



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

AVALIAÇÃO DA CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS (CTH) E HISTOPATOLOGIA DE CAMARÕES DA ESPÉCIE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) ALIMENTADOS COM UMA RAÇÃO SEM VITAMINA C.

FRANCISCO ALEXSANDRO MARQUES CAVALCANTE

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ-BRASIL

JANEIRO DE 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C364a Cavalcante, Francisco Aleksandro Marques.
Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) e histopatologia de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) alimentados com uma ração sem vitamina C / Francisco Aleksandro Marques Cavalcante. – 2004.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2004.
Orientação: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.

1. Camarões - Criação. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. ALBERTO JORGE PINTO NUNES, Ph. D.
Orientador

Prof^ª SILVANA SAKER SAMPAIO, Ph. D.
Membro

Prof. MANUEL ANTÔNIO ANDRADE FURTADO NETO, Ph. D.
Membro

VISTO:

Prof. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA, D. Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^ª. ARTAMÍZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA, M. Sc.
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos devem ser prestados a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Principalmente gostaria de agradecer:

À Deus e à minha família, em especial aos meus pais Anselmo e Valdelice, à minha irmã Selma pelo incentivo e apoio nas minhas decisões profissionais.

À professora Cristina Gesteira, pelos ensinamentos, companheirismo nas horas difíceis e, sobretudo, pela paciência e amizade ao longo desses anos.

À professora Regine Helena pela orientação e apoio prontamente concedido.

Ao professor Alberto Nunes por sua valiosa contribuição na realização desse trabalho.

Aos amigos da faculdade: Ricardo Lima (essa é a razão), Marleon (hey buldogue !!), Ronaldo, Júlio Neto, Carol, Charles, Ana Maria, Karlinha, Janisi, e Gleire.

Aos amigos Thales Andrade, Daniel Lustosa, Arizonaldo, Tito Tsuji e Lula.

A todas as meninas da Microbiologia (cadê a bata Alex ?), em especial, Gleire, Janisi e Danny.

A todos aqueles que fazem o GECMAR/CEDECAM: Pedro Carlos, Pedro Alexandre, Kilvia (valeu gatinha pela força!), Cândida, Graça (PCR girls), João, Antônio Carlos, Andrezza, Alice, Cicero, Diego, Milena, Roberto e Gleison.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Histórico	1
1.2- Alimentação e Nutrição	2
1.3- Importância da Vitamina C	5
2.4- Sistema Imunológico	7
2- MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1- Preparação das Dietas	10
2.2- Procedimento Experimental	11
2.3- Contagem Total de Hemócitos	12
2.4- Análises Estatísticas	13
2.5- Análises Histológicas	14
3- RESULTADOS	15
3.1- Sinais Externos e Biometrias	15
3.2- Contagem Total de Hemócitos	16
3.3- Análises Histológicas	17
4- DISCUSSÃO	19
5- CONCLUSÕES	22
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

Camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* foram alimentados por um período de dois meses com duas rações, sendo uma com e outra sem vitamina C. Com objetivo de avaliar a resposta imune e condição histológica dos animais dois parâmetros foram analisados: Contagem Total de Hemócitos por ml de hemolinfa e histologia do hepatopâncreas e tecido conjuntivo. Ao longo do período experimental foram realizadas coletas quinzenais para extração de hemolinfa e fixação em solução de Davidson. As contagens de hemócitos mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos a partir do 45º dia. O número médio de hemócitos ($\times 10^6$ células/ml) dos camarões alimentados com a ração sem vitamina C foi $13,92 \pm 2,82$ (15º dia), $12,48 \pm 6,85$ (30º dia), $7,86 \pm 4,98$ (45º dia) e $11,68 \pm 4,81$ (60º dia). A quantidade de hemócitos ($\times 10^6$ células/ml) dos camarões alimentados com a ração com vitamina C foi de $11,01 \pm 4,38$ (15º dia), $13,96 \pm 3,97$ (30º dia) $14,36 \pm 3,69$ (45º dia) e $18,23 \pm 4,76$ (60º dia). As análises histológicas revelaram poucas alterações, com exceção de alguns túbulos do hepatopâncreas, que se mostraram expandidos e com suas células secretoras de enzimas digestivas destruídas, também ocorreu pouca perda de tecido conjuntivo. Esses resultados mostraram que os camarões sofreram influência da carência de vitamina C em seu sistema imunológico e na constituição do hepatopâncreas e tecido conjuntivo, mesmo sem ter apresentado sinais externos da sua deficiência.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1- Hemócitos presentes na hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
2- Tanques utilizados no experimento	12
3- Coleta das sobras de ração	12
4- Extração de hemolinfa	13
5- Preparação das amostras para contagem de hemócitos	13
6- Fixação em solução de Davidson	14
7- Lâminas coradas pelo método H & E	14
8- Hepatopâncreas de um camarão alimentado sem vitamina C	18
9- Ausência de tecido conjuntivo entre os túbulos do Hepatopâncreas.	19
10- Resultado das biometrias realizadas ao longo do período experimental.	19
11- Resultado das contagens totais de hemócitos ($\times 10^6$ cel/mL) Realizadas ao longo do período experimental.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1- Principais funções biológicas das vitaminas, segundo ARANGO (1999).	4
2- Classificação e função dos hemócitos encontrados em crustáceos (NEWMAN & BULLIS, 2001).	8
3- Composição básica da dieta administrada aos camarões.	10
4- Resultado das biometrias quinzenais realizadas ao longo do ciclo experimental mostrando o ganho de peso dos animais.	16
5- Resultados das contagens totais de hemócitos ($\times 10^6$ células/ml) realizadas nos indivíduos amostrados ao longo do período experimental. Os valores representam média e desvio padrão.	17

AVALIAÇÃO DA CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS (CTH) E HISTOPATOLOGIA DE CAMARÕES DA ESPÉCIE *LITOPENAEUS VANNAMEI* (BOONE, 1931) ALIMENTADOS COM UMA RAÇÃO SEM VITAMINA C.

