



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR



**JESARELA MERABE SILVA FREIRE**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS HEMÓCITOS  
DA OSTRÁ *CRASSOSTREA GASAR***

João Pessoa – PB

2022

**JESARELA MERABE SILVA FREIRE**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS  
HEMÓCITOS DA OSTRÁ *CRASSOSTREA GASAR***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Co-orientador: Dr. Natanael Dantas Farias

João Pessoa – PB

2022

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

F866c Freire, Jesarela Merabe Silva.

Caracterização morfológica e funcional dos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar* / Jesarela Merabe Silva Freire. - João Pessoa, 2022.

55 f. : il.

Orientação: Patricia Mirella da Silva Scardua.

Coorientação: Natanael Dantas Farias.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Ostras. 2. *Crassostrea gasar*. 3. Hemócitos. 4. Hemolinfa. 5. Fagocitose. 6. *E. coli*. 7. Zymosan. 8. Látex. I. Scardua, Patricia Mirella da Silva. II. Farias, Natanael Dantas. III. Título.

UFPB/BC

CDU 594.11(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMPUS I - CIDADE UNIVERSITÁRIA  
CEP: 58051-900 - JOÃO PESSOA - PB  
TELEFONE: (83) 3216-7987  
E-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br

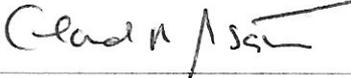
EXAME DE DISSERTAÇÃO

NOME DO CURSO OU PROGRAMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
NOME DA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TÍTULO DO TRABALHO
<b>"Caracterização Morfológica e Funcional dos hemócitos da Ostra de Mangue <i>Crassostrea gasar</i>."</b>
NOME DO ORIENTADOR
<b>Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua</b>

OBSERVAÇÕES DA BANCA EXAMINADORA
Foi sugerida a modificação de título (retirando "de mangue") e sugestões de formatação e complementação de alguns pontos na fundamentação, resultados e discussão.

A Banca Examinadora, tendo em vista a exposição oral apresentada pelo aluno e procedida a arguição pertinente ao trabalho final, considerou o candidato **Jesarela Merabe Silva freire**

APROVADO |  APROVADO COM RESTRIÇÕES |  REPROVADO

MEMBROS DA BANCA	TIT	INSTIT. A QUE PERTENCE	ASSINATURA
Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua	DO	UFPB	
Prof. Dr. Cláudio Roberto Bezerra Barbosa	DO	UFPB	
Dra. Sâmia Sousa Duarte	DO	UFPB	

LOCAL João Pessoa		DATA/HORÁRIO 09h00 – 30/05/2022
----------------------	--	------------------------------------

*A minha família,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

O mestrado foi uma fase importante da minha vida, e gostaria de dedicar este espaço para expressar minha gratidão a algumas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista. Meus sinceros agradecimentos a todos.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade e a capacidade de ingressar nesse mestrado, por ter me dado forças e sabedoria para enfrentar todas as dificuldades, e por ser o meu guia em todos os momentos dessa jornada e da minha vida.

Agradeço, especialmente a minha orientadora, professora Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua, pela disponibilidade e paciência em me orientar e por ter me dado a oportunidade de conhecer a pessoa incrível que és. Pela dedicação que teve com o meu trabalho e pela confiança em mim depositada. Sua participação, ensinamentos e sugestões foram fundamentais para a realização desse trabalho. A senhora é maravilhosa no que faz.

A minha mãe Damiana, a meu pai José Luiz e a minha irmã Laís pela compreensão, apoio, e por estarem presente em todos os momentos da minha vida. Pelo amor e cuidado que sempre me dedicaram, vocês são a minha base, a razão que me fez conseguir chegar até aqui.

A Fernando Ramos Queiroga, pela disponibilidade em me ajudar, principalmente no começo do mestrado.

Aos professores da pós-graduação, aqueles que tive a oportunidade de cursar as disciplinas do mestrado. Sou grata pela dedicação e esforço de cada um nas aulas ministradas, dada a situação atípica que enfrentamos.

## RESUMO

Os hemócitos são as células circulantes da hemolinfa das ostras e as responsáveis por inúmeras funções fisiológicas incluindo a defesa imunológica. A ostra *Crassostrea gasar* é uma espécie nativa que habita o manguezal e é de grande interesse comercial, sendo cultivada em todo litoral brasileiro, principalmente no Norte e Nordeste. Apesar da sua importância comercial pouco ainda se conhece sobre os aspectos imunológicos e as células de defesa. Este trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente os hemócitos da ostra *C. gasar* e estudar uma das principais respostas de defesa celular, a fagocitose. As ostras foram coletadas em um cultivo comercial localizado no estuário do Rio Mamanguape, PB. A caracterização morfológica dos hemócitos foi feita por microscopia de luz, onde os hemócitos foram aderidos em lâminas e corados com Giemsa ou vermelho neutro, e a citometria de fluxo para análise dos parâmetros morfológicos em citogramas. A fagocitose foi analisada por citometria de fluxo utilizando três partículas fluorescentes, uma inerte (látex) e duas biológicas (zymosan A e *Escherichia coli*). Os resultados mostraram a presença de seis populações de hemócitos na hemolinfa da ostra, granulócitos grandes e pequenos, hialinócitos grandes e pequenos e células tipo-blásticas. Os hialinócitos foram as células mais abundantes e a população celular mais heterogênea, e os granulócitos pequenos a população menos abundante. Um tipo de hemócito raro foi identificado e classificado como célula vesicular. Os hemócitos da ostra *C. gasar* foram capazes de fagocitar três tipos diferentes de partículas: zymosan A, partículas de látex e *E. coli* indicando uma ampla capacidade de defesa. O látex foi a partícula mais englobada pelos granulócitos que foram as células mais fagocíticas, enquanto, os hialinócitos fagocitaram mais bactérias *E. coli*. Este estudo foi a primeira caracterização dos hemócitos da ostra *C. gasar* e servirá de base para estudos que visem compreender a participação dos diferentes hemócitos nas respostas de defesa frente à patógenos e/ou alterações ambientais.

**Palavras-chave:** Ostras, *Crassostrea gasar*, hemócitos, hemolinfa, fagocitose, *E. coli*, zymosan, látex.

## ABSTRACT

Hemocytes are the circulating cells of the hemolymph of oysters and are responsible for numerous physiological functions including immune defense. The oyster *Crassostrea gasar* is a native species that inhabits the mangrove and is of great commercial interest, being cultured throughout the Brazilian coast, mainly in the North and Northeast. Despite its commercial importance, little is known about immunological aspects and defense cells. This work aimed to morphologically characterize the hemocytes of the oyster *C. gasar* and to study one of the main cellular defense responses, the phagocytosis. The oysters were sampled in a commercial culture located in the estuary of the Mamanguape River, PB. The morphological characterization of the hemocytes was performed by light microscopy, where the hemocytes were adhered to slides and stained with Giemsa or neutral red, and flow cytometry was used to analyze the morphological parameters in cytograms. Phagocytosis was analyzed by flow cytometry using three fluorescent particles, one inert (latex) and two biological (zymosan A and *Escherichia coli*). The results showed the presence of six hemocytes populations in the *C. gasar* hemolymph, large and small granulocytes, large and small hyalinocytes and blast-like cells. Hyalinocytes were the most abundant cells and the most heterogeneous cell population, while small granulocytes were the less abundant population. A rare type of hemocyte was identified and classified as a vesicular cell. *C. gasar* oyster hemocytes were able to phagocytose three different types of particles: zymosan A, latex particles and *Escherichia coli*, indicating a broad defense capacity. The latex was the most engulfed particle by granulocytes that were the most phagocytic cells, while hyalinocytes phagocytized more *E. coli* bacteria. This study was the first characterization of *C. gasar* oyster hemocytes and will support future studies that aim to understand the participation of different hemocytes in defense responses against pathogens and/or environmental changes.

**Keywords:** Oysters, *Crassostrea gasar*, hemocytes, hemolymph, phagocytosis, *E. coli*, zymosan, latex.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão
- AMFS – Água do Mar Filtrada Estéril
- AMPs – *Antimicrobial Peptides*
- A.U. – Unidades Arbitrárias
- APROOSTRAS – Associação de Produtores de Ostras
- B – Células tipo-blásticas
- CF – Citometria de Fluxo
- CEDAP – Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca
- DAMPs – *Damage-Associated Molecular Patterns*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FSC – *Forward Scatter*
- G – Granulócitos
- Gp – Granulócitos pequenos
- Gg – Granulócitos grandes
- GNBPs – *Gram-Negative Binding Proteins*
- H – Hialinócitos
- Hp – Hialinócitos pequenos
- Hg – Hialinócitos grandes
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- ML – Microscopia de Luz
- ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
- PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
- PAMs – Peptídeos antimicrobianos
- PGRPs – *Peptidoglycan Recognition Proteins*
- PMADs – Padrões Moleculares Associados a Danos
- PMAPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- PRRs - *Pattern Recognition Receptors*
- PRPs – *Pattern Recognition Proteins*
- ROS – *Reactive oxygen species*

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SSC – *Side Scatter*

TEPs – *Thioester-Containing Proteins*

TLRs – *Toll-Like Receptors*

V – Hemócitos Vesiculares

WORMS – *World Register of Marine Species*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos principais grupos de animais aquáticos cultivados em cada estado brasileiro .....	19
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de defesa dos hemócitos .....	24
<b>Figura 3</b> - Hemócitos da hemolinfa de <i>Crassostrea gasar</i> (granulócitos e células tipo-blásticas).....	386
<b>Figura 4</b> - Hemócitos da hemolinfa de <i>Crassostrea gasar</i> (hialinócitos e células vesiculares).....	38
<b>Figura 5</b> - Citograma representativo das células da hemolinfa de <i>Crassostrea gasar</i> . .....	3941
<b>Figura 6</b> - Fagocitose de partículas por hemócitos de <i>Crassostrea gasar</i> . .....	420
<b>Figura 7</b> - Taxa de fagocitose de diferentes partículas por hemócitos de <i>Crassostrea gasar</i> .....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Desempenho da produção aquícola no Brasil (2020).....	18
<b>Tabela 2</b> - Tamanho e proporção dos hemócitos da hemolinfa de <i>Crassostrea gasar</i> obtida por microscopia de luz ( $\mu\text{m}$ ) e citometria de fluxo (A.U.).....	37

