma perda substancial de íons e grande ganho de água, devido a diferença entre as concentrações osmóticas do ambiente e meio interno do animal. Neste sentido, a Na^+K^+ ATPase, tem um papel crucial na recaptação dos íons, fazendo a regulação osmótica do meio interno dos organismos. Desta forma, para a manutenção deste processo, esta enzima necessita de energia na forma de ATP, gerada a partir do processo de fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias (Towle et al., 1976).

Entretanto, o aumento da taxa metabólica em resposta ao decréscimo de salinidade não é apenas resultado da taxa metabólica dos tecidos responsáveis pelo processo de osmorregulação e sim a soma deste com a taxa metabólica dos tecidos que não estão diretamente envolvidos com os processos osmorregulatórios (Leffler, 1975). Neste sentido, os demais mecanismos bioquímicos e fisiológicos e comportamentais

poderiam contribuir para esta modificação do metabolismo geral.

Os trabalhos citados acima relatam os efeitos de variáveis ambientais na taxa metabólica dos animais, fato este que de maneira indireta pode influenciar o acúmulo de lipofuscina. De acordo com Sohal e Allen (1986), evidências indicam que a taxa de acumulação de lipofuscina é dependente da taxa metabólica do organismo. Portanto, indiretamente, variáveis ambientais que afetem o consumo de oxigênio poderiam ter efeito na quantidade de neurolipofuscina acumulada. Outra possibilidade, é que estes não afetariam o conteúdo de LF acumulada, devido as diferentes respostas metabólicas exercida pelos tecidos - taxa metabólica tecido específica. Além disto, o acúmulo de LF ainda pode ser influenciado pelo balanço entre EAO e defesas antioxidantes, de forma que cada tecido responde as EAO de maneira diferente, não havendo um padrão único para as defesas antioxidantes que são variáveis entre os tecidos, conforme demonstrado no trabalho de Freire et al. (2011).

Trabalhos realizados por Tully et al. (2000) e Sheehy (2002) demonstraram o efeito direto da temperatura na taxa metabólica de crustáceos e que a lipofuscinogênese pode ser reduzida ou suprimida em animais ectotérmicos quando submetidos a baixas temperaturas. Corroborando o efeito da temperatura neste processo, Sheehy (1990) em seu estudo com lagostins observou um aumento na taxa de acumulação de neurolipofuscina com o aumento da temperatura do cultivo. Alguns estudos de campo, revisados por Sheehy (2002), também demonstraram incremento sobre a taxa de acúmulo de neurolipofuscina com o aumento da temperatura média da água. O aumento da temperatura, principalmente em animais ectotérmicos afeta o metabolismo como um todo, de forma que todas as células estão sujeitas a este efeito, desencadeando respostas para lidar com a situação.

Portanto, estes estudos demonstraram que o processo de formação de LF, tem

uma forte relação com fatores que alterem drasticamente a taxa metabólica e com a forma pela qual os organismos utilizam os mecanismos para lidar com as adversidades do ambiente. Neste sentido, levando em conta a salinidade, pode ser possível que o custo energético da osmorregulação se reflita no metabolismo total e culmine com a geração de EAO e consequente formação de LPO que contribui com a gênese de grânulos de LF.

Deste modo, sabendo que os efeitos da variação de salinidade sobre o acúmulo de neurolipofuscina ainda não são conhecidos, a ideia deste trabalho contribuirá para o entendimento deste efeito, sendo essencial para a calibração desta metodologia para a determinação etária de espécies estuarinas de interesse comercial bem como para a dinâmica de populações. No entanto, caso as variações neste parâmetro levem a acúmulo diferenciado de nerolipofuscina, estas respostas poderiam invalidar o uso do pigmento como uma marcador de idade.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito crônico da variação da salinidade no acúmulo de neurolipofuscina em juvenis de *Callinectes sapidus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da variação de salinidade no consumo de O₂ total;
- Avaliar o efeito da variação de salinidade na concentração de espécies reativas de oxigênio (EAO) e na capacidade antioxidante (ACAP) no tecido nervoso do siri-azul;
- Verificar os níveis de lipoperoxidação (LPO) no gânglio cerebroyde de *Callinectes sapidus*;
- Verificar o efeito de variação de salinidade na taxa de acúmulo de lipofuscina no gânglio cerebroyde.

Manuscrito: SALINITY VARIATION DOES NOT AFFECT NEUROLIPOFUSCIN ACCUMULATION IN JUVENILE OF *Callinectes sapidus*.

Manuscrito a ser submetido para a revista:

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

SALINITY VARIATION DOES NOT AFFECT NEUROLIPOFUSCIN ACCUMULATION IN JUVENILE OF *Callinectes sapidus*.

Raquel Machado Martins¹, Juliano da Silva Barreto¹, Carlos Eduardo da Rosa^{1,2*}, Duane Barros da Fonseca².

1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas¹, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande²

*Corresponding author: Duane Barros da Fonseca

Email address: dbf1@mac.com

Address: Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, CEP: 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

Abstract:

Lipofuscin has been a useful tool for measuring the physiological age of animals, especially for crustaceans that do not retain any rigid structure for age determination. The formation of lipofuscin granules is related to oxidative stress and their insoluble nature allows them to accumulate throughout the life of the organisms, inside secondary lysosomes of post-mitotic tissues. Here we evaluated the effect of salinity variation on metabolic parameters (total oxygen consumption), biochemical parameters (ROS - ACAP - LPO) and neurolipofuscin accumulation (LF). Animals in the control group were kept at their isosmotic point (salinity 26) for 49 days. Animals from the treatment group initially at salinity 26 were subsequently subjected to weekly changes at times 7, 14, 21, 28, 35 and 49 days, ranging from salinity 10 - hyposaline shock - to salinity 26. The biochemical parameters - ROS, ACAP, LPO and LF - were determined in the *Callinectes sapidus* brain at times 7, 14 (short term) and 49 days (long term). For ROS, ACAP and LPO no significant differences were found between control and treatment groups. For the accumulation of neurolipofuscin, there was no difference between the control and treatment groups. The results in this study indicated that the variation of salinity did not alter the accumulation of neurolipofuscin and in the biochemical parameters examined. These results showed that the accumulation of neurolipofuscin was not influenced by variations in salinity, thus reinforcing the reliability and applicability of this method for age determination of crustaceans.

Keywords: Age pigment; Environmental variables; Blue crab; Oxidative stress; Age determination.

1. Introduction:

Callinectes sapidus Rathbun, 1896, is a portunid crab with a wide and disjunct geographic distribution on the Atlantic, from Massachusetts (USA) to Venezuela, and from Rio de Janeiro (Brazil) to Buenos Aires (Argentina) (Santos, 2007). Known as “Blue-Crab”, it has been for a long time an important fishery resource in US Atlantic and Gulf Coasts (Kennedy et al., 2007) as well as in Southern Brazil (Ferreira and D’Incao, 2008). This species is an euryhaline hyper-osmoregulator and it is typically found in estuarine region and in coastal waters (Williams, 1974). The life-cycle of *C. sapidus* is linked to environmental salinity, as mating takes place in estuarine oligohaline regions, while maturation and spawning happens in saltier waters, while juvenile development occurs in the mesohaline regions of the estuary and adults are able to seek water near to their isosmotic point (Williams, 1974). To cope with salinity fluctuations, osmoregulator crustaceans regulate osmolarity of both intracellular and extracellular fluids (Péqueux, 1995), being the extracellular regulation related to the control of ionic concentrations (Na^+ and Cl^-). For instance, at low salinity Na^+ input takes place at the basolateral gill epithelia throughout $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, a process that demands energy (Péqueux, 1995).

Salinity variations may affect behavior and physiological traits. For instance, crabs in low salinities tend to have a higher locomotor activity and more frequent grooming (McGaw et al., 1999). Physiologically, heart rate is higher in low salinities (McGaw and Reiber, 1998), individual growth is faster in saltier waters (Cadman and Wienstein, 1988), and more energy is required for digestion when the crab is subject to hypo-saline waters (Curtis and McGaw, 2010).

Energy - i.e., ATP - needed for these active processes related to osmoregulation and other physiological process is mostly obtained by oxidative phosphorylation in

which cells oxidize nutrients to release energy. However, in this process some unwanted molecules - called reactive oxygen species - are formed (H_2O_2 , O_2^- , and $\text{HO}\cdot$), which are highly reactive and tend to oxidize biomolecules to reach stability (Halliwell and Gutteridge, 2007). According to Sohal (2000), the mitochondrial rate of accumulation of O_2^- and H_2O_2 , and the amount of damage caused to macromolecules - such as proteins, DNA, and lipids - increase with age and it is ubiquitous among animals. Since the main source of production of reactive oxygen species is non-enzymatically controlled (i.e., complex III in the mitochondrion electron transport chain), the formation of reactive oxygen species is usually correlated with metabolic rate. The interaction of these oxygen active species with polyunsaturated fatty acids (PUFA's) lead to oxidative damage of biological membranes (Storey, 1996) which may form the pigment lipofuscin (Sohal and Allen, 1986).