FRANCISCO ALEXSANDRO MARQUES CAVALCANTE

1-INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

O cultivo de camarão teve sua origem histórica no sudoeste da Ásia, para satisfazer as necessidades de subsistência da população. Lá os pescadores artesanais construíram diques de terra nas zonas costeiras para aprisionamento de pós-larvas selvagens que habitavam as águas estuarinas e o seu posterior crescimento nas condições naturais prevaletentes. O regime de marés cuidava do abastecimento e renovação da água dos reservatórios superficiais (DPA, 2001).

A atividade se manteve por séculos com características artesanais, até o início da década de 30, quando o técnico japonês Motasaku Fujinaga conseguiu fazer a desova em laboratório da espécie *Marsupenaeus japonicus* (DPA, 2001). Isso desencadeou o desenvolvimento da tecnologia de reprodução de camarões em cativeiro. Nos anos 70 houve uma ampla propagação das técnicas industriais de engorda em países de regiões tropicais e subtropicais. A partir de então a carcinicultura marinha começou a ganhar uma posição de destaque no cenário internacional. Nos anos 80, com uma crescente demanda e valor econômico em ascensão, a produção de camarões em cativeiro evoluiu rapidamente (NUNES, 2002).

Hoje a atividade está modernizada e opera em escala industrial em mais de 50 países, com uma produção respondendo por quase metade do volume pescado (NUNES, 2000).

Os principais mercados do camarão marinho cultivado estão localizados nos Estados Unidos, Japão e países da Europa Ocidental, notadamente Espanha, França e Itália (ABCC, 2001).

Os primeiros experimentos com o camarão cultivado no Brasil datam da década de 70 quando o governo do Rio Grande do Norte criou o “Projeto Camarão” (DPA, 2001). Após anos de fracassos com a tentativa da domesticação da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus* e das espécies nativas (*Litopenaeus subtilis*, *Litopenaeus paulensis*, *Litopenaeus schimitti*) a carcinicultura brasileira alcançou o êxito com a domesticação da espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, que já vinha sendo cultivada com sucesso no Equador e Panamá. A vantagem dessa espécie em relação às demais está na sua alta capacidade de adaptação aos diferentes ecossistemas do hemisfério ocidental. Atualmente o *Litopenaeus vannamei* é o camarão cultivado em todos os empreendimentos de carcinicultura do país.

No Brasil a produção de camarão em cativeiro cresceu de 3.600 t. em 1997 para 60.000 t. em 2002, nesse ano o volume de exportações foi da ordem de 37.799 t. para uma receita de US\$ 155 milhões. Esses valores colocaram o Brasil como maior produtor de camarão cultivado do Hemisfério Ocidental, à frente do Equador e México que tradicionalmente ocupavam a primeira e a segunda posições (ABCC, 2003).

A produção nacional se concentra na região Nordeste, responsável por 96,5% da produção total. No ano de 2002, o Estado do Ceará se destacou no cenário nacional da carcinicultura como segundo maior produtor (16.383 t), líder em produtividade (7.249 kg/ha/ano) e exportações (13.585,5 t.) com uma receita de US\$ 54,7 milhões.

1.1- Alimentação e Nutrição

No início, o cultivo de camarão se caracterizava pelo uso de técnicas artesanais. As larvas eram capturadas do próprio estuário, não havia qualquer

monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água e o alimento predominantemente consumido era composto por poliquetas, fito e zooplâncton presentes nos viveiros, não existindo naquela época uma indústria voltada para a produção de alimentos para camarão, em todo o território nacional.

Com o desenvolvimento e a intensificação da atividade surgiram as primeiras fábricas de rações em escala comercial e, atualmente, cerca de oito marcas estão à disposição no mercado nacional.

Devido à intensificação dos cultivos, o alimento natural contribui pouco para o crescimento dos camarões, sendo, portanto de fundamental importância o uso de alimentos mais elaborados, que atendam às exigências nutricionais e energéticas dos animais e sejam economicamente viáveis. Melhoras significativas têm ocorrido nos últimos anos devido a um melhor conhecimento das necessidades nutricionais do camarão, qualidade dos insumos e tecnologia de fabricação.

Em nutrição, é considerado como fator de crescimento ou promotor de crescimento, qualquer elemento que ao ser incorporado à dieta em pequenas quantidades, sem variar sua composição, leva a uma aceleração do crescimento, que se reflete em aumento de peso corporal. Para serem efetivas, essas substâncias devem ter a condição de manter sua integridade durante o processo de digestão e serem absorvidas de forma eficaz para exercer sua função (CARRILLO et al., 2000).

Os animais cultivados em sistemas intensivos, alimentados com rações faltando ou contendo níveis insuficientes de nutrientes essenciais podem exibir um crescimento deficiente, deformidades ou até susceptibilidade a doenças (NUNES, 2000). Os conhecimentos de imunologia de vertebrados mostram que as carências nutricionais são o fator mais importante nas imunodeficiências (RODRIGUEZ et al., 2000).

Na nutrição aquícola, os componentes nutricionais de alimentos que mais tem recebido atenção são as vitaminas. Vitaminas são um complexo grupo de substâncias orgânicas requeridas pelos animais em sua alimentação diária para manutenção de seu crescimento, reprodução e mecanismos de defesa. Cada

vitamina cumpre um papel específico no organismo. Na Tabela 1 pode ser visto um resumo das principais funções biológicas das vitaminas. Deficiências vitamínicas podem levar a disfunções bioquímicas, e, conseqüentemente, celulares e orgânicas. Essas deficiências podem ser causadas por seu baixo conteúdo nos alimentos, estresse ambiental e fisiológico e doenças, especialmente aquelas que ocorrem nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Segundo KANAZAWA (1982 a); CONKLIN (1990); TACON (1991); AKYIAMA (1992) e CONKLIN (1997), citados por ARANGO (1999), os camarões requerem 15 vitaminas, (vitamina A, vitamina E, vitamina D e vitamina K, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, inositol, colina e ácido ascórbico).

