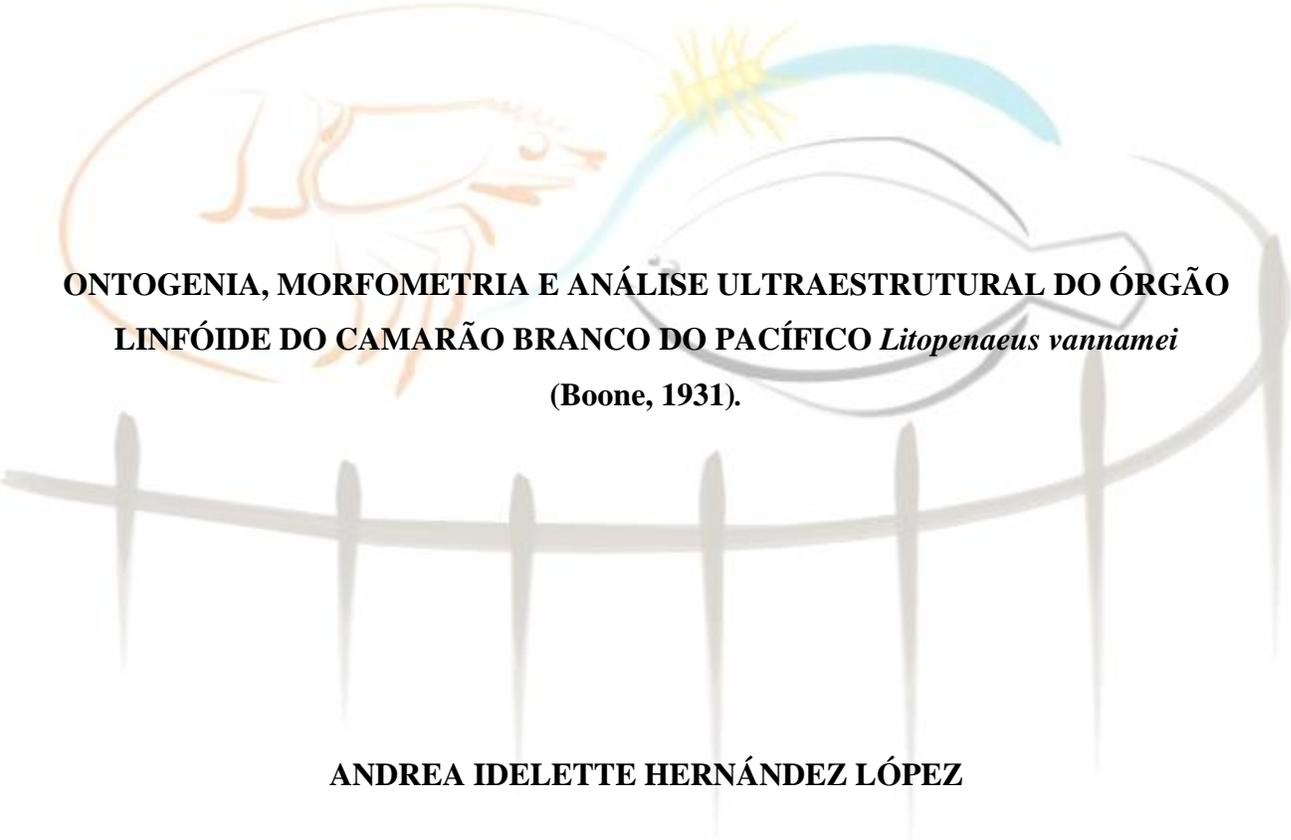




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

The background of the cover features a large, faint illustration. On the left, a shrimp is depicted in a light orange color. On the right, a fish is shown in a light blue color. The shrimp and fish are positioned as if they are interacting or in a close proximity. The entire illustration is set against a light, circular background that resembles a lens or a field of view.

**ONTOGENIA, MORFOMETRIA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO ÓRGÃO
LINFÓIDE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*
(Boone, 1931).**

ANDREA IDELETTE HERNÁNDEZ LÓPEZ

RIO GRANDE, RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

ONTOGENIA, MORFOMETRIA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO ÓRGÃO
LINFÓIDE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*
(Boone, 1931).

ANDREA IDELETTE HERNÁNDEZ LÓPEZ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa

Co-Orientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr

Rio Grande, RS

Fevereiro, 2019

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 CARCINICULTURA MARINHA	10
1.2 CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DO <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
1.3 ÓRGÃO LINFÓIDE	13
2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO I	20
1 INTRODUÇÃO	24
1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	26
1.2 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	29
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	29
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	30
3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
4 RESULTADOS	31
4.1 ONTOGENIA	32
4.2 EXPRESSÃO FENOTÍPICA DE CD68.....	34
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	40
7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO II	44
1 INTRODUÇÃO	48
1.1 SISTEMA BFT.....	47
2 OBJETIVOS	50

2.1	OBJETIVO GERAL	50
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1	LOCAL E INSTALAÇÕES.....	50
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	50
3.2.1	Sistema BFT (Bio-Floc Technology).....	51
3.2.2	Sistema Água clara.....	51
3.3	MATERIAL BIOLÓGICO	51
3.4	ANÁLISES EXPERIMENTAIS.....	52
3.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	52
3.6	ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	53
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS	54
4.2	DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	55
4.3	MORFOMETRIA DO ÓRGÃO LINFÓIDE	57
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8	CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias (\pm DP) valores máximos e mínimos dos parâmetros físicos e químicos dos tanques experimentais de ambos tratamentos durante o período experimental (12 semanas).....	55
Tabela 2: Desempenho zootécnico dos camarões <i>L. vannamei</i>	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte histológico do órgão linfóide do camarão <i>L. vannamei</i> . Coloração HE 40X.....	13
Figura 2: Ciclo de vida do <i>L. vannamei</i>	24
Figura 3: Figura 3: Corte histológico de pós-larva 15 de camarão <i>L. vananmei</i> . Coloração HE 10X. Localização do órgão linfóide.....	30
Figura 4: Vestígios do órgão linfóide (seta) observado em pós-larva 5 de <i>L. vannamei</i> . Coloração HE 40X	31
Figura 5: Órgão linfóide de pós-larvas de <i>L. vannamei</i> (setas). OL encontrado em PL6, sendo observado o provável início de formação do órgão em PL 5. Em PL 18, o órgão já apresenta lúmen bem diferenciado e o esferóide mais desenvolvido. a: PL 5; b: PL 6; c: PL7; d: PL 13; e: PL 15; f: PL 18. Coloração HE 40X. Bar = 20 μ m.....	33
Figura 6: Órgão linfóide de pós-larvas de <i>L. vannamei</i> . PL 13, coloração HE e imunomarcção com CD68.....	34
Figura 7: Órgão linfóide de pós-larvas de <i>L. vannamei</i> . PL 18, coloração HE; imunomarcção CD68.....	34
Figura 8: MET do órgão linfóide. k: células redondas com núcleos grandes (seta). Células fusiformes, com restos de colágeno (aparentemente células de sustentação). l: Fagossoma na superfície da célula (seta), células com grânulos (seta longa).....	35
Figura 9: MET do órgão linfóide. m: material fagocitado; n: Projeções da hemolinfa.....	36

Figura 10: MET do órgão linfóide. o : mitocôndrias (seta), núcleo, e cromatina periférica (seta longa); p : G: complexo de Golgi, S: seio hemal, desmossomos (setas).....	36
Figura 11: MET do órgão linfóide. q : Retículo endoplasmático rugoso (setas); r : ribossomos citoplasmáticos (seta).....	37
Figura 12: Micrografia de luz da seção longitudinal da OL de <i>P. monodon</i>	50
Figura 13: Ganho de peso semanal (12 semanas) de juvenis de <i>L. vannamei</i> em tratamentos AC e BFT.....	56
Figura 14: CAA Conversão alimentar aparente obtida para os camarões <i>L. vannamei</i> de ambos tratamentos ao final do período experimental (12 semanas)	57
Figura 15: Diferenças no tamanho do OL de <i>L. vannamei</i> em tratamentos de água clara e BFT.....	58
Figura 16: OL de camarões juvenis <i>L. vannamei</i> (setas) a : OL no tratamento AC; b : OL no tratamento BFT	58

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande por ter me acolhido.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP pela concessão da bolsa e pelos recursos concedidos que possibilitam a execução da ciência no Brasil.

Um especial agradecimento aos nossos apoiadores Guabi, Trevisan, AllAqua, Inve e Aquatec, pelo suporte e apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho, que são indispensáveis para realização das nossas pesquisas.

Ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG.

A minha orientadora a Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa, por todos os conselhos, aprendizados e a paciência que teve comigo, e por me dar força em todo momento.

Ao meu Co-orientador, professor Dr. Wilson Wasielesky, por aceitar a função da co-orientação, e pela ajuda nos meus experimentos.

Ao laboratório LIPOA, e o laboratório de Carcinicultura, e ao Projeto Camarão, que foram peça chave na realização da minha dissertação.

Ao professor Dr, Luis Alberto Romano, pela grande ajuda em minhas análises.

Ao Rafael Buitrago Ramírez, pela ajuda nos meus experimentos, e pelos conselhos brindados.

Ao pessoal da larvicultura, Sabrina Suinta e Alessandro Cardozo, pela ajuda nas minhas coletas.

Aos professores da Pós-Graduação, pelos ensinamentos. Aprendi muito no percorrer do mestrado.

A todas as pessoas que me ajudaram no dia a dia no ciclo dos meus experimentos, nas estocagens, coletas e nas rotinas.

Ao Brasil, por me acolher e me ensinar cada dia as simplicidades do mundo.

Muito obrigado.

RESUMO GERAL

Um dos entraves que apresenta a carcinicultura é a ocorrência de enfermidades, as quais provocam altas perdas econômicas podendo atingir toda a população do cultivo. Nos crustáceos, por não apresentarem uma memória imunológica, a prevenção de doenças torna-se mais difícil, pois dispõem de um sistema imunológico inato, eliminando patógenos de maneira inespecífica. São vários sistemas envolvidos no sistema inespecífico de peneídeos, podendo ser fatores humorais, celulares, físicos e químicos. O órgão linfóide, é considerado um órgão com participação nos processos imunológicos. Atualmente se acredita que o órgão linfóide seja local de maturação dos hemócitos, e que pode estar envolvido diretamente na ativação imunológica de camarões. Dessa forma, objetiva-se, com este trabalho, a ontogenia, quantificação morfométrica e ultraestrutural do órgão linfóide, no camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Os resultados indicaram o surgimento do órgão em pós larva 6, encontrando-se capacidade fagocítica no final do período de larvicultura. Dados também indicam as afetações do órgão linfóide cultivado em sistemas de água clara e Bioflocos, encontrando-se mais desenvolvidos nos sistemas BFT. Com o presente trabalho podemos afirmar a participação do órgão linfóide no sistema imunológico do camarão *L. vanammei*, especialmente no processo de fagocitose.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, histologia, imunologia.

ABSTRACT

One of the obstacles that shrimp farming presents is the occurrence of diseases, which cause high economic losses and can reach the entire population of the crop. In crustaceans, because they do not present an immunological memory, the prevention of diseases becomes more difficult, since they have an innate immune system, eliminating pathogens in an unspecific way. There are several systems involved in the nonspecific system of penises, which may be humoral, cellular, physical and chemical factors. The lymphoid organ is considered an organ with participation in the immunological processes. It is currently believed that the lymphoid organ is a site of hemocyte maturation and may be directly involved in the immunological activation of shrimp. Thus, the objective of this work is the ontogeny, morphometric and ultrastructural quantification of the lymphoid organ in the white Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. The results indicated the appearance of the organ in post larvae 6, being found phagocytic capacity at the end of the larviculture period. Data also indicate the affections of the lymphoid Organ cultured in clear water systems and Bioflocos, being more developed in the BFT systems. With the present work we can affirm the participation of the lymphoid organ in the immune system of *L. vanammei* shrimp, especially in the process of phagocytosis.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, histology, immunology.

1 1 INTRODUÇÃO GERAL

2 1.1 CARCINICULTURA MARINHA

3 No Brasil, a carcinicultura marinha teve início na década dos anos 70, mas apenas em
4 meados da década dos 90 foi consolidada, quando foi investido mais recursos nos cultivos
5 do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. (Boone, 1931). As características
6 zootécnicas de rápido crescimento, eficiente conversão alimentar, rusticidade, alta taxa de
7 sobrevivência e o pacote tecnológico previamente estabelecido foram imprescindíveis para
8 a consolidação de *L. vannamei* como espécie predominante na carcinicultura marinha
9 nacional (Barbieri & Ostrensky, 2002).

10 Atualmente, *L. vannamei*, é o peneídeo mais cultivado no país e no mundo (FAO,
11 2018). Doenças altamente letais e contagiosas têm prejudicado a expansão da produção de
12 camarões no país. São relatados cinco tipos de vírus presentes no país. Um dos mais letais é
13 o White Spot Syndrome Virus - WSSV, que provoca a mancha branca no camarão.
14 Detectado pela primeira vez na Ásia em 1993, dois anos depois já atingia os Estados
15 Unidos e logo chegou à América do Sul. A doença aniquilou a produção do crustáceo no
16 Ceará em 2017. Em seis meses, 30 mil toneladas de camarões foram perdidas; o
17 equivalente a 60% da produção do período. Além do Ceará, a doença tem afetado criações
18 de camarões no Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí, Paraíba, Pernambuco e Bahia
19 (ABCC, 2016).

20 A prevalência de numerosas doenças que afetam a indústria da carcinicultura tem
21 promovido o desenvolvimento de várias estratégias de manejo sanitário. Algumas incluem
22 uma maior biossegurança e utilização de animais livres de patógenos específicos, e em
23 casos mais extremos, o uso de produtos químicos. No entanto, devido à natureza da
24 carcinicultura em viveiros ao ar livre, onde a maior parte do camarão de cultivo é produzido
25 globalmente, muitas vezes o manejo na biossegurança torna-se difícil. De fato, nos sistemas
26 tradicionais de viveiros, a acumulação contínua de sedimentos e a subsequente deterioração
27 da qualidade da água são apontadas por incentivar o crescimento de muitos patógenos,
28 incluindo os vibrios patogênicos (Romano, 2017).

29 **1.2 CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DO *Litopenaeus vannamei*.**

30 Camarões invertebrados não possuem um sistema imunológico específico como o dos
31 vertebrados. Para combater infecções, elas dependem apenas de suas respostas imunes
32 inatas, que geralmente são caracterizadas como rápidas (de horas a dias), inespecíficas e
33 sem o desenvolvimento de memória imunológica (Norouzitallab et al., 2019)

34 A primeira linha de defesa nos crustáceos ocorre pela presença de barreiras físicas e
35 químicas. O exoesqueleto representa a primeira linha de defesa presente nos camarões,
36 formado por carbonato de cálcio, quitina e proteínas, e participa em diferentes processos
37 associados com o sistema imune, para identificação e possível destruição de
38 microrganismos patógenos (Mylonakis & Aballay, 2005).

39 Os crustáceos possuem um sistema circulatório aberto onde os nutrientes,
40 hormônios, oxigênio e células, estão distribuídos na hemolinfa. Na presença de um
41 patógeno, a defesa dos crustáceos se manifesta por meio de processos mecânicos e
42 bioquímicos durante a infecção e na identificação através de células presentes na hemolinfa
43 e fatores celulares envolvidos na destruição dos patógenos.

44 Quando os microrganismos invadem o tecido, os processos proteolíticos tomam
45 lugar instantaneamente, para iniciar os processos de eliminação ou diminuição destes
46 (Vazquez et al., 2009). O sistema imune conta com células efetivas e um sistema humoral
47 que respondem a invasões de microrganismos, sendo a resposta humoral envolvida na
48 síntese e relação de várias proteínas de imunidade conhecidas, como por exemplo,
49 peptídeos antimicrobianos, inibidores de proteinases, entre outras (Martin et al., 1985;
50 Bachère et al., 2004).

51 A hemolinfa conta com três diferentes tipos de hemócitos, definidos como hialinos,
52 granulares e semigranulares (Martin et al., 1985). Estas células participam em processos de
53 fagocitose, encapsulação, formação de nódulos, coagulação e reparação de feridas, e
54 ativação do sistema profenoloxidase (proPO) (Destoumieux et al., 1997; Bachère et al.,
55 2000). Os hemócitos hialinos representam células pequenas e não refrativas, com um
56 pequeno núcleo relativo ao seu citoplasma, não possuindo atividade fagocítica. O papel

57 principal destes hemócitos está relacionada com a coagulação (Zhang et al., 2006). Os
58 hemócitos granulares têm um núcleo menor e um alto número de grânulos citoplasmáticos,
59 exibindo atividade fagocítica e armazenam a enzima profenoloxidase. Essas células podem
60 ser estimuladas por 1,3-glucanos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos para gerar
61 exocitoses e liberação de enzimas, com sua função ligada ao encapsulamento, iniciando a
62 cascata de proPO e a fagocitose. Os hemócitos semi-granulares possuem um grande
63 número de pequenos grânulos, como também receptores β -1,3-glucanos. Esse tipo celular
64 apresenta como principais funções a fagocitose, encapsulação e coagulação (Smith &
65 Chisholm, 2001; Zhang et al., 2006).