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>15</b>
1.1	AQUICULTURA E SUA IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA .....	15
1.2	AQUICULTURA NO BRASIL.....	17
1.3	OSTREICULTURA.....	20
1.4	ALGUNS ASPECTOS DA OSTRÁ <i>CRASSOSTREA GASAR</i> (= <i>C. BRASILIANA</i> ) (ADASON, 1975).....	21
1.5	SISTEMA IMUNOLÓGICO DE BIVALVES.....	22
1.6	HEMÓCITOS DE BIVALVES E SUA CARACTERIZAÇÃO .....	25
<b>1.6.1</b>	<b><i>Ostras</i></b> .....	26
<b>1.6.2</b>	<b><i>Mexilhões</i></b> .....	28
<b>1.6.3</b>	<b><i>Vieiras</i></b> .....	29
<b>1.6.4</b>	<b><i>Amêijoas</i></b> .....	29
1.7	CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE BIVALVES DO BRASIL.....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	ANIMAIS E COLETA DE HEMOLINFA.....	33
3.2	ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	33
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	34
3.4	AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	34
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DE <i>CRASSOSTREA</i> <i>GASAR</i> POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	37
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DE <i>CRASSOSTREA</i> <i>GASAR</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
4.3	FAGOCITOSE DE DIFERENTES PARTÍCULAS FLUORESCENTES.....	41
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Aquicultura e sua importância socioeconômica

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) define a aquicultura como o cultivo de organismos aquáticos, animais e plantas, incluindo crustáceos, peixes, moluscos e algas, nas áreas interiores e costeiras.

A aquicultura desempenha um papel importante na subsistência, na geração de emprego, na segurança alimentar e no desenvolvimento econômico local das comunidades em muitos países, principalmente, nos países menos desenvolvidos e em desenvolvimento (FAO, 2020). É também uma importante ferramenta para se atingir os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) presentes na Agenda 2030, dentre elas podemos destacar o: ODS 1 (Erradicação da pobreza), ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável), ODS 8 (Trabalho decente e crescimento econômico) e ODS 14 (Vida na água) (CAVALLI, L. S. *et al.*, 2021).

Uma das maneiras de se diminuir a pobreza e a desigualdade social no mundo, é ofertando oportunidades de emprego e renda para as pessoas. E a aquicultura pode contribuir de forma eficaz no cumprimento desse objetivo. De acordo com o último relatório da FAO de 2020, cerca de 20 milhões de pessoas trabalharam direta ou indiretamente no setor aquícola em regime de tempo integral, parcial ou ocasional, e desse total, 19% correspondeu a mulheres (FAO, 2020). As mulheres, apesar de serem minoria, são fundamentais nesse setor, atuando principalmente, na venda e no processamento dos produtos gerados pela atividade aquícola.

Com o crescimento da população mundial e a diminuição dos estoques pesqueiros biologicamente sustentáveis, o setor aquícola tem se expandido rapidamente nos últimos anos quando comparado com outros setores alimentícios, como aves, suínos, laticínios bovinos e grãos (TROELL *et al.*, 2014). Prova disso, é que a produção global de organismos aquáticos provenientes da aquicultura foi estimada em 2018 em 82,1 milhões de toneladas, o que correspondeu a cerca de metade (46%) da produção de animais aquáticos no mundo (FAO, 2020).

O aumento da atividade aquícola tem contribuído para a erradicação da fome no

mundo, pois fornece um alimento saudável e nutritivo. De acordo com o último relatório da FAO, em 2020, foi observado um aumento significativo no consumo de produtos aquícolas, especialmente nos países em desenvolvimento, nos menos desenvolvidos e nos países de baixa renda com déficit alimentar, apresentando uma taxa de crescimento de 9,0 kg *per capita* em 1961 para 20,5 kg anual em 2018, crescimento de cerca de 1,5% ao ano (FAO, 2020). Os produtos da aquicultura também constituem uma excelente fonte de proteína animal, beneficiando cerca de metade da população mundial que obtêm em média 20% de sua ingestão de proteína a partir desses organismos, valor que pode chegar a 50% em países com baixo desenvolvimento econômico (FAO, 2020).

Além de promover a geração de emprego, renda, e ser uma fonte alimentar saudável, a aquicultura também promove o desenvolvimento econômico em muitos países. Tanto que, no comércio internacional, os produtos provenientes da aquicultura estão entre as *commodities* alimentares mais comercializadas no mundo. Somente em 2018, cerca de 67 milhões de toneladas de organismos aquáticos foram comercializados internacionalmente, além disso, o valor total das exportações a nível global foi estimado em 164 bilhões de dólares americanos (FAO, 2020).

O continente asiático, especialmente a China, vem se destacando como o principal exportador da produção aquícola e pesqueira. Porém, países em desenvolvimento têm expandido continuamente sua participação no comércio internacional, com um aumento de 60% em volume no número de exportações em 2018, quando comparado ao ano de 1976 (34%) (FAO, 2020).

A aquicultura divide-se em diferentes categorias de produção, a saber: a piscicultura (cultivo de peixes), a carcinocultura (cultivo de camarões), a malacocultura (cultivo de moluscos, que incluem ostras, mexilhões, gastrópodes e vieiras), a ranicultura (cultivo de rãs), a algicultura (cultivo de algas), a quelonicultura (cultivo de tartarugas e tracajás) e a criação de crocodilos e jacarés (VALENTI *et al.*, 2021).

A atividade aquícola abrange não somente o setor alimentício. Sabe-se que a maior parte do que é produzido pelo setor aquícola é destinado ao consumo humano, mas uma fração é usada para fins não alimentícios e são destinadas a produção de pérolas, peles, cosméticos e medicamentos (FAO, 2020).

Os peixes são os organismos aquáticos mais consumidos no mundo, e, conseqüentemente, os mais pescados e cultivados. Dados revelam que somente em 2019, o cultivo de peixes produziu mais de 56 milhões de toneladas. Em seguida, moluscos, principalmente bivalves, crustáceos e plantas aquáticas (ABABOUC *et al.*, 2021).

A aquicultura também é responsável por suprir a crescente demanda de moluscos bivalves no mundo e já corresponde a 22% da produção aquícola total (FAO, 2020). Aspectos que podem ter contribuído para o aumento da produção e do consumo de bivalves no mundo incluem: a facilidade de cultivo desses organismos, pois não necessitam de ração, e ainda podem ser cultivados em sistemas integrados ou policultivos. É um alimento saudável e saboroso, e que possui um alto valor comercial quando comparado com outros produtos aquícolas, promovendo o aumento de renda, principalmente entre os pequenos produtores (FAO, 2020).

Entre as principais espécies de bivalves cultivadas no mundo, estão as ostras do gênero *Crassostrea* spp., sendo a principal delas a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*), mas também, *C. rhizophorae*, *C. gasar*, *C. virginica*, *C. iredalei*, *C. madrasensis*, e ostras de outros gêneros: *Ostrea edulis*, *O. chilensis*, *O. conchaphila*, *Saccostrea cucullata*, *S. glomerata*. Além das ostras, outros bivalves são cultivados, entre eles as amêijoas (*Ruditapes philippinarum* e *Anadara granosa*), as vieiras (*Argopecten irradians*, *A. purpuratus*, *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*, *Pecten maximus*, *Placopecten magellanicus*, *Nodipecten subnodosus*, *Chlamys varia* e *Aequipecten opercularis*), os mexilhões (*Mytilus edulis*, *M. coruscus*, *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *Aulacomya ater*, *Choromytilus chorus*, *Perna canaliculus*, *P. viridis*) (SEAFISH, 2020; FAO, 2020).

## 1.2 Aquicultura no Brasil

O Brasil detém grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura, pois possui características geográficas, ambientais e sociais favoráveis. Dentre elas, podemos citar: a extensa área litorânea, a disponibilidade de água, temperaturas propícias, e com pouca variação climática anual, além do alto índice de pobreza e de desigualdade social.

Apesar de possuir características favoráveis para o crescimento da atividade, o Brasil é o 13º produtor aquícola mundial, com uma produção estimada em 643 mil toneladas, e um valor de produção de aproximadamente 5,96 bilhões de reais, em 2020 (IBGE, 2021). A **tabela 1** mostra o desempenho da produção aquícola brasileira.