As vitaminas lipossolúveis são absorvidas pelo trato gastrintestinal na presença de lipídios, e podem ser armazenadas nas reservas lipídicas corporais, sempre quando a quantidade contida no alimento consumido exceda as demandas metabólicas. Por outro lado, as vitaminas hidrossolúveis não são armazenadas em quantidades significativas no tecido dos camarões, e, no caso de uma ausência contínua na alimentação, suas reservas são rapidamente consumidas (TACON, 1989 a) citado por ARANGO (1999).

Tabela 1: Principais funções biológicas das vitaminas, segundo ARANGO (1999).

VITAMINA	FUNÇÃO BIOLÓGICA
Vitamina A	Manutenção do tecido epitelial, trato reprodutivo e trato intestinal.
Vitamina D	Essencial para o metabolismo do cálcio e fósforo.
Vitamina E	Antioxidante intra e extracelular.
Vitamina K	Requerida para manutenção de uma coagulação normal e para alguns precursores protéicos do hepatopâncreas.
Vitamina B1 (Tiamina)	Fundamental para o metabolismo dos carboidratos.
Vitamina B2 (Riboflavina)	Fundamental para o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas através das coenzimas FMN e FAD.

Vitamina B6 (Piridoxina)	Essencial para o metabolismo de proteínas.
Niacina	Componente essencial das coenzimas NAD e NADP, as quais estão relacionadas com os processos de liberação de energia a partir dos carboidratos, lipídios e proteínas.
Ácido pantotênico	Essencial para a liberação de energia do organismo, por ser constituinte da acetil coenzima A.
Biotina	Fundamental para o metabolismo de lipídios e carboidratos.
Ácido fólico	Importante para o metabolismo de aminoácidos.
Vitamina B12	Funciona no metabolismo de ácidos nucleicos e proteínas.
Colina	Integridade da estrutura celular e transporte de lipídios.
Inositol	Essencial para o transporte de lipídios e componente essencial dos tecidos.
Vitamina C	Funciona como potente antioxidante fisiológico intracelular, está envolvida com a formação do colágeno e mucopolissacarídeos. Cumpre um papel essencial nos mecanismos de defesa em crustáceos.

1.2- Importância da Vitamina C

É importante ressaltar que uma das vitaminas de mais destaque na nutrição aquícola é a vitamina C (ácido ascórbico), pois espécies aquáticas, como camarões e peixes são sensíveis à sua deficiência pelo fato do ácido ascórbico ser uma vitamina hidrossolúvel e de não possuírem a capacidade de sintetizar as quantidades diárias requeridas para um normal crescimento, reprodução e defesa.

Vários estudos têm demonstrado que a vitamina C influencia em vários parâmetros da resposta imune e resistência a doenças em animais terrestres e aquáticos, e que esses últimos possuem extrema sensibilidade à deficiência de ácido ascórbico. LALL (2000) demonstrou que peixes alimentados com dietas deficientes em vitamina C são mais suscetíveis ao estresse causado pela baixa qualidade de água (altos níveis de amônia e baixa concentração de oxigênio).

Camarões juvenis privados de vitamina C apresentam uma maior suscetibilidade ao estresse (ABE et al., 1990, MERCHIE, 1995) e a enfermidades (CATACUTAM; LAVILLA - PITOGO 1994, KONTARA et al., 1995).

LIGHTNER et al., (1977) demonstraram que camarões da espécie *Penaeus californiensis* desenvolveram uma doença denominada de "morte negra" quando alimentados com uma dieta livre de vitamina C. Tal doença é caracterizada por acumulações hemocíticas melanizadas no tecido conjuntivo. Essa síndrome pode indicar perturbações na resposta imune, já que a formação de melanina é o passo final da ativação do sistema profenoloxidase (sistema proPo) Shigueno; Itoh (1988) mencionam como um dos sintomas da deficiência de vitamina C a reduzida capacidade de regenerar tecidos e pouca resposta ao estresse.

Outra importante função atribuída a vitamina C está relacionada com síntese de colágeno (HUNTER et al., 1979) componente essencial dos capilares e do tecido conjuntivo. Segundo Hunter et al. (1979), e Lightner et al. (1979) deficiências de vitamina C podem levar a uma síntese anormal do colágeno. A vitamina C é essencial para a formação do colágeno, cicatrização, hematopoiese, desintoxicação de compostos, bem como das funções metabólicas, incluindo o sistema antioxidante (LALL, 2000).

Devido a sua natureza instável, alimentos podem perder ácido ascórbico durante o processamento e armazenamento em temperaturas ambientes. SHIAU; HSU (1993) demonstraram que aproximadamente 75% da quantidade inicial de ácido ascórbico suplementado para camarões pode se perder durante processamento em temperaturas ambientes. Exposições prolongadas no meio aquoso podem levar a perdas por lixiviação uma vez que o camarão é um animal de comportamento alimentar lento e pelo fato de a vitamina C ser um composto hidrossolúvel, podem ocorrer perdas significativas antes que o alimento tenha sido ingerido. A partir desses dados pode-se concluir que tais perdas podem levar a deficiências nutricionais e imunológicas irreversíveis que acarretem em grades mortalidades e conseqüentes prejuízos econômicos.

Com base em caracterizações morfológicas e citoquímicas, algumas funções (Tabela 2) e envolvimento em diferentes reações de defesa têm sido atribuídas a diferentes tipos de células. O envolvimento de células hialinas com a coagulação (OMORI et al., 1989), de células granulares e semigranulares com a fagocitose (GARGIONI;BARRACO, 1998) e com o sistema proPo (JOHANSON;SÖDERHÄLL, 1985). Entretanto o número de hemócitos pode variar, por exemplo, decrescer dramaticamente durante uma infecção. Nesse caso, novos hemócitos precisam ser produzidos pelo tecido hematopoiético.

As reações de defesa incluem além dos processos de encapsulação e fagocitose, mecanismos microbianos baseados na produção de citotoxinas intermediárias de oxigênio demonstrados em camarões (SONG;HSIEH, 1994).

Tabela 2 - Classificação e função dos hemócitos encontrados em crustáceos (NEWMAN;BULLIS, 2001).