66 A cascata de coagulação, um dos mecanismos imunes dos crustáceos, é responsável
67 por evitar a perda de hemolinfa e de ativar os metabólitos oxidativos e a produção da
68 melanina, por meio da ativação do sistema proPO (Kawabata et al., 1996; Sritunyalucksana
69 & Söderhäll, 2000). Neste processo os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são ativados por
70 meio dos receptores de reconhecimento, junto com essa ativação, é acionado o sistema
71 proPO, assim, os receptores reconhecem os peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, e β -1,3-
72 glucanos, presentes nas membranas celulares dos agentes estranhos. Como resultado da
73 ativação do sistema proPO, os agentes estranhos são pigmentados pela melanina presente
74 na hemolinfa ou no exoesqueleto, isso pela reação de fenoloxidase e oxidoreductase,
75 conhecida como Reação de Melanização (Söderhäll & Cerenius, 1998).

76 A ativação do sistema proPO, estimula outros processos do sistema imune como a
77 fagocitose, encapsulação e formação dos nódulos (Söderhäll et al., 1990). A ativação destes
78 processos participa no reconhecimento dos patógenos, os quais podem ser associados com
79 padrões moleculares mediados por proteínas dos crustáceos (Vazquez et al., 2009). Estes
80 mecanismos são ativados por um grupo de receptores (receptores de reconhecimento),
81 capazes de reconhecer a superfície microbiana, determinada por lipopolissacarídeos,
82 peptidoglicanos e por β -1,3-glucano (Lee & Söderhäll, 2001).

83 Os PAMs, são moléculas efetoras do sistema imune inato. São uma família de
84 substâncias multifacéticas com mecanismos complexos de ação relacionados com a
85 interação com o patógeno a través de sua membrana, ou afetando alvos internos, como

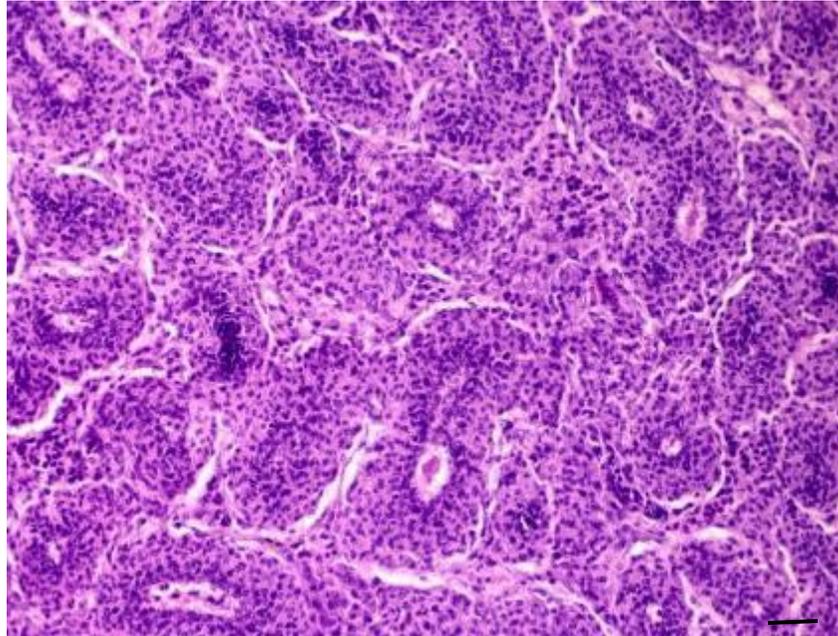
86 replicação do DNA ou sínteses de proteínas, e interagindo com o hospedeiro com funções
87 imunomoduladoras da regulação do processo inflamatório e de cicatrização (Téllez &
88 Castaño, 2010). Possuem uma estrutura anfipática, com propriedades catiônicas ou
89 aniônicas. São comumente sintetizados e ativados em presença de bactérias, vírus,
90 leveduras, parasitos e fungos, e sua produção e armazenamento, ocorre nos hemócitos
91 (Hancock & Diamond, 2000). Os PAMs das várias famílias de camarões são peneidinas,
92 lisozimas, crustinas, ALFs e estilicinas (Rolland et al., 2010; Tassanakajon, et al., 2010).

93

94 **1.3 ÓRGÃO LINFÓIDE**

95

96 O órgão linfóide (OL) é encontrado exclusivamente nos camarões peneídeos
97 (Rusaini & Owens, 2010), constituído anatomicamente por 2 lóbulos, cada um localizado
98 em posição ventro-lateral. Os lóbulos linfóides (fig. 1) estão em posição ligeiramente
99 dorso-anterior ao lóbulo hepatopancreático ventral (Bell & Lightner, 1988). O tamanho do
100 órgão linfóide é inferior à 2 mm de diâmetro em indivíduos *Fenneropenaeus chinensis* com
101 um peso corporal de 12 e 13 cm, podendo o seu tamanho se apresentar maior em uma
102 infecção viral (Shao et al., 2004)



103

104 Figura 1: Corte histológico do órgão linfóide do camarão *L. vannamei*. Coloração HE 40 X.
105 Bar = 20 μ m. Arquivo pessoal Dr. Luis Alberto Romano

106

107 Um exame detalhado do modelo vascular do órgão linfóide de *Penaeus monodon*
108 por meio de microscopia eletrônica de varredura indicou claramente que esse órgão é, na
109 verdade, a parte terminal das artérias subgástricas que se ramificam da aorta anterior. Os
110 ramos terminais da artéria subgástrica são, os capilares de extremidade cega, cada um com
111 uma parede espessa que compreende células endoteliais, células estromais e células
112 capsulares que são as células "fixas". Juntos, eles formam o suporte celular que define a
113 estrutura do túbulo linfóide, enquanto os hemócitos penetram no endotélio para ocupar os
114 espaços entre as células estromais (Duangsuwan et al., 2008). Além desses componentes
115 celulares, estruturas elaboradas de tecido conjuntivo também são observadas dentro e ao
116 redor dos túbulos linfóides. Esse tecido de suporte é formado por uma extensa rede de
117 fibras do tipo 1 que são incorporadas em uma matriz extracelular. Ambas as estruturas são
118 positivas para Ácido Periódico de Schiff - PAS, o que implica que são ricas em glicogênio
119 (Brown et al., 2006). A natureza bioquímica desta estrutura de fibra de matriz extracelular
120 precisa ser mais estudada. Comparando com a matriz de vertebrados, essas estruturas

121 combinadas pareciam semelhantes ao componente da membrana basal (Duangsuwan et al.,
122 2008).

123 O órgão linfóide dos camarões peneídeos está envolvido na imunodefesa contra
124 organismos estranhos (Kondo et al., 1994; Anggraeni & Owens, 2000; van de Braak et al.,
125 2002), representando o sítio primário de fagocitose (Kondo et al., 1994; Pongsomboon et
126 al., 2008). Este órgão tem uma função de filtração e imobilização de agentes estranhos na
127 hemolinfa, dificultando a passagem de patógenos no sistema circulatório (Kondo et al.,
128 1994; Van de Braak, et al., 2002), podendo ainda possuir uma ação bacteriostática
129 (Burgents, et al., 2005), isto se refere a capacidade de retenção para imobilizar material
130 estranho da hemolinfa antes que este material entre no sistema circulatório (Kondo et al.,
131 1994; van de Braak et al., 2002). O órgão também aparece como um local primário para o
132 acúmulo de substâncias estranhas (Kondo et al., 1994; Burgents et al., 2005). Um grande
133 número de genes relacionados com o sistema imunológico dentro da OL confirma o
134 importante papel desse órgão no sistema imunológico do camarão peneídeo (Pongsomboon
135 et al., 2008).

136 O órgão, ele pode ser considerado como o maior tecido de defesa antiviral, por meio
137 da formação dos chamados esferóides do órgão linfóide (Anggraeni & Owens, 2000). Essa
138 suposição foi apoiada pelo trabalho de Cowley et al., (2005) e Rajendran et al., (2006), que
139 observaram que a carga viral no órgão linfóide de camarões peneídeos infectados com o
140 vírus Mourilyan é maior em comparação com outros órgãos.

141 O órgão também é considerado o local de maturação de hemócitos. Quando ocorre
142 uma infecção, os hemócitos do órgão linfóide atuam no tecido, e migram para o local da
143 infecção, circundando o agente patógeno (Owens, 2010) e, a partir daí, fazem uma
144 encapsulação do patógeno (Van de Braak et al., 2002).

145 O órgão linfóide provavelmente representa um dos principais órgãos fagocitários
146 dos camarões peneídeos (Kondo et al., 1994; van de Braak et al., 2002). Este órgão foi
147 relatado como sendo mais eficiente em fagocitar materiais estranhos do que os outros
148 órgãos avaliados, como brânquias, coração, glândula digestiva, músculo abdominal e tecido

149 conjuntivo, como demonstrado com substâncias bióticas (Martin, et al., 1996) e abióticas
150 (Kondo et al., 1994). A fagocitose bacteriana no interior do órgão linfóide foi observada em
151 *Sicyonia ingentis* injetado com *Bacillus subtilis*, (Martin, et al., 1996) e em *Penaeus*
152 *monodon* injetado com *Vibrio anguillarum*, sorotipo O2 (van de Braak et al., 2002).

153 A atividade fagocítica do OL para materiais abióticos tem sido estudada em *P.*
154 *japonicus* injetado com látex FITC, carbono coloidal e peroxidase de rábano. Várias outras
155 funções imunológicas do OL também foram relatadas (Kondo et al., 1994).

156 A importância do presente trabalho é enfocada no entendimento do órgão linfóide,
157 descrevendo o desenvolvimento do mesmo no *L. vannamei*, citado como o principal órgão
158 que atua no processo da fagocitose, processo principal para eliminação de agentes
159 patogênicos no sistema imune inato.

160

161 **2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

162

163 Anggraeni Ms, & Owens I. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells
164 in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. Dis aquat org. 40: 85-92.

165 Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC. (2016). Um novo despertar da
166 carcinicultura marinha brasileira, mantendo os compromissos com a
167 sustentabilidade ambiental, contribuição social e qualidade sensorial do camarão
168 cultivado. ABCC, 18 (2): 104.

169 Bachère E., Destoumieux D., Bulet P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp,
170 a with other effectors of innate immune. Aquaculture. 191: 71-88.

171 Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. (2004).
172 Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid
173 shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Ver. 198:149-168.

174 Barbieri, R.C.J., & Ostrensky, A (2002). Camarões marinhos - engorda. Viçosa. 370.

175 Bell T., Lightner D. (1988). Manual de histología del camarón peneídeo normal. World
176 Aquaculture Society. University of Arizona. USA, 120 p.

177 Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, DB., Badylak, SF. (2006). The basement
178 membrane components of biological scaffolds derived from extracellular matrix.
179 Tissue eng. 12:519-26.

180 Burgents, J.E., Burnett, L.E., Stabb, E.V., Burnett, K.G (2005). Localization and
181 bacteriostasis of vibrio introduced into the pacific white shrimp, *Litopenaeus*
182 *vannamei*. Dev comp immunol. 29: 681-91.

183 Cowley, JÁ., Mcculloch. RJ., Rajendran. KV., Cadogan. LC., Spann. KM., Walker, PJ.
184 (2005). Retnested PCR detection of mourilyan virus in australian *Penaeus monodon*
185 and its tissue distribution in healthy and moribund prawns. Dis aquat org. 66:91-
186 104.

- 187 Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorselaer, A., Rodriguez, J., Bachere, E.
188 (1997). Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp, *Penaeus*
189 *vannamei*. Decapoda. J. Biol. Chem. 272: 28398–28406.
- 190 Duangsuwan P, Phoungpetchara I, Tinikul Y, Poljaroen J, Wanichanon C, Sobhon P.
191 (2008). Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in
192 normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 24: 426-35.
- 193 Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. (2018). The State of
194 World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.
195 Rome. 210.
- 196 Hancock, R.E., & Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate
197 host defenses. Trends Microbiol., 8:402-410.
- 198 Kawabata, S.I., Mutua, T., Iwanaga, S. (1996). The clotting cascade and defense molecules
199 found in the hemolymph of the horseshoe crab. New direction. In: Söderhäll K,
200 Iwanaga S, Vasta GR., (eds) Invertebrate Immunology. Fair Haven, CT: SOS. 255–
201 283.
- 202 Kondo, M., Itami, T., Takahashi, Y., Fujii, R., Tomonaga, S. (1994). Structure and function
203 of the lymphoid organ in the *Kuruma prawn*. Dev comp immunol. 18: 109.
- 204 Lee, S.Y., & Söderhäll, K. (2001). Characterization of a pattern recognition protein, a
205 masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J.
206 Immunol. 166: 7319–7326.
- 207 Martin, G.G., Graves B.L., Fine. (1985). Structure and classification of shrimp hemocytes.
208 J. Morphol. 185:339-348.
- 209 Martin, Gg., Hose, Je., Minka, G., Rosenberg, S. (1996). Clearance of bacteria injected into
210 the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (crustacea: decapoda):
211 Role of hematopoietic tissue. J morfol. 227: 227-233.

- 212 Mylonakis, E., & Aballay, A. (2005). Worms and flies as genetically tractable animal
213 models to study host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 73: 3833-3841.
- 214 Norouzitallab, P., Baruah, K., Vanrompay, D., & Bossier, P. (2019). Teaching Shrimps
215 Self-Defense to Fight Infections. *Trends in biotechnology*, 37(1), 16-19.
- 216 Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., Tassanakajon, A. (2008)
217 Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp,
218 *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish shellfish*
219 *immunol* 25: 485-93.
- 220 Rajendran, K.V., Cowley, J.A., Mcculloch, R.J., Walker, P.J. (2006). A taqman real-time
221 PCR for quantifying mourilyan virus infection levels in penaeid shrimp tissues. *J*
222 *virol methods.* 137: 265-271.
- 223 Rolland, J.L., Abdelouahab, M., Dupont, J., Lefevre, F., Bachère, E., Romestand, B.
224 (2010). Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue
225 shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Mol. Immunol.*, 47:1269-1277.
- 226 Romano, N. (2017). Aquamimicry: Um conceito revolucionário para o cultivo de camarão.
227 *Revista ABCC.* 26-28.
- 228 Shao, M.Y., Zhang, Z.F., Kang K.H., Chen, Z.T., Kim J.M. (2004). The study on the
229 cytology and histochemistry of lymphoid organ spheroids in *Penaeus chinensis*.
230 *Aquaculture*, 240:463- 471.
- 231 Smith, V.J., & Chisholm, J.R. (2001). Antimicrobial proteins in crustaceans. *Adv. Exp.*
232 *Med. Biol.*, 484: 95–112.
- 233 Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system
234 invertebrate immunity. *Innate immunity*, 10:23-28.
- 235 Söderhäll, K., Aspán, A., Duvic, B. (1990). The proPO system and associated proteins –
236 role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.*, 141: 896–907.

- 237 Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in
238 crustaceans. *Aquaculture*, 191: 53–69.
- 239 Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Supungul, P. (2010). Cationic
240 antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, 12:487-505.
- 241 Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 14(1), 55-67.
- 242 Van De Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W.B.,
243 Rombout, J.H.W.M., Van Der Knaap, W.P.W. (2002). The roles of haemocytes and
244 the lymphoid organ in the clearance of injected vibrio bacteria in *Penaeus monodon*
245 shrimp. *Fish shellfish immunol.* 13:293-309.
- 246 Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E.
247 (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity*, 15(3): 179–188.
- 248 Zhang, Z.F., Shao, M., Ho Kang, K. (2006). Classification of haematopoietic cells and
249 haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*
250 21: 159-169.

CAPÍTULO I

**ONTOGENIA, EXPRESSÃO FENOTÍPICA DO CD68 E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DO ÓRGÃO LINFÓIDE DO CAMARÃO BRANCO DO
PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).**

1 RESUMO

2 Nas últimas décadas o cultivo de camarões vem sendo afetado por diferentes doenças virais
3 e bacterianas. Embora esteja sendo estudado o sistema imune de camarões, as informações
4 de sítios de ativação de proteínas, processos moleculares e a eficácia de eliminação de
5 patógenos ainda são escassas. Nesse contexto, o órgão linfóide está sendo motivo de
6 atenção nos últimos anos, no sentido de se conhecer suas possíveis atividades nos animais
7 diante uma infecção viral ou bacteriana. No entanto, são escassos os trabalhos que indicam
8 os componentes celulares presentes no órgão, assim como o surgimento deste no camarão
9 branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Neste trabalho objetivou-se descrever alguns
10 componentes celulares por meio de análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de
11 Transmissão (MET) e análise histológica do órgão linfóide em larvas e juvenis do camarão
12 *L. vannamei*. Com os dados obtidos, pode se indicar a presença do órgão no estágio de pós
13 larva 6 do camarão, que vem a ser importante no conhecimento da presença de estruturas de
14 suporte do sistema imune em camarões desta espécie. Assim como a capacidade fagocítica
15 nos estágios de pós larva 13 e 18, utilizando o receptor anti-CD68. Além disso, junto com a
16 MET, corroboramos a existência de fagocitoses no OL de juvenis, encontrando estruturas
17 como fagossomos, as quais são vitais para os processos fagocitários.