**Tabela 1** - Desempenho da produção aquícola no Brasil (2020).

Regiões	Produção (mil toneladas)	Valor da produção (milhões reais)
Sul	202,98	1401,75
Sudeste	96,99	749,45
Centro-Oeste	69,07	586,40
Nordeste	176,12	2335,23
Norte	98,09	887,13
Total	643,28	5959,96

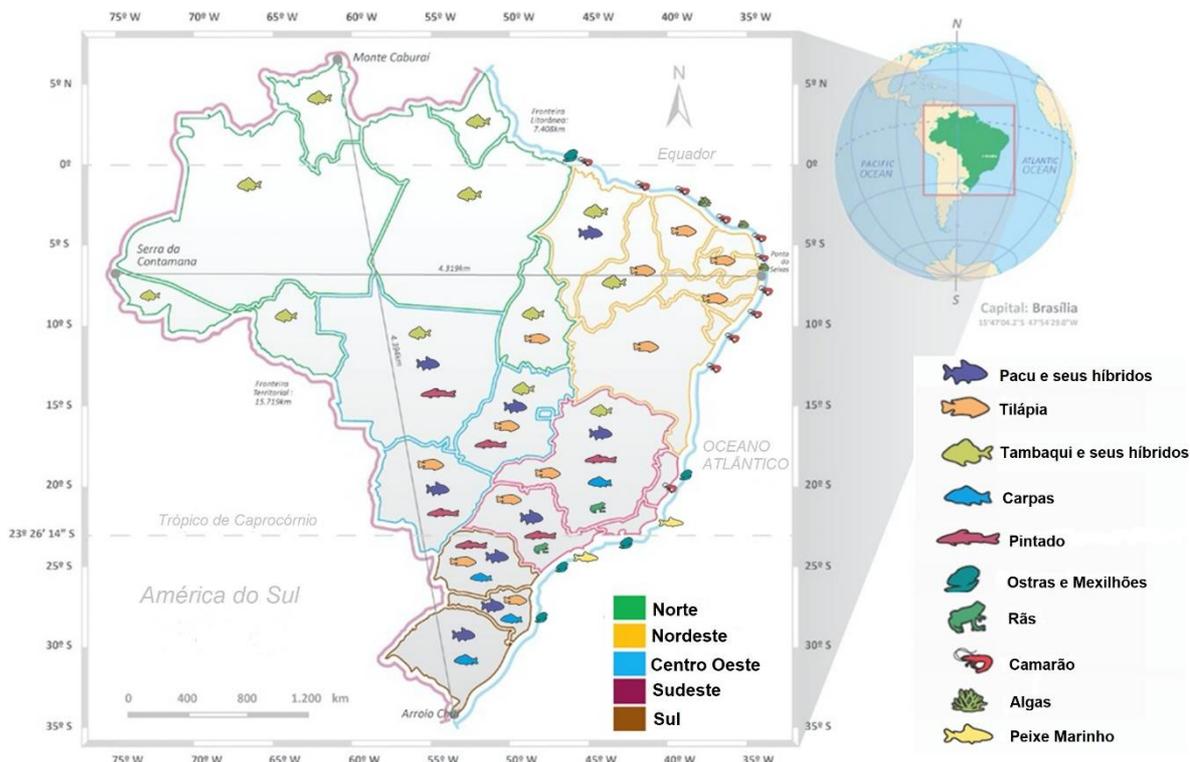
**FONTE:** IBGE (2020).

É importante salientar que esses dados podem estar subestimados, pois o país não repassa dados oficiais da produção aquícola a FAO desde 2014. De acordo com a Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2022), somente a produção de peixes no ano de 2020 ultrapassou a marca de 800 mil toneladas, enquanto que a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) reportou, no mesmo ano, que a produção de camarão atingiu 112 mil toneladas (ABCC, 2021). Entre os dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e os dados fornecidos pelas associações, existe uma diferença de produção de mais de 250 mil toneladas. Nos dados da PeixeBR e da ABCC não estão computados os números relativos ao cultivo de moluscos, algas e demais culturas aquícolas praticadas no Brasil.

Atualmente, cerca de 60 espécies de animais aquáticos, e aproximadamente 250 espécies de peixes ornamentais, plantas aquáticas e invertebrados são cultivadas no Brasil (VALENTI *et al.*, 2021) (**Figura 1**). Os peixes são os mais cultivados e consumidos, seguido dos crustáceos e moluscos. Entre os peixes, a espécie exótica tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e os peixes nativos, pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos, dominam a produção nacional (VALENTI *et al.*, 2021). A produção de crustáceos também merece destaque no país, especificamente na região Nordeste, com o cultivo da espécie exótica *Litopenaeus vannamei* (TAHIM; DAMACENO; ARAÚJO, 2019).

O cultivo de moluscos bivalves no Brasil é uma atividade abrangente e promissora. Entretanto, ostras, vieiras e mexilhões representam apenas 2,2% da produção aquícola do país (IBGE, 2021).

**Figura 1** - Distribuição dos principais grupo de animais aquáticos cultivados em cada estado brasileiro



**FONTE:** Adaptado de Valenti *et al.*, 2021.

As principais espécies de bivalves produzidas no Brasil são o mexilhão marrom (*Perna perna*), a ostra do pacífico (*C. gigas*), a vieira (*Nodipecten subnodosus*), e as ostras do mangue (*C. rhizophorae* e *C. gasar*) (VALENTI *et al.*, 2021).

A região Sul lidera o ranking nacional na produção de bivalves, especificamente o Estado de Santa Catarina, que responde por mais de 97% da produção brasileira (IBGE, 2021). Em 2020, Santa Catarina produziu mais de 16 mil toneladas de bivalves, sendo a maior parte dela representada pelos mexilhões (VALENTI *et al.*, 2021).

O sucesso da produção em grande escala em Santa Catarina é resultado de um conjunto de ações e projetos de pesquisa e extensão desenvolvido por instituições nacionais e internacionais no Estado, que possibilitou o desenvolvimento de recursos tecnológicos e a qualificação profissional dos produtores na região (ANDRADE, DE, 2016).

### 1.3 Ostreicultura

O cultivo de ostras, denominado ostreicultura, representa cerca de 1/3 da produção global de moluscos. Os moluscos correspondem aos organismos aquáticos mais produzidos no mundo, após os peixes (FAO, 2020). De acordo com o último relatório da FAO, a produção de ostras, em 2018, foi estimada em 6 milhões de toneladas, com um valor calculado em 7,4 bilhões de dólares americanos.

Dentre os países que praticam a ostreicultura, a China se destaca como o maior produtor e consumidor. Somente em 2018, foi responsável por produzir cerca de 5,1 milhões de toneladas do bivalve. Entretanto, países como República da Coreia, Japão, Estados Unidos, França, Filipinas, Indonésia e Taiwan também são responsáveis por produzirem quantidades significativas de ostras (SEAFISH, 2022).

A criação de ostras apresenta vantagens em relação aos demais cultivos de organismos aquáticos. São animais resistentes, sésseis, e como são organismos filtradores, consomem o fitoplâncton disponível na água, e, portanto, não precisam receber nenhuma alimentação suplementar (KENNEDY, Victor S.; NEWELL, Roger I. E.; EBLE, Albert F., 1996). Além disso, as ostras desempenham papel ambiental positivo, eliminando através da filtração a matéria orgânica presente na água, incluindo os resíduos produzidos por outras espécies, contribuindo assim, para a melhora na qualidade da água (GALLARDI, 2014).

Atualmente, cerca de 12 espécies são cultivadas no mundo, que incluem as ostras dos gêneros *Crassostrea* (*C. gigas*, *C. virginica*, *C. gasar*, *C. rhizophora*, *C. conteziensis*, *C. madrasensis*, *C. iredalei*), *Ostrea* (*Ostrea edulis*, *O. chilensis* e *Ostreala conchaphila*) entre outras espécies (*Saccostrea glomerata*, *S. cucullata*).

No Brasil, a produção de ostras é insignificante quando comparada a nível mundial, mesmo o país possuindo condições propícias para incrementar a atividade. O início do cultivo comercial do bivalve, data do início da década de 70, nos Estados da Bahia e de Santa Catarina, com a ostra nativa *C. rhizophorae*. Nesta mesma década, foi importada da Grã-Bretanha e introduzida no país a espécie de ostra *C. gigas*. E os primeiros experimentos com esta espécie se deram no Instituto de Pesquisas da Marinha de Cabo Frio, no Rio de Janeiro (OLIVERA *et al.*, 2006).

Atualmente, apenas três espécies são cultivadas no país, todas do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897), duas espécies nativas, (*C. gasar* (= *C. brasiliiana*) e *C.*

*rhizophorae*), e uma exótica (*C. gigas*) (PORTELLA, 2005).

*C. gigas* é a espécie de ostra mais produzida no Brasil, seu cultivo predomina na região Sul, devido a temperatura mais fria das águas, que é um fator limitante para a produção dessa espécie. Por outro lado, as duas espécies de ostras nativas, *C. gasar* e *C. rhizophorae* são produzidas principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A produção de *C. gigas* em SC em 2020 foi de aproximadamente 2 mil toneladas (IBGE, 2021) e de ostras nativas foi de 37 toneladas, com um valor total de produção de cerca de 23,6 milhões de reais (GIEHL *et al.*, 2020). A produção de *C. gasar* e *C. rhizophorae* no Nordeste foi de 132 toneladas (<https://sidra.ibge.gov.br>). Acredita-se que os dados de produção do NE devam estar subestimados, pela falta de um acompanhamento constante da evolução da produção, que cresce anualmente.

Diferente da produção na região Sul, no NE os cultivos são em pequena escala e feitos de forma rústica, com a utilização de mesas e troncos de madeira, muitas vezes de mangue. A captação de *sementes* (indivíduos jovens) para engorda, se dá majoritariamente no ambiente natural, por coleta direta do fundo ou das raízes do mangue, sem coletores artificiais. O Rio Grande do Norte é o Estado que está com a produção de ostras mais organizada em termos de áreas legalizadas, tecnologia para a produção e manejo e compra de *sementes* de um laboratório de produção situado em Tibau do Sul (RN). O laboratório de produção de sementes de ostras *C. gasar* tem a capacidade para produzir 6 milhões de sementes por safra, o que indica o alto potencial de desenvolvimento da atividade nesta região.

O Estado conta ainda com uma associação de produtores de ostras, a APROOSTRAS, e com o apoio de instituições como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Já na Paraíba, o cultivo ocorre de forma rústica ainda sem *sementes* de laboratório e a produção ocorre no Estuário do Rio Mamanguape.

#### **1.4 Alguns aspectos da ostra *Crassostrea gasar* (= *C. brasiliiana*) (Adason, 1975)**

As ostras da espécie *C. gasar* são animais que pertencem ao Filo Mollusca, Classe Bivalvia, Ordem Ostreoida, Família Ostreidae, Gênero *Crassostrea* e espécie *C. gasar* (WORMS, 2022). Sua distribuição geográfica abrange toda a costa brasileira e a costa

Oeste da África (LAPÈGUE *et al.*, 2002).

*C. gasar* é uma espécie dioica, com fecundação externa, apesar de alguns trabalhos terem relatado a presença de animais hermafroditas (RAMOS *et al.*, 2014). As larvas são de vida livre e após uns dias na coluna d'água assentam em um substrato e passam a ser sésseis (KENNEDY, Victor S.; NEWELL, Roger I. E.; EBLE, Albert F., 1996).