Tipo de hemócito	Função imunológica
Agranular (hialino)	Fagocitose Coagulação
Semigranular	Fagocitose Encapsulação Estocagem e liberação do sistema proPo. Citotoxicidade
Granular	Estocagem e liberação do sistema proPo. Citotoxicidade

O primeiro processo de reconhecimento de microrganismos invasores é mediado pelos hemócitos e proteínas plasmáticas. Existem poucas informações sobre os mecanismos moleculares que mediam o reconhecimento; entretanto,

crustáceos, vários tipos de moduladores protéicos têm sido citados como reconhecedores de paredes celulares de microrganismos dentre os quais podem ser citados as beta-glicanas, peptidoglicanas e os lipopolissacarídeos.

O sistema de defesa de camarões possui proteínas de reconhecimento que estão aptas para detectar e se ligar aos componentes da célula microbiana tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e beta-glicanas. Estas moléculas de reconhecimento não estão aptas a imobilizar ou matar os microrganismos. Uma vez aderidas essas proteínas se ligam a superfície do hemócito ativando o sistema imune, especificamente o sistema profenoloxidase. Uma vez induzido, o sistema é responsável pela produção de melanina, a qual requer passos bioquímicos. A partir de então metabólitos tóxicos são formados resultando em atividade antimicrobiana (SRITUNYALUCKSONA ;SÖDERHÅLL, 2000).

Vários parâmetros da hemolinfa foram testados e propostos para servirem como indicativo do estado de saúde geral - nível de estresse – para camarões peneídeos. Dentre eles, podem ser citados a quantificação da atividade enzimática do sistema profenoloxidase (BECKAGE, 1996); a capacidade osmorregulatória do camarão - medida diretamente (COCHARD et al., 1992) ou indiretamente através da quantificação do magnésio do plasma do camarão (BOGLIO, 1995) e a contagem total dos hemócitos presentes na hemolinfa (HENNIG *et al.*, 1998). Por se tratar de um método mais rápido, barato e de relativa facilidade, é o mais comumente usado para se verificar o grau de estresse dos animais

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da deficiência de vitamina C no sistema imunológico e na histologia de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* alimentados com uma dieta sem o referido composto. Dois parâmetros foram analisados para atestar possíveis alterações nos animais: (1) Contagem Total de Hemócitos (Células/ml) para verificar possíveis alterações no sistema imunológico dos camarões, em decorrência da deficiência de vitamina C e (2) Histopatologia para observar possíveis alterações que evidenciem a carência de vitamina C nos animais.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Preparação das Dietas

Duas dietas foram formuladas e processadas, e suas composições seguiram a formulação regular de uma ração contendo 35% de proteína (Tabela 3). As dietas necessárias para todo o experimento foram processadas de uma única vez, transportadas até as dependências do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) onde foram ensacadas e estocadas em um freezer de onde eram retiradas apenas as quantidades necessárias para cada alimentação. Os tratamentos consistiam em duas dietas: Uma contendo vitamina C (L-ascorbil-2-polifosfatase) e outra sem vitamina C. As partículas foram peletizadas em tamanhos de 2,0-2,5 mm.

Tabela 3 - Composição básica da dieta administrada aos camarões.

COMPOSIÇÃO BÁSICA	PREMIX MINERAL E VITAMÍNICO		NÍVEIS DE GARANTIA
Farelo de soja	Magnésio	Ácido fólico	Umidade (13%)
Fosfato bicálcico	Cobre	Biotina	Proteína bruta (35%)
Levedura seca de cerveja	Zinco	Colina	Extrato etéreo (8%)
Óleo de peixe refinado	Manganês	Niacianina	Matéria fibrosa (5%)
Remoído de trigo	Iodo	Pantotenato de cálcio	Matéria mineral (13%)
Amido de mandioca	Selênio	Tiamina	Cálcio (3%)
Aditivo aglutinante	Vitamina A	Riboflavina	Fósforo (0,7%)
Cloreto de sódio (sal comum)	Vitamina D	Piridoxina	
Premix mineral e vitamínico *	Vitamina E	Vitamina B ₁₂	
Farinha de peixe	Vitamina K		

* O premix vitamínico não continha vitamina C.

2.2- Procedimento Experimental

O experimento foi desenvolvido no setor de aquários do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR - no período de agosto a novembro de 2003.

Juvenis de *Litopenaeus vannamei* com peso médio inicial de 4,35 g foram capturados e transportados vivos de uma fazenda de camarão até as dependências do LABOMAR. Os animais foram estocados em seis caixas de 500 L contendo água marinha (Figura 2). A alimentação foi ofertada quatro vezes ao dia, à base de uma ração peletizada comercial.

Dez dias após a estocagem e 15 dias antes do início do período experimental os animais foram alimentados com uma ração sem vitamina C para que ocorresse o esgotamento de suas reservas corporais.

Para testar o efeito da ração sem vitamina C na resposta imune (CTH) e histopatologia em *Litopenaeus vannamei*, os animais foram cultivados por um período de dois meses em seis tanques de PVC de 500 L. O delineamento experimental constava de dois tratamentos (ração sem vitamina C e ração comercial) com três repetições cada. O tratamento com ração comercial (com vitamina C) funcionou como controle.

Cada tanque foi estocado com 120 camarões, e cada um dos dois tratamentos era equipado com um filtro biológico de areia (50 mm), aeração constante e um sistema de circulação que renovava 100% da água dos tanques a cada hora. Os principais parâmetros ambientais (salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido) foram monitorados diariamente. O sistema usou fotoperíodo artificial de 12 h.

O manejo alimentar ao longo do período experimental consistia em quatro alimentações que eram ofertadas às 08:00; 11:00; 14:00 e 17:00 horas em bandejas de alimentação circulares de 21 cm de diâmetro fabricadas com canos de PVC e telas de 500 µm, de acordo com a metodologia proposta por MARQUES (1997). A quantidade diária de alimento ofertado correspondia a 5% da biomassa total dividida igualmente entre as quatro alimentações. Trinta minutos após cada

alimentação, o alimento não consumido era recolhido (figura 3) das bandejas e pesado para se calcular o consumo diário de ração.