18

19 **Palavras chaves:** histologia, microscopia eletrônica de transmissão, imunidade, *L.*
20 *vannamei*.

21

22 **ABSTRACT**

23 In the last decades the cultivation of prawns has been affected by different viral and
24 bacterial diseases. Although the immune system of shrimp is being studied, information on
25 protein activation sites, molecular processes and the efficacy of pathogen elimination are
26 still scarce. In this context, the lymphoid organ has been the focus of attention in the last
27 years, in order to know its possible activities in the animals before a viral or bacterial
28 infection. However, there are few studies that indicate the cellular components present in
29 the organ, as well as the appearance of this in the white prawn of the Pacific *Litopenaeus*
30 *vannamei*. This work aimed to describe some cellular components by ultrastructural
31 analysis by Electron Transmission Electron Microscopy (MET) and histological analysis of
32 the lymphoid organ in larvae and juveniles of *L. vannamei* shrimp. With the obtained data,
33 the presence of the organ can be indicated in the post larval stage 6 of the shrimp, which is
34 important in the knowledge of the presence of support structures of the immune system in
35 shrimp of this species. As well as the phagocytic capacity in post-larva stages 13 and 18,
36 using the anti-CD68 receptor. In addition, together with MET, corroborating the existence of
37 phagocytosis in the juvenile OL, finding structures such as phagosomes, which are vital for
38 the phagocytic processes.

39

40 **Keywords:** histology, ultrastructural analysis, *L. vannamei*.

41

42 1 INTRODUÇÃO

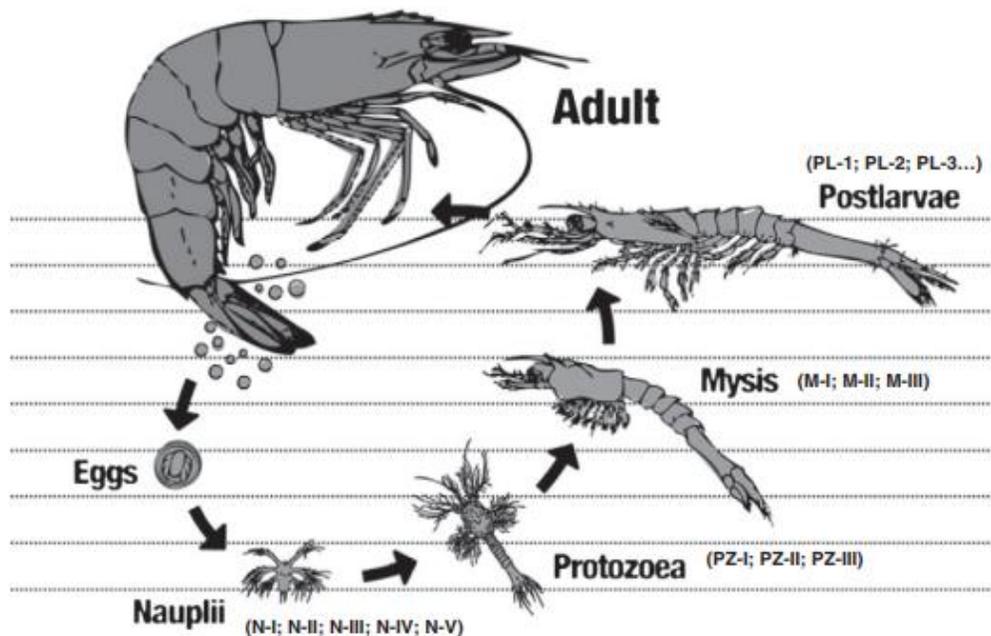
43 A aquicultura de crustáceos contribui significativamente para o desenvolvimento
44 econômico de muitos países de áreas tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Ainda
45 segue sendo importante preocupação o surgimento de doenças que afetam as espécies
46 cultivadas que ameaçam a sustentabilidade da aquicultura. O desenvolvimento de doenças,
47 particularmente na criação de camarões (Naylor et al., 2000), resultou não somente de uma
48 intensificação da produção, baseada no progresso zootécnico, mas também de distúrbios
49 ecológicos e ambientais, poluição e desequilíbrios nutricionais. Tais condições,
50 contribuíram para o surgimento de doenças não infecciosas e infecciosas. Além disso, a
51 prática de transferência de ovos, larvas e reprodutores contaminados a nível nacional e
52 internacional exacerbou a disseminação de muitos patógenos. Entre os agentes causadores
53 encontrados na aquicultura marinha, os problemas de doenças virais, bacterianas e fúngicas
54 dominam a tecnologia de produção larval de crustáceos. Porém, o funcionamento do
55 sistema imune de camarões ainda segue sendo estudado (Bachère, 2003).

56 Camarões peneídeos, como outros crustáceos, dependem de seu sistema
57 imunológico inato para proteção contra patógenos. Este sistema de defesa é baseado em
58 componentes celulares e humorais que interagem para reconhecer e eliminar
59 microrganismos estranhos e patógenos (Vázquez et al., 2009). Vários autores têm
60 trabalhado na quantificação de diferentes parâmetros celulares e humorais da resposta
61 imune de espécies de camarão cultivadas. Entre os indicadores disponíveis e comumente
62 usados para avaliar a imunidade e o estado de saúde de um hospedeiro estão: geração de
63 intermediários reativos de oxigênio (ROI), atividade de superóxido dismutase (SOD),
64 atividade de fenoxidase (PO) e medições de atividade antibacteriana (Rodríguez & Le
65 Moullac, 2000). No entanto, a maioria desses estudos foi realizada apenas nos estágios de
66 juvenil e em adultos. Até o momento, pouco se sabe sobre o sistema imunológico durante a
67 ontogenia inicial de invertebrados marinhos de interesse econômico (Bachère, 2003).

68 Um dos problemas para o estudo do sistema imunológico nos estágios larval e pós-
69 larval (fig. 2) é o pequeno tamanho do corpo, o que impossibilita estudos diretos. Não se
70 pode presumir que nesses estágios eles exibam as mesmas respostas que juvenis e adultos,

71 ou que a expressão de proteínas imunes ocorra no mesmo grau (Smith et al., 2003). Há um
72 grande número de doenças que afetam preferencialmente larvas e pós-larvas, com taxas de
73 mortalidade de até 100% (Aguirre & Ascencio, 2000). Do ponto de vista imunológico,
74 larvas de camarão e pós-larvas representam “casos especiais”, e sua suscetibilidade pode
75 estar relacionada à sua imunocompetência. Neste contexto, uma melhor compreensão da
76 imunidade do camarão durante a ontogenia ajudaria a conceber estratégias eficientes para o
77 controle de doenças e garantir a viabilidade em longo prazo da aquicultura do camarão
78 (Bachère, 2000).

79



80

81 Figura 2: Ciclo de vida do *L. vannamei*, (Martín et al., 2012).

82

83 A larvicultura, em condições de criação inadequadas, como alta densidade larval, e
84 excesso ou má qualidade alimentar, estão associadas à mortalidade larval, favorecendo à
85 contaminação com cepas patogênicas. O estabelecimento do manejo sanitário e seleção de
86 camarões mais resistentes a doenças envolve a caracterização de efetores do sistema
87 imunológico e a compreensão das reações de defesa a infecções e estresse, durante o

88 desenvolvimento. De fato, as dificuldades no controle de doenças na aquicultura marinha
89 vêm em parte das diferenças na suscetibilidade dos animais (de larvas a adultos) e da
90 diversidade de patógenos que os afetam em cada estágio de desenvolvimento. Até o
91 momento, pouco se conhece sobre a ontogenia do sistema imune em larvas de camarões
92 marinhos de interesse econômico (Bachère, 2003).

93 **1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

94 A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta importante na
95 demonstração da ultraestrutura de células e tecidos, tanto em condições normais quanto em
96 doenças. O princípio fundamental subjacente ao MET é que os elétrons passam através da
97 seção para dar uma imagem do espécime. O feixe de elétrons só é capaz de penetrar uma
98 seção de resina efetivamente a uma profundidade de aproximadamente 100 nm, então para
99 obter uma imagem de alta qualidade e otimizar a resolução do instrumento, é necessário
100 seccionar o tecido a uma espessura de cerca de 80 nm (Stirling & Woods, 2002).

101 O avanço acelerado do conhecimento científico e tecnológico permitiu que a
102 microscopia eletrônica tivesse uma grande capacidade de análise ultraestrutural em
103 organelas, células, tecidos e materiais inorgânicos; e foi possível a obtenção de imagens até
104 quase um milhão de vezes, com uma resolução de 1,4 Å. Isso facilita o conhecimento
105 ultraestrutural dos materiais e sistemas biológicos, ajudando a entender melhor o seu
106 funcionamento (Hernández-Chavarría et al., 2002). Em invertebrados, essa ferramenta já
107 foi usada para analisar ultraestruturalmente o órgão linfóide de *P. monodon*, neste caso, a
108 análise ajudou na composição dos túbulos do órgão linfóide, e no reconhecimento das
109 estruturas celulares próprias do órgão (Duangsuwan et al., 2008)

110

111 1.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

112 A técnica de imunohistoquímica surgiu pela primeira vez durante um diagnóstico
113 histopatológico por volta dos anos 70, em seguida sofreu uma enorme expansão a partir da
114 descoberta e aplicação dos anticorpos monoclonais, os quais acrescentaram precisão e
115 especificidade (Ciocca & Bjerche, 1986). Sendo um ramo da técnica histológica voltada
116 para detecção de antígeno em tecidos, é extremamente útil como método diagnóstico. A
117 imunohistoquímica usa anticorpos para identificar antígenos (marcadores) nos tecidos.
118 Com essa técnica é possível visualizar uma reação antígeno/anticorpo, específico em uma
119 célula ou tecido, tanto com microscopia óptica como eletrônica (Romano, 2008).

120 Muitas proteínas animais se mantêm conservadas durante a evolução, por existir
121 reatividade cruzada entre diferentes espécies. A glicoproteína CD68 é um membro da
122 família de proteínas transportadoras de membranas plasmáticas lisossômicas - *lamp*
123 (lysosomal-associated membrane protein) (fonte), que inclui macrosialina de camundongo
124 (Holness et al., 1993), *lamp* 1 humana (Fukuda, 1991), galinha lep100 (Zot & Fambrough,
125 1990) e Igp 120 de rato (Howe et al., 1988). Devido à sua localização particular, as
126 glicoproteínas da *lamp* são encontradas como componentes da membrana plasmática do
127 complexo vesicular endoexocítico característico da atividade lisossomal de animais vivos.
128 A proteína CD68 é mais abundante do que outros componentes da *lamp* na membrana do
129 sistema monócito-macrófago, representando assim um marcador molecular (Martinez-
130 Pomares et al., 1996). Entretanto, além do sistema monócito-macrófago, o domínio
131 intracelular de proteína CD68 possui uma sequência de 10 aminoácidos involucrada no
132 processamento do material antigênico internalizado por pino-fagocitoses ou como
133 alternativa, na proteção da membrana vesicular dos vacúolos lisossomais do ataque de
134 hidrolases (Holness, & Simmons, 1993).

135 O sistema imune também se caracteriza pela presença ou ausência de proteínas na
136 célula, neste caso, a família das proteínas CD68 estão dentro das proteínas de importância
137 imunológica, e tem como função a interceptação de restos celulares fazendo o papel de
138 receptores e sinalizadores para a ativação de processos de fagocitoses mediando o
139 recrutamento e ativação de macrófagos em animais com sistemas imunológicos mais

140 complexos. A detecção e a quantificação da expressão fenotípica de proteínas CD68 têm
141 sido considerada um indicador do status imunológico, principalmente em humanos e outros
142 mamíferos. Dessa forma, o anticorpo CD68 é comumente considerado como um marcador
143 seletivo para monócitos e macrófagos humanos marcando especificamente células onde
144 haja lisossomos em abundância, característica também encontrada em hemócitos
145 (granulócitos) (Gottfried et al., 2008).

146 O órgão linfóide pode ser considerado como parte do sistema de defesa do peneídeo
147 *L. vannamei*, no entanto as estruturas que pertencem ao OL são pouco estudadas, e para
148 entender as premissas sobre a capacidade fagocítica do mesmo, estudos ultraestruturais
149 podem ajudar no entendimento do órgão, assim como o momento de seu surgimento.

150 **2 OBJETIVOS**

151 **2.1 OBJETIVO GERAL**

152 Analisar a ontogenia, ultraestrutura e a capacidade fagocítica do órgão linfóide no
153 camarão *L. vannamei*.

154 **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 155 • Descrever o surgimento do órgão linfóide em camarão do pacífico *L.*
156 *vannamei*;
- 157 • Descrever a presença do receptor do anticorpo anti-CD68 em órgão linfóide
158 de pós-larvas de *L. vannamei*;
- 159 • Realizar análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão
160 (MET) do órgão linfóide, em juvenis de *L. vannamei*.

161

162 3 MATERIAL E MÉTODOS

163 3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

164 Os experimentos, juntamente com as análises, foram realizados na Estação Marinha
165 de Aquacultura (EMA-FURG), do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal
166 do Rio Grande – FURG, no Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos
167 Aquáticos (LIPOA), e no Laboratório de Carcinicultura, localizados no balneário Cassino,
168 cidade do Rio Grande - RS, Brasil.

169 3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

170 Náuplios de camarão foram adquiridos do laboratório Aquatec (Rio Grande do
171 Norte, Brasil), e transportados para a Estação Marinha de Aquacultura, onde foram
172 mantidos desde o estágio náuplio V até o estágio pós-larval (PL) no setor de larvicultura de
173 camarão marinho da Universidade Federal do Rio Grande.

174 Para as análises experimentais foram utilizados desde náuplios até PL 21, e juvenis
175 de *L. vannamei*.

176 As larvas foram alimentadas quatro vezes ao dia, de PL1 a PL10, duas vezes com as
177 rações comerciais Flake e StressPak (INVE®) e duas vezes com náuplios de *Artemia* sp.
178 De PL10 a PL20, foram alimentadas cinco vezes ao dia, duas vezes com Flake-INVE®,
179 duas vezes com a ração comercial de viveiro PL40-GUABITM e *Artemia* sp. congelada
180 uma vez ao dia. Após a fase de PL20, a ração PL40-GUABITM foi oferecida quatro vezes
181 ao dia e náuplios de *Artemia* sp. congelados foram oferecidos uma vez ao dia.
182 Complementarmente, microalga *Chaetoceros muelleri* foi inoculada nos tanques, na
183 concentração de 5×10^4 células mL⁻¹. Contagens diárias foram realizadas para manter essa
184 concentração inicial. O regime alimentar foi adaptado da FAO (2004). Também foi
185 aplicado diariamente o probiótico (Pro-W INVE®) (1,0 ppm).

186 Os juvenis de *L. vannamei* utilizados foram coletados de um prévio experimento. Onde
187 foi utilizada uma densidade de 300 camarões/m², com duração de 12 semanas de cultivo. O
188 peso médio inicial dos animais experimentais foi de 0.04 gramas, e o peso médio final foi

189 de 6 gramas. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração de 38% de
190 proteína bruta.

191 **3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

192 Foram coletadas diariamente durante todo o período de larvicultura 5 larvas, e
193 fixadas na solução de Davidson, composta de ácido acético, formol, álcool 95% e água
194 destilada. Após 6 horas, foram transferidos para álcool a 70%. Posteriormente foram
195 submetidas ao processamento histológico, onde os tecidos foram desidratados através de
196 concentrações ascendentes de etanol, diafanizados em xilol e incorporados em parafina. Os
197 blocos histológicos com tecido foram cortados no micrótomo (LEICA RM2245) em
198 espessura de 3µm. O tecido foi corado com hematoxilina e eosina (HE). Após serem
199 coradas, as lâminas foram observadas por microscopia óptica (Nikon, Eclipse E200).

200 As imagens com os cortes histológicos foram digitalizadas para análise
201 morfológica com microscópio Primo Star Zeiss e câmera digital AxioCam ERc5s. A
202 análise das imagens foi realizada por meio do software AxioVision 4.8.2.0.

203

204 **3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

205 Pequenos fragmentos de tecido do órgão linfóide de juvenis de *L. vannamei* foram
206 cortados em blocos de 1 mm e imediatamente fixados em glutaraldeído tamponado com
207 fosfato (pH 6,9 a 4 ° C), lavados em solução de Millonig e pós-fixados em tetróxido de
208 ósmio a 1%; os blocos de tecido foram então desidratados numa série graduada de etanol-
209 acetona, imersos em óxido de propileno e embebidos em Durcupan ACNI (Fluka Chemie
210 A.G., Suíça). Cortes finos foram cortados com ultramicrótomo LKB e duplamente corados
211 com acetato de uranila e citrato de chumbo antes do exame em um microscópio eletrônico
212 Jeol JEM-8T (Jeol, Tóquio, Japão).