*C. gasar*, popularmente conhecida como “ostra do mangue” forma bancos naturais na zona costeira, fixadas tanto em substratos rochosos como em raízes de mangue (NASCIMENTO, 2018). Por apresentar um rápido crescimento, sua produção é preferencial em detrimento à ostra *C. rhizophorae* (SCARDUA *et al.*, 2017), além de tolerar uma variação maior de temperatura (NASCIMENTO, 2018) e salinidade (HORODESKY *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, com o aumento da produção de *C. gasar* no país, diversos estudos têm sido conduzidos para conhecer melhor a biologia da espécie, e assim aperfeiçoar as técnicas de produção e prevenir surtos de mortalidade nos cultivos. Vários trabalhos analisaram a influência de fatores abióticos como a salinidade, a temperatura e a precipitação, e concluíram que esses fatores interferem no crescimento, no ciclo reprodutivo e no desenvolvimento larval de *C. gasar* (GOMES, C. *et al.*, 2014; LEGAT *et al.*, 2017, 2021; LOPES, G. R. *et al.*, 2013; PAIXÃO *et al.*, 2013).

## 1.5 Sistema imunológico de bivalves

Ao longo dos milhões de anos de evolução, os bivalves desenvolveram um sistema de defesa complexo e eficiente para se protegerem de ataques de patógenos e estresses ambientais (SONG, L. *et al.*, 2010). O sistema imune inclui uma barreira física promovida pela concha, uma segunda barreira fornecida pelas células epiteliais e secreções do muco, e a defesa interna que é assegurada pelos efetores da imunidade inata (ALLAM, Bassem; ESPINOSA, 2015; ALLAM, Bassem; RAFTOS, D., 2015). Invertebrados, como os moluscos bivalves, não possuem imunidade adaptativa e contam apenas com a imunidade inata para a defesa do hospedeiro (GUO *et al.*, 2015).

Os componentes da imunidade inata se encontram na hemolinfa (CHENG, 1996; SONG, L. *et al.*, 2010). A hemolinfa, em bivalves, flui por um sistema circulatório aberto,

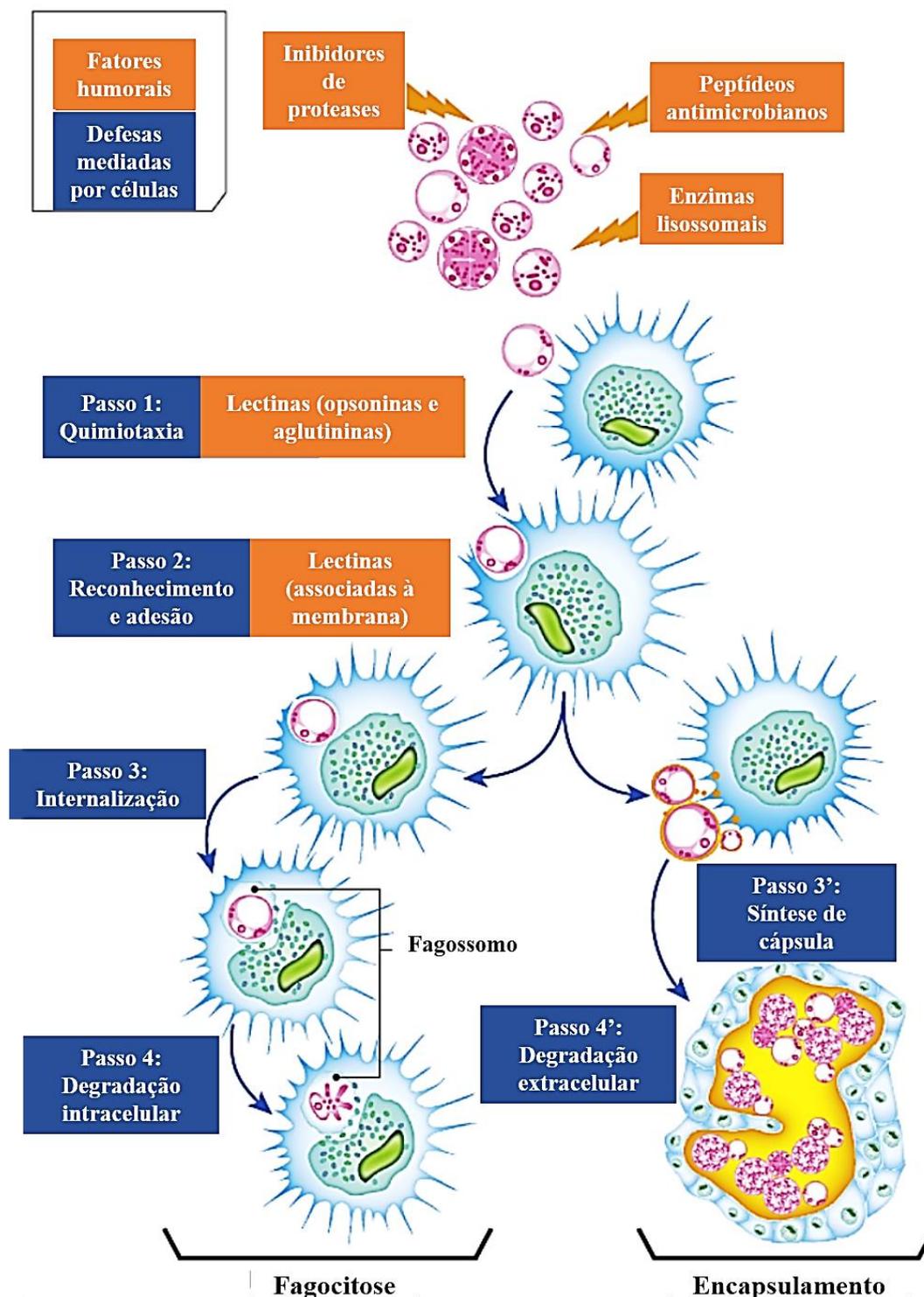
onde é bombeada para as artérias, percorre todos os órgãos e tecidos, e retorna ao coração por meio dos seios e das brânquias. Na hemolinfa encontram-se os hemócitos, eles são os principais mediadores das respostas celulares do sistema de defesa em bivalves, mas também estão implicados em diversas funções essenciais que incluem: reparo de feridas, reparo da concha, digestão e transporte de nutrientes, excreção e defesas internas (CHENG, 1996).

De forma geral as respostas imunológicas compreendem 1) o reconhecimento, 2) o recrutamento dos hemócitos para o local da infecção, 3) a fagocitose e/ou encapsulamento e, 4) a neutralização ou eliminação dos microrganismos invasores (**Figura 2**).

Os principais mecanismo de defesa celulares dos hemócitos são a fagocitose ou encapsulamento. A fagocitose ocorre em etapas, resumidas assim: 1º passo: Quimiotaxia, 2º passo: Reconhecimento e adesão do microrganismo, 3º passo: Internalização do microrganismo e formação de um fagossomo, e por fim, 4º passo: Degradação intracelular do microrganismo. Se o microrganismo for muito grande, ocorre o processo de encapsulamento, onde, no 3º passo: Ocorre a síntese da cápsula, e no 4º passo: Degradação extracelular do microrganismo (**Figura 2**).

A discriminação entre o próprio e não próprio é o passo inicial para a ativação da resposta imune inata nos bivalves. Ela depende de receptores ou proteínas de reconhecimento padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors or proteins* PRRs ou PRPs) que identificam e se ligam a moléculas estranhas chamadas de padrões moleculares associados à patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern* ou PAMPs ou PMAPs), bem como a padrões moleculares associados a danos (do inglês, *Damage-associated molecular patterns* ou DAMPs). Vários grupos de PRRs foram identificados em bivalves, a saber: as proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (do inglês, *peptidoglycan recognition proteins* ou PGRPs), proteínas de ligação a bactérias gram-negativas (do inglês, *Gram-negative binding proteins* ou GNBPs), lectinas tipo C, galectinas, proteínas contendo tioéster (do inglês, *thioester-containing proteins* ou TEPs) e receptores tipo Toll-like (do inglês, *Toll-like receptors* ou TLRs) que estão entre as famílias mais importantes de PRRs (ALLAM, Bassem; RAFTOS, D., 2015; SONG, L. *et al.*, 2010).

**Figura 2** - Mecanismos de defesa dos hemócitos.



Após o reconhecimento, a fagocitose é o principal mecanismo celular de defesa, e eliminação de microrganismos patogênicos pequenos. Ela ocorre através de estágios bem definidos sequenciais, incluindo a quimiotaxia (atração e migração), formação de um fagossoma, e por último, a neutralização ou destruição intracelular do microrganismo.

A morte dos microrganismos fagocitados é realizada por liberação repentina de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive oxygen species*, ROS), conhecida como explosão oxidativa (BACHÈRE, E. *et al.*, 1995). Quando os microrganismos são muito grandes para serem fagocitados, como no caso dos metazoários, ocorre o processo de encapsulamento (FISHER, 1986). Outras moléculas estão envolvidas na eliminação de microrganismos patogênicos, como os peptídeos antimicrobianos (do inglês, *Antimicrobial peptides and proteins* ou AMPs) que já foram isoladas e caracterizadas em algumas espécies de bivalves como mexilhões (*M. galloprovincialis* e *M. edulis*), amêijoas (*Venerupis philippinarum*), vieiras (*A. irradians*, *A. purpuratus* e *Chlamys nobilis*) e ostras (*C. virginica* e *C. gigas*) (ZANNELLA *et al.*, 2017), e enzimas hidrolíticas lisossomais (BACHÈRE, Evelyne *et al.*, 2015; DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016; SOUDANT *et al.*, 2013). Em *C. gasar*, até o momento, não há trabalhos sobre a presença e função de peptídeos antimicrobianos.