Lipofuscin – a.k.a age pigment - have been defined as pigments that (i) consist of intracellular secondary lysosome deposits, (ii) have yellow autofluorescent emission when excited by near ultraviolet or blue light, and (iii) accumulate during normal ageing (Katz and Robison, 2002). Lipofuscin is found in many tissues, but the most conspicuous accumulations are observed in post-mitotic cells such as those of the brain - neurolipofuscin - and heart (Terman and Brunk, 1998). The accumulation of lipofuscin in the secondary lysosomes of post-mitotic or slowly dividing tissues is a phylogenetically widespread hallmark of normal ageing (Porta, 2002). As such, lipofuscin has been shown to be a useful tool for exploring the ageing process, and for age determination for a better understanding of the population dynamics of crustaceans, particularly with regard to the assessment of commercially important stocks (Fonseca and Sheehy, 2007).

Investigations regarding environmental variables affecting neurolipofuscin

accumulation have been restricted to temperature. For crayfish, it has been reported an increase in neurolipofuscin accumulation with rearing temperature (Sheehy, 1990). Still, for reared animals, decreases in temperature reduced or even prevented the accumulation of neurolipofuscin in the brain of lobsters (Tully et al., 2000). For populations in the wild, several studies revised elsewhere (Sheehy, 2002) indicated increases in neurolipofuscin accumulation rate with average sea temperatures and with lower latitudes.

The present investigation intends to address the chronic effect of salinity variation on metabolic rate, ROS generation, antioxidant total capacity, lipid peroxidation, and the accumulation of neurolipofuscin in the euryhaline crab *C. sapidus*. As this species is an important fishery resource, and as during its life cycle it is exposed to salinity variations, any effect of changing salinity on neurolipofuscin accumulation would be an interference for the application of the approach for age determination of blue crabs in the wild. As the metabolic rate, and the amount of oxidative damage to lipids are factors which have been linked to lipofuscinogenesis, these variables are also evaluated in this investigation.

2. Material and Methods:

2.1 Crab collection and acclimation

Juveniles of *C. sapidus* (males and females) were caught in the estuarine region of the Patos Lagoon (Rio Grande do Sul, Southern Brazil – 32.02 S, 52.13 W), with a Renfro net between February and April 2018. After sampling, animals were taken to the laboratory (Biological Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande -

FURG) in which they were acclimated for seven days (20°C, salinity 20, and 12D:12L) in 200L tanks. During acclimation, crabs were fed with raw fish (striped weakfish), every other day. Water quality was kept by using a biological filter, and by cleaning the tanks daily. Ammonia was monitored to check water quality.

2.2 Experimental design

2.1.1 Long-term analysis

After acclimation, two groups containing 20 animals each with around one year old, were established in which they differ in the salinity regime. The first, called control, in which animals were kept at salinity 26 during the whole period. The second, called treatment, in which animals were subject to a variable salinity regime, alternating from 10 and 26, as follows: in the beginning (t0), salinity was 26 and it was kept for seven days. Thereafter, animals were moved to another tank - seventh day, t7 - in which salinity was 10, and they were kept for further seven days. This alternating salinity was kept for further 35 days, with initial times as t14, t21, t28, t35, t42, and t49. In each tank (30 L), twenty animals were put, based on a haphazard selection from acclimated crab with similar size (carapace width, CW, from 30 to 40mm). Salinity were determined as 26 is the isosmotic point for *C. sapidus*, and salinity 10 represents a hypo-osmotic shock. Animals were fasted two days before the analyses started and each experiment was repeated twice. Animals were randomly sampled at time t7, t14 and t49 for oxygen consumption and in t49 for biochemical measurements (reactive oxygen species, antioxidant capacity against peroxil radical and lipid peroxidation) and neurolipofuscin content determination. Carapace width (between the base of lateral spines) was measured at t49.

2.1.2 Short-term analysis

The animals were submitted to the same experimental conditions of the long term analysis - same saline regimes. For this experiment the animals were conditioned in aquariums of 18 L and the experiment was carried out in triplicate. At times t7 and t14 animals were randomly sampled for biochemical determinations.

2.3 Determination of total metabolism

At t7, t14 and t49 the oxygen consumption was measured in animals of each group (n=6-12). For measurements, each animal was put in a 180 mL vial with water at same salinity of the group. Animals were acclimated in this condition for 10 minutes before the start of the measurement of total oxygen consumption. Using a field oxymeter (DO-5519, Lutron Eletrônica) O₂ concentration (mg/L) was measured at two times (time zero and time nine minutes). The difference between both measures was the consumption of O₂ in nine minutes and expressed as mg O₂/min. After measures, the wet weight (w.w., in g) was recorded, and the animal was returned to its tank. Oxygen consumption was expressed as mg O₂/h/w.w.

2.4 Biochemical dosages

2.4.1 Reactive Oxygen Species (ROS) and Antioxidant Capacity Against Peroxylradicals (ACAP) measurements

Animals (n=6-10 per group) were cryoanaesthetised and tissue (supraoesophageal ganglion, brain for short therein) was removed by dissection, after the brains were cold homogenized in a buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7.75) at a 1:9 ratio (w/v). After, tissue was centrifuged (20,000 x g), at 4°C, for 20 minutes. Supernatant was taken for ROS and ACAP determinations. Protein contents were determined using BioDrop μ LITE.

Reactive Oxygen Species were quantified according to Myhre and Fonnum (2001), from the fluorescence emission of samples with the addition of (10 μ L - 2',7'-

dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), 16µM, Molecular Probes). Readings was performed using 488nm excitation, and 525 nm emission on multi-plate reader (Victor 2, Perkin Elmer). ROS concentration was expressed as Fluorescence Units .mg of protein⁻¹.

Antioxidant capacity against peroxil radicals (ACAP) was determined according to Amado et al. (2009). Peroxil radicals generated by the addition of ABAP (2, 2'-azobis, 2 methylpropionatemidine dihydrochloride; 20mM; Sigma-Aldrich, USA) oxidates H₂DCF-DA (10 µL, 16µM) resulting in fluorochromes which are detected by emission at 525 nm - (488nm, excitation). Fluorescence intensity was determined for 40 minutes at 37°C on multi-plate reader (Victor 2, Perkin Elmer). Results were expressed by the fluorescence area, and figures calculated by the equation $ACAP = [1 / (\text{fluorescence area with ABAP} - \text{area without ABAP}) / (\text{area without ABAP})]$.

2.4.2 Lipid Peroxidation

Analyses were based on the FOX methodology (Hermes-Lima et al., 1996) with modifications, in which brains (n=6-10) were homogenized in chilled methanol (1:8 w/v), and centrifuged at 1000 X g at 4°C during 10 minutes. Supernatant was used to quantify lipid peroxidation. This method is based on the oxidation of Fe²⁺ by lipids hydroperoxides — at acid pH — which makes a complex with xylenol orange (100µM – Sigma Aldrich). The quantification of this complex was carried out on a spectrophotometer at 550 nm. Cumene hydroperoxide (CHP - 3µM – Sigma Aldrich) was used as standard. Results were expressed as nmoles CHP / g wet weight.

2.5 Neurolipofuscin quantification

At t49, animals (n=12 per group) were cryoanaesthetised and brain tissue was

removed by dissection and fixed in 10% formaldehyde. After two days in the fixative, tissues were dehydrated and embedded according to the protocol proposed by Pereira et al. (2010). Sectioning was performed using a microtome set at 6 μ m section thickness. Serial sections (“ribbons”) were collected and floated in a water bath (40 °C) to allow stretching. Mounting was performed after three dewaxing baths in xylene 100% (two minutes each). Coverslips were mounted using Entellan mountant. No staining was utilized.

The deutocerebrum region has a pair of olfactory lobes (OL) which lie on each side of the brain. Each lobe has a large cluster of globuli cells called cluster 10 (OLCM-10), which is connected to OL by neurites (NT). Only sections containing the OL, NT, and OLCM-10 were utilized for quantification of neurolipofuscin.

Unstained sections were observed (100 x immersion oil) using an Olympus IX-81 microscope with fluorescence attachment (BX-FLA) set at blue (488 nm) excitation filter. Images were acquired using a Olympus DP-72 camera, and saved as grey scale files. For each section, the region with the most conspicuous neurolipofuscin accumulation was selected and an image was acquired. Six sections were acquired per sample. The estimation of neurolipofuscin concentration (area fraction, in %) for each section was obtained from the ratio between the number of pixels occupied by lipofuscin granules and total number of pixels of the image. Image analysis was performed using GNU Image Manipulation Program (GIMP), in which a variable grey scale threshold level was applied to select pixels with the brightest values which represent lipofuscin granules. Neurolipofuscin quantity was expressed as percentage volume (% vol.) using a geometric weighted average of the area fractions (Sheehy et al., 1998).