213 Foram utilizados camarões juvenis pela dificuldade do análises, posto que para a
214 realização do mesmo, são necessárias mostras precisas milimétricas de tecido, neste caso do
215 OL.

216

217 3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

218 Na imunohistoquímica realizada no órgão linfóide foram utilizados os mesmos
219 animais processados para as análises histológicas. Após a desparafinização e hidratação, os
220 cortes foram lavados com água (5min), em seguida expostos a uma solução de peróxido de
221 hidrogênio a 1% em metanol durante 30 minutos para bloqueio da atividade da peroxidase
222 endógena e lavada em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, por 20 minutos. Em seguida
223 foram incubadas com albumina sérica bovina (3%) em PBS (BSA, type V Sigma
224 Chemical®, Saint Louis, Mo, USA) durante 40 minutos. Os cortes foram incubados em
225 câmara úmida (30 min) com um anticorpo monoclonal anti- CD68, (Ventana Medical
226 Systems, USA) de uso humano, colocados em uma diluição em PBS 0.4 µg/mL, em
227 seguida lavados em PBS e inoculados (45 min) com o complexo avidina-biotina-
228 peroxidase, segundo metodologia de Hsus (1981). Posteriormente os cortes foram
229 incubados com solução 0,1% diaminobenzidina (Sigma), desidratados e contrastados com
230 hematoxilina, e então as lâminas foram montadas com bálsamo de Canadá (Sigma) e
231 examinadas em microscópio óptico.

232 4 RESULTADOS

233 Na Figura 3 se observa a localização do órgão linfóide no camarão *L. vannamei*.

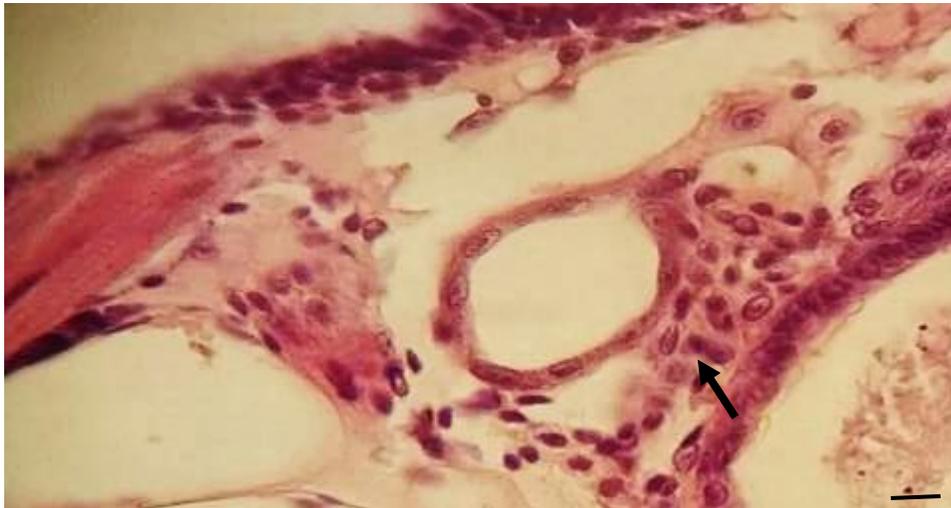


Figura 3: Corte histológico de pós-larva 15 de camarão *L. vananmei*.
Localização do órgão linfóide (seta). HEP: Hepatopâncreas. Coloração HE
10X. Bar = 100 µm.

234

235 **4.1 ONTOGENIA**

236 O surgimento do órgão linfóide foi observado a partir de pós-larva 6 (figura 4). No
237 entanto, cortes histológicos em pós-larva 5 (figura 3) apresentaram vestígios do órgão sob a
238 forma de células dispersas.



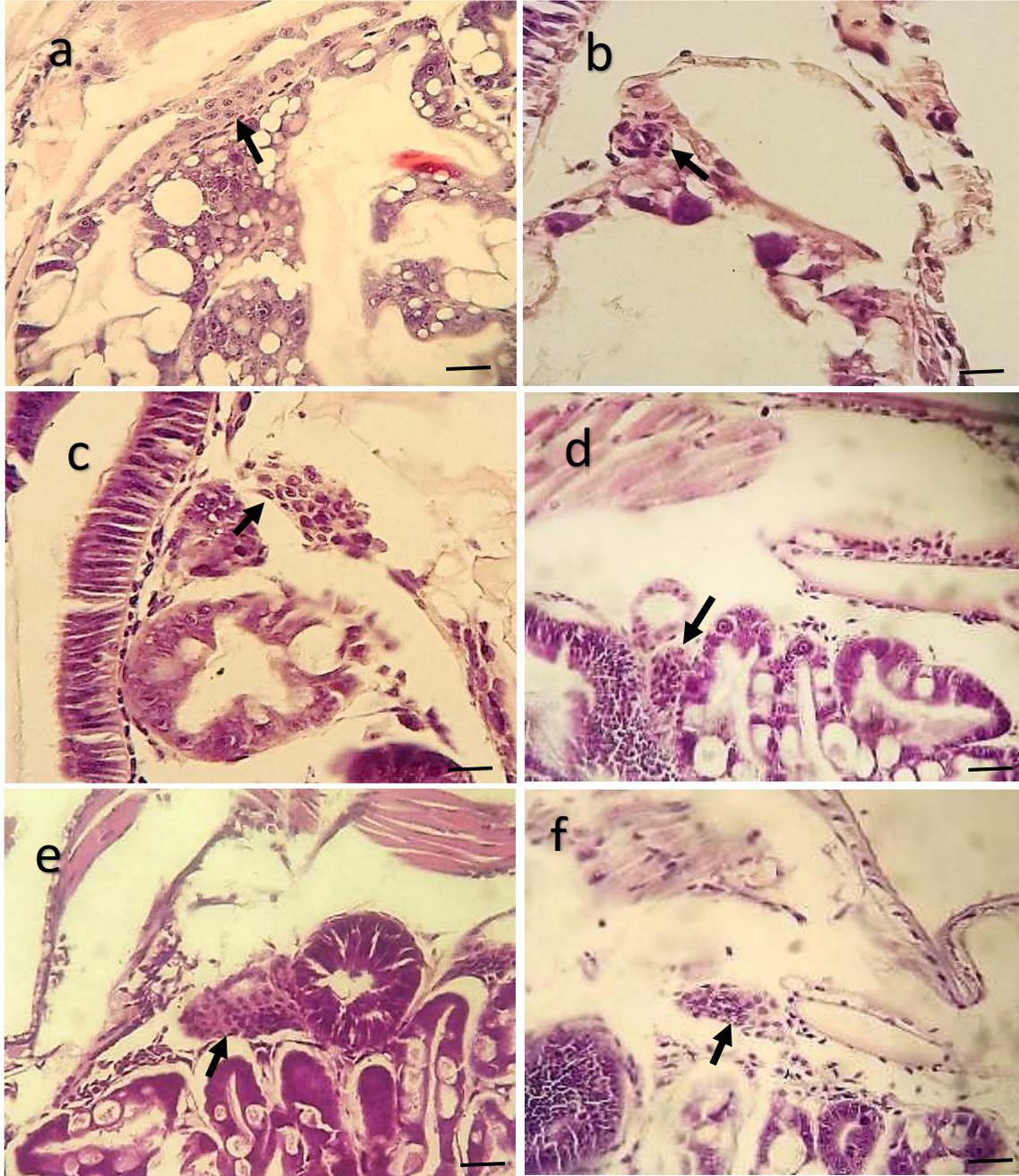
239

240 **Figura 4:** Vestígios do órgão linfóide (seta) observado em pós-larva 5 de *L. vannamei*.
241 Coloração HE 40X. Bar = 20 µm.

242

243 O perfil de desenvolvimento do órgão linfóide de *L. vannamei* é observado na figura
244 5 (observam-se apenas alguns estágios), assim como os componentes celulares próprios de
245 um OL mais desenvolvido, formação de esferóides, tecidos epiteliais e hemócitos.

246 São apresentadas as comparações nos diferentes estágios de vida do camarão,
247 durante a fase de larvicultura. Desde o vestígio do órgão com células dispersas, até as
248 primeiras formações de esferóides típicos do órgão.



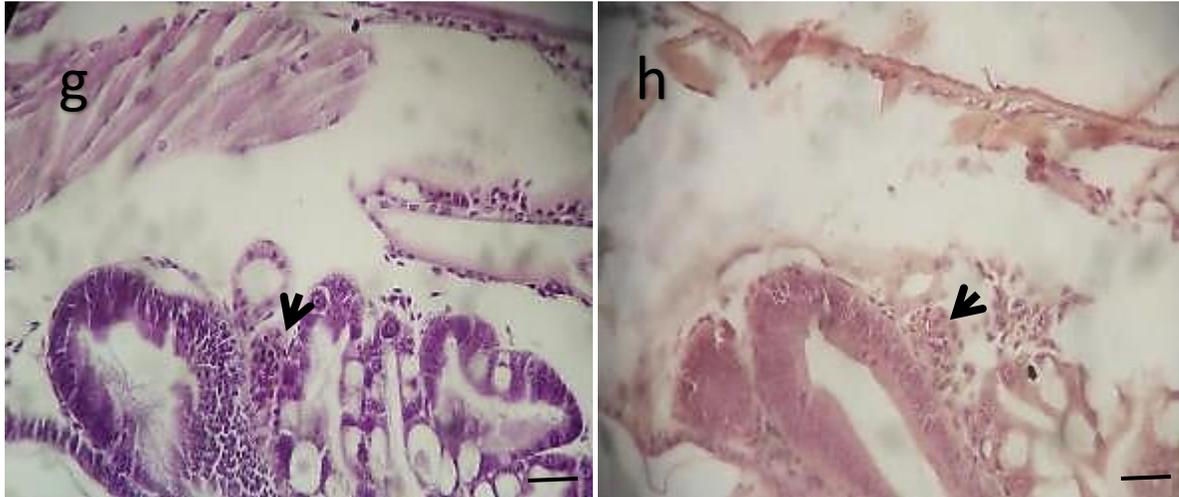
249

250 **Figura 5:** Órgão linfóide de pós-larvas de *L. vannamei* (setas). OL encontrado em PL6,
 251 sendo observado o provável início de formação do órgão em PL 5. Em PL 18, o órgão já
 252 apresenta lúmen bem diferenciado e o esferóide mais desenvolvido. **a:** PL 5; **b:** PL 6; **c:**
 253 PL 7; **d:** PL 13; **e:** PL 15; **f:** PL 18. Coloração HE 40X. Bar = 20 µm.

254

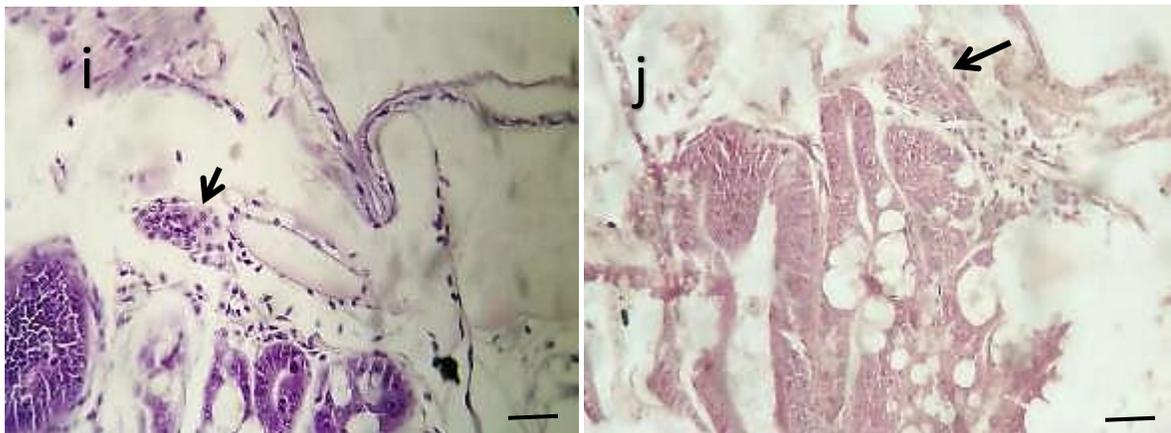
255 **4.2 EXPRESSÃO FENOTÍPICA DE CD68**

256 A possível capacidade fagocítica pode ser observada com a imunomarcção do
257 anticorpo CD68 em OL de larvas (fig. 6 e 7).



258 **Figura 6:** Órgão linfóide de pós-larvas de *L. vannamei* (setas). **g:** PL 13; **h:**
259 imunomarcção com CD68. Coloração HE 40X. Bar = 20 µm.
260

261



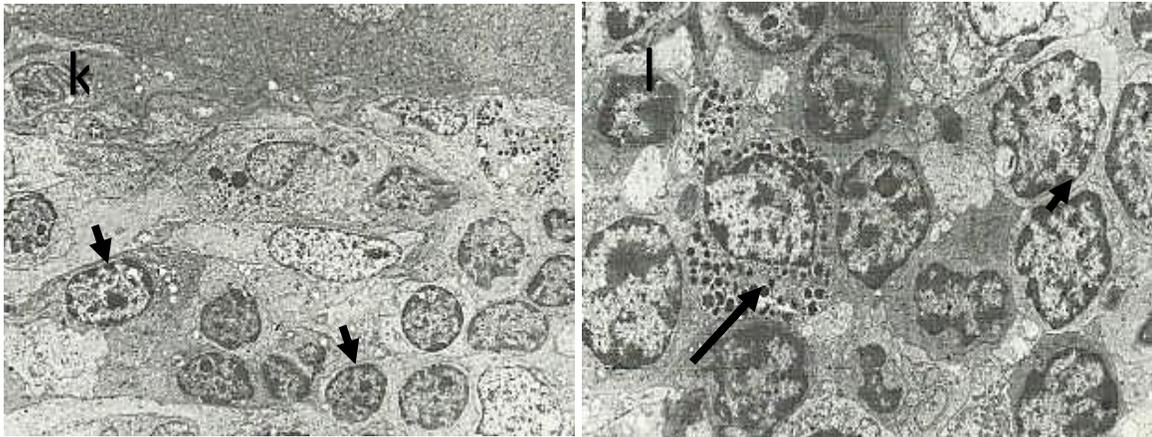
262

263 **Figura 7:** Órgão linfóide de pós-larvas de *L. vannamei* (setas). **i:** PL 18; **j:** imunomarcção
264 CD68. Coloração HE 40X. Bar = 20 µm.

265

266 **4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

267 Com a finalidade de identificar as estruturas celulares no órgão linfóide, foi
268 realizada análise ultraestrutural do órgão linfóide de juvenis de *L. vannamei*, quando
269 atingiram um peso médio de 5 g. Nas imagens abaixo são observadas as diferentes
270 estruturas que compõem as células no OL.



271 **Figura 8:** MET do órgão linfóide. **k:** células redondas com núcleos grandes (seta).
Células fusiformes, com restos de colágeno (aparentemente células de sustentação).
3200x. **l:** Fagossoma na superfície da célula (seta), células com grânulos (seta longa).

272 Na figura 8 observa-se o processo de fagocitose e a presença de mitocôndrias. São
273 observadas projeções celulares voltadas para o seio hemal, as quais são características de
274 boa capacidade fagocítica.

275 Na figura 9 e 10 são observadas estruturas próprias do órgão linfóide, como a
276 presença de grânulos, mitocôndrias, cromatina periférica e núcleo central. Além de
277 desmossomos, complexo de Golgi e um seio hemal.

278

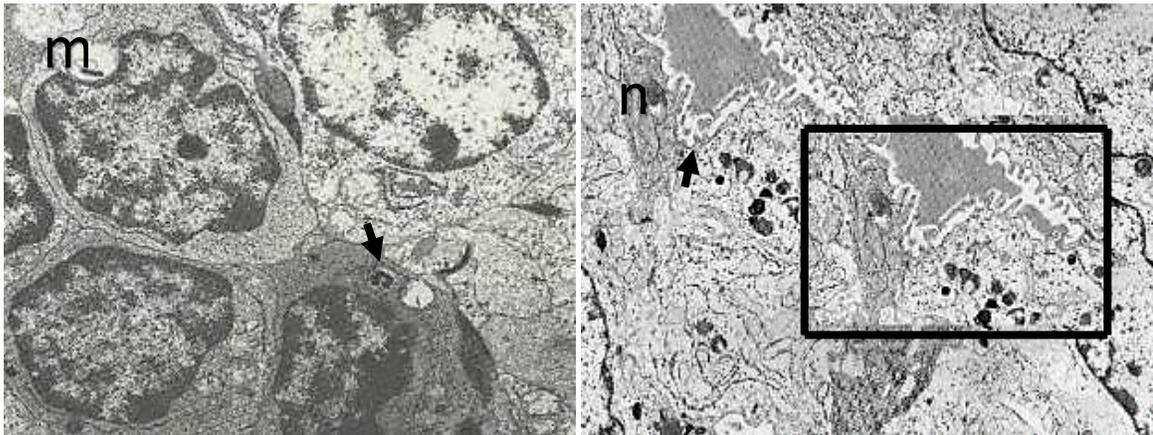


Figura 9: MET do órgão linfóide. **m:** material fagocitado. 20000x; **n:** Projeções da hemolinfa. 5000x.