## 1.6 Hemócitos de bivalves e sua caracterização

Como os hemócitos são as principais células envolvidas na resposta de defesa em bivalves, conhecer os tipos existentes em cada espécie de bivalve é fundamental. Cabe considerar também que os bivalves não possuem um órgão hematopoiético (DYACHUK, 2016). Alguns estudos recentes sugerem que um tecido hematopoiético estaria na brânquia (JEMAA *et al.*, 2014; LI, Y. *et al.*, 2017).

A caracterização dos hemócitos tem sido um vasto campo de estudo ao longo dos anos. Mesmo após anos de pesquisas, não foi alcançado um consenso sobre a classificação destas células (PILA *et al.*, 2016). Sabe-se hoje, que as populações de hemócitos variam de acordo com a espécie de bivalve. Uma variedade de abordagens técnicas (citoquímica, ultraestrutural, com o uso de anticorpos) têm sido utilizadas para classificar essas células (HINE, 1999), incluindo a microscopia de luz (ML), eletrônica de transmissão (MET) e a citometria de fluxo (CF).

A citometria de fluxo permite identificar populações com base em diferenças de tamanho e quantidade de grânulos citoplasmáticos, fazendo a diferenciação entre populações de hemócitos com mais precisão do que outras técnicas. Por outro lado, a microscopia de luz permite diferenciar grânulos com diferentes afinidades pelos corantes.

O uso combinado da citometria de fluxo e da microscopia de luz tem sido usado com sucesso na caracterização de hemócitos de bivalves (DONAGHY; VOLETY, A. K., 2011; PARRINO *et al.*, 2019; ROLTON; RAGG, 2020), amêijoas (DONAGHY; LAMBERT; *et al.*, 2009; ZENG; HUO; YANG, H., 2021) e ostras (ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX; FORD, 2002; ANDREYEVA, A.Y. *et al.*, 2020; DANG, Cécile *et al.*, 2012; DONAGHY; KIM, B.-K.; *et al.*, 2009; HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a; HONG, H.-K.; DONAGHY; CHOI, K.-S., 2014; LI, J. *et al.*, 2018; ROLTON *et al.*, 2020; XUE; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, 2001).

Uma das primeiras caracterizações dos hemócitos de bivalves foi feita com base em critérios morfofuncionais. Os hemócitos foram classificados em dois tipos principais: granulócitos e hialinócitos (ou agranulares). Os granulócitos se caracterizam por conter muitos grânulos, além disso, possuem baixa razão núcleo:citoplasma, podendo ser uninucleados ou binucleados, com o núcleo excêntrico, esférico ou ovoide. Enquanto que os hialinócitos se caracterizam por conter poucos ou nenhum grânulo, alta razão núcleo:citoplasma, e um núcleo excêntrico, redondo ou ovoide (CHENG, 1996).

Abaixo uma revisão sobre os tipos de hemócitos de alguns bivalves de importância comercial, com ênfase em espécies de ostras.

### 1.6.1 Ostras

Em ostras dos gêneros *Crassostrea* e *Ostrea*, de forma geral, três populações de hemócitos foram identificadas. Abaixo estão sumarizados os trabalhos e resultados obtidos para as principais espécies destes dois gêneros.

Na ostra *C. gigas*, o primeiro trabalho que fez uma caracterização morfológica dos hemócitos desta espécie foi o de Chang *et al.* (2005) utilizando duas técnicas microscópicas, ML e MET. Foram observados dois tipos celulares, agranulócitos, que eram levemente basófilos e com longos pseudópodes, sendo este o tipo mais abundante (64%) e os granulócitos, que foram subclassificados em eosinófilos, basófilos e células contendo os dois tipos de grânulos. Outro tipo de hemócito também foi encontrado e denominado de célula vesicular, que não foi classificada pelos autores, mas tinha as seguintes características: núcleo excêntrico e ectoplasma proeminente, semelhantes aos dos granulócitos, mas apresentavam citoplasma vacuolado e ausência de grânulos

citoplasmáticos. Mais recentemente, Andreyeva (2021) usando a ML e a CF confirmaram a existência dos dois tipos de hemócitos, os granulócitos com os mesmos subtipos, mas os hemócitos sem grânulos foram classificados por estes autores em dois subtipos: agranulócitos e hialinócitos, que juntos representaram também a população mais abundante (87%) da hemolinfa.

Um dos primeiros estudos dos hemócitos da ostra *C. virginica*, feito por CF, revelou quatro populações distintas, sendo eles: hialinócitos grandes, hialinócitos pequenos, granulócitos e granulócitos pequenos (ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX; FORD, 2002) o que foi visto posteriormente no trabalho de (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a). Um estudo realizado nesta espécie, avaliou as características dos hemócitos de diferentes compartimentos corporais da ostra, incluindo, hemolinfa, muco palial, e extrapalial (LAU *et al.*, 2017). A CF em conjunto com marcadores de epítomos fluorescentes foi usada para a caracterização. Os resultados indicaram a presença de quatro subpopulações, sendo elas, agranulócitos, hemócitos intermediários, granulócitos e granulócitos pequenos, em todos os três fluidos corporais. Os hemócitos intermediários apresentaram morfologia heterogênea, alta relação núcleo:citoplasma, ausência ou presença de poucos grânulos escuros ou refrativos, e a presença de vacúolos no citoplasma (ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX; FORD, 2002; PRADO-ALVAREZ, M. *et al.*, 2012).

Na ostra *C. ariakensis*, a primeira caracterização dos hemócitos que usou a CF aliada a ML revelou três tipos de hemócitos na hemolinfa, incluindo hialinócitos, granulócitos e células tipo-blásticas. Estas células são as menores da hemolinfa e apresentam alta relação núcleo:citoplasma e ausência de grânulos no citoplasma (DONAGHY; KIM, B.-K.; *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi observado na espécie *C. nippona* também usando ML e CF (HONG, H.-K.; DONAGHY; CHOI, K.-S., 2014). Já na ostra *C. madrasensis*, a ML e a MET identificaram três tipos de hemócitos, os dois tipos celulares básicos granulócitos e hialinócitos, e a presença de um semi-granulócito. Foram observados também que os granulócitos continham grânulos acidófilos e basófilos, enquanto os semi-granulócitos continham apenas grânulos basófilos (ITTOOP *et al.*, 2006). No primeiro estudo na ostra *C. hongkongensis* usando a ML e a CF, foram identificados os dois tipos básicos granulócitos e hialinócitos, mas os autores não relataram se haviam subpopulações dos mesmos (LI, J. *et al.*, 2018).

Nas ostras do gênero *Saccostrea* e *Ostrea* spp. os estudos de caracterização de hemócitos mostraram dois ou três tipos celulares. Na ostra *S. glomerata* Aladaileh *et al*

(2007) observaram por CF a presença de quatro populações distintas. Dessas populações, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) identificou hialinócitos, granulócitos e células tipo hemoblásticas, enquanto a MET além de evidenciar a presença desses três tipos celulares, identificou quatro subtipos de hialinócitos e cinco subtipos de granulócitos. Por outro lado Dang *et al* (2012), ao analisar os hemócitos das ostras *S. glomerata* e *Pinctada fucata*, observaram três populações distintas de hemócitos que puderam ser diferenciadas por citometria de fluxo em granulócitos, hialinócitos e uma subpopulação de pequenos agranulócitos.

Hong *et al.* (2013) caracterizou os hemócitos pela primeira vez nas espécies subtropicais *S. kegaki*, *O. circumpecta* e *Hyotissa hyotis* usando, a ML e a CF. Com base na presença ou ausência de grânulos citoplasmáticos, os hemócitos foram classificados em dois tipos principais: granulócitos e hialinócitos. Uma terceira população de células pequenas, agranulares e com pouca quantidade de citoplasma foram chamadas de células tipo-blásticas.

Na primeira caracterização dos hemócitos da ostra *O. chilensis*, a CF revelou duas principais populações (granulócitos e hialinócitos), que foram divididos em duas subpopulações de cada tipo. Em contrapartida, as análises histológicas revelaram nos vasos hemolinfáticos cinco subpopulações de hemócitos com base no tamanho, relação núcleo:citoplasma e coloração, que foram denominadas de granulócitos grandes e altamente eosinófilos, semi-granulócitos grandes e menos eosinófilos, granulócitos pequenos, hialinócitos, hialinócitos pequenos basófilos, estes que seriam as células tipo-blásticas (ROLTON *et al.*, 2020). Em *O. edulis*, três populações de hemócitos foram identificadas por citometria de fluxo, a saber: hialinócitos pequenos, hialinócitos grandes e granulócitos (XUE; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, 2001).

## 1.6.2 Mexilhões

Hemócitos granulócitos e hialinócitos foram identificados por CF nos mexilhões *M. galloprovincialis* (ANDREYEVA, A. Y.; EFREMOVA; KUKHAREVA, T. A., 2019; PARRINO *et al.*, 2019) e *P. viridis* (DONAGHY; VOLETY, A. K., 2011). Em *P. canaliculus* além dos dois tipos citados acima, um terceiro tipo, células tipo-blásticas, foi observado e representou 4% da população (ROLTON; RAGG, 2020).

### 1.6.3 Vieiras

A classificação dos hemócitos de vieiras é assunto controverso. Isso se deve ao fato de alguns estudos relatarem a ausência de granulócitos. Na revisão proposta por Hine (1999), os estudos até aquele momento envolvendo pectíneos coincidem com este fato. Entretanto, estudos posteriores detectaram a presença de granulócitos em algumas espécies de vieiras, *Chlamys farreri* (XING; ZHAN; ZHOU, L., 2002), *A. purpuratus* (GONZÁLEZ; ARENAS, 2002), *N. subnodosus* (SCHLEDER *et al.*, 2008) e *A. irradians* (ZHANG, W.; WU, X.; WANG, Ming, 2006). Porém, as características dos granulócitos destas espécies são distintas das de outros bivalves, pela presença de poucos grânulos e muitos vacúolos no citoplasma, o que pode ter sido o motivo das diferenças de classificação feita nos diferentes estudos. Um exemplo é o da vieira *N. subnodosus* que no estudo conduzido por Estrada *et al.* (2013) identificou hialinócitos pequenos e grandes e células tipo-blásticas, mas não granulócitos. Enquanto que eles foram descritos por Schleder *et al.* (2008).