2.6 Statistical analyses

For metabolic rate and LPO, a two-way ANOVA was performed considering factors time (t7, t14, and t49) and group (control and treatment). As LPO data did not comply with ANOVA assumptions, an extension of the Kruskal-Wallis test (Scheirer-Hay-Hare test) was applied (Sokal and Rohlf, 1995). Pos-hoc comparisons were carried out using either Tukey (parametric) or Mann-Whitney, with Holm-Bonferroni correction, for pair-wise comparisons (non-parametric).

Neurolipofuscin data was compared by a T test, as data were obtained only at t49 for control and treatment groups. Average CW among t7, t14 and t49, and between treatments was compared using a ANOVA two way.

For ROS and ACAP, measurements were performed temporally as the remaining measurements. Since there is no standard or baseline values for this measurements, time was not considered a factor in the analysis because different analytical methodologies were employed for these determinations at each time. In the sense, ROS and ACAP data was statistically analysed using Mann-Whitney tests, as these variables did not presented normal distribution.

In all analyses, significance level adopted was 0.05, which was accordingly decreased when Holm-Bonferroni correction was utilized for pair-wise comparisons.

3. Results:

3.1 Oxygen Consumption

Regarding the metabolic rate (Fig. 1), no significant interaction was found between time and group ($p = 0.12$). No significant difference was found in the metabolic rate between groups ($p = 0.15$). However, time was significant ($p < 0.05$) as $t14 < t7 =$

t49.

3.2 Reactive oxygen species (ROS) - Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)

Regarding ROS and ACAP (Fig. 2), no significance was found between groups ($p = 0.63$ and 0.97 respectively, Mann-Whitney Test).

3.3 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation (Fig. 3) did not differ between groups ($p = 0.26$). Interaction was not significant ($p = 0.30$). However, time was a significant factor ($p < 0.001$), and post-hoc comparison indicated that all pair-wise comparisons were significant, being $t_{14} < t_7 < t_{49}$ ($p < 0.001$, Mann-Whitney Test with Holm-Bonferroni correction).

3.4 Neurolipofuscin and Carapace width:

No statistical difference was found in neurolipofuscin concentration (Fig. 4) between groups ($p = 0.40$). Carapace width did not differ between groups ($p = 0.69$), but time was significant ($p < 0.001$). Average CW at t_7 was 3.16 ± 0.12 mm, while the at t_{49} the average was 4.14 ± 0.22 mm. Interaction was not significant ($p = 0.22$).

4. Discussion

Since the establishment of reliable microscope-based quantification methods for neurolipofuscin (Sheehy, 1989, 1990), studies on the potential of this age-pigment as a crustacean age determinant were able to demonstrate very significant relationships between neurolipofuscin concentration and chronological age in reared animals (Sheehy, 1990b, 1992; Belchier et al., 1998). Further developments intending to quantify the effect of temperature (Sheehy et al., 1994) showed a significant positive relationship between environmental temperature and neurolipofuscin accumulation rate in crayfish. The effects of temperature on neurolipofuscin accumulation rate were also

modelled in wild *Homarus gammarus* populations resulting in an equation to correct neurolipofuscin accumulation rate for spatial and temporal variations in the average sea temperature (Sheehy and Bannister, 2002).

Sheehy et al. (1998), Bluhm and Brey (2001) and Bluhm et al. (2001) successfully used neurolipofuscin to resolve age groups in wild populations, which opened up new possibilities for use of the method where there was no captive or tagged known-age calibration material. This is the situation of *C. sapidus*, in which captive rearing would be difficult to reproduce - if not impossible - the precise thermal regime occurring in nature, and, in the case of this estuarine-costal species, to reproduce the salinity regime imposed to these populations. Research has been done in the last few years to assess possible difficulties for age determination of *C. sapidus* using *in situ* quantification of neurolipofuscin. Previously it has been shown that brains could be used for neurolipofuscin quantification - and age determination - and that there is no bilaterally in the accumulation in brains (Pereira et al., 2010).

The rationale of the present investigation was to assess whether acclimation to salinity changes has effects on the accumulation of neurolipofuscin in the blue crab *C. sapidus*. Therefore, this investigation explored different physiological responses to salinity changes, with a straightforward application on the feasibility of this approach for age determination of *C. sapidus* in the wild.

4.1 Osmoregulation vs. Animal metabolic rate

Several investigations have described the physiological responses of crustaceans to salinity challenges (Péqueux, 1995; Leone et al., 2015). These studies have shown that acute and chronic responses of metabolic rates to changes in salinity are markedly distinct. For instance, acute increases in metabolic rate have been reported for *C.*

sapidus (Leffler, 1975) subjected to hypo-osmotic conditions. Similarly, simulation of circatidal variations in salinity (20-10-20 over a 24h period) showed an increased metabolic rate as an acute effect of salinity 10 (Findley et al., 1978). Such responses have been found in Caridae species as well (Allan, 2006; Via, 1986, 1987). Conversely, when crabs are acclimated to these hypo-osmotic media, metabolic rates return to the same controls levels (Leffer, 1975), indicating a compensation of this rate, and a no significant chronic increase of the metabolic rate, as it has been found in the present investigation.

Acute increases in metabolic rates could be explained on the grounds of processes related to the increase in activity of the enzyme $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. This enzyme activity on gill homogenates of *C. sapidus* (adult males) increases and reaches a peak six days after the transfer to hypo-osmotic media (Lovett et al. 2006). According to this authors, this increase in activity was related to the grow of the “*osmoregulatory patch*” which takes place because of the differentiation of either gas exchange cells or undifferentiated epithelial cells into ion-transporting cells. In the specific case of blue-crab juveniles, the higher activity of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ than in adults is explained by the larger relative surface of the gills, and the smaller than expected decrease of the permeability to water and ions. In this sense, the higher activity would compensate the small changes in permeability (Li et al., 2006).

Moreover, also in juvenile blue-crab, a smaller increase in activity of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ has been reported in posterior gills acclimated to hypo-osmotic conditions (Li et al., 2006). According to these authors, juveniles crabs keep high levels of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity even in sea water, while adults crabs showed a much higher increase in $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity in hypo-osmotic conditions. Therefore, the increase in activity found is higher in adults than in juveniles. This explains the absence of

differences in the metabolic rate demonstrated in our results. Based on the fact that the animals acclimatized under conditions of hyperactivity are already subject to high Na^+K^+ activity when transferred to a medium of hyposalines, they employed less energy for the remodeling of transporters that arrive at the absence of modulation of the total metabolism. In juveniles, this increase in activity is due to transcription up-regulation of this enzyme – and not an increase of the osmoregulatory patch –, which peaks at four days after transfer to hypo-osmotic conditions (Li et al., 2006). This up-regulation is also related to the alpha subunit of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, which is the main binding site of Na^+ and K^+ (Towle et al., 2001). The up-regulation of osmoregulatory genes typically occurs in hours, but the resulting protein activity is found days after the transfer to hypo-osmotic conditions (Towle et al., 2001; Havird et al. 2016; Lovett et al., 2006). Individuals of *C. sapidus* subject to hypo-saline shock show an increase in metabolic rate. On the other hand, the distinct chronic response – i.e., no increase in metabolic rate – could be explained by two reasons. The first is that the steadily high activity of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ in juveniles – even in sea water – would not allow the observation of significant increases in metabolic rates. The second would be that chronic increases in activity of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ and cellular differentiation would occur typically after one week, and the time frame of this experiment did not allow eventual differences to be detected.

4.2 Osmoregulation vs. ROS, ACAP, LPO, and neurolipofuscin accumulation

As discussed above, the costs of osmoregulation are linked to the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ roles in this process. In this sense, extra O_2 consumed for osmoregulation will inevitably lead to formation of higher amounts of ROS at mitochondrial level (Storey, 1996), which, if not counterbalanced by antioxidant defenses might lead to oxidative damage

as lipids peroxidation (Finkell, 2011) and lipofuscin formation (Brunk and Terman, 2002). In general, one would expect that hyposaline shock indirectly affected - through the metabolic rate - the increase in the production of ROS, leading to the generation of oxidative damages, such as LPO, that may result in the formation of lipofuscin.