279

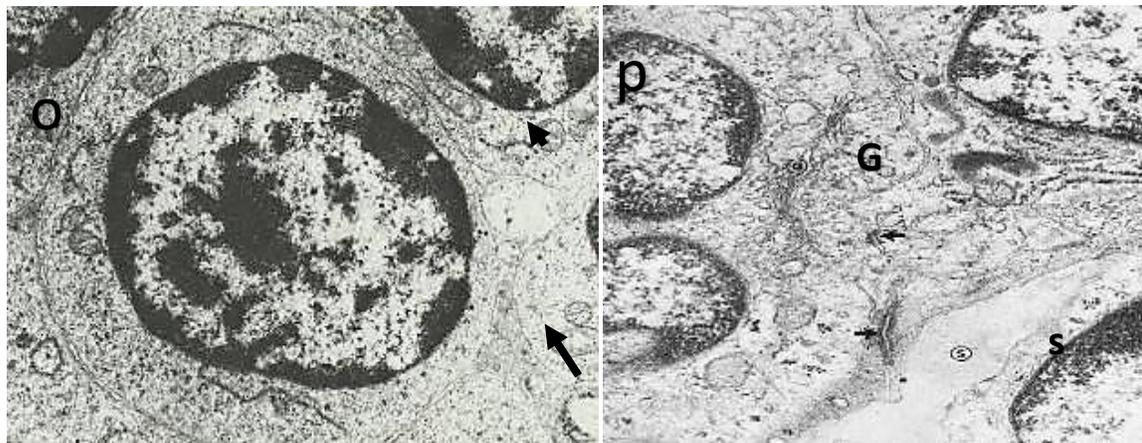


Figura 10: MET do órgão linfóide. **o:** mitocôndrias (seta), núcleo, e cromatina periférica (seta longa). 30000x; **p:** G: complexo de Golgi, S: seio hemal, desmosomos (setas). 11000x.

280

281 O retículo endoplasmático rugoso é visualizado na figura 11, além de invaginações,
 282 o que indica maior facilidade para fagocitar.

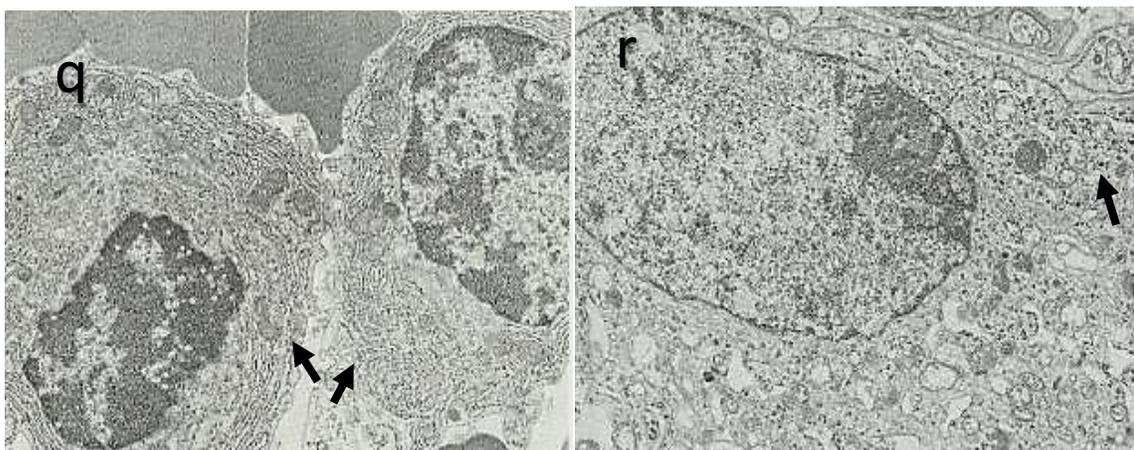


Figura 11: MET do órgão linfóide. **q:** Retículo endoplasmático rugoso (setas). 11000x; **r:** ribossomos citoplasmáticos (seta). 13000x.

283

284 5 DISCUSSÃO

285 O sistema imune de peneídeos vem sendo estudando, visando uma melhor
286 compreensão do papel do sistema imunológico dos crustáceos contra patógenos. No
287 entanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares do sistema imune
288 associados ao reconhecimento e eliminação de patógenos ainda é escasso. Ainda são
289 necessários mais estudos sobre a ativação de mecanismos genéticos associados ao sistema
290 imune inato, especificamente do camarão, além do sistema proPO, proteínas de adesão
291 celular peroxinectinas, proteínas de reconhecimento, proteína de ligação a β 1,3-glucano
292 (GBP) e formação e ativação de hemócitos e sua síntese proteica (Aguirre-Guzmán et al.,
293 2009). Na busca do conhecimento de outras estruturas presentes na eliminação dos
294 patógenos, o presente trabalho abordou a presença e importância funcional do órgão
295 linfóide em *L. vannamei*.

296 Neste trabalho foi observada a presença do OL na fase de PL 6, o que poderia
297 indicar que neste estágio o sistema imune começa a ser funcional, uma vez que pesquisas
298 indicam que o OL é um órgão presente nos processos de eliminação de patógenos e de
299 maturação de hemócitos (Hose et al., 1992; Kondo et al., 1994; van de Braak et al., 2002;
300 Pongsomboon et al., 2008).

301 Já na fase de PL 15, o órgão apresenta um maior número de componentes celulares
302 próprios de um OL mais desenvolvido, como a formação de esferóides, tecidos epiteliais e
303 hemócitos. Importante salientar que nesse estágio os animais são postos a diferentes tipos
304 de estresse, por exemplo, começa-se a baixar a salinidade, sendo então transferidos aos
305 diferentes sistemas de cultivo, como viveiros, estufas, sistemas com temperaturas baixas, e
306 altas densidades de estocagem, ou à cultivos com carga bacterina alta, como o sistema de
307 biofloco (Samocha et al., 1998; ABCC, 2005; Wang & Chen, 2006; Samocha et al., 2007).
308 Diante disso, a presença do órgão nas fases finais da larvicultura, pode indicar que os
309 camarões nessa fase já estão preparados para diferentes tipos de estresse.

310 O órgão linfóide de peneídeos muda de tamanho durante os estágios de
311 desenvolvimento do camarão. OL tende a mudar de tamanho, sendo menor nos estágios de
312 pós-larva. Segundo Nakamura (1987), o OL de *Marsupenaeus japonicus* apresentou uma
313 diminuição em tamanho relativo do órgão entre as PL 4 e 20. O autor sugeriu que uma
314 diminuição no OL indica que nesses estágios as larvas são mais vulneráveis a patógenos
315 infecciosos. No presente trabalho não se abordou as oscilações em área do OL, pelo que se
316 precisaria de estudos completos que indiquem se efetivamente o OL em *L. vannamei*,
317 apresenta a mesma condição antes citada.

318 Na análise imunohistoquímica do OL foram obtidos os primeiros dados da
319 imunomarcção com anticorpo primário CD68, marcador de células seletivo para
320 monócitos e macrófagos humanos, que marca especificamente células abundantes com
321 lisossomas. A abundância de lisossomos também é característica em hemócitos
322 (granulócitos) (Gottfried et al., 2008).

323 A família das proteínas CD68, se situa dentro das proteínas de importância
324 imunológica, apresentando como função a intercepção de restos celulares, exercendo dessa
325 forma o papel de receptores e sinalizadores para a ativação de processos de fagocitose,
326 mediando o recrutamento e ativação de macrófagos em animais com sistemas imunológicos
327 mais complexos. Sua detecção e a quantificação da expressão fenotípica tem sido
328 considerada um indicador do status imunológico principalmente em humanos e outros
329 mamíferos (Gottfried et al., 2008). Neste caso, podemos citar que o CD68 encontrou sítios

330 de adesão, marcando áreas com atividade fagocítica no órgão linfóide, podendo indicar que
331 o CD68 é uma proteína conservada filogeneticamente em camarões.

332 Com os dados obtidos, esta pesquisa aporta informação relevante na função
333 imunológica do órgão linfóide, e corroborando a importância destes, a análise
334 ultraestrutural por meio de MET indicou sinais de função fagocitária, demonstrando
335 importância do OL no ponto de vista imunológico. Nas imagens de MET foram
336 encontrados ribossomos nas células do órgão, e são nos ribossomos onde os peptídeos
337 antimicrobianos (PAMs) são sintetizados. Eles participam no sistema de defesa contra
338 diferentes patógenos como bactérias, vírus e fungos. Alguns dos PAMs eliminam
339 patógenos de forma direta, enquanto outros atuam indiretamente através da modulação de
340 sistemas de defesa do hospedeiro (Fox, 2013).

341 Exemplos de organelas de síntese e secreção, o retículo endoplasmático rugoso
342 (RER) e complexo de Golgi e, dependendo da quantidade deles pode existir pobre ou
343 abundante atividade metabólica (Raisz & Rodan, 1998; Sodek & Mckee, 2000). Ligado à
344 superfície externa de muitas partes do retículo endoplasmático, há um grande número de
345 minúsculas partículas granulares conhecidas como ribossomos. Quando essas partículas
346 estão presentes, o retículo é chamado de retículo endoplasmático rugoso. Os ribossomos
347 são formados por uma mistura de RNA e proteínas e sua função é sintetizar novas
348 moléculas de proteína na célula (Guyton & Hall, 2006).

349 Metchnikoff, 1880 em Rojas Espinosa & Arce Paredes (2003), verificou que a
350 função de células fagocitárias foi essencial para a sobrevivência de todas as espécies do
351 reino animal. Em organismos unicelulares como os protozoários, a função fagocitária é o
352 único meio pelo qual esses organismos adquirem sua comida. A capacidade fagocitária
353 dessas células melhorou ao longo da evolução e permanece nos animais mais evoluídos,
354 embora hoje a função dos fagócitos deixe de ser preponderantemente nutricional, se
355 tornando um mecanismo eficiente de proteção inespecífica contra agentes infecciosos e
356 eliminação de células mortas ou senis. Cada estágio do processo fagocítico (migração,
357 reconhecimento do que pode e deve ser ingerido, endocitose e destruição de partículas)
358 segue sendo estudado, como por exemplo, componentes moleculares e novas vias

359 metabólicas continuam sendo identificadas (Rojas Espinosa & Arce Paredes, 2003). Os
360 fagossomos presentes nas células que compõem o OL, observados neste trabalho por meio
361 de MET, são vesículas citoplasmáticas delimitadas por membranas, e são formados por
362 invaginações de material fagocitado, os quais podem se ligar aos lisossomos e assim em
363 conjunto digerir o material fagocitado Na MET de tecidos de juvenis de *L. vannamei* foi
364 encontrada uma abundante proliferação de fagossomos, que juntamente com a
365 imunomarcção com anticorpo CD68, indicaram a capacidade fagocítica do órgão linfóide

366 **6 CONCLUSÃO**

367 No presente trabalho, foi observado o surgimento do órgão linfóide em PL 6. No
368 entanto, um estágio antes (PL5), apresenta-se vestígios do OL. Também, verificou-se que
369 larvas de camarão *L. vannamei* no estágio PL 13 contam com capacidade fagocítica, e o OL
370 começa a ser funcional. Essa característica pode contribuir com menores taxas de
371 mortalidades no final da larvicultura, uma vez que, nesse estágio os animais poderão estar
372 mais aptos ante invasões patogênicas ou ambientes estressores.

373 Também podemos assumir o papel da fagocitose no OL por meio da MET e a
374 imunohistoquímica. Na MET, foram encontradas estruturas próprias do sistema fagocitário
375 e, com esses dados, corrobora com as informações já citadas sobre a possível função do OL
376 no processo de fagocitose. Por meio de imunohistoquímica, foi demonstrada a marcação do
377 OL com o anti- CD68, indicando que a proteína poderia permanecer conservada
378 filogeneticamente em camarões.

379

380 **7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

381

382 ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão. (2005). Programa de biosegurança
383 para Fazendas de Camarão Marinho Recife1th (ed), 68p.

384 Aguirre, G., & Ascencio, V. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture
385 potential. Recent Research Developments in Microbiology. 4: 333–348.

386 Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martinez, J.G., Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A.
387 Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. Thai Journal of Veterinary
388 Medicine. 39: 205-215.

389 Bachère, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. Aquaculture. 191: 3–11.

390 Bachère, E. (2003). Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential
391 tools for disease control in larviculture. Aquaculture. 227: 427–438.

392 Ciocca, D.R & Bjercke, R.J. (1986). Immunohistochemical Techniques Using Monoclonal
393 Antibodies. Methods in Enzymology. 121: 562-579.

394 Duangsuwan, P., Phoungpetchara, I., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Wanichanon, C., Sobhon,
395 P. (2008). Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in
396 normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. Fish & shellfish immunology, 24(4),
397 426-435.

398 FAO. (2004) Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de
399 postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. Roma:
400 Documento Tecnico de Pesca p. 450.

401 Fox, J.L. (2013). Antimicrobial peptides stage a comeback. Nat. Biotechnol. 31: 379-83.

402 Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and
403 intracellular trafficking, j. Biol. Chem. 266: 21327-21330.

- 404 Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Müller, A.,
405 Kastenberge,r M., Brockhoff, G, Andreesen, R., Kreutz, M. (2008). Expression of
406 CD68 in non-myeloid cell types, *Scand. J. Immunol.* 67 453-463.
- 407 Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). *Tratado de fisiología médica*. Elsevier Brasil.
- 408 Hernández-Chavarría, F., Sáenz, A., Freer, E. (2002). Aplicaciones biomédicas de la
409 microscopia electrónica y el análisis elemental con espectrómetro de Rayos
410 X. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas.* 23(3-4): 153-159.
- 411 Holness, C.L, & Simmons, D.L., (1993). Molecular cloning of cd68, a human macrophage
412 marker related to lysosomal glycoproteins, *blood* 81 1607- 1613.
- 413 Hose Je, Martin Gg, Tiu S, Mckrell N. (1992). Patterns of hemocyte production and release
414 throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Biol bull.* 183:
415 185-189.
- 416 Howe, C.L., Granger, B.L., Hull, M., Green, S.A., Gabel, C.A., Helenius, A., Mellman, I.
417 (1988). Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the
418 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly
419 conserved family of lysosomal membrane glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
420 U.S.A. 7577-7581.
- 421 Kondo, M., Itami, T., Takahashi, Y., Fujii, R., Tomonaga, S. (1994). Structure and function
422 of the lymphoid organ in the *Kuruma prawn*. *Dev comp immunol.* 18: 109.
- 423 Martín, L., Castillo, N. M., Arenal, A., Rodríguez, G., Franco, R., Santiesteban, D., e
424 Cabrera, H. (2012). Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to
425 early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea:
426 Decapoda). *Aquaculture*, 358, 234-239.
- 427 Martinez-Pomares, L., Platt, N., McKnight, A.J., da Silva, R.P., Gordon, S. (1996).
428 Macrophage membrane molecules: markers of tissue differentiation and
429 heterogeneity, *Immunobiology* 195 407-416.