### 1.6.4 Amêijoas

As amêijoas são um grupo a parte em relação aos tipos de bivalves, pois além de apresentarem os dois tipos básicos (granulócitos e hialinócitos) tem outros tipos únicos e distintos dos encontrados em outros bivalves. Por exemplo, células serosas identificadas em *R. philippinarum* (CIMA; MATOZZO, 2018), eritrócitos tipo I, eritrócitos tipo II em *Anadara broughtonii*, *A. kagoshimensis* e *Tegillarca granosa* (KIM, J.-H. *et al.*, 2020), células semelhantes a amebócitos em *A. kagoshimensis* (KLADCHENKO, E.S. *et al.*, 2020).

Os eritrócitos foram as maiores células observadas na hemolinfa destas espécies, apresentavam formato redondo, baixa relação núcleo:citoplasma, e presença de hemoglobina (Kim *et al.*, 2020). Por outro lado, os amebócitos eram células pequenas, com alta relação núcleo: citoplasma, formato redondo e não apresentavam grânulos no citoplasma (Kladchenko *et al.*, 2020).

## 1.7 Caracterização dos hemócitos de bivalves do Brasil

Algumas espécies de bivalves comerciais tiveram sua hemolinfa e os hemócitos caracterizados. Os estudos foram para a ostra, *C. rhizophorae* (BARTH; MORAES; BARRACCO, Margherita Anna, 2005), para o mexilhão *P. perna* (BARRACCO, M.; MEDEIROS; MOREIRA, 1999; FONSECA *et al.*, 2022), para a vieira *N. subnodosus* (SCHLEDER *et al.*, 2008), e para a ostra perlífera *Pteria hirundo* (VIEIRA *et al.*, 2017).

No primeiro estudo conduzido por Barth *et al.* (2005) utilizando somente a ML e de interferência diferencial, duas populações de hemócitos foram observadas na ostra *C. rhizophorae*: granulócitos e hialinócitos. Diferentemente, Rebelo *et al.* (2013) em um trabalho mais recente, com o uso da CF identificou nesta mesma espécie um tipo adicional, que ele denominou de hemoblastos, além de hemócitos agranulares e granulares, os quais corresponderiam aos observados previamente por Barth *et al.* (2005).

No estudo com o mexilhão *P. perna* (BARRACCO, M.; MEDEIROS; MOREIRA, 1999) usando a ML foram identificados dois tipos de hemócitos na hemolinfa: hialinócitos e granulócitos. Recentemente, combinando a CF e MET, Fonseca *et al.* (2022) identificou nesta mesma espécie mais dois tipos de hemócitos, os semigranulócitos e as células tipo-blásticas.

No estudo conduzido por Vieira *et al.* (2017) na ostra perlífera *P. hirundo*, três principais populações foram identificadas por ML: hialinócitos, granulócitos e células tipo-blásticas, e duas subpopulações de hialinócitos por CF, os hialinócitos grandes e hialinócitos pequenos.

Para a vieira *N. subnodosus*, usando a microscopia de contraste de fase foram encontrados apenas dois tipos de hemócitos, hialinócitos e granulócitos (SCHLEDER *et al.*, 2008).

Com a ostra nativa *C. gasar* não há nenhum estudo da caracterização dos hemócitos. No entanto, um estudo que avaliou a resposta de defesa frente a infecção pelo protozoário *Perkinsus* spp. observou que existiam ao menos três populações distintas: hemócitos hialinos, hemócitos granulares e células tipo-blásticas (QUEIROGA *et al.*, 2013).

Diante da pouca informação disponível sobre as células da hemolinfa de *C. gasar*,

o objetivo deste estudo, foi caracterizar morfológica e funcionalmente os hemócitos presentes na hemolinfa desta espécie.

## **1.8 Hemócitos como indicadores da saúde animal e ambiental**

Parâmetros hemocitários, como a contagem total de hemócitos da hemolinfa ou a contagem diferencial dos tipos de hemócitos e fagocitose podem ser usados para monitorar a saúde dos bivalves, assim como determinar a qualidade do ambiente onde vivem (BARRACCO, M.; SILVA, P. DA, 2008; DONAGHY *et al.*, 2016; FOURNIER *et al.*, 2000). Alguns trabalhos de revisão sobre o impacto de contaminantes ambientais ou do efeito das microalgas nocivas nos bivalves demonstram a importância dos estudos destas células para avaliar a saúde dos animais e do ambiente (LASSUDRIE *et al.*, 2020; RENAULT, T, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os hemócitos da ostra de mangue *Crassostrea gasar*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a morfologia, morfometria e as características tintoriais dos hemócitos da ostra *C. gasar*.
- Quantificar e estimar a proporção dos diferentes tipos de hemócitos na hemolinfa da ostra *C. gasar*, por duas técnicas, a microscopia de luz e a citometria de fluxo.
- Avaliar a capacidade fagocítica dos hemócitos da ostra *C. gasar* utilizando um tipo de partícula inerte (látex) e duas partículas de origem biológica (Zymosan A e *E. coli*).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e coleta de hemolinfa**

Ostras adultas *Crassostrea gasar* (> 70 mm) foram coletadas em um cultivo comercial localizado no estuário do Rio Mamanguape (PB, S06°47'08,2"; WO34°59'46,7"). Os animais foram trazidos para o Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados Marinhos (LABIPI, UFPB) e foram mantidos em tanques com água do mar na salinidade de 25, temperatura de 25-28°C e com aeração constante.

A hemolinfa foi retirada de cada animal através do músculo adutor, usando uma seringa acoplada a uma agulha (21G), a qual foi mantida em gelo para reduzir a agregação celular ou imediatamente fixada dependendo da análise. A hemolinfa foi observada ao microscópio de luz para verificar contaminação com água intravalvar e as amostras que continham qualquer tipo de impurezas foram descartadas.

#### **3.2 Análises microscópicas**

A hemolinfa foi preparada de duas maneiras diferentes para analisar os tipos de hemócitos ao microscópio de luz. Na primeira, a hemolinfa de 10 ostras foi corada com vermelho neutro (concentração final 0,005%) e os hemócitos foram observados em microscópio de contraste de fase (Olympus BX41), e fotografados com câmera Olympus Q-Color 5TM durante 20 min. Foram registradas projeções do citoplasma e presença ou ausência de vesículas ácidas intracitoplasmáticas (n = 7 células/animal).

Na segunda, a hemolinfa de 27 animais foi depositada individualmente em uma lâmina posicionada sobre papel umedecido para criar uma câmara úmida e foi incubada a temperatura ambiente (25°C) por 5 min, para permitir que as células aderissem à superfície do vidro. As monocamadas de células foram fixadas com metanol (5 min) e coradas com Giemsa puro (Newprov) por 5 min.

Os hemócitos foram analisados sob microscópio de contraste de fase e

fotografados. Cem células por ostra foram caracterizadas com base no padrão de coloração dos grânulos intracitoplasmáticos (basófilos ou acidófilos), relação núcleo/citoplasma, formato (arredondado ou espalhado), tamanho (eixo maior, sem considerar projeções citoplasmáticas). Os tipos de hemócitos encontrados foram quantificados e tiveram sua proporção estimada para cada animal.

### **3.3 Caracterização dos hemócitos por citometria de fluxo**

A hemolinfa das mesmas 27 ostras usadas para análise microscópica foi preparada para citometria de fluxo. A hemolinfa foi imediatamente fixada em formaldeído (concentração final de 2%, em água do mar esterilizada filtrada) e analisada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA). As populações de hemócitos foram discriminadas em citogramas de *forward scatter* (FSC) vs *side scatter* (SSC), representando tamanho e complexidade interna (indicador de grânulos intracitoplasmáticos), respectivamente.

### **3.4 Avaliação da fagocitose por citometria de fluxo**

Três partículas diferentes foram usadas para estimar a capacidade fagocítica dos hemócitos: Partículas de látex fluorescentes (*Fluoresbrite yellow-green microspheres*, 2 $\mu$ m, Polysciences), zymosan A (*Texas Red conjugate*, ~ 3 $\mu$ m, Life Technologies) e *Escherichia coli* (*Texas Red conjugate*, ~1 $\mu$ m, Life Technologies). As partículas foram diluídas em tampão fosfato contendo azida de sódio (0,07 mM) e  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  foi a concentração final nos ensaios.

A hemolinfa individual de 30 ostras foi disposta em tubos contendo separadamente a suspensão das três partículas na proporção de 1:10 hemócito: partículas. Os controles foi a hemolinfa com água do mar filtrada estéril (AMFS). A hemolinfa foi incubada por 1 hora à 25 °C, e então analisadas em citômetro de fluxo.

As populações de hemócitos foram selecionadas em citogramas de *dot plot* FSC vs SSC para serem visualizadas em citogramas SSC vs Fluorescência, verde para partículas de látex (530 nm) e vermelho para as partículas de zymosan e *E. coli* (613 nm). A fagocitose foi estimada em histograma de fluorescência selecionando picos de hemócitos fagocitando 1 ou mais partículas (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a). Para a fagocitose do zymosan A, não foi observado nenhum pico representando as populações de células que engolfaram um número específico de partículas, mas um pico achatado, provavelmente devido ao tamanho irregular das partículas. Neste caso, todos os hemócitos fluorescentes foram considerados fagocíticos e a fagocitose total foi estimada. As partículas de *E. coli* apresentaram fluorescência fraca, provavelmente devido ao pequeno tamanho destas células. A fagocitose de *E. coli* foi estimada deduzindo-se a fluorescência total dos hemócitos incubados com suspensão de *E. coli* da fluorescência total das células em AMFS.

### 3.5 Análises estatísticas

O teste de normalidade de D'Agostino & Pearson foi aplicado a todos os dados. Os dados de porcentagem foram transformados para arco seno da raiz quadrada. Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn's foi usado para comparação do tamanho dos hemócitos por microscopia e citometria de fluxo.