In brachyurans, oxidative stress and the activation of antioxidants systems has been related with salinity fluctuations in tissues such as gills, muscles and hepatopancreas. For the Indo-Pacific mud crab, in animals acclimated to three salinities (10, 17 and 35), it has been observed a decrease in lipid peroxidation in hepatopancreas, abdominal muscle, and gills at salinity 10, when compared to salinity 35 (Paital and Chainy, 2010). Regarding ROS and total antioxidant capacity, the same authors found mixed results for H₂O₂ production, in which at salinity 10 higher amounts were reported for muscle, and smaller amount were reported for gills and hepatopancreas. Finally, total antioxidant activity showed a positive correlation with salinity (Paital and Chainy, 2010). Therefore, for a species which hyper-regulates at low salinity, is the high salinity that induced more oxidative stress (Paital and Chainy, 2010). Freire et al. (2011), subjecting the euryhaline crab *Callinectes danae* to salinity challenges (hyper and hypo), did not find any difference in lipid peroxidation in hepatopancreas, muscles and gills. This is a reflex of a higher constitutive antioxidant mechanisms. On the other hand, different results were found for the crab *Carcinus aestuarii* to hypo-osmotic conditions in which ROS levels were significantly higher in posterior gills and hemolymph probably due to increased activity of Na⁺K⁺ATPase (Rivera et al., 2016). As pointed out by Freire et al. (2011), there is no consensus in the literature regarding a pattern of the effects of salinity on the amounts of oxidative stress observed, as it depends on the species and the kind of treatments employed. However, to our knowledge, studies on salinity effects in brain oxidative stress in crab were inexistent.

Nevertheless, the no effect found in the present investigation is an important piece of information to contribute for this understanding. A consequence of the excess of ROS is oxidative damage, as lipid peroxidation happens because of the reaction of ROS and lipids from cellular membranes. Actually, in this investigation, it has been found the increment of the oxidative damage at 49 days – accrued as lipid peroxidation – in the brain of *C. sapidus*.

4.3 Neurolipofuscin accumulation in an oligohaline estuary – consequences on age determination methodology:

Salinity variation in this estuarine region in both spatial and temporal ranging from 0 to 25 along the year (Pereira et al., 2011). In this investigation, it has been addressed whether hypo-osmotic acclimation would affect metabolic rate, biochemical traits, and consequently neurolipofuscin accumulation, as the accumulation of this age pigment is closely related to oxidative metabolism (Tully et al., 2000). Therefore, if an increase in neurolipofuscin accumulation were observed, as a result of an increment of the metabolic rate, it would have important consequences for the applicability of this approach for age determination methodology.

The first and straightforward consequence of such effect would be the need to calibrate the method to incorporate salinity variations. Modelling the temperature effect on neurolipofuscin accumulation has been laborious, but it is viable (Sheehy, 2002), as seasonal variations in temperature are easier to predict, particularly for water bodies. However, salinity variations in estuarine regions like in the Patos Lagoon are difficult to predict. Salinity is dependent of the pluviosity and wind directions, and the approach of cold fronts has also an important influence, particularly in autumn and winter (Garcia, 1998; Moller and Fernandes, 2009). Therefore, an effect of salinity would

affect, in an unpredictable way, the significant positive relationship between chronological age and % vol. of neurolipofuscin described for many crustaceans (Fonseca et al., 2005).

Due to growth rate variability at the same chronological age, the separation of age groups using length-based methods can be quite subjective, as it is based on the assumption that size is coupled with age, which is often unreliable (Hilborn and Walter, 1992). On the other hand, the relationship between age and % vol. of neurolipofuscin – which typically does not change with the sex, as shown in the studies reviewed by Sheehy (2002) - is the cornerstone of the reliability of *in situ* quantification of neurolipofuscin as a method for crustacean age determination, and it is the main advantage of this approach when compared to traditional length-based methods applied for crustaceans (Fonseca and Sheehy, 2007). In this sense, the no significant effect of salinity variations applied in the present study on neurolipofuscin accumulation is a welcome finding for the applicability and reliability of this approach for age determination of individuals of *C. sapidus* in the wild. Although this, it cannot be discarded that a higher times exposure to salinity fluctuations would have different results when considering an animal with a life expectancy of 3-4 years.

5. Conclusion

Chronic hypoosmotic conditions did not elicit a significative changes in animal oxygen consumption and in the overall state of the oxidative damage in the brain. Moreover, finding no significative changes in the accumulation of the age-pigment neurolipofuscin reinforces the reliability of this approach for age determination in crustaceans inhabiting estuarine regions.

6. Acknowledgements

We would like to thank to Guilherme Martins Limberger, Lamia Marques Halal and Jéssica Albañil for the crab collection and analysis support. Authors would like to thank to Laboratory of Decapod Crustaceans (FURG) for the assistance with histological procedures. R.M. Martins received a fellowship from the Brazilian Agency - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. References

- Allan, E.L., Froneman, P.W., Hodgson, A.N., 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 337, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.06.006>
- Asmus, M.L., 1997. Coastal Plain and Patos Lagoon, in: Subtropical Convergence Environments. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 9–12. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60467-6_3
- 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. Freshw. Biol. 39, 439–446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00292.x>
- Bluhm, B.A., Brey, T., 2001. Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin. Mar. Biol. 138, 247–257. <https://doi.org/10.1007/s002270000458>
- Bluhm, B.A., Brey, T., Klages, M., Arntz, W.E., 2002. Occurrence of the autofluorescent pigment, lipofuscin, in polar crustaceans and its potential as an age marker, in: Ecological Studies in the Antarctic Sea Ice Zone. Springer

Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 251–258.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-59419-9_33

Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 611–619. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00959-0)

Calliari, L.J., Garcia, C.A.E., Niencheski, L.F., Baumgarten, M.G., Costa, C.S.B., Seeliger, U., Abreu, P.C., Odebrecht, C., Montú, M., Duarte, A.K., Gloeden, I.M., Bemvenuti, C.E., Santos, E.A., Bianchini, A., Sinque, C., Muelbert, J.H., Vieira, J.P., Castello, J.P., Vooren, C.M., Pinedo, M.C., 1997. Environment and Biota of the Patos Lagoon Estuary, in: Subtropical Convergence Environments. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 13–64. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60467-6_4

Castilho, P.C., Martins, I.A., Bianchini, A., 2001. Gill Na^+K^+ ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 256, 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00315-4)

Curtis, D. L., & McGaw, I. J. (2011). A Possible Feeding Control Mechanism in Dungeness Crabs During Hyposaline Exposure. *Journal of Crustacean Biology*, 31(2), 313–316. <https://doi.org/10.1651/10-3330>.

Ferreira, L.S., D’Incao, F., 2008. Crescimento de *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) no estuário da laguna dos Patos, RS, Brasil. *Iheringia. Série Zool.* 98, 70–77. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000100010>

- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Fonseca, D.B., Sheehy, M.R.J., 2007. Does size matter? A cautionary experiment on overoptimism in length-based bioresource assessment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 996–1008. <https://doi.org/10.1139/f07-076>
- Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.024>
- Garcia, C.A.E. (1998). Características hidrográficas. In: Seeliger, U.; Odebrecht.; Castello, J.P. Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande: Ecoscientia, p: 18-21.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186(1981), 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093)
- Havird, J.C., Mitchell, R.T., Henry, R.P., Santos, S.R., 2016. Salinity-induced changes in gene expression from anterior and posterior gills of *Callinectes sapidus* (Crustacea: Portunidae) with implications for crustacean ecological genomics. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 19, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.06.002>
- Hilborn, R., Walters, C.J. 1992. Analysis of body size and growth data. In: Quantitative Fisheries Stock Assessment: choice, dynamics & uncertainty, pp. 410-433.

London: Chapman & Hall.

Ju, S., Secor, D., Harvey, H., 2001. Growth rate variability and lipofuscin accumulation rates in the blue crab *Callinectes sapidus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 224, 197–205.

<https://doi.org/10.3354/meps224197>

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. [https://doi.org/10.1016/S0167-4943\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4943(02)00005-5)

Kennedy, V.S. & Cronin, L.E. 2007. The blue crab *Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant College, EUA. 774p

Lacerda, T.P., Sawaya, P., 1986. Effects of hypo-osmotic conditions on haemolymph glucose concentration in *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol. 85, 509–512.

[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90438-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90438-X)

Leffler, C. W. (1975). Ionic and Osmotic Regulation and Metabolic Response To Salinity Of Juvenile *Callinectes sapidus* Rathbun. Comp. Biochem. Physiol. 1975. Vol. 52A. Pp. 545 to 549. Pergamon Press. Printed in Great Britain IONIC, 545–549. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(75\)80079-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(75)80079-x)

Leone, F.A., Garçon, D.P., Lucena, M.N., Faleiros, R.O., Azevedo, S. V., Pinto, M.R., McNamara, J.C., 2015. Gill-specific Na⁺ K⁺ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-salinity acclimation of the ornate blue crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 186, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.04.010>