- 430 Nakamura, K. (1987). Lymphoid organ and its developmental property of larval prawn
431 *Penaeus japonicus*. Mem Fac Fish, Kagoshima University. 36: 215-220.
- 432 Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J.,
433 Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on
434 world fish supplies. Nature 405: 1017-1024.
- 435 Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., Tassanakajon, A. (2008)
436 Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp,
437 *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. Fish shellfish
438 immunol 25: 485-93.
- 439 Raisz L.G., & Rodan G.A. (1998). Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV,
440 Krane SM. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego:
441 Academic Press; 1-22.
- 442 Rodríguez, J., & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health
443 control of Penaeid shrimp. Aquaculture 191: 109–119.
- 444 Rojas Espinosa, O., & Arce Paredes, P. (2003). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias.
445 Primera parte. Bioquimia, 28(4).
- 446 Romano, L.A. (2008). La inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica de
447 enfermedades de los peces. Anales de la Sociedad Científica Argentina. 417: 379-
448 386.
- 449 Samocha, T.M., Guajardo, H., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Speed, M., Mckee, D.A.,
450 Page, K.I. (1998). A simple stress test for *Penaeus vannamei* post-larvae.
451 Aquaculture 165: 233–242
- 452 Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z.,
453 Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L. (2007). Use of molasses as carbon source
454 in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*.
455 Aquacult. Eng. 36:184–191

- 456 Smith, V., Brown, J., Hauton, C., (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really
457 protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology* 15: 71–90.
- 458 Sodek J, & McKee M.E. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone.
459 *Periodontology*. 24:99-126.
- 460 Stirling JW, & Woods (2002). A. Transmission electron microscopy: diagnostic
461 applications. In: Bancroft JD, Gamble M, eds. *Theory and Practice of Histological*
462 *Techniques*, ed 5. London: Churchill Livingstone:701–728.
- 463 Van De Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W.B.,
464 Rombout, J.H.W.M., Van Der Knaap, W.P.W. (2002). The roles of haemocytes and
465 the lymphoid organ in the clearance of injected vibrio bacteria in *Penaeus monodon*
466 shrimp. *Fish shellfish immunol.* 13:293-309.
- 467 Vázquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agudis, C., Morales, A., Zenteno, E., (2009).
468 Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity* 15, 179–188.
- 469 Wang, F.I & Chen, J.C. (2006). The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon*
470 and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* under
471 temperature stress. *Aquaculture*, 258:34-41.
- 472 Zot A.s., & Fambrough D.M. (1990). Structure of a gene for a lysosomal membrane
473 glycoprotein (lep100). Housekeeping gene with unexpected exon organization, *J.*
474 *Biol. Chem.* 265: 20988-20995.
- 476

CAPÍTULO II

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÓRGÃO LINFÓIDE DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADO EM SISTEMAS DE ÁGUA CLARA E DE BIOFLOCO (BFT)

1 **RESUMO**

2 Mundialmente, a espécie de camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* é a mais
3 produzida, sendo o segundo produto comestível mais importante em termos de aquacultura.
4 Novas tecnologias como o sistema de bioflocos estão sendo otimizadas objetivando o
5 controle das doenças e redução do uso de água na carcinicultura. Neste tipo de sistema,
6 ocorre uma aparente estimulação no sistema imune inato, mantendo os camarões menos
7 susceptíveis a uma invasão patogênica. Pesquisas envolvendo o manejo na engorda da
8 espécie em sistemas BFT já estão bem elucidadas, sendo necessários mais estudos no que
9 se refere ao comportamento imunológico do camarão no sistema. Tentando aportar mais
10 uma variável a ser avaliada no sistema imunológico de camarões peneídeos, no presente
11 capítulo foi pesquisada a participação do órgão linfóide em processos de fagocitose,
12 tentando elucidar as sugestões de vários autores, que indicam que o órgão possa ter um
13 papel importante no sistema imune. Análises morfométricas indicam que os camarões
14 cultivados em sistemas BFT apresentam órgão linfóide de maiores dimensões, comparado
15 com os cultivados em sistemas de água clara.

16

17 **Palavras chaves:** histologia, morfometria, imunidade.

18

19 **ABSTRACT**

20 Worldwide, the species of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* is the most
21 produced, being the second most important edible product in terms of aquaculture. New
22 technologies such as the biofloc system are being optimized to control disease and reduce
23 water use in shrimp farming. In this type of system, an apparent stimulation occurs in the
24 innate immune system, keeping the shrimp less susceptible to a pathogenic invasion.
25 Researches involving the management of fattening in BFT systems are already well
26 understood, and further studies are required regarding the immune behavior of the shrimp
27 in the system. In this chapter, the participation of the lymphoid organ in phagocytic
28 processes was investigated in an attempt to elucidate the suggestions of several authors,
29 which indicate that the organ may play an important role in the system immune.
30 Morphometric analyzes indicate that shrimp cultured in BFT systems have a larger
31 lymphoid organ compared to those grown in clear water systems.

32

33 **Keywords:** histology, morphometry, immunity.

34

35 1 INTRODUÇÃO

36 Atualmente o cultivo de camarão *L. vannamei* segue crescendo mundialmente, sendo
37 relatada uma produção em 2016 de 4.156 milhões de toneladas, atingindo 53% da produção
38 mundial de crustáceos (FAO, 2018).

39 Nas últimas décadas, houve a projeção de inúmeros sistemas de produção para o cultivo
40 de vários organismos aquáticos na aquicultura, destinadas a reduzir o consumo de água e
41 espaço, aumentando a densidade nos cultivos (Hargreaves, 2006). Um exemplo interessante
42 deste tipo de sistema é o chamado bioflocos ou BFT (BioFloc Technology), baseado no
43 desenvolvimento de flocos microbianos formados a partir de uma elevada relação de
44 carbono: nitrogênio (C: N) na água, com pouca ou nenhuma troca de água e alta oxigenação
45 (Avnimelech & Kochba, 2009).

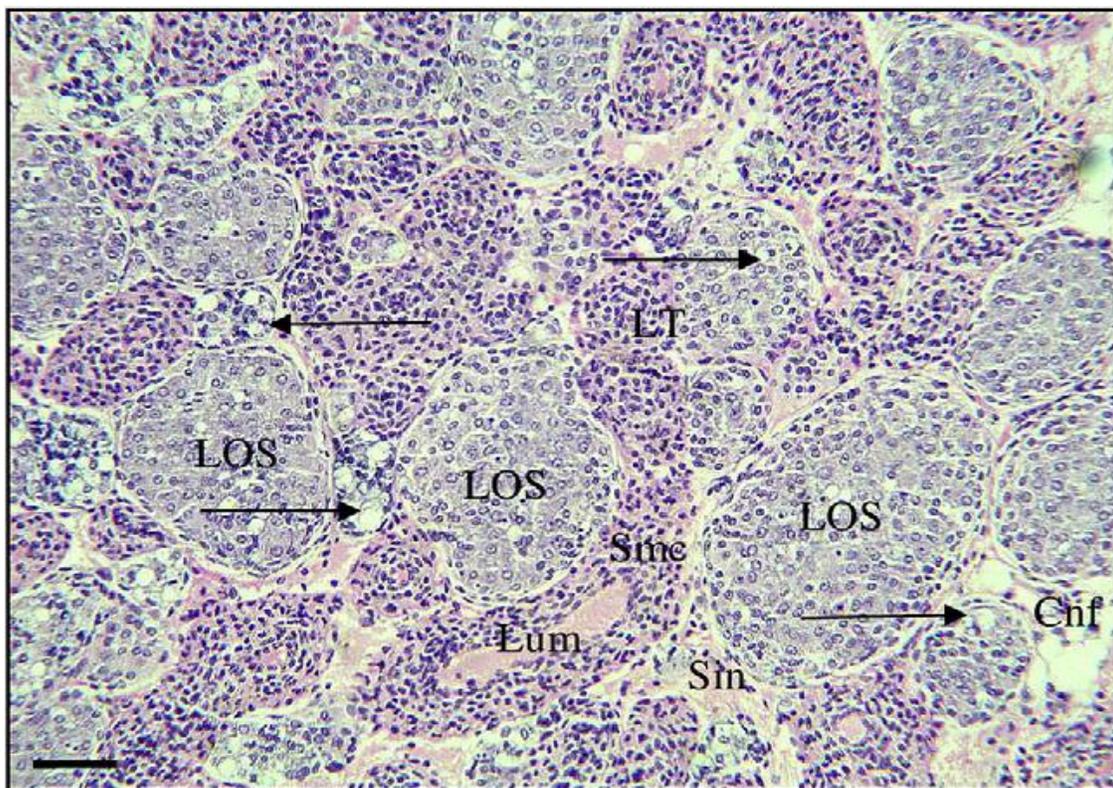
46 O sistema BFT apresenta uma proposta por ser uma alternativa para evitar ou controlar
47 as doenças dos camarões cultivados. No sistema com bioflocos o risco com
48 desenvolvimento de doenças é menor (Poersch et al., 2012). Estudos mais recentes indicam
49 que os sistemas em bioflocos oferecem mais proteção contra doenças na carcinicultura
50 quando comparado a sistemas convencionais (Kim et al., 2014).

51 Embora o sistema de bioflocos tenha sido criado para melhorar a qualidade da água
52 (Avnimelech, 2012), quando os agentes patogênicos entram nos sistemas de produção, os
53 camarões não apresentam necessariamente um mecanismo imunológico imediato. Tem sido
54 demonstrado que a população microbiana associada aos bioflocos induz um gatilho
55 permanente para o desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico do camarão e,
56 assim, cria um mecanismo de defesa nos animais (Avnimelech, 2012; Kim et al., 2014).

57 Em crustáceos, o órgão linfóide (figura 12) é encontrado exclusivamente nos
58 camarões peneídeos. Atualmente é aceito que o órgão linfóide desempenha um papel
59 importante na defesa imunológica frente à invasão de patógenos. A descoberta de genes
60 relacionados ao sistema imune com o OL confirma que algumas células têm papéis
61 imunológicos, mesmo que esses genes possam ser dos hemócitos alojados dentro desse
62 órgão (Rusaini & Owens, 2010).

63 A formação de agregados celulares esféricos no órgão linfóide (Lymphoid Organ
64 Spheroid - LOS) tem sido observada em peneídeos, natural ou experimentalmente
65 infectados, com doenças virais. Tem sido sugerido que estas células esféricas constituem
66 um importante local de degradação viral. O mecanismo de origem e eliminação de
67 patógenos pelos esferóides é mais provável que seja produzido a partir de hemócitos
68 granulares por exocitoses e eliminado para o ambiente (Anggraeni & Owens, 2000)

69



70
71 **Figura 12:** Micrografia de luz da seção longitudinal do OL de *P. monodon*. As células LOS
72 são formadas nos seios hemais (Sin) e parecem ter um citoplasma mais basofílico e
73 ausência de lúmen central (Lum) em comparação com o túbulo linfóide normal (LT).
74 Alguns esferóides demonstraram vacúolos citoplasmáticos (seta). Coloração HE. Barra de
75 escala: 50 µm. Cnf, fibra de tecido conjuntivo; Smc, células da matriz estromal (Rusaini &
76 Owens, 2010).

77

78 O cultivo de camarões em um sistema BFT ajuda a reforçar o sistema imune dos
79 camarões, podendo esse efeito ser refletido na atividade do órgão linfóide, quando
80 comparado com camarões provenientes de criação em água clara. Por meio de morfometria
81 histológica e determinação do tamanho do órgão linfóide em camarões provenientes de
82 sistema BFT, poderá ser possível conhecer o comportamento do órgão linfóide em sistemas
83 de água clara (com recirculação de água) e BFT. Com a finalidade de demonstrar possíveis
84 variações morfométricas do órgão linfóide em *L. vannamei*, no presente trabalho foi
85 aportado o desenvolvimento do órgão linfóide em camarões cultivados em sistemas de água
86 clara e sistemas de bioflocos (BFT).

87 **2 OBJETIVOS**

88 **2.1 OBJETIVO GERAL**

89 Analisar a morfometria do órgão linfóide do camarão branco do Pacífico *L.*
90 *vannamei* cultivados em sistemas de água clara e sistema BFT.

91 **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 92 • Realizar análise histológica morfométrica do órgão linfóide em camarões
93 provenientes de sistema de água clara e de sistema BFT.

94

95 **3 MATERIAL E MÉTODOS**

96 **3.1 LOCAL E INSTALAÇÕES**

97 O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquacultura (EMA-FURG) do Instituto
98 de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande, localizada na praia do Cassino,
99 Rio Grande, RS, Brasil.

100 **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

101 Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com dois
102 tratamentos de três repetições cada, com duração de 12 semanas (de janeiro a março).

103 Foram utilizados como unidades experimentais seis tanques de PVC com capacidade
104 de 310 L e volume de 200 L, distribuídos em dois tratamentos: Água clara (AC) e bioflocos

105 (BFT) com três repetições cada um. A água utilizada foi bombeada da praia do Cassin, e
106 filtrada com filtro de areia.

107 As unidades experimentais foram mantidas com renovação diária de água de 50%
108 para os tratamentos AC, e sem renovação de água para os tratamentos BFT. As unidades
109 foram providas de aeração individual, por meio de aerotubes.

110 **3.2.1 Sistema BFT (Bio-Floc Technology)**

111 Com a finalidade de estimular a rápida formação do biofoco na coluna da água e de
112 não ter concentrações altas de compostos nitrogenados na fase inicial do experimento, foi
113 utilizado 20% de inóculo de biofocos 40 L, para cada unidade experimental (3 tanques) do
114 tratamento BFT. Esse inóculo foi proveniente do Raceway (GH5) da Estação Marinha de
115 Aquicultura (EMA-FURG).

116 **3.2.2 Sistema Água clara**

117 Foram adicionados 200 BioBalls por tanque, em total 3 unidades experimentais, do
118 tratamento AC. As biobols foram usadas com a finalidade de ajudar na adesão de matéria
119 orgânica e bactérias nitrificantes (Domingos & Vinatea 2008). As BioBalls foram mantidas
120 submersas em cada unidade experimental.

121 **3.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

122 Para realização do experimento, náuplios da espécie *L. vannamei* foram obtidos da
123 empresa Aquatec® e após atingirem o tamanho de pós larva 21, foram estocados numa
124 densidade de 300 indivíduos /m³ por cada unidade experimental, sendo em total de 6. As
125 unidades experimentais foram mantidas na estufa -GHI da Estação Marinha de Aquicultura.

126 Foi utilizada ração de 40% (no período inicial das PL's) e 38% (na fase de engorda), de
127 proteína bruta, que foi fornecida duas vezes ao dia, em bandejas de alimentação, de acordo
128 com a metodologia descrita por Wasielesky et al., (2006).

129 3.4 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

130 **Parâmetros físico-químicos:** Duas vezes por dia foram monitoradas as concentrações
131 de oxigênio dissolvido, temperatura e pH com um multiparâmetro YSI pro 20 e pHmetro
132 FE20-FiveEasy™ (Mettler Toledo). A salinidade foi medida com um multi parâmetro
133 (Hatch, HQ40D) e mantida em 27 ppm ao longo do experimento.

134 **Nitrogenados:** Uma vez ao dia foi coletada uma amostra de água por tanque e efetuada
135 análise da amônia (N- (NH₃ +NH₄⁺)), nitrito (N-NO₂⁻) e nitrato (N-NO₃⁻), conforme
136 UNESCO (1983).

137 **Sólidos suspensos totais:** O peso dos sólidos suspensos totais foi aferido por
138 gravimetria mediante a filtragem de alíquotas de 20 e 50 mL de água (tratamento BFT e
139 AC, respectivamente) em filtros de fibra de vidro GF 50-A.

140 **Desempenho zootécnico:**

141 Foi realizada biometria inicial para a seleção de camarões para estocagem (n=100).
142 tendo um peso médio de 0.04 gramas.

143 • **Crescimento:** Foram realizadas biometrias semanalmente (n=20) para determinar o
144 crescimento dos camarões de cada tratamento, utilizando balança de precisão
145 AD2000 Marte (0.01 g).

146 • **Sobrevivência:** Ao final do período experimental todos os camarões foram
147 coletados, contados e pesados individualmente para quantificar a sobrevivência.

148 • **Conversão alimentar aparente (CAA):** A taxa de conversão alimentar foi
149 calculada através da equação: CAA=Quantidade de Ração Fornecida / Biomassa
150 Total Produzida A taxa foi calculada para as diferentes repetições e, posteriormente,
151 para os tratamentos.

152 3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

153 No final do experimento, nove camarões de cada tratamento foram coletados. Foram
154 eutanasiados em gelo, e posteriormente, dissecados e fixados em solução de Davidson e,
155 após 48 horas, transferidos para álcool a 70%. Os tecidos foram desidratados em
156 concentrações ascendentes de etanol, diafanizados em xilol e incorporados em parafina
157 (Paraplast – Sigma Aldrich, USA). O cefalotórax foi selecionado para corte do órgão

158 linfóide, de acordo com o posicionamento do órgão, cortado no micrótomo (LEICA
159 RM2245) na espessura de 5 μm . O tecido foi corado com hematoxilina e eosina (HE), e as
160 lâminas foram observadas com microscópio óptico (Nikon, Eclipse E200).

161 As imagens com os cortes histológicos foram digitalizadas para análise
162 morfométrica com microscópio Primo Star Zeiss e câmera digital AxioCam ERc5s. A
163 análise das imagens foi realizada por meio do software AxioVision 4.8.2.0.

164 **3.6 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS**

165 Mediante o gráfico em plano cartesiano das áreas medidas a partir dos cortes
166 histológicos do OL utilizando o software Graphpad® 6, foram matematicamente integradas
167 todas as áreas a maneira de área sob a curva. Em seguida a integral da área (IA) foi operada
168 com o largo padrão dos cortes (5 μm) para obter o volume total cortado do OL por camarão.
169 Posteriormente todos os dados foram normalizados com os pesos de cada indivíduo
170 obtendo finalmente o coeficiente alométrico μm^3 de OL/g de cam, com o qual foi feita a
171 análise estatística de Mann-Whitney.

172 Para determinar o comprimento e a área total dos órgãos, utilizou-se uma ocular de
173 integração de 5 linhas e 25 pontos (Carl Zeiss).