Uma ANOVA *One-way* seguida por um teste post-hoc de Tukey foi usada para comparar a fagocitose entre as três partículas: látex, zimosan A e *E. coli* considerando neste caso todos os tipos de hemócitos como uma única população. O teste t não pareado foi usado para comparar a capacidade fagocítico de partículas de látex e de partículas de *E. coli* (separadamente) entre granulócitos e hialinócitos.

As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP). As análises estatísticas foram realizadas

utilizando o software Statgraphics Centurion XV (Virginia, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de *Crassostrea gasar* por microscopia de luz

A hemolinfa das ostras da espécie *C. gasar* apresentou seis populações celulares com diferentes tamanhos, morfologias e propriedade de coloração: granulócitos grandes (Gg) e pequenos (Gp), hialinócitos grandes (Hg) e pequenos (Hp) e células tipo-blásticas (B). Um tipo de célula não identificada também foi encontrado e chamado aqui de hemócito vesicular (V).

Os granulócitos grandes foram o maior tipo celular entre as populações de hemócitos de *C. gasar* ( $31,5 \pm 0,31 \mu\text{m}$ ; **tabela 2**) e apresentaram baixa relação núcleo/citoplasma. O núcleo era arredondado e excêntrico e o citoplasma continha muitos grânulos ácidos, corados de vermelho (vermelho neutro) ou azul (Giemsa). Essas células projetaram rapidamente filipódios e lamelipódios em adesão espontânea (**Figs. 3a-d**) e compreendiam 14,4% ( $\pm 1,58$ ) dos hemócitos da hemolinfa (**Tabela 2**).

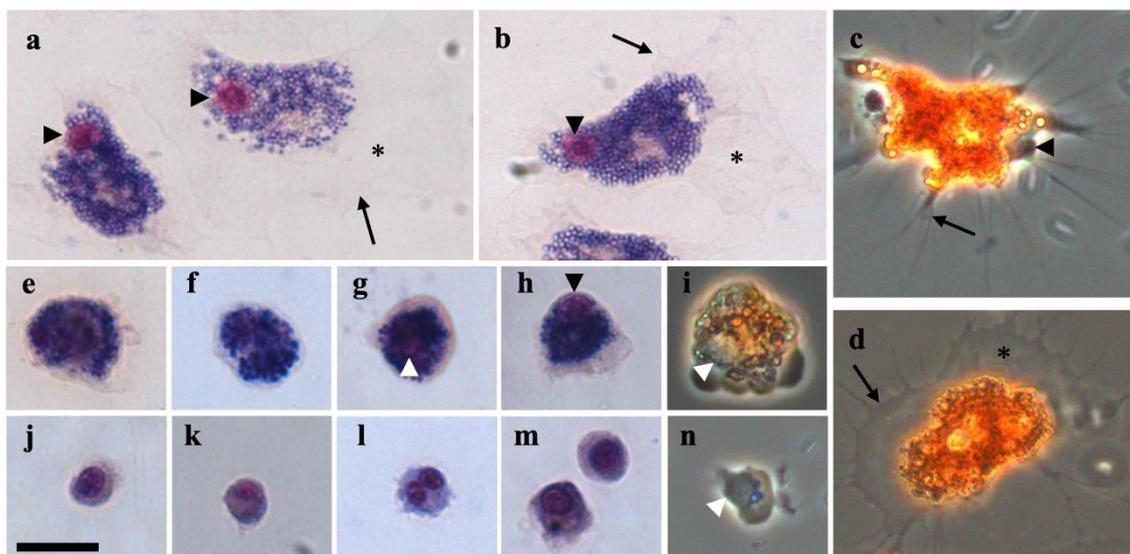
**Tabela 2** - Tamanho e proporção dos hemócitos da hemolinfa de *Crassostrea gasar* obtida por microscopia de luz e citometria de fluxo.

	Microscopia		Citometria de Fluxo		
	( $\mu\text{m}$ )	%	N	(A.U.)	%
<b>Granulócitos grandes (Gg)</b>	$31,5 \pm 0,31$ <b>a</b>	$14,4 \pm 1,59$	694	$369,5 \pm 12,96$ <b>a</b>	$6,3 \pm 0,79$
<b>Granulócitos pequenos (Gp)</b>	$11,9 \pm 0,22$ <b>c</b>	$4,8 \pm 1,10$	282	$160,3 \pm 4,32$ <b>b</b>	$1,3 \pm 0,15$
<b>Hialinócitos grandes (Hg*)</b>	$23,1 \pm 0,24$ <b>b</b>	$31,7 \pm 2,66$	528	$303,1 \pm 2,34$ <b>a</b>	$38,2 \pm 2,13$
<b>Hialinócitos pequenos (Hp)</b>	$10,7 \pm 0,13$ <b>c</b>	$33,0 \pm 2,12$	529	$138,7 \pm 2,3$ <b>b</b>	$43,8 \pm 1,85$
<b>Células tipo-blásticas (B)</b>	$5,4 \pm 0,06$ <b>d</b>	$16,0 \pm 1,53$	489	$43,55 \pm 0,35$ <b>c</b>	$10,6 \pm 1,24$

Dados são a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 27$ ). N: número de hemócitos analisados por microscopia de luz. Letras diferentes denotam diferenças significativas de tamanho entre os tipos de hemócitos (separadamente para cada técnica),  $P < 0,0001$ , teste post-hoc de

Dunns. \* Hemócitos vesiculares estão incluídos nesta população devido à sua representatividade extremamente baixa.

**Figura 3** - Hemócitos da hemolinfa de *Crassostrea gasar* (granulócitos e células tipo-blásticas).



Coloração Giemsa (a, b, e-h, j-m, campo claro) e vermelho neutro (c, d, i, n, contraste de fase). Granulócitos grandes (a-d), granulócitos pequenos (e-i) e células tipo-blásticas (j-n). Observe as projeções citoplasmáticas de filipódios e lamelipódios (setas finas), o ectoplasma (\*), o endoplasma contendo vários grânulos vermelhos ou azuis (basófilos) e o núcleo (ponta de seta). Barra = 10  $\mu\text{m}$  para todas as imagens.

Os granulócitos pequenos apresentaram tamanho médio de 11,9  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,21$ ; **tabela 2**) e baixa relação núcleo/citoplasma. O núcleo era arredondado ou oval e excêntrico, e o citoplasma continha grânulos abundantes e grandes corados de vermelho (vermelho neutro) ou azul (Giemsa) (**Figs. 3e-i**). O núcleo estava quase completamente coberto por grânulos. Essas células raramente estendiam projeções citoplasmáticas. Foram as menos numerosas na hemolinfa ( $4,8\% \pm 1,09$ ; **tabela 2**).

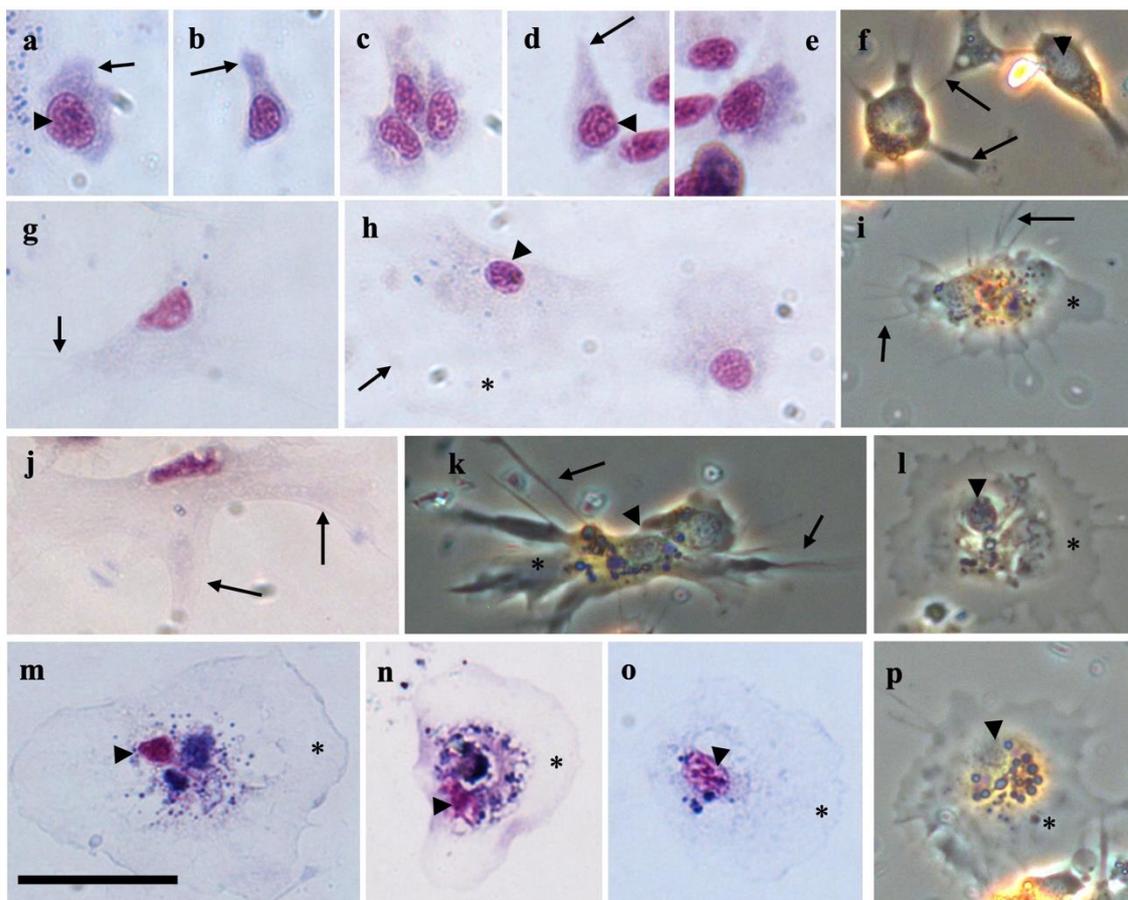
As células tipo-blásticas foram as células menores (5,4  $\mu\text{m} \pm 0,05$ ; **tabela 2**), apresentaram alta razão núcleo/citoplasma, núcleo excêntrico e citoplasma altamente basófilo sem grânulos nem projeções proeminentes da membrana (**Figs. 3j-n**).