Foram observados os aspectos externos dos animais, tais como mobilidade, aparecimento de lesões externas melanizadas (necrose), coloração, muda e crescimento (acompanhado por meio de biometrias quinzenais) quando as coletas eram realizadas.



Figura 2 - Tanques utilizados no experimento.



Figura 3 - Coleta das sobras de ração.

2.3- Contagem Total de Hemócitos

Quinze dias antes do início do período experimental os camarões foram alimentados com uma ração sem vitamina C como mencionado anteriormente. Após esse período 18 camarões foram coletados para extração de hemolinfa e biometria. A extração de hemolinfa seguiu o protocolo descrito por HENNIG (1999): secagem da região abdominal com papel absorvente; coleta da hemolinfa na região ventral entre o final do cefalotórax e o primeiro segmento abdominal (figura 4) usando uma seringa de 0,5 mL contendo uma solução tamponada (citrato de sódio 0,1 M; tris-HCl 0,01 M; sacarose 0,25 M; pH 7,6 e formalina 5%) em uma proporção de 1:1. A quantidade de hemolinfa coletada por indivíduo foi

de 50 μL , que foi transferida para tubos ependorf de 1,5 mL e mantidos a 4°C até o momento da contagem.

Durante o período experimental foram realizadas 4 coletas de 10 animais provenientes de cada tratamento (4 coletas x 10 animais por tratamento x 2 tratamentos = 80 camarões) em intervalos de quinze dias para extração de hemolinfa e posterior contagem de hemócitos seguindo-se o protocolo descrito por HENNIG (1999).

A contagem total de hemócitos por mL de hemolinfa foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer (figura 5) em microscópio óptico com aumento de 400 x. Para facilitar a contagem, a hemolinfa foi diluída (4x) na solução citada anteriormente.



Figura 4- Extração de hemolinfa



Figura 5- Preparação da amostra para contagem de hemócitos

2.4- Análises Estatísticas

Para verificar possíveis diferenças estatísticas de peso e contagem total de hemócitos entre os tratamentos foi empregada a análise de variância (One-way ANOVA) ao nível de 5% de significância.

2.5- Análises Histológicas

As análises histológicas foram realizadas em três camarões provenientes de cada tratamento em períodos de 15 dias, após o início do período experimental.

Os indivíduos coletados foram fixados em solução de Davidson por um período de 24 horas (figura 6). Após essa etapa, os camarões fixados foram transferidos para o álcool 70% onde permaneceram até o momento do processamento histológico.

Para a obtenção dos cortes histológicos, os camarões foram submetidos à desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, começando com álcool 70% e terminando com álcool 100% , diafanização (ou branqueamento) em xilol e inclusão em parafina a 60°C. Os blocos obtidos após esse processamento foram cortados (5 μ) em micrótomo manual e coletados em lâminas. Posteriormente as lâminas foram coradas (figura 7) pelo método H&E (JUNQUEIRA;CARNEIRO, 1999).

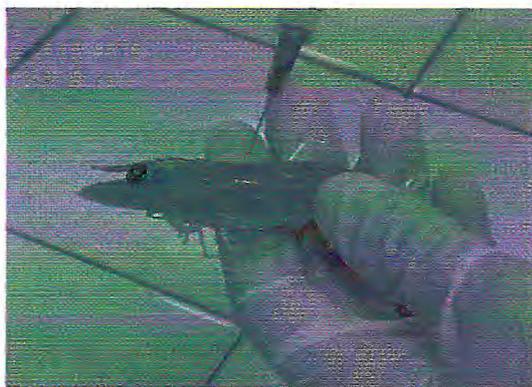


Figura 6- Fixação em solução de Davidson.

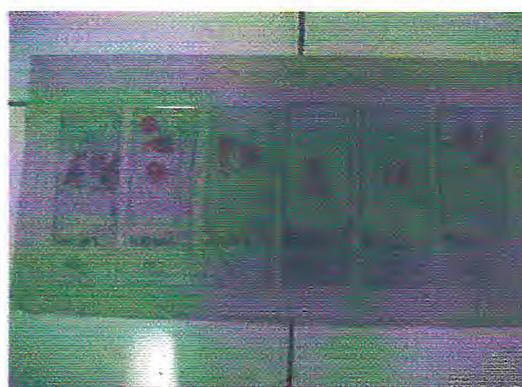


Figura 7- Lâminas coradas pelo método H & E.

3- RESULTADOS

3.1-Sinais Externos e Biometrias

Os sinais externos de pigmentações negras foram observados somente em alguns camarões privados de vitamina C. Estes sinais consistiam em lesões melanizadas na cutícula, entretanto outros sinais externos como coloração escura na antena, rostrum, periópodos, brânquias, urópodos, cefalotórax e cutícula abdominal não foram observados.

O comportamento dos animais aparentemente não foi alterado pela carência de vitamina C. Os camarões não apresentaram sinais de letargia, ou falta de resposta ao estímulo (resposta ao escape) quando este foi sucessivamente provocado.

Poucas mortalidades foram observadas ao longo do período experimental em ambos os tratamentos, o que mostra que não houve, aparentemente, qualquer relação dos animais mortos com a carência de vitamina C. É provável que os animais mortos tenham sido predados pelos demais animais durante a muda, uma vez que nessa fase os camarões se apresentam mais fragilizados.

O comportamento alimentar também não foi alterado e os camarões não mostraram perda de apetite ao longo do ciclo experimental, mostrando inclusive ganho de peso (Tabela 4). As biometrias quinzenais não mostraram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, apesar do peso dos animais alimentados com a ração comercial ter sido maior do que os alimentados com a ração sem vitamina C.

Os parâmetros físicos e químicos tiveram valores médios de oxigênio dissolvido $6,03 \pm 3,40$ mg/L e $5,86 \pm 1,30$ mg/L ($n=120$); pH $7,38 \pm 0,125$ e $7,39 \pm 0,126$ ($n=114$); temperatura $27,43 \pm 0,218^\circ\text{C}$ e $27,51 \pm 0,31^\circ\text{C}$ ($n=120$); salinidade $35,00 \pm 0,93\text{‰}$ e $35,02 \pm 0,94\text{‰}$ ($n=120$) nos tratamentos com e sem vitamina C, respectivamente.