- Li, T., Roer, R., Vana, M., Pate, S., Check, J., 2006. Gill area, permeability and Na^+K^+ ATPase activity as a function of size and salinity in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol. 305A, 233–245. <https://doi.org/10.1002/jez.a.248>
- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M., Towle, D.W., 2006. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the Blue Crab *Callinectes sapidus*. Biol. Bull. 210, 132–139. <https://doi.org/10.2307/4134602>
- Matthews, T.R., Derby, C.D., Maxwell, K.E., Bertelsen, R.D., 2015. Age determination method using neuropeptide fuscinate: A reply to Buesa. New Zeal. J. Mar. Freshw. Res. 49, 497–502. <https://doi.org/10.1080/00288330.2015.1095772>
- McGaw, I.J., Reiber, C.L., Guadagnoli, J.A., 1999. Behavioral physiology of four crab species in low salinity. Biol. Bull. 196, 163–176. <https://doi.org/10.2307/1542562>
- Neufeld, G.J., Holliday, C.W., Pritchard, J.B., 1980. Salinity adaption of gill Na^+K^+ in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211, 215–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1402110210>
- Norse, E.A., 1978. An experimental gradient analysis: hyposalinity as an “upstress” distributional determinant for caribbean portunid crabs. Biol. Bull. 155, 586–598. <https://doi.org/10.2307/1540792>
- Oliveira, A., Pinto, T. K., Santos, D. P. D., & D’Incao, F. (2006). Dieta natural do siri-azul *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 96(3), 305–313. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000300006>

- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.007>
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2012. Effects of salinity on O₂ consumption, ROS generation and oxidative stress status of gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.08.009>
- Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60. <https://doi.org/10.1163/193724095X00578>
- Pereira, C.R., D’Incao, F., Fonseca, D.B., 2010. Bilateral comparison of in situ neurolipofuscin accumulation in *Callinectes sapidus* caught in the wild. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 90, 563. <https://doi.org/10.1017/S0025315409990725>
- Porta, E.A., 2002. Pigments in aging: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02083.x>
- Puckett, B.J., Secor, D.H., Ju, S.-J., 2008. Validation and application of lipofuscin-based age determination for Chesapeake Bay blue crabs *Callinectes sapidus*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 137, 1637–1649. <https://doi.org/10.1577/T07-278.1>
- Rivera-Ingraham, G. A., Barri, K., Boe I, M., Farcy, E., Charles, A.-L., Geny, B., & Lignot, J.-H. (2016). Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *Journal of Experimental Biology*, 219(1), 80–89. <https://doi.org/10.1242/jeb.128595>

- Rodrigues, M. A., & D’Incao, F. (2008). Comparação do crescimento entre *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) coletados em campo e mantidos em condições controladas. *Iheringia. Série Zoologia*, 98(3), 372–378. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000300012>
- Rodrigues, A.P., Oliveira, P.C., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2012. Effects of salinity stress on neurotransmission, energy metabolism, and anti-oxidant biomarkers of *Carcinus maenas* from two estuaries of the NW Iberian Peninsula. *Mar. Biol.* 159, 2061–2074. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1992-8>
- Seeliger, U., Costa, C.S.B., Abreu, P.C., Bemvenuti, C.E., Capítoli, R.R., 1997. Energy Flow and Habitats in the Patos Lagoon Estuary, in: *Subtropical Convergence Environments*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60467-6_5
- Sheehy, M.R.J, 1990. Individual variation in, and the effect of rearing temperature and body size on, the concentration of fluorescent morphological lipofuscin in the brains of freshwater crayfish, *Cherax cuspidatus* (Crustacea: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 96, 281–286. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90693-M](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90693-M)
- Sheehy, M.R.J., Bannister, R.C.A., 2002. Year-class detection reveals climatic modulation of settlement strength in the European lobster, *Homarus gammarus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1132–1143. <https://doi.org/10.1139/f02-083>
- Sheehy, M.R.J., 1989. Crustacean brain lipofuscin: an examination of the morphological pigment in the fresh-water crayfish *Cherax cuspidatus* (Parastacidae). *J. Crustac. Biol.* 9, 387. <https://doi.org/10.2307/1548562>

- Sheehy, M.R.J., 1990. Potential of morphological lipofuscin age-pigment as an index of crustacean age. *Mar. Biol.* 107, 439–442.
<https://doi.org/10.1007/BF01313426>
- Sheehy, M.R.J., 1992. Lipofuscin age-pigment accumulation in the brains of ageing field- and laboratory-reared crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) (Decapoda: Parastacidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 161, 79–89.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90191-C](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90191-C)
- Sheehy, M.R.J., 2002. Role of environmental temperature in ageing and longevity: insights from neuroliofuscin. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34, 287–310.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(01\)00216-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(01)00216-3)
- Sheehy, M.R.J., Caputi, N., Chubb, C., Belchier, M., 1998. Use of lipofuscin for resolving cohorts of western rock lobster (*Panulirus cygnus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 925–936. <https://doi.org/10.1139/f98-016>
- Sheehy, M.R.J., Greenwood, J.G., Fielder, D.R., 1994. More accurate chronological age determination of crustaceans from field situations using the physiological age marker, lipofuscin. *Mar. Biol.* 121, 237–245.
<https://doi.org/10.1007/BF00346731>
- Siebers, D., Leweck, K., Markus, H., Winkler, A., 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar. Biol.* 69, 37–43.
<https://doi.org/10.1007/BF00396958>
- Sohal, R.S., Allen, R.G., 1986. Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2, 117–160.
[https://doi.org/10.1016/S8755-9668\(86\)80026-6](https://doi.org/10.1016/S8755-9668(86)80026-6)
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1995. *Biometry: the principles of statistics in biological research*. Freeman and Company USA (3) ed 850pp.

- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1996). Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 365–386. <https://doi.org/DOI10.1146/annurev.ecolsys.27.1.365>
- Terman, A., Brunk, U.T., 1998. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106, 265–276. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x>
- Towle, D.W., Paulsen, R.S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., 2001. Na⁺K⁺ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of alpha-subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* 204, 4005–4012.
- Tully, O., O'Donovan, V., & Fletcher, D. (2000). Metabolic rate and Lipofuscin Accumulation in Juvenile European Lobster (*Homarus gammarus*) in Relation to Simulated Seasonal Changes in Temperature. *Marine Biology*, 137, 1031–1040.
- Via, G.J.D., 1987. Salinity responses in brackish water populations of the freshwater shrimp *Palaemonetes antennarius*—I. Oxygen consumption. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 87, 471–478. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90153-8)
- Via, G. J.D., 1987. Effects of salinity and temperature on oxygen consumption in a freshwater population of *Palaemonetes antennarius* (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 88, 299–305. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90487-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90487-7)
- Williams, A.B., 1973. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). *Fish. Bull.* 72, 685–798.

Table I. Relative mean \pm SE of ROS and ACAP measurements. In all comparisons, no significance was found between control and treatment.

		ROS (%)	ACAP (%)
7 days	Control	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.15
	Treatment	2,87 \pm 0.82	0.54 \pm 0.17
14 days	Control	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.12
	Treatment	0.98 \pm 0.11	0.46 \pm 0.10
49 days	Control	1.00 \pm 0.36	1.00 \pm 0.60
	Treatment	0.47 \pm 0.10	0.44 \pm 0.16