174 **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

175 Os valores de qualidade da água, crescimento, sobrevivência, e conversão alimentar
176 de cada tratamento foram analisados com auxílio do software STATISTICA® 7.0. Foram
177 feitos testes de Kolmogorov-smirnov e Levene para normalidade e homoscedasticidade,
178 respectivamente. Após atingirem as premissas, os dados foram submetidos a ANOVA de
179 uma via. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha=0,05$) e após
180 cumprir as premissas necessárias para analisar possíveis diferenças entre as repetições em
181 um mesmo tratamento, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey, para determinar se existiam
182 diferenças significativas entre os tratamentos. Quando os dados não apresentavam
183 distribuição normal e homocedasticidade, foram transformados, e submetidos ao teste não
184 paramétrico de Teste U Mann-Whitney.

185 Os dados de volume de OL/g ($\mu\text{m}^3/\text{g}$) de camarão foram ranqueados para a
186 aplicação do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

187 **4 RESULTADOS**

188 **4.1 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS:**

189 Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos são apresentados na Tabela 1.
190 Todos os parâmetros físico-químicos, com exceção do pH, apresentaram diferenças
191 significativas entre ambos tratamentos.

192 Os sólidos suspensos totais (SST) para AC não apresentaram acumulação em função
193 da constante renovação de água. No entanto, para o sistema BFT, nas últimas semanas do
194 experimento surgiu um acúmulo chegando a 875 ml l⁻¹.

195 No tratamento AC, não foram registrados valores de acumulação de amônia, nitrito
196 e nitrato devido a constante troca de água. Além disso, a transparência foi total ao longo do
197 experimento. No tratamento BFT, quando se iniciou o incremento da amônia, o sistema foi
198 controlado com a incorporação de melação.

199 Tabela 1: Médias (\pm DP), valores máximos e mínimos dos parâmetros físicos e químicos
200 dos tanques experimentais de ambos tratamentos durante o período experimental (12
201 semanas).

	TRATAMENTO				TRATAMENTO		
	ÁGUA CLARA				BFT		
	Media	Max	Min	Media	Max	Min	
Oxigênio (mg l ⁻¹)	6.3 ^a ± 0.4	7.0	5.3	6.1 ^b ± 0.3	7.0	4.5	
Temperatura (°C)	28.6 ^a ± 0.8	31.7	25.5	28.8 ^b ± 0.7	31.7	22.2	
pH	8.08 ± 0.30	8.66	7.27	8.08 ± 0.40	8.63	6.82	
Alcalinidade (ml l ⁻¹)	133 ^a ± 26	220	51	176 ^b ± 41	280	82	
SST (mg l ⁻¹)	29 ^a ± 9.27	68	10	537 ^b ± 266	875	120	
Amônia (ml l ⁻¹)	0.75 ^a ± 0.92	8.89	0.39	0.12 ^b ± 0.14	0.82	0.00	
Nitrito (ml l ⁻¹)	1.51 ^a ± 1.69	7.73	0.00	0.45 ^b ± 1.73	12.87	0.04	
Nitrato (ml l ⁻¹)	7.44 ^a ± 6.34	14.77	2.00	100 ^b ± 53	190	48	

202 Letras diferentes indicam diferenças significativas p>0,05

203

204 **4.2 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO**

205

206 Os parâmetros de desempenho dos camarões no sistema experimental estão
207 detalhados na Tabela 2.

208

209 A sobrevivência para ambos tratamentos foi estatisticamente igual, sendo a superior
210 a 90 % ($p>0,05$). O crescimento de *L. vannamei* no tratamento AC foi significativamente
211 maior que o tratamento BFT ($P< 0,05$) durante todo o período experimental. O peso médio
212 no final do experimento foi de 6 g para tratamento AC e 4.5 g para o BFT, e o ganho de
213 peso semanal (Figura 13) para o tratamento AC foi na média de 5.98, e 4.43 para BFT.
Ambos dados apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

214

215 O consumo de ração no período experimental para ambos tratamentos não
apresentou diferenças significativas (Figura 14).

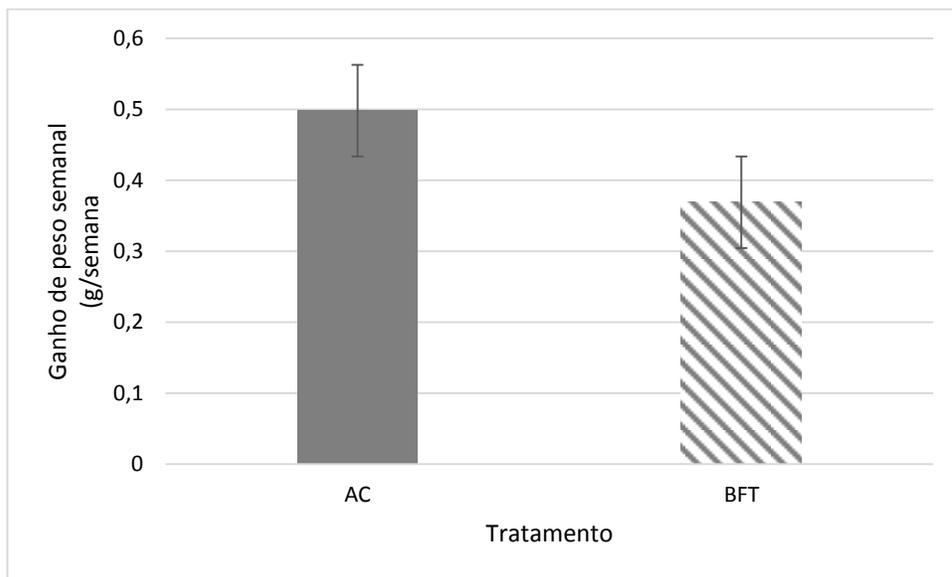
216

217 **Tabela 2:** Desempenho zootécnico dos camarões *L. vannamei*.

	TRATAMENTO		TRATAMENTO	
	ÁGUA CLARA		BFT	
	Media		Media	
Sobrevivência	90	± 6	90.8	± 10.8
Peso médio final	6.0 ^a	± 1.2	4.5 ^b	± 1.4
Ganho de peso	5.98 ^a	± 0.67	4.43 ^b	± 0.15
Ganho de peso semanal	0.50 ^a	± 0.06	0.37 ^b	± 0.01
Biomassa final	948.01 ^a	± 91.08	710.64 ^b	±114.85
CAA	2.51 ^a	± 0.10	3.18 ^b	± 0.70

218 Letras diferentes indicam diferenças significativas $p>0,05$

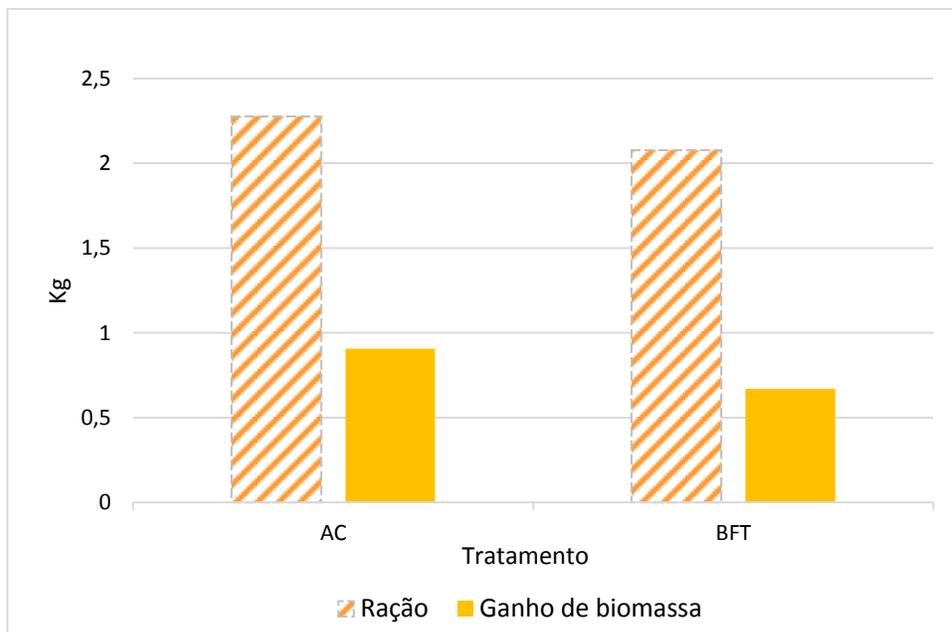
219



220

221 **Figura 13:** Ganho de peso semanal (12 semanas) de juvenis de *L. vannamei* em tratamentos
 222 AC e BFT.

223



224

225 **Figura 14:** CAA Conversão alimentar aparente obtida para os camarões *L. vannamei* de
 226 ambos tratamentos ao final do período experimental (12 semanas).

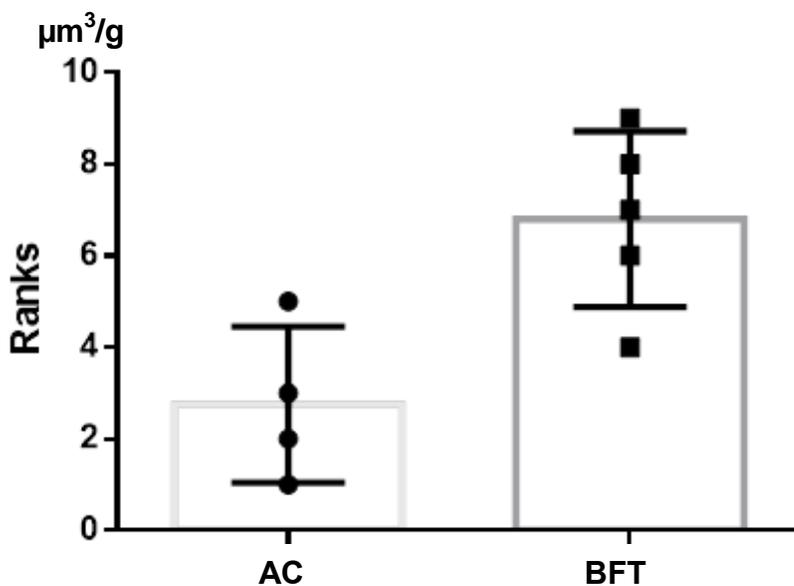
227 **4.3 MORFOMETRIA DO ÓRGÃO LINFÓIDE**

228 Os dados dos cortes histológicos morfométricos não apresentaram normalidade nem
229 homogeneidade das variâncias, e utilizou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-
230 Whitney. No entanto, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (p
231 $<0,05$) (figura 15).

232 Na figura 16 são demonstradas as diferenças morfométricas no órgão linfóide em ambos
233 tratamentos.

234

235



236

237 **Figura 15:** Diferenças no tamanho do OL de *L. vannamei* em tratamentos de água clara e
238 BFT.

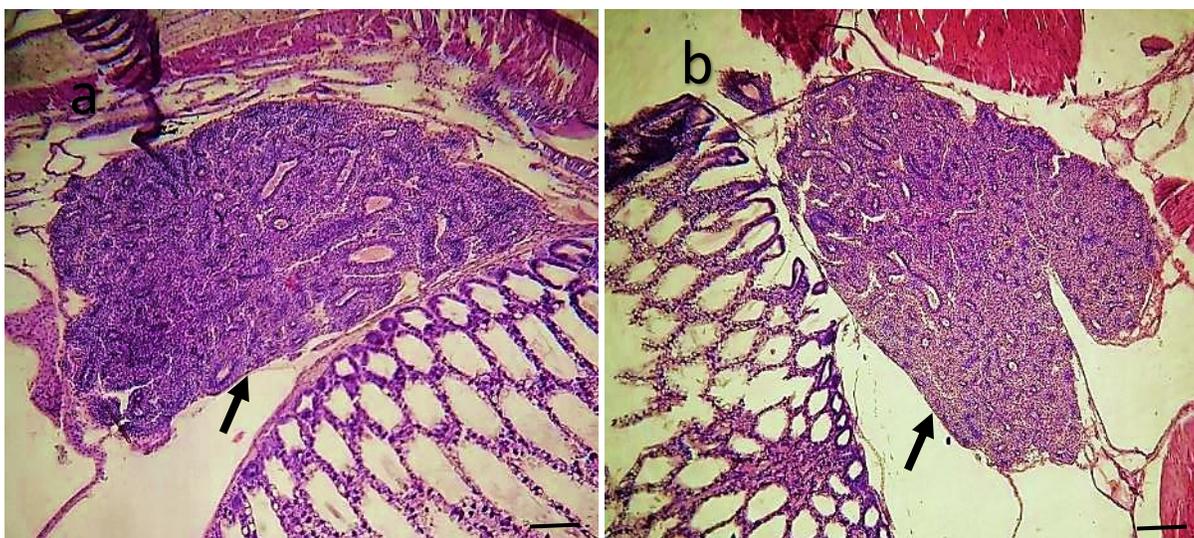


Figura 16: OL de camarões juvenis *L. vannamei* (setas) **a:** OL no tratamento AC; **b:** OL no tratamento BFT. Coloração HE 40X. Bar = 20 μ m.

239

240 5 DISCUSSÃO

241 As consequências de um manejo inadequado dos parâmetros de qualidade da água
242 podem interferir diretamente no desempenho zootécnico de organismos aquáticos (Barbieri
243 & Ostrenki, 2002). Parâmetros como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e
244 salinidade no presente trabalho foram mantidos dentro do recomendado para cultivos de
245 camarões. A temperatura ideal para *L. vannamei*, oscila entre os 27 e 30°C. (Wyban et al.,
246 1995). As concentrações ótimas de oxigênio dissolvido para *L.vannamei* são iguais ou
247 superiores a 5 mg / l (Boyd, 1990, Van Wyn & Scarpa, 1999, Krumenauer et al., 2012). O
248 valor ótimo de pH para cultivos de camarão oscila entre 7,5 e 8,5 (Zhang et al., 2006). No
249 experimento foram registrados pH na média de 8, para ambos tratamentos. No caso da
250 alcalinidade, o *L. vannamei* é uma espécie com alta tolerância a variações deste parâmetro.
251 Os níveis aceitáveis da alcalinidade encontram-se acima de 100 mg/L de CaCO₃. A
252 alcalinidade foi monitorada durante todo o período experimental, mantendo os valores
253 sempre acima de 100 mg/L de CaCO₃ com a utilização de Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)
254 (Furtado et al., 2011). Ponce-Palafox et al., (1997) obtiveram melhores resultados de
255 sobrevivência e crescimento de juvenis de *L. vannamei* em salinidades entre 33 e 40 ‰. As

256 unidades experimentais aqui trabalhadas foram mantidas em uma salinidade de 27‰, no
257 entanto, não houve interferência na sobrevivência dos indivíduos, apresentando índices
258 superiores a 90%.

259 O nitrogênio pode ser visto em duas formas na aquicultura: como nutriente e como
260 tóxico. Lorenzen et al., (1997) afirmam que a absorção por fitoplâncton e sedimentação
261 subsequente são processos chave na dinâmica do nitrogênio nos tanques de camarão.
262 Dentro dessa dinâmica, são gerados compostos nitrogenados que podem afetar a
263 sobrevivência e o crescimento do camarão, como a amônia e o nitrito, que em altas
264 concentrações podem causar mortalidades (Burford & Lorenzen, 2004). A amônia quando
265 em concentrações superiores a 3,95 mg/L, pode afetar negativamente o desempenho dos
266 organismos, podendo gerar mortalidades (Boyd, 1990; Lin & Chen, 2001). O nível de
267 segurança do nitrito para o cultivo em salinidade 35, é de 25,7 mg/L, acima desta
268 concentração pode reduzir o crescimento dos camarões, aumentar o consumo de oxigênio e
269 gerar altas taxas de mortalidade no cultivo (Lin & Chen, 2003). E o nitrato, sendo o
270 composto menos tóxico, Kuhn et al. (2010), indicou que concentrações inferiores a 220
271 mg/L para o *L. vannamei* não afetam o desempenho zootécnico dos camarões. No presente
272 experimento, os níveis de compostos nitrogenados se mantiveram sempre dentro dos níveis
273 aceitáveis para peneídeos (Thoman, 2001; Azim & Little, 2008) e normais para sistemas
274 BFT (Lin & Chen, 2001; Kuhn, et al., 2008; Avnimelech & Kochba, 2009). A ausência na
275 acumulação destes compostos no tratamento de água clara foi devido a constante renovação
276 de água, e no tratamento BFT, pela adição do inóculo no início do experimento.

277 Nos cultivos com sistema BFT, os níveis dos sólidos suspensos totais (SST) tende a
278 se acumular e aumentar, podendo afetar negativamente o desempenho zootécnico dos
279 camarões (Gaona et al., 2011). Os níveis toleráveis de SST para *L. vannamei* devem
280 permanecer abaixo de 500 mg/L (Samocha et al., 2007). Schweitzer et al., (2013)
281 corroborou com a citação anterior, mostrando valores de sólidos suspensos totais entre 400
282 ~ 600 mg/L sendo os adequados para o cultivo do *L. vannamei*. No presente estudo
283 apresentaram-se concentrações medias de 537 mg/L, no entanto nas últimas semanas de
284 cultivo, os níveis de SST foi de 875 mg/L, sendo possível que as altas concentrações de

285 sólidos suspensos tenham influenciado negativamente no desempenho zootécnico dos
286 organismos cultivados no tratamento BFT.