Tabela 4 - Resultado das biometrias quinzenais realizadas ao longo do ciclo experimental mostrando o ganho de peso dos animais.

DIAS DE CULTIVO	PESO (g)	
	SEM VITAMINA C	COM VITAMINA C
0	5,00 ± 0,61	5,00 ± 0,61
15	7,42 ± 1,39	7,73 ± 1,34
30	7,42 ± 1,28	8,29 ± 1,61
45	9,48 ± 1,80	10,38 ± 2,59
60	9,53 ± 2,09	10,01 ± 1,24

3.2- Contagem Total de Hemócitos (CTH)

Os resultados das contagens de hemócitos dos camarões provenientes de cada tratamento (com e sem vitamina C) são mostrados na tabela 5. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os tratamentos somente na terceira amostragem (45 dias de cultivo). Quando os resultados foram analisados levando-se em consideração todo período experimental também foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, os camarões alimentados com a dieta livre de vitamina C apresentaram uma contagem média de hemócitos de $11,28 \pm 5,36$ ($\times 10^6$ células/mL) enquanto que os camarões alimentados com os níveis normais de ácido ascórbico apresentaram uma contagem média de $14,57 \pm 4,80$ ($\times 10^6$ células/mL).

Nos camarões alimentados com a ração sem vitamina C não ocorreram diferenças significativas nas contagens realizadas ao longo do período experimental (tabela 5), mesmo tendo havido um incremento de peso por parte dos animais provenientes desse tratamento não foram observadas alterações numéricas que gerassem diferenças estatísticas ao longo do ciclo experimental.

Os camarões alimentados com a ração comercial apresentaram um incremento no número de hemócitos ao longo do período experimental, o que sugere que esse parâmetro pode ser influenciado pelo tamanho do animal. No entanto não existem pesquisas publicadas que relacionem o tamanho do animal com sua contagem total de hemócitos ou que tentem estabelecer um número padrão de hemócitos por mL de hemolinfa em função de seu peso corporal.

Tabela 5 - Resultados da Contagem Total de Hemócitos ($\times 10^6$ cel/ml) realizadas nos indivíduos amostrados ao longo do período experimental. Os valores representam média e desvio padrão.

Dias de cultivo	Com vitamina C	Sem vitamina C
0	12,90 \pm 3,63	12,90 \pm 3,63
15	11,01 \pm 4,38 ^a	13,92 \pm 2,82 ^a
30	13,96 \pm 3,97 ^a	12,48 \pm 6,85 ^a
45	14,36 \pm 3,69 ^a	7,86 \pm 4,98 ^b
60	18,23 \pm 4,76 ^a	11,68 \pm 4,81 ^b

Médias seguidas por letras distintas são estatisticamente diferentes entre si (válido para diferenças entre tratamentos)

3.3- Análises Histológicas

O exame histológico dos camarões privados de vitamina C revelou poucas alterações no hepatopâncreas (Figura 8) e tecido conjuntivo que em teoria seriam as regiões mais afetadas pela carência de vitamina C. No rostrum, periópodos, brânquias, uropódos e cutícula abdominal não foram observadas acumulações hemocíticas melanizadas características da síndrome da "morte negra".

Os lúmens de alguns túbulos do hepatopâncreas dos camarões alimentados sem vitamina C se apresentaram maiores. Também foi observada a

destruição de células secretoras de enzimas (setas na figura 8) responsáveis pelos processos digestivos nesses túbulos. No entanto essas alterações não ocorreram no hepatopâncreas como um todo, ficando somente restrito a algumas regiões. Foram observadas poucas perdas de tecido conjuntivo entre os túbulos do hepatopâncreas (setas na figura 9). A ausência de qualquer microrganismo nas regiões observadas revela que a natureza das lesões não era de origem microbiana.

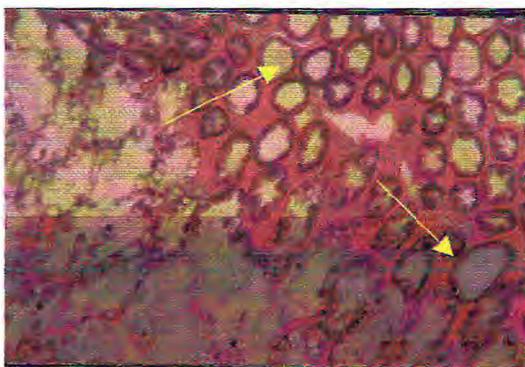


Figura 8 – Hepatopâncreas de um camarão alimentado sem vitamina C.

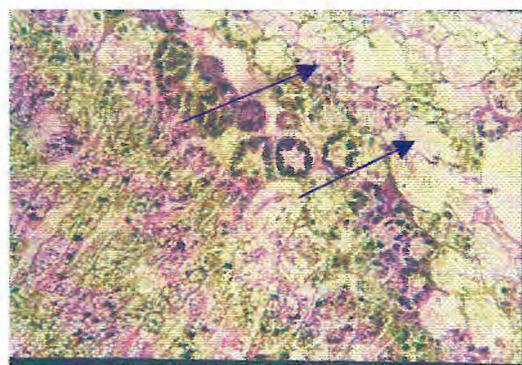
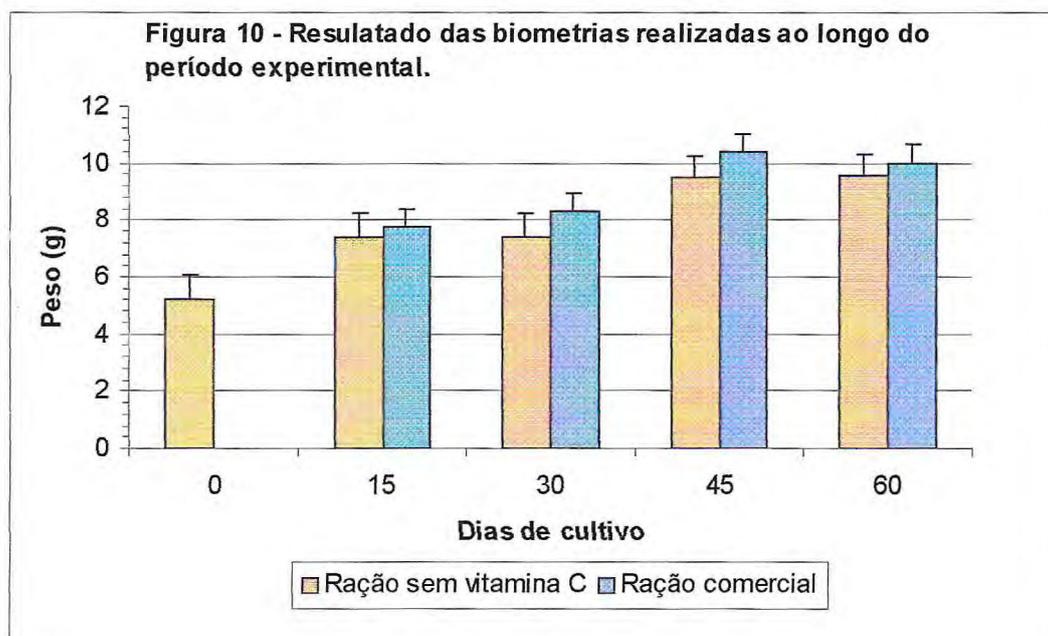