8. FIGURES

Figure 1

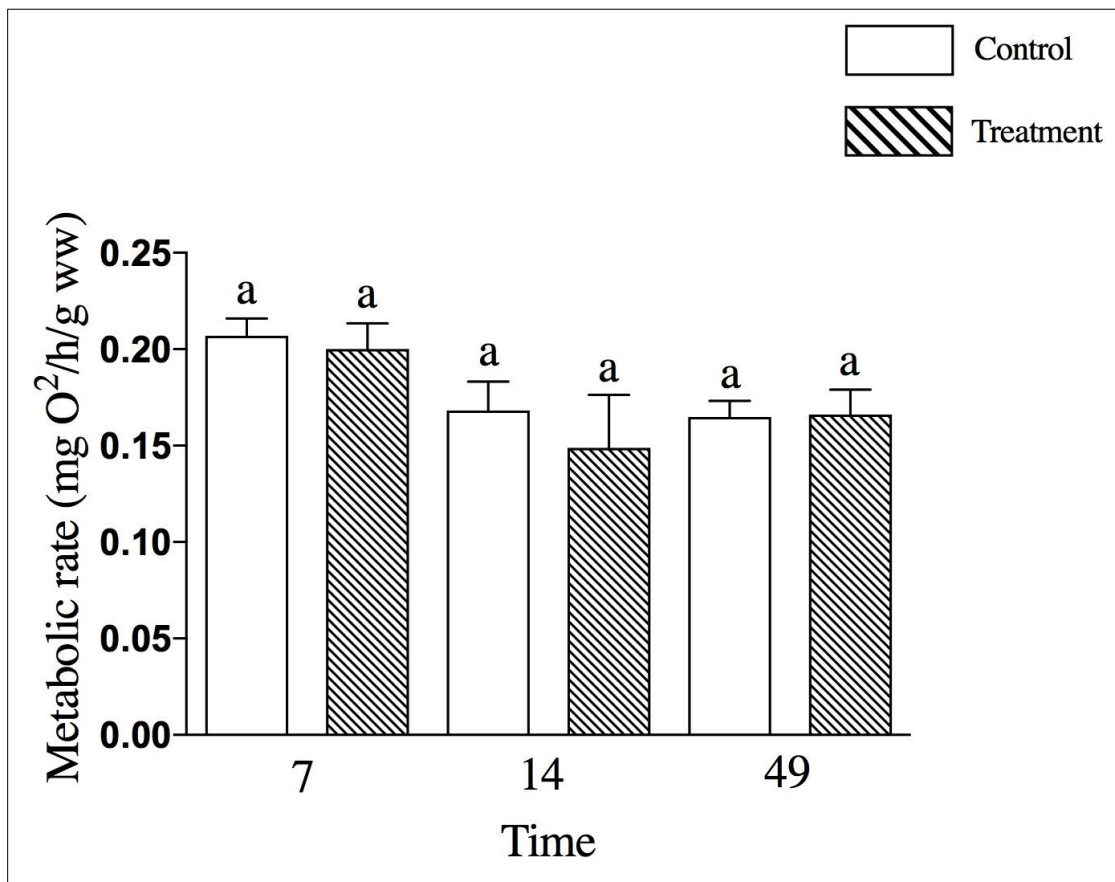


Figure 2

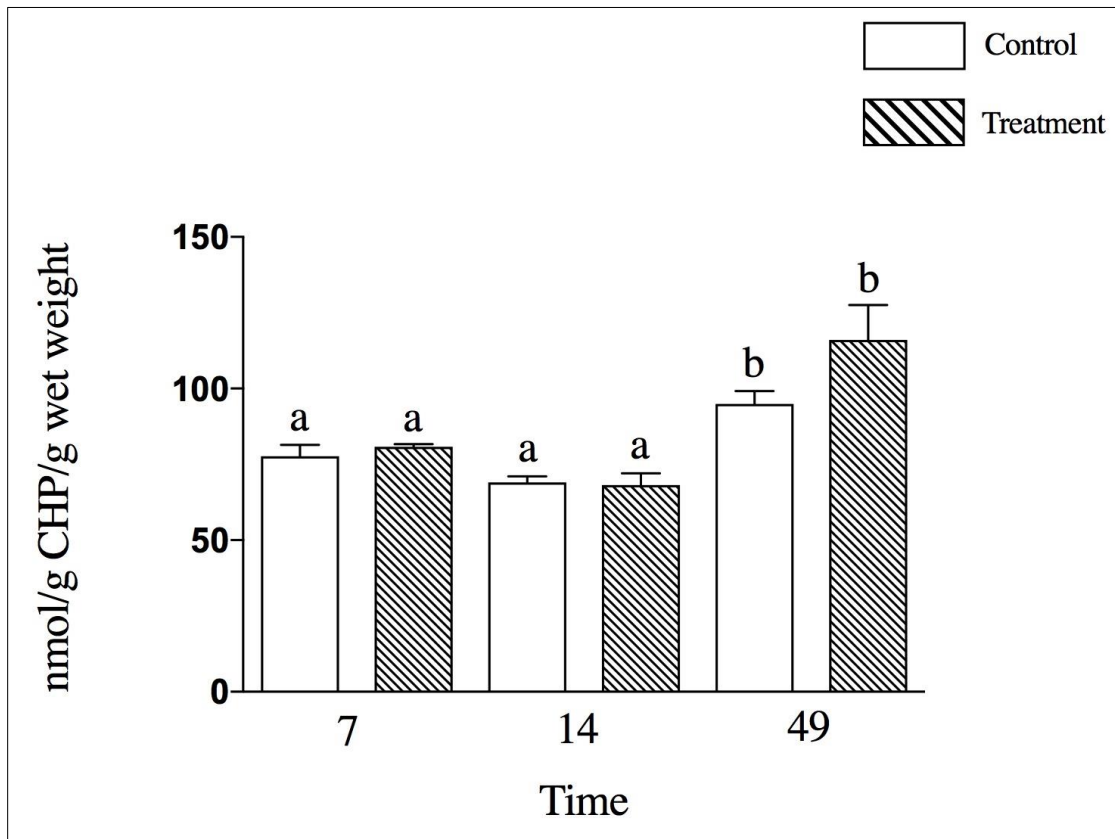
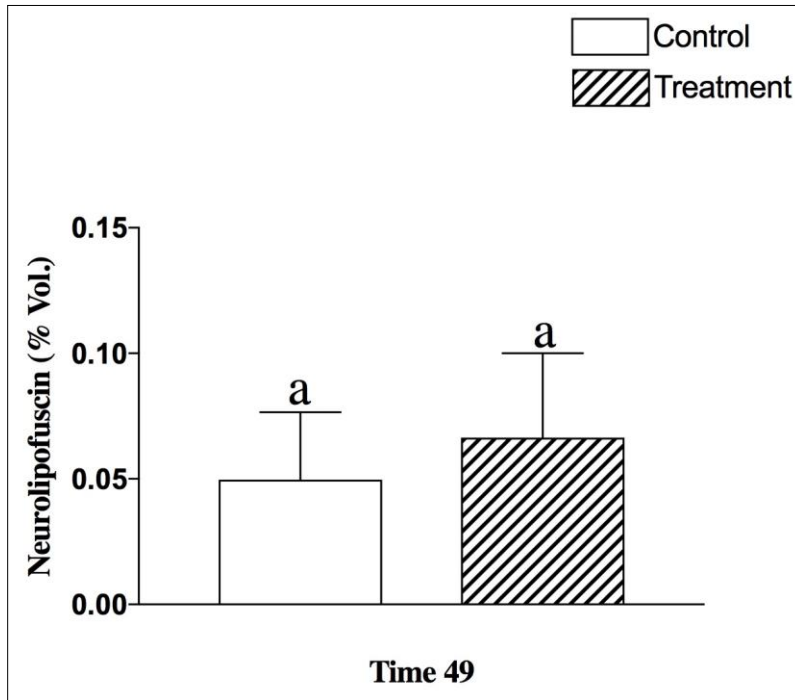


Figure 3



9. TABLES

Table I: Relative mean \pm SE of ROS and ACAP measurements. In all comparisons, no significance was found between control and treatment.

10. FIGURE LEGENDS

Figure 1: Oxygen consumption of *Callinectes sapidus* exposed to salinity variations in diferentes times 7d, 14d and 49d. Data are expressed as means \pm standard error ($p > 0.05$).

Figure 2: Lipid hydroperoxide levels – at t7, t14 and t49 - in the brain of juveniles of *Callinectes sapidus* exposed to two salinity regimes (Control, constant; Treatment, varying). Data are expressed as means \pm standard error. Different letters means statistical significance ($p < 0.05$).

Figure 3: Neurolipofuscin concentration in MC 10 of *Callinectes sapidus* submitted to salinity variations during 49 days. Data are expressed as means \pm standard error. Different letters means statistical significance ($p < 0.05$).

2. DISCUSSÃO GERAL

Muitos estudos direcionados sobre a utilização da lipofuscina (LF) como um método para determinação etária em crustáceos, verificaram a existência de relações significativas entre o volume acumulado, *in situ*, de LF e idade cronológica (Sheehy, 1990b, 1992; Belchier et al., 1998). Além disto, sabe-se que a temperatura é positivamente correlacionada com a quantidade de pigmento encontrado em tecido nervoso em populações da lagosta europeia, o que resultou em uma equação para corrigir a taxa de acúmulo de lipofuscina em relação a variações espaciais e temporais da temperatura média do mar (Sheehy e Bannister, 2002). O método de quantificação de lipofuscina para determinar idade de indivíduos em populações no ambiente, revelou novas perspectivas referentes a utilização desta ferramenta, principalmente para grupos em que não há conhecimento da idade cronológica ou espécies em que o desenvolvimento em laboratório torna-se difícil, como ocorre com o siri-azul *C. sapidus* (Sheehy et al., 1998; Bluhm e Brey, 2001; Bluhm et al., 2001). Nos últimos anos, pesquisas têm sido elaboradas afim de determinar a idade de *C. sapidus* através da quantificação de lipofuscina *in situ* e foi verificado que o tecido nervoso – tanto o cérebro quando o pedúnculo ocular – pode ser utilizado para a quantificação de LF em indivíduos desta espécie (Pereira et al., 2010). Tendo em vista esta linha de raciocínio, visamos avaliar se a aclimação à variações de salinidade ocasionaria efeitos sobre o conteúdo de neurolipofuscina no siri azul. Assim, buscamos explorar diferentes respostas fisiológicas às alterações de salinidade, visando a aplicação direta desta abordagem na determinação etária de *Callinectes sapidus* no ambiente

