

Efeito da Temperatura na resposta fagocitária do caranguejo estuarino *Neohelice granulata* (Decapoda; Brachiura)

Ana Luiza Kalb, Luciano de Mello Silva, Ana Cristina Kalb, Pablo Elías Martínez

Introdução

Em crustáceos, animais ectotérmicos, as respostas autonômicas são rudimentares e de pouca significatividade termoregulatória. O sistema imunológico de crustáceos também tem suas respostas melhoradas com o aumento da temperatura, entretanto, este aumento ocorre como uma resposta comportamental e não fisiológica num processo conhecido como febre comportamental (Castelin & Reynolds, 1977, Castelin & Reynolds, 1980; Lagerspetz & Vainio, 2006).

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar as taxas de fagocitose em diferentes temperaturas para estabelecimento do protocolo de avaliação da fagocitose em lâmina utilizando hemócitos coletados da hemolinfa de caranguejos *Neohelice granulata*, cujo conhecimento da resposta fagocitária em diferentes temperaturas ainda é pouco. A metodologia visa o estabelecimento do método para a espécie, na avaliação de compostos tóxicos.

Metodologia

Os caranguejos da espécie *Neohelice granulata* foram coletados do plano de lama do estuário da Lagoa dos Patos, RS e aclimatados a 20°C na salinidade de 30S e fotoperíodo 12/12hs claro/escuro. Foram crioanestesiados por 5,5 minutos no freezer e a hemolinfa coletada com em seringa contendo 9 ml de solução anti-coagulante (Soderhal & Smith, 1983) a 0°C. A hemolinfa foi centrifugada em tubo Falcon a 800g durante 5 minutos a 4°C para lavagem dos hemócitos e remoção do anticoagulante sendo feita a ressuspensão em meio de cultura.

Foi feito um teste de viabilidade por exclusão do corante Tripán Blue 0,2% e as células foram contadas e ajustadas com solução fisiológica para crustáceos a uma concentração de 1×10^5 células.mL⁻¹. As lâminas foram colocadas em câmara úmida onde receberam 1ml da suspensão de células contendo 1×10^5 células.mL⁻¹ e incubadas, posteriormente na estufa numa temperatura de 20°C por 1 hora para adesão dos hemócitos na lâmina.

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram autoclavadas durante 15 minutos em solução corante Vermelho Congo (0,8% p/v). Após a ressuspensão das leveduras as mesmas foram contadas e ajustadas a 1×10^7 células.mL⁻¹. Passada 1 hora da incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica de crustáceos e, sobre elas, foi colocado o volume de 1 ml de leveduras ressuspensas em solução fisiológica. As lâminas foram incubadas mais uma vez nas temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, durante 1 hora para avaliação da atividade fagocitária nestas diferentes temperaturas.

Após a incubação, as laminae foram lavadas com solução fisiológica e fixadas com páraformaldeído 4% para fixação das células, durante 15 minutos.

Um dia após a fixação das células as mesmas foram coradas em Giemsa (10% v/v) e contou-se o número de fagocitoses em cada uma das laminae considerando as leveduras maiores de 4µM fagocitadas. No total foram feitas 30 laminae, 5 de cada temperatura analisadas estatisticamente em software Statistica 7.0 quanto as suas diferenças significativas.

Resultados e Discussão

Foram atendidos os pré-requisitos da análise de variância observando-se que a probabilidade das médias das taxas de fagocitose serem iguais foram significativamente baixas ($p < 0,05$), apresentando diferenças significativas também na análise *a posteriori* de Newman-Keuls (**Fig. 1**) entre o grupo das temperaturas de 5°, 20°, 25° e 30°C que foram semelhantes entre si e o grupo das temperaturas de 10° e 15°C também semelhantes entre si. A semelhança significativa entre a resposta fagocitária dos hemócitos do caranguejo estuarino *N. granulata* entre a temperatura de 5° e as temperaturas de 20°, 25° e 30°C podem estar associadas com as características do animal nos períodos de baixas temperaturas no estuário da Lagoa dos Patos, representando uma possível estratégia de proteção pelo aumento da atividade do sistema imunológico nos períodos de baixas temperaturas.

Conclusão

As temperaturas ideais para incubação dos hemócitos do caranguejo *N. granulata* com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* no teste de fagocitose em lâmina foram as temperaturas de 20 e 25°C, entretanto as elevadas taxas de fagocitose a 5°C precisam de mais investigação para um melhor entendimento da resposta imune do caranguejo *N. granulata* em períodos de baixa temperatura na região estuarina da Lagoa dos Patos no extremo Sul do Brasil.

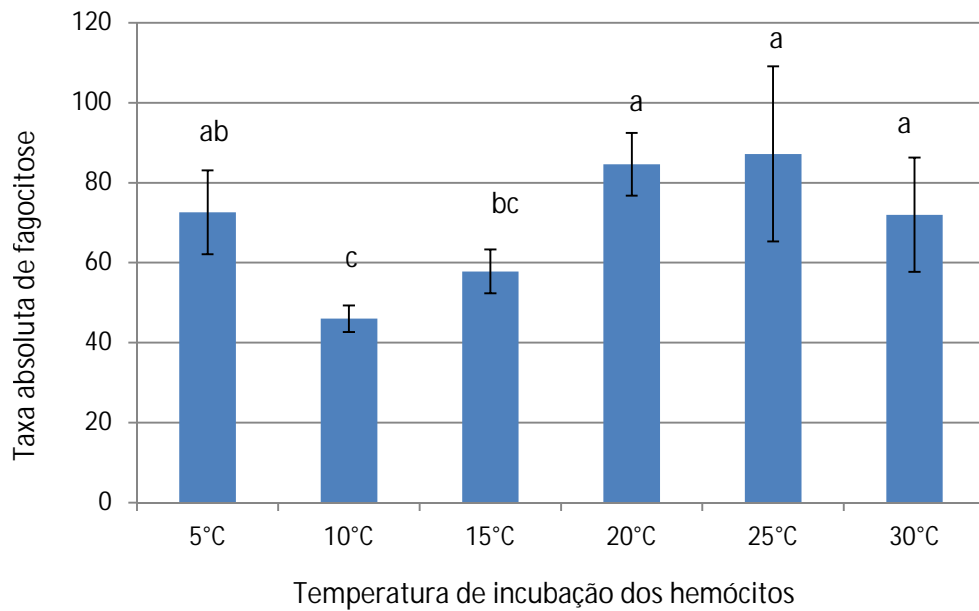


Figura 1. Taxas de fagocitose nas temperaturas de 5°, 10°, 15°, 20°, 25° e 30°C.

Referências

CASTERLIN, E. M. & REYNOLDS, W. W. Behavioral fever in Crayfish. **Hydrobiologia**. Vol 56-2, p. 99-101, 1977.

LAGERSPETZ, K. Y. H. & VAINIO L. A. Thermal behaviour of crustaceans. **Biological Reviews**. 81, p. 237-258, 2006.