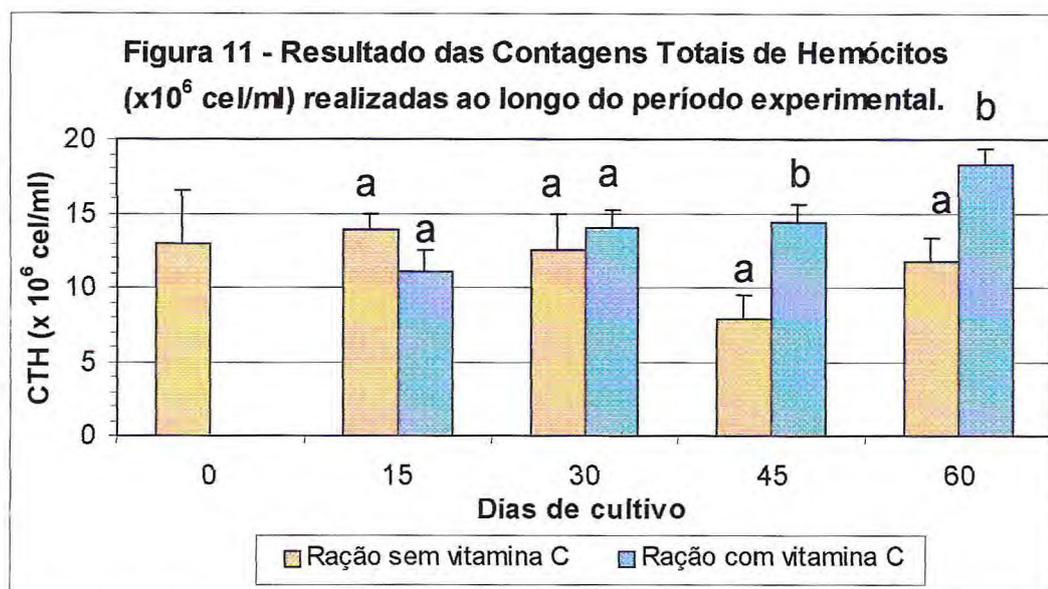
Figura 9 – Ausência de tecido conjuntivo entre os túbulos do hepatopâncreas.

4- DISCUSSÃO

Ao longo dos 60 dias do período experimental, os camarões alimentados com as duas rações (comercial e sem vitamina C) não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) em peso (Figura 10). Nesse aspecto, o presente estudo não foi compatível com aqueles onde os pesos dos indivíduos alimentados com uma ração sem vitamina C foi estatisticamente menor quando comparado com indivíduos alimentados com ração convencional. A ausência de lesões melanizadas na cutícula (síndrome da morte negra) também contrasta com o estudo de MOLINA; MONTOYA (1999), que se propôs a avaliar a deficiência de vitamina C em *Litopenaeus vannamei*. As mortalidades observadas nos dois tratamentos testados se deveram mais ao canibalismo, durante o processo de muda que torna os indivíduos mais fragilizados e propensos a predação. Além disso, os animais não apresentaram sinais externos da deficiência de vitamina C como citado anteriormente.



A análise estatística empregada no número total de hemócitos por mL de hemolinfa (CTH) dos camarões provenientes dos dois tratamentos mostrou diferenças significativas entre ambos ($p < 0,05$) a partir do 45º dia. A contagem de hemócitos na hemolinfa foi menor nos camarões privados de vitamina C, quando comparados com aqueles que receberam alimentação com ácido ascórbico (Figura 11)



LEE;SHIAU (2002) quando testaram a eficiência de quatro diferentes fontes de ácido ascórbico para camarões da espécie *Penaeus monodon* usando como controle uma ração sem vitamina C, observaram uma quantidade de hemócitos na hemolinfa menor nos camarões provenientes desse tratamento no final do experimento.

Mesmo não apresentando sinais externos da deficiência de vitamina C, camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* sofrem influência negativa de sua carência na contagem total de hemócitos. Quantidades muito baixas no número de hemócitos por mL de hemolinfa indicam deficiências no sistema imunológico em camarões, caracterizando um quadro de estresse nos animais, o que pode

funcionar como gatilho para proliferação de patógenos oportunistas (LIGHTNER, 1983).

Segundo MOULLAC;HAFFNER (2000), as condições de estresse podem resultar no comprometimento da eficiência do sistema imune do camarão, com baixos valores na contagem de hemócitos, na ativação do sistema proPo, nos índices de fagocitose e na liberação do oxigênio intermediário.

As análises histológicas não mostraram grandes diferenças entre os tratamentos testados, com exceção de alguns túbulos do hepatopâncreas dos camarões alimentados sem vitamina C que apresentaram seu lúmen aumentado devido ao rompimento de células secretoras de enzimas digestivas. No entanto, tais alterações não foram observadas no hepatopâncreas como um todo e a ausência de tecido conjuntivo em algumas regiões entre os túbulos do hepatopâncreas também não ocorreram em grande escala.