3.1 Osmorregulação vs. Taxa metabólica

De forma experimental, foi verificado que várias espécies de crustáceos submetidas à choques salinos apresentam aumentos significativos na taxa metabólica

total (Via, 1986, 1987; Allan, 2006). Durante o processo de osmorregulação são utilizados mecanismos responsáveis pela manutenção do meio interno que requerem energia na forma de ATP. Esta demanda por ATP, acarreta no aumento do consumo de oxigênio, refletido na taxa metabólica do animal. A regulação da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é um dos principais mecanismos envolvidos neste processo, sendo responsável pelo transporte ativo de Na^+ e K^+ que conduzem a regulação da osmolaridade do meio interno do organismo (Luco e Towle, 2003; Lovett et al., 2006). Em nosso estudo, observamos que a transferência dos animais para condições hiposalinas não acarretaram diferenças significativas no metabolismo total. No entanto, um estudo realizado com juvenis de *C. sapidus* demonstrou aumento na expressão de genes envolvidos nos processos osmorregulatórios, principalmente os que codificam a subunidade α da proteína $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, principal sítio de ligação dos íons Na^+ e K^+ (Towle, 2001). Isto sugere que a necessidade de energia requerida para manutenção das bombas seja aumentada, levando a possíveis alterações no metabolismo total. Em machos adultos de *C. sapidus* Lovett (2006) também relatou, a modulação da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ durante a exposição a condições hiposalinas. Como resposta, foi observado o aumento de células transportadoras de íons – células ricas em mitocôndrias – sendo que este aumento na quantidade de células transportadoras de íons foi refletido no aumento da atividade enzimática. O aumento observado no número de células ricas em mitocôndrias foi atribuído ao processo de diferenciação celular, em que células epiteliais indiferenciadas e células responsáveis por trocas gasosas diferenciaram-se em células transportadoras de íons (Lovett, 2006). As diferenças entre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ também foi observada em brânquias de juvenis e adultos de *C. sapidus*, de modo que a atividade enzimática nas brânquias de juvenis foi superior a atividade observada nas brânquias de siris adultos (Li et al.,

2006). Estes resultados indicam que animais pequenos apresentam maior área relativa de superfície branquial e somente a permeabilidade da membrana não seria suficiente para manutenção em meio hipo-osmótico, desta forma, levando a necessidade de maior atuação dos transportadores a fim realizar a manutenção do equilíbrio osmótico. Adicionalmente, este trabalho registrou que o aumento da atividade da enzima em juvenis é produto super-regulação da transcrição e não por processos de diferenciação celular, como ocorre em animais adultos (Li et al., 2006). Ainda referente a este estudo, os autores registraram que juvenis de siri azul apresentam alta atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ mesmo em condições hiper-salinas, padrão diferente do que o encontrado em animais adultos que têm a atividade enzimática aumentada em condições hiposalinas. Esta informação é de fundamental relevância para justificar a ausência de diferenças na taxa metabólica registradas em nossos resultados. Já que não obtivemos alterações no metabolismo total do animal e diante do exposto acima, nossos resultados podem ser justificados pela estabilidade da Na^+K^+ ao decréscimo de salinidade.

3.2 Osmorregulação vs. ROS, ACAP, LPO e acúmulo de neurolipofuscina

Como discutido acima, os custos energéticos da osmorregulação estão relacionados principalmente com a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, que necessita de energia na forma de ATP para cumprir seu papel fisiológico de manutenção osmótica. Durante o processo de respiração celular nem todo O_2 é utilizado de forma eficiente na fosforilação oxidativa, podendo resultar na formação de EAO a nível mitocondrial (Storey, 1996) que caso não sejam contrabalanceados pela ação de defesas antioxidantes, podem levar a danos oxidativos como a peroxidação lipídica (Finkel, 2011) que pode influenciar na formação de lipofuscina (Brunk and Terman, 2002a). Em crustáceos, o estresse oxidativo e sistema de defesas antioxidantes têm sido estudados

em relação a respostas aos efeitos da variação de salinidade em tecidos tais como, brânquias, músculos e hepatopâncreas. Nossos resultados não demonstraram alterações nos níveis de ROS e ACAP no tecido nervoso de animais expostos a variação de salinidade. Estudos realizados com o caranguejo *Scylla serrata* submetido a variações de salinidade (10-17-35) revelaram que o tecido muscular apresenta maior quantidade de H₂O₂ quando comparado com brânquias e hepatopâncreas. Os resultados de ROS encontrados pelos autores está de acordo com os encontrados para capacidade antioxidante, revelando uma correlação entre eles. Neste mesmo trabalho foi observado um decréscimo na peroxidação lipídica em hepatopâncreas, músculo abdominal e brânquias em salidade baixa, sendo este resultado possivelmente atribuído ao fato de que as defesas antioxidantes tenham sido ativadas resultando na redução de LPO nestes tecidos (Paital e Chainy, 2010). Em nossos resultados, os níveis de LPO não demonstraram alterações mediante a variação salina, bem como a ausência de alterações na capacidade antioxidante. Porém, para espécies hiper-reguladoras em águas hiposalinas, a água salgada é considerada o maior gerador de estresse oxidativo, segundo Paital e Chainy (2010). *Callinectes danae* submetidos a variações de hiper e hipo salinidade não apresentaram diferenças significativas na peroxidação lipídica em hepatopâncreas, músculos e brânquias (Freire et al., 2011). Já em *Carcinus aestuarii* submetidos a condições hiposmóticas, os resultados demonstraram aumento significativo nos níveis de ROS nas brânquias posteriores e na hemolinfa devido ao aumento da atividade Na⁺K⁺ATPase (Rivera et al., 2016). De acordo com Freire et al. (2011), a literatura não apresenta um consenso a respeito de um padrão que seja consistente a respeito dos efeitos da salinidade sobre o estresse oxidativo, pois estes fatores dependem da espécie estudada, do tratamento empregado e do tipo de tecido avaliado, pois as respostas podem não ser similares, podendo ser diferente para cada

caso. À vista disto, os resultados do nosso trabalho fornecem informações importantes para o entendimento dos efeitos da salinidade na produção de danos oxidativos em um tecido até então não considerado, o tecido nervoso.

3.3 Acumulação de neurolipofuscina em um estuário oligohalino – consequências para a metodologia de determinação de idade:

A variação de salinidade dentro do estuário pode ser observada espacial e temporalmente podendo ser encontrados valores que oscilam de 0 a 25 ao longo do ano (Pereira et al., 2011). No presente estudo, buscamos identificar se choques hiposalinos levariam a alterações no conteúdo de LF acumulada no tecido nervoso, partindo da premissa de que o processo de formação de lipofuscina esteja relacionado com o metabolismo oxidativo (Tully et al., 2000). Nossos resultados mostraram que o acúmulo de neurolipofuscina não foi modulado pela variação de salinidade. Portanto, se um aumento no acúmulo de neurolipofuscina fosse observado, como resultado de um incremento da taxa metabólica, isso teria importantes consequências para a aplicabilidade dessa abordagem na metodologia de determinação da idade. A primeira e direta consequência seria a necessidade de calibrar o método para incorporar variações de salinidade. No estuário da Lagoa dos Patos, a variação de temperatura de águas rasas é conhecida - no inverno, 9-18 ° C; no verão, 25-28 ° C - (Calliari et al., 1997). No entanto, as variações de salinidade em regiões estuarinas, como na Lagoa dos Patos, são difíceis de prever. A salinidade é dependente da pluviosidade e das direções do vento, e a entrada das frentes frias também tem uma influência importante, particularmente no outono e inverno (Garcia, 1998; Moller e Fernandes, 2009). Utilizando nossa região como exemplo, nos últimos anos, um ambiente de águas salobras a oligohalino é o que tem sido observado na região estuarina da Lagoa dos

Patos, pois a salinidade média foi inferior a 10 em 2013 e 2014 (9,37 e 5,93, respectivamente), e um pouco acima deste valor (13,78) em 2015. Embora não haja informações publicadas sobre a salinidade para 2016 e 2017, a precipitação foi bastante alta - particularmente em 2016, um ano de El Niño - resultando em um estuário oligohalino, típico quando El Niño é observado (Calliari et al., 1997). De fato, a condição oligohalina do estuário foi presenciada durante as amostragens. Essas variações de salinidade seriam virtualmente impossíveis de incorporar nos modelos de taxa de acumulação de neurolipofuscina. Portanto, um efeito de salinidade afetaria, de forma imprevisível, a relação positiva significativa entre a idade cronológica e o % vol. de neurolipofuscina descrito para muitos crustáceos (Fonseca et al., 2005). Esta relação é o pilar da confiabilidade da quantificação *in situ* da neurolipofuscina como um método para a determinação da idade dos crustáceos, sendo esta a principal vantagem desta abordagem quando comparada aos métodos tradicionais de comprimento aplicados aos crustáceos (Fonseca et al., 2005; Sparre e Venema, 1998). Nesse sentido, o efeito não significativo das variações de salinidade no acúmulo de neurolipofuscina é um achado pertinente para a aplicabilidade e confiabilidade desta metodologia para determinação da idade de indivíduos de *C. sapidus* em populações de habitando regiões estuarinas.

3. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo, concluímos que condições hiposmóticas empregadas no presente estudo não ocasionaram mudanças significativas no consumo de oxigênio do animal e não levaram alterações oxidativas no cérebro do siririz azul *Callinectes sapidus*.