287 O presente experimento apresentou um melhor desempenho zootécnico nos
288 camarões provenientes do tratamento AC, tendo o maior peso final, ganho de peso semanal,
289 CAA e biomassa final. No entanto o tratamento BFT apresentou valores baixos no ganho
290 de peso semanal e final, e apresentando maior CAA. Ray et al., (2017), relata resultados
291 similares com este trabalho. Os autores indicam que camarões cultivados em sistemas de
292 recirculação aquícola (RAS), de água clara, obtiveram melhoras significativas em termos
293 de desempenho zootécnico, alcançando maior peso final, e menor conversão alimentar
294 aparente.

295 Várias pesquisas indicam melhora no desempenho zootécnico de camarões
296 cultivados em sistemas BFT. Em estudo comparativo de sistemas superintensivos
297 (300 camarões/ m²) de *L. vannamei*, em sistemas de água clara, bioflocos e água misturada
298 50:50, verificou-se que os camarões criados em sistemas de bioflocos atingiram um peso
299 final significativamente maior ($p < 0,05$) à aqueles cultivados em sistemas de água clara
300 (Wasiolesky et al., 2006). Esses dados foram corroborados por Emerenciano et al. (2011),
301 os autores compararam o sistema BFT e água clara, utilizando pós-larvas do
302 *Farfantepenaeus paulensis*. Concluindo que, a presença dos bioflocos contribuiu no ganho
303 de peso dos camarões em cerca de 50% em comparação com os criados em sistema de água
304 clara. Sugere-se que, o menor ganho de peso no tratamento BFT, verificado no presente
305 trabalho, pode ter sido influenciado pelas altas concentrações de SST no final do período
306 experimental, sendo que esse aumento de material particulado pode gerar o mal
307 funcionamento das brânquias, prejudicando o desenvolvimento ótimo dos organismos
308 cultivados e afetando negativamente seu desempenho zootécnico (Hargreaves, 2006; Gaona
309 et al., 2011).

310 O peso e o estado de saúde dos camarões podem afetar o tamanho do OL, ou seja,
311 quanto maior o camarão, maior o OL. De acordo com Shao et al., (2004) o diâmetro do OL
312 em *F. chinensis* de 2 mm de diâmetro em indivíduos com 12 e 13 cm de comprimento. ().
313 No caso de *P. monodon*, foram analisados espécimes entre 150 e 170 g, e observado órgão

314 linfóide de cerca de 3-4 mm de comprimento, 2-3 mm de largura e 1-2mm de espessura
315 (Duangsuwan et al., 2008). No presente estudo foram obtidos dados volumétricos de 6 e 3
316 $\mu\text{m}^3/\text{g}$ de camarão para o tratamento BFT e AC, respectivamente.

317 As diferenças no tamanho do órgão nos tratamentos podem ser explicadas pelos
318 distintos sistemas de cultivo em que foram mantidos os camarões. Tendo em vista que, em
319 um sistema de água clara, a constante troca de água impede acumulação de compostos
320 nitrogenados, matéria orgânica, podendo também reduzir a presença de patógenos. Por
321 outro lado, no sistema BFT, a carga microbiana poderia influenciar na ativação do sistema
322 imune dos camarões. Trabalhos prévios utilizando bioflocos como sistema de cultivo, tem
323 sugerido uma melhor condição imunológica dos camarões, o que pode ser efeito do aporte
324 de proteína de origem microbiana e das condições próprias do sistema BFT (Burford et al.,
325 2004). O biofoco elucidada claramente a resposta imune inata do camarão. Este efeito de
326 estimulação parece ser uma característica geral do sistema de bioflocos (Panigrahi et al.,
327 2018; Panigrahi, et al., 2019). O Biofoco age como um probiótico natural atuando contra
328 estimulantes patogênicos e, a fonte de carbono usada no biofoco aumenta as bactérias
329 benéficas naturalmente (Hapsari, 2016).

330 Estudos com órgãos linfóides em vertebrados indicam que funcionalmente são
331 considerados mais ativos os órgãos com maior tamanho (Tambini et al., 2010), sendo
332 realizada análise morfométrica de órgãos linfóides em vertebrados, após utilização de
333 própolis como composto bacteriostático. Os autores obtiveram os melhores resultados com
334 organismos tratados com própolis, e indicaram que quanto maior o desenvolvimento dos
335 órgãos linfóides, melhor será a resposta imunológica dos animais (Arteaga & Jauregui,
336 2016). Neste trabalho, os dados aqui apresentados podem coincidir com tal pesquisa, uma
337 vez que, morfometricamente, os organismos cultivados no sistema BFT apresentaram maior
338 tamanho do órgão linfóide.

339 As organizações estruturais dos órgãos linfóides de penéides foram pouco
340 estudados em *F. chinensis* por Oka (1969), em *Sicyona ingentis* por Martin et al., (1987), e
341 em *Litopenaeus stylirostris* por Bell & Lightner (1996). Esses autores descreveram o órgão
342 linfóide constituído por túbulos linfóides, que são a unidade básica do órgão. Acredita-se

343 que este órgão desempenha um papel muito importante contra a infecção, especialmente
344 por vírus, pois é essencialmente um órgão de filtração. (Anggraeni & Owens, 2000;
345 Kanobdee et al., 2002).

346 Duangsuwan et al., (2008) citaram que a condição de função filtradora do OL pode
347 ser assertiva. Eles explicam que os túbulos linfóides são essencialmente os capilares de
348 extremidades cega da artéria subgástrica, onde a hemolinfa do camarão passa, assim como
349 o sangue que circula no baço dos mamíferos. Uma vez nos capilares (os lúmenes dos
350 túbulos linfóides), a hemolinfa é infiltrada através das células endoteliais e nas paredes
351 tubulares. Em situações normais, alguns hemócitos também podem passar rotineiramente
352 para a parede tubular e, em seguida, atravessar para os seios hemais. A julgar pela extensa
353 rede de seios hemais, deve haver um grande volume de hemolinfa fluindo através do órgão
354 linfóide a qualquer momento. Nas análises dos juvenis de *L. vannamei*, encontraram-se
355 uma quantidade considerável de seios hemais, baseado nisso, podemos afirmar a
356 similaridade dos resultados com os dos autores acima citados. Em outras palavras, o órgão
357 linfóide atua como um verdadeiro órgão de filtração com efeitos de filtração e eliminação
358 de materiais estranhos e agentes infecciosos da hemolinfa, bem como para a melhoria
359 homeostática do filtrado da hemolinfa.

360 **6 CONCLUSÃO**

361 O presente estudo indicou que o sistema BFT pode ter efeitos positivos no sistema
362 imune de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. Os dados demonstram um maior
363 volume do OL em organismos provenientes de sistemas BFT, quando comparado com
364 animais criados em água clara, isto poderia ser explicado pela capacidade probiótica do
365 biofoco nos camarões. No entanto, estudos bioquímicos poderiam ser feitos, para conhecer
366 a produção energética que requerem os camarões, na manutenção do sistema imune ativo
367 em sistemas BFT, e se esse gasto energético não influencia no desempenho zootécnico dos
368 camarões.

369

370 **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 371 Anggraeni, M.S., & Owens, L. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid
372 cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 40: 85-92.
- 373 Arteaga, C, V., & Jauregui, D. (2016). El propóleo en la morfometría linfoidea y control
374 bacteriano en pollos camperos. *Revista científica axioma.* 15: 16-25.
- 375 Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc Technology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
376 LA., 48:189.
- 377 Avnimelech, Y. & Kochba, M. (2009). Evaluation of nitrogen uptake and excretion by
378 tilapia in bio floc tanks, using ¹⁵N tracing. *Aquaculture* 287, 163–168
- 379 Azim, M. E. & Little, D. C. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water
380 quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia *Oreochromis*
381 *niloticus*. *Aquaculture.* 283, 29-35
- 382 Barbieri, R.C.J., & Ostrensky, A., (2002). *Camarões Marinhos - Engorda*. Viçosa. 370p.
- 383 Bell, T.A., & Lightner, D.V. A. (1996). *Handbook of normal penaeid shrimp histology*.
384 Baton Rouge: World Aquaculture Society. 14: 70-73.
- 385 Boyd, C.E. (1990). *Water quality in ponds for Aquaculture*. Alabama Agricultural
386 Experiment Station, Auburn University. Birmingham Publishing Co. 482
- 387 Burford, M.A. & Lorenzen, K. (2004). Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp
388 ponds: the role of sediment remineralization. *Aquaculture.* 229: 129–145
- 389 Burford, M.A., Sellars, M.J., Arnold, S.J., Keys, S.J., Crocos, P.J., Preston, N.P. (2004).
390 Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional
391 requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-
392 density rearing systems. *Aquaculture Research*, 35, 508–515.
- 393 Domingos, J. A., & Vinatea, L. (2008). Efeito do uso de diferentes quantidades de
394 substratos artificiais na engorda do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*
395 (Boone, 1931), em sistema de cultivo semi-intensivo. *B. Inst. Pesca*, 34(1), 141-150.

396 Duangsuwan, P., Phoungpetchara, I., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Wanichanon, C., Sobhon, P.
397 (2008). Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in
398 normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 426-435.

399 Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O. Wasielesky, W. (2011). Effect of biofloc
400 technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus*
401 *paulensis*: Growth performance, floc composition and salinity stress tolerance.
402 *Aquac. Int.*, 19: 891–901.

403 Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. (2018). The State of
404 World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.
405 Rome. 210

406 Furtado, P. S., Poersch, L. H., Wasielesky Jr, W. (2011). Effect of calcium hydroxide,
407 carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of
408 shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT)
409 systems. *Aquaculture*, 321(1-2): 130-135.

410 Gaona, C. A. P., Poersch, L. H., Krummenauer, D., Foes, G. K., Wasielesky, W. J. (2011).
411 The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus*
412 *vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of*
413 *Recirculating Aquaculture.* 12(1).

414 Hapsari, F. (2016). The effect of fermented and non fermented biofloc inoculated with
415 bacterium *Bacillus cereus* for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles, *AACL Bioflux.*
416 9(2): 334-339

417 Hargreaves, J.A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture.
418 *Aquacultural Engineering* 34: 344–363

419 Kanobdee K, Soowannayan C, Flegel TW, Ubol S, Withyachumnarnkul B. (2002).
420 Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp
421 *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Org*;48: 79-90.

- 422 Kim S., Pang Z., Seo H., Cho Y., Samocha T., Jang I. (2014). Effect of bioflocs on growth
423 and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae,
424 362–371
- 425 Krummenauer, D., Seifert, C., Poersch, L., Foes, G., Rodrigues de Lara, G., Wasielesky
426 junior, W. (2012). Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: Análise
427 da reutilização da água. *Atlantica*. 34(2) 103-111
- 428 Kuhn, D. D., Smith, S. A., Boardman, G. D., Angier, M. W., Marsh, L., Flick Jr, G. J.
429 (2010). Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*:
430 impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*. 309(1-
431 4): 109-114.
- 432 Lin, Y.C., & Chen, J.C., (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*
433 juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 109-119.
- 434 Lin, Y.C., & Chen, J.C., (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei*
435 juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224, 193-201.
- 436 Lorenzen, K., Struve, J. Cowan, J. (1997). Impact of farming intensity and water
437 management on nitrogen dynamics in intensive pond culture: a mathematical model
438 applied to Thai commercial shrimp farms. *Aquaculture Research*. 28: 493-507.
- 439 Martin, G.G., Hose, J.E., Kim, J.J. (1987). Structure of hematopoietic nodules in the
440 ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*: light and electron microscopic observations. *J*
441 *Morphol*; 192:193-204
- 442 Nakamura, K. (1987). Lymphoid organ and its developmental property of larval prawn
443 *Penaeus japonicus*. *Mem Fac Fish, Kagoshima University*. 36:215-220.
- 444 Oka, M. (1969). Studies on *Penaeus orientalis* Kishinouye-VIII structure of the newly found
445 lymphoid organ. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 35:245-250.
- 446 Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Kannan, S. V., Das, R. R., Kumar, R. S., Otta, S.
447 K. (2018). Carbon: Nitrogen (C: N) ratio level variation influences microbial
448 community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus*

- 449 vannamei) in biofloc based culture system. Fish & shellfish immunology, 81, 329-
450 337.
- 451 Panigrahi, A., Sundaram, M., Saranya, C., Swain, S., Dash, R. R., Dayal, J. S. (2019).
452 Carbohydrate sources deferentially influence growth performances, microbial
453 dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
454 under biofloc system. Fish & shellfish immunology, 86, 1207-1216.
- 455 Poersch, L.H., Fóes, G., Krummenauer, D., Romano, L.A., Wasielesky, W. Jr. (2012).
456 Bioflocos: uma alternativa para camarões saudáveis. Panorama da Aqüicultura,
457 22(130): 28-37.
- 458 Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., (1997). The effects of salinity and
459 temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus*
460 *vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157, 107-115.
- 461 Ray, A.J., Drury, T.H., Cecil, A. 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems:
462 Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional
463 contributions estimated using stable isotopes. Aquacult. Eng., 77: 9-14.
- 464 Rusaini, & Owens L. (2010). Effect of moulting and lunar rhythms on the lymphoid organ
465 spheroid (LOS) cells of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*). J Exp Mar Biol
466 Ecol; 389:6e12.
- 467 Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z.,
468 Harisanto, M., Horowitz, A., Brook, D.L., (2007). Use of molasses as carbon source
469 in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vanammei*.
470 Aquacult. Eng. 36, 184-191.
- 471 Shao, M.Y., Zhang, Z.F., Kang, K.H., Chen, Z.T., Kim, J.M. (2004). The study on the
472 cytology and histochemistry of lymphoid organ spheroids in *Penaeus chinensis*.
473 Aquaculture; 240:463-471.

- 474 Tambini, A., Alba M., Perales, R., Falcon, N. (2010). Evaluación anátomo-histopatológica
475 de bursa, timo y bazo de pollos de carne criados sobre cama reutilizada vs. cama
476 nueva. Rev. investig. vet. Perú. 21(2): 180-186.
- 477 Thoman, E.S., Ingall, E.D., Davis, D.A. Arnold, C.R. (2001). A nitrogen budget for a
478 closed, recirculating mariculture system. Aquacultural Engineering. 24, 195–211
- 479 Van Wyk, P. & Scarpa, J. (1999). Water quality and management. In: Van Wyk, P. et al.
480 (Eds.). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida
481 department of agriculture and consumer services, Tallahassee, Florida, 141-161.
- 482 Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 2006. Effect of natural production
483 in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for
484 white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258: 396–403.
- 485 Wyban, J., Walsh, W. A., Godin, D. M. (1995). Temperature effects on growth, feeding
486 rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus*
487 *vannamei*). Aquaculture, 138(1-4), 267-279.
- 488 Zhang, Z.F., Shao, M., Ho Kang, K. (2006). Classification of haematopoietic cells and
489 haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol.
490 21: 159-169.
- 491

492 8 CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES

493 Com o presente trabalho podemos citar a formação e surgimento do órgão linfóide
494 em pós-larva 6, podendo ser um órgão funcional na fase de pós-larva 15. Isso continua
495 corroborando a importância da manutenção de larvicultura nos estágios após PL15, para
496 garantir a sobrevivência dos camarões.

497 Foi demonstrada a capacidade fagocítica do órgão linfóide, desde PL 13 até juvenis
498 de *L. vannamei*. Dessa forma, podemos afirmar que o sistema BFT pode ser benéfico ao
499 sistema imune dos camarões, neste caso influenciando no crescimento e,
500 conseqüentemente, na atividade do órgão.

501 Com MET podemos citar a capacidade fagocítica do OL em camarões juvenis.
502 Além disso, o sistema de bioflocos afeta positivamente no sistema imunológico dos
503 camarões, mantendo um maior volume do órgão linfóide, nos camarões provenientes deste
504 sistema.

505 Estudos futuros testando desafios com agentes patogênicos poderiam ajudar a
506 conhecer melhor o comportamento do órgão linfóide e se verdadeiramente o sistema de
507 bioflocos influencia em uma maior atividade do sistema imune.

508 Com este trabalho se tem os primeiros registros de imunomarcagem com o receptor
509 anti-CD68 em *L. vannamei*. No entanto, estudos futuros quantificando áreas de marcação
510 do receptor em OL, ajudariam conhecer as diferenças na atividade fagocítica em
511 organismos de água clara e bioflocos.

512 Também seria interessante conhecer especificamente a partir de que estágio pós
513 larval os camarões desenvolvem a fagocitose, uma vez que, no presente trabalho só foram
514 demonstrados dados de dois estágios PL13 e 18.