Esses resultados são diferentes dos observados por MOLINA;MONTROYA (1999) que além de encontrarem lesões hemocíticas generalizadas no hepatopâncreas e tecido conjuntivo também observaram acumulações hemocíticas melanizadas no rostrum, periópodos, brânquias, cefalotórax e cutícula abdominal.

Segundo STORCH et al. (1984) e VOGT et al. (1985) a histologia do hepatopâncreas pode ser utilizada para avaliar o estado nutricional dos camarões. Assim, mudanças histológicas nesse órgão podem ser observadas antes que a redução no crescimento seja evidenciada. O rompimento das células digestivas de alguns túbulos do hepatopâncreas dos animais privados de vitamina C evidencia, embora tendo ocorrido em pouca escala, o início de um quadro de deficiência nutricional.

5- CONCLUSÕES

1- A vitamina C é essencial para a manutenção do sistema imunológico de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

2- Mesmo não apresentando sinais externos da carência de vitamina C os animais sofrem uma redução na quantidade de hémocitos por mL de hemolinfa.

3- As alterações observadas no hepatopâncreas podem ser um indicativo do início de um quadro de deficiência nutricional causada pela ausência de vitamina C em sua alimentação.

4- Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os aspectos nutricionais e imunológicos devem ser constantemente monitorados nos camarões, mesmo quando os animais não apresentem sinais externos dessas deficiências. Nesse caso a histologia e a CTH são importantes ferramentas que auxiliam nessa avaliação.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC, **Revista da ABCC**, Associação Brasileira dos Criadores de Camarão, Recife, Ano 3, n.º 1, p. 8-11, 2001.
- ABCC, **Revista da ABCC**, Associação Brasileira dos Criadores de Camarão, Recife, Ano 5, n.º 1, p. 100, 2003.
- ARANGO, J. I. G. Importancia de Vitaminas en Alimentacion de Camarones, **Acuicultura del Ecuador**, Guayaquil, n.º 2, p. 33 - 37, 1999.
- CARRILLO, O.; VEGA-VILLASANTE, F.; NOLASCO, H. Aditivos Alimentarios como Estimulantes del Crecimiento de Camarón. **Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola**, Mérida, p. 90 - 101, 2000.
- CATACUTAN, M. R; LAVILLA-PITOGO, C. R. L-Ascorbyl-2-phosphate Mg as a source of vitamin for juvenile *Penaeus monodon*. **Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 46, p. 40 - 47, 1994.
- DPA. Departamento de Pesca e Aquicultura - **Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado** - Brasília, p. 276, 2001.
- HENNIG, O. L.; GESTEIRA, T. C. V.; ANDRADE, T. P.; CARVALHO, R. L.; CAVALCANTE, F. A. M.; ARAÚJO, P. H. G.; MARTINS, P. C. C.; MARQUES, L. C. Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa do Camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado em diferentes salinidades. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 11, 1999, Recife. **Anais**, Recife: CONBEP, 1999, v. 2, p. 589 - 593.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed, Rio de Janeiro, p. 1 - 5, 1999.
- LALL, S. P. Nutrition and Health of Fish, **Avances en Nutricion Acuicola V**, Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, Mérida, p. 13 - 23, 2000.
- LEE, M. H.; SHIAU, S. Y. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in Grass Shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 12, p. 119 - 129, 2002.

LIGHTNER, D. V.; COLVIN, L. B.; DANALD, D. A. Black death, a disease syndrome of Penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbic acid. In: **Proceedings of the Eighth Annual Meeting World Mariculture Society**, Louisiana State University, Baton Rouge, p. 611 - 623, 1977.

LIGHTNER, D. V. Diseases of cultured Penaeid shrimp, **Handbook of Mariculture**, Crustacean Aquaculture, Boca Raton, v. 1, p. 239 - 320, 1983.

MARQUES, L. C. Efeito da salinidade e da frequência alimentar sobre o consumo de alimento, crescimento e sobrevivência de juvenis do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Perez Farfante, 1967), **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 66, 1997.

MOLINA, C.; MONTROYA, N. Histopatologia de la Deficiencia de Vitamina C en Camarón Blanco, *Penaeus vannamei*. In: V Congresso Equatoriano de Acuicultura, **Anais**, p. 33 - 43, Guayaquil, 1999.

MOULLAC, L.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, n. 191, p. 121 - 131, 2000.

NEWMAN, S. G.; BULLIS, R. A. Imune mechanisms of shrimp: form, function and practical application, **The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture**, Aquaculture, 1 ed., Baton Rouge, p. 226 - 237, 2001.

NUNES, A. J. P. **Manual Purina**, Alimentação de Camarões Marinhos, São Lourenço da Mata, p. 4, 2000.

NUNES, A. J. P. A Preliminary Report on the Sustainability of the NE Brazilian shrimp Farming Industry, **Advocate**, p. 49, 2000.

NUNES, A. J. P. **Guia Purina**, Fundamentos da Engorda de Camarões Marinhos, p. 3, 2002.

- RODRIGUEZ, J.; CADEÑO, R.; MOLINA, C.; VALENZUELA, E.; SOTOMAYOR, M. A. Efecto de la calidade de la dieta sobre la respuesta imune del camarón *Litopenaeus vannamei*. **Avances en Nutricion Acuicola V**, Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, Mérida, p. 57 - 71, 2000.
- SONG, Y. L.; HSIEH, Y. T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygem species. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 18, p. 201 - 209, 1994.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPo cloting in crustacean, **Aquaculture**, n. 191, p. 53 - 69, 2000.
- STORCH, V.; JUARIO, J.; PASCUAL, R. J. Early effects of nutritional stress on the liver, *Chanos chanos*, and on the hepatopancreas of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, n. 36, p. 229 - 236, 1984.
- VOGT, G.; STORCH, V.; QUINTIO, E.; PASCUAL, F. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, n. 48, p. 1 - 12, 1985.