Desta forma, a ausência de mudanças significativas no conteúdo de neurolipofuscina acumulada reforça a confiabilidade desta metodologia para a determinação de idade em crustáceos que habitam regiões estuarinas.

4. REFERÊNCIAS:

- Allan, E.L., Froneman, P.W., Hodgson, A.N., 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 337, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.06.006>
- Asmus, M.L., (1997). Coastal Plain and Patos Lagoon, in: Subtropical Convergence Environments. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 9–12.
- 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 Biology, 39(3), 439–446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00292.x>
- Bemvenuti, C.E., Capitoli, R. R & Gianuca, N. M. (1978). Estudos de Ecologia Bentônica na Região Estuarial da Lagoa dos Patos. Rio Grande: Atlântica, 3: 23-32.
- Bluhm, B.A., Brey, T., 2001. Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin. Mar. Biol. 138, 247–257. <https://doi.org/10.1007/s002270000458>

- Bluhm, B.A., Brey, T., Klages, M., Arntz, W.E., 2002. Occurrence of the autofluorescent pigment, lipofuscin, in polar crustaceans and its potential as an age marker, in: Ecological Studies in the Antarctic Sea Ice Zone. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 251–258. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59419-9_33
- Bonilha, L.E. (1996). Modelo ecológico da coluna d'água do estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) MELP: Uma abordagem sistêmica e integrada. Dissertação de Mestrado, Curso de Oceanografia Biológica, Fundação Universidade do Rio Grande, RS, Brasil, 274p.
- Brunk, U.T., & Terman, A. (2002). Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 611–619. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00959-0)
- Brunk, U.T., Jones, C. B., Sohal, R. S. (1992). A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 275, 395–403.
- Bulger, A.J., Hayden, B. P, Monaco, M. E, Nelson, D. M, McCormick – Ray, M. G. (1998). Biologically – Based Estuarine salinity zones derived from a Multivariate analysis. *Estuaries*. 16: 311-322
- Cargo, D.G. (1958) The migration of adult female blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun, in Chincoteague and adjacent Waters. *J Mar Res*, 16(3): 180-191
- Calliari, L.J., Garcia, C.A.E., Niencheski, L.F., Baumgarten, M.G., Costa, C.S.B., Seeliger, U., Abreu, P.C., Odebrecht, C., Montú, M., Duarte, A.K., Gloeden, I.M.,

- Bemvenuti, C.E., Santos, E.A., Bianchini, A., Sinque, C., Muelbert, J.H., Vieira, J.P., Castello, J.P., Vooren, C.M., Pinedo, M.C., 1997. Environment and Biota of the Patos Lagoon Estuary, in: Subtropical Convergence Environments. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 13–64. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60467-6_4
- D’Incao, F. (1991). Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. *Revista Atlântica*, 13: 159-169
- Ferreira, L.S., & D’Incao, F. (2008). Crescimento de *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) no estuário da laguna dos Patos, RS, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 98(1), 70–77. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000100010>
- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.024>
- Fonseca, D.B., Brancato, C. L., Prior, A. E., Shelton, P. M. ., & Sheehy, M. R. . (2005). Death rates reflect accumulating brain damage in arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1941–1948. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3192>

- Garcia, C.A.E. (1998). Características hidrográficas. In: Seeliger, U.; Odebrecht.; Castello, J.P. Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande: Ecoscientia, p: 18-21.
- González-Ortegón, E., Pascual, E., & Drake, P. (2013). Respiratory responses to salinity, temperature and hypoxia of six caridean shrimps from different aquatic habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.006>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186(1981), 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093)
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hartnoll, R.G. (2001). Growth in Crustacea - Twenty years on. *Hydrobiologia*, 449, 111–122. <https://doi.org/10.1023/A:1017597104367>
- Jolly, R.D., Douglas, B.V., Davey, P.M. (1995) Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. <https://doi.org/10.1159/000213750>
- Katz, M.L., & Robison, W. G. (2002). What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3), 169–184. [https://doi.org/10.1016/S0167-4943\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4943(02)00005-5)

- Leffler, C. W. (1975). Ionic and Osmotic Regulation and Metabolic Response To Salinity Of Juvenile *Callinectes Sapidus* Rathbun. *Comp. Bioche.i. Physiol.*. 1975.Vol. 52A. Pp. 545 to 549. Pergamon Press. Printed in Great Britain , 545–549. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(75\)80079-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(75)80079-x)
- Li, T., Roer, R., Vana, M., Pate, S., Check, J., 2006. Gill area, permeability and $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity as a function of size and salinity in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 305A, 233–245. <https://doi.org/10.1002/jez.a.248>
- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M., Towle, D.W., 2006. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 210, 132–139. <https://doi.org/10.2307/4134602>
- Mantel, L. H.; Farmer, L. L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L. H. (Ed), *The Biology of Crustacea – Internal Anatomy and Physiological Regulation*. New York. Academic Press (5), pp. 53- 161.
- Marques, W.C., Fernandes, E.H.L., & Rocha, L.A.O. (2009). Straining and advection contributions to the mixing process in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 116(3), 1–23. <https://doi.org/10.1029/2010JC006524>
- Marques, W.M. (1994). Estrutura da comunidade de peixes em enseadas protegidas do Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil). Monografia de graduação, Curso de oceanologia, Fundação Universidade do Rio Grande, Brasil, 58p.

- Oliveira, A., Pinto, T. K., Santos, D. P. D., & D’Incao, F. (2006). Dieta natural do siri-azul *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 96(3), 305–313. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000300006>
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.007>
- Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 15, 1–60. <https://doi.org/10.1163/193724095X00578>
- Pereira, N., Campos, B. R. De, & D’Incao, F. (2011). Estudo da salinidade e sua relação com as frentes frias e a pluviosidade no estuário da Lagoa Dos Patos. *Atlântica*, 33(2), 173–182. <https://doi.org/10.5088/atl.2011.33.2.173>
- Prosser, C. L., (1991). *Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology*. JohnWiley and Sons
- Rivera-Ingraham, G. A., Barri, K., Boe I, M., Farcy, E., Charles, A.-L., Geny, B., & Lignot, J.-H. (2016). Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *Journal of Experimental Biology*, 219(1), 80–89. <https://doi.org/10.1242/jeb.128595>
- Robert, M., & Gray, I. (1972). Enzymatic mechanisms during temperature acclimation of the blue crab, *Callinectes sapidus*-I. Oxygen consumption and activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase.

Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and, 42(3), 377–387. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(72\)90254-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(72)90254-4)

Rosas, C., Lazaro-Chaves, E., & Bückle-Ramirez, F. (1994). Feeding habits and Food niche segregation of *Callinectes sapidus*, *C. rathbunae*, and *C. similis* in a Subtropical Coastal Lagoon of the Gulf of Mexico., 14(2), 371–382. <https://doi.org/10.2307/1548915>

Sheehy, M.R.J, 1990. Individual variation in, and the effect of rearing temperature and body size on, the concentration of fluorescent morphological lipofuscin in the brains of freshwater crayfish, *Cherax cuspidatus* (Crustacea: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 96, 281–286. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90693-M](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90693-M)

Sheehy, M.R.J., Bannister, R.C.A., 2002. Year-class detection reveals climatic modulation of settlement strength in the European lobster, *Homarus gammarus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1132–1143. <https://doi.org/10.1139/f02-083>

Sohal, R.S., & Allen, R. G. (1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 2(1), 117–160. [https://doi.org/10.1016/S8755-9668\(86\)80026-6](https://doi.org/10.1016/S8755-9668(86)80026-6)

Storey, K.B., & Storey, J. M. (1996). Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 365–386. <https://doi.org/DOI.10.1146/annurev.ecolsys.27.1.365>

- Terman, A. (2001). Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? Redox Report, 6(1), 15–26.
<https://doi.org/10.1179/135100001101535996>
- Terman, A., & Brunk, U. T. (1998). Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 106(2), 265–276. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x>
- Towle, D.W., & Palmer, G. E. P. and J. L. H. Role of gill Na⁺K⁺dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. J. <https://doi.org/10.1002/jez.1401960306>
- Tully, O., O'Donovan, V., & Fletcher, D. (2000). Metabolic rate and lipofuscin accumulation in juvenile European Lobster (*Homarus gammarus*) in relation to simulated seasonal changes in temperature. Marine Biology, 137, 1031–1040.
- Van Engel, W.A. (1958). The blue crab and its fishery in Chesapeake Bay. Part. 1. Reproduction, early, development, growth, and migration. Commer Fish Rev 20(6), 6-17
- Via, G. J.D., 1987. Effects of salinity and temperature on oxygen consumption in a freshwater population of *Palaemonetes antennarius* (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol. 88, 299–305.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90487-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90487-7)
- Villwock, J.A., & Tomazelli, L. J. (1998). Geologia costeira do Rio Grande do Sul. Centro de Estudos de Geologia Costeira E Oceânica, 8, 1–45.

Williams, A.B. (1973). The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). Fishery Bulletin, 72(3), 685–798.