Os hialinócitos foram a população de hemócitos mais numerosa e heterogênea da hemolinfa (**Tabela 2**). Dois tipos principais foram observados, células pequenas e grandes. Os hialinócitos pequenos eram semelhantes em tamanho aos granulócitos pequenos (10,7  $\mu\text{m} \pm 0,12$ ; **tabela 2**). Apresentavam alta relação núcleo/citoplasma,

núcleo grande arredondado ou alongado, em sua maioria centrado e citoplasma levemente basófilo, muitas vezes sem grânulos (**Figs. 4a-f**). As projeções do citoplasma eram escassas e, quando presentes, frequentemente espessas (**Figs. 4b, d, f**). Os hialinócitos grandes foram o segundo maior tipo de hemócito ( $23,1 \mu\text{m} \pm 0,24$ ; **tabela 2**). Eles apresentaram baixa relação núcleo/citoplasma, núcleo central ou excêntrico e citoplasma levemente acidófilo com poucos grânulos não corados que passariam despercebidos se não fossem observados sob contraste de fase (**Figs. 4i e k**). As células aderiram rapidamente às lâminas e emitiram vários tipos de projeções, espessas e longas ou finas e curtas (**Figs. 4g-k**).

Um tipo de hemócito não identificado foi caracterizado como uma célula arredondada com baixa relação núcleo/citoplasma, núcleo central ou excêntrico e projeções tipo lamelipódios (**Figs. 4l-p**). Eles eram tão grandes quanto os Hg e apresentavam um endoplasma contendo grânulos e vacúolos de tamanho e forma irregulares que se coravam de azul (basófilo), embora alguns não se corassem (**Figs. 4m-o**). Este tipo foi chamado de hemócito vesicular e foi raro na hemolinfa, por isso não foi considerado como uma população separada nas contagens, mas sim, incluída na população de Hg.

**Figura 4** - Hemócitos da hemolinfa de *Crassostrea gasar* (hialinócitos e células vesiculares).



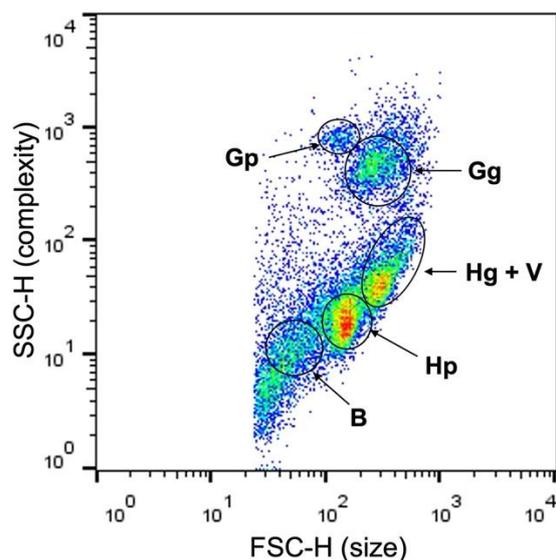
Coloração Giemsa (a-e, g-h, j, m-o, campo claro) e vermelho neutro (f, i, k, l, p, contraste de fase). Hialinócitos pequenos (a-f), hialinócitos grandes (g-k) e células vesiculares (l-p). Observe o endoplasma contendo pouco ou nenhum grânulo não corado nos hialinócitos ou vacúolos irregulares azulados (basófilos) nas células vesiculares. Projeções citoplasmáticas e lamelipódios (setas finas), ectoplasma (\*) e o núcleo (ponta de seta). Barra = 20  $\mu$ m para todas as imagens.

#### 4.2 Caracterização morfológica dos hemócitos de *Crassostrea gasar* por citometria de fluxo

Cinco tipos de hemócitos foram detectados nos citogramas FSC vs SSC das amostras de hemolinfa fixada de *C. gasar* (**Fig. 5**). O tipo 1 foi o hemócito com menor tamanho e complexidade interna; o tipo 2 foi maior e com maior granularidade que o tipo 1, mas menor que o tipo 3. O tipo 3 eram hemócitos com tamanho e complexidade médios

e variáveis; os tipos 4 e 5 eram hemócitos de alta complexidade e tamanhos variáveis. Comparando esses tipos celulares com hemócitos identificados nas monocamadas, sugerimos que eles corresponderiam aos tipos B, Hp, Hg, Gp e Gg respectivamente (**Tabela 2**).

**Figura 5** - Citograma representativo das células da hemolinfa de *Crassostrea gasar*.



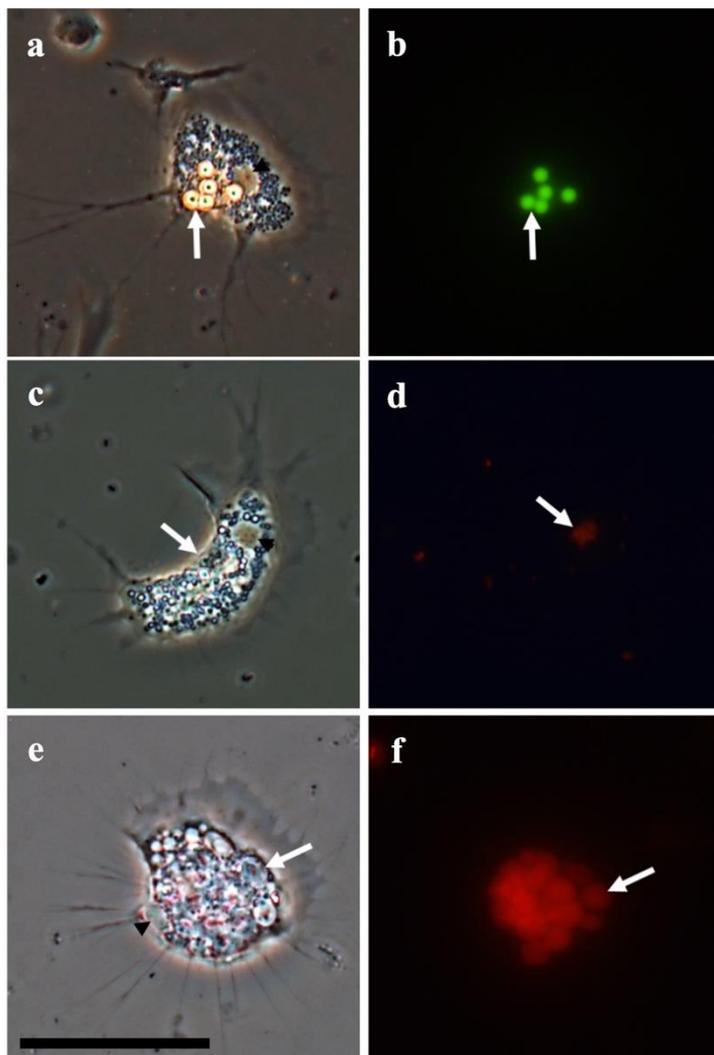
Células tipo-blásticas (B), hialinócitos pequenos (Hp), hialinócitos grandes (Hg), granulócitos pequenos (Gp), granulócitos grandes (Gg); os hemócitos vesiculares (V) estão dentro da população de Hg.

Os hialinócitos, incluindo os pequenos e grandes formaram a população mais numerosa da hemolinfa, em contraste os granulócitos pequenos eram escassos. Esses resultados foram semelhantes as análises de microscopia de luz (**Tabela 2**).

#### 4.3 Fagocitose de diferentes partículas fluorescentes

Os hemócitos de *C. gasar* foram capazes de englobar três tipos distintos de partículas, esferas de látex inertes (**Figs. 6a-b**) e as partículas biológicas, *E. coli* (**Figs. 6c-d**) e zymosan A (**Figs. 6e-f**).

**Figura 6** - Fagocitose de partículas por hemócitos de *Crassostrea gasar*.



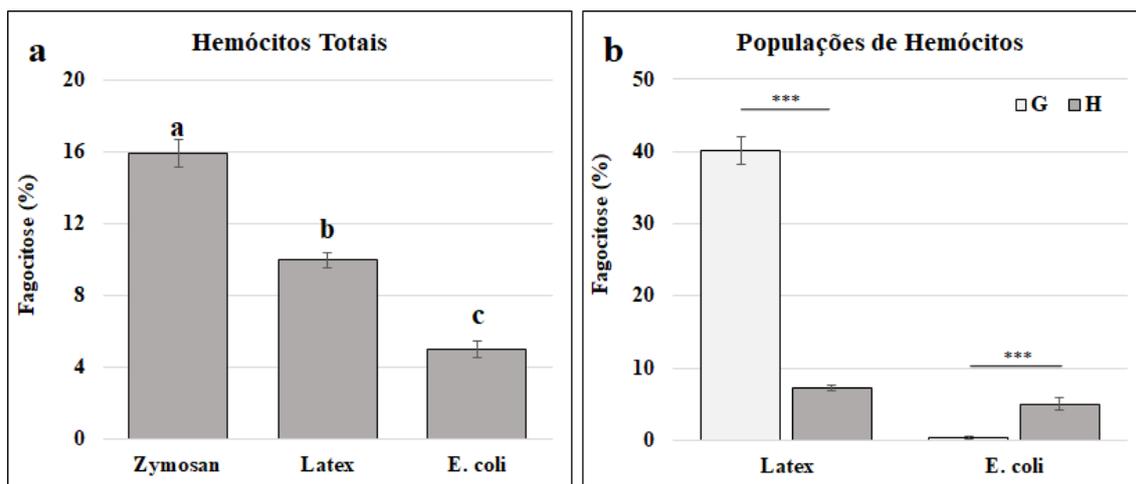
Imagens de microscopia de contraste de fase (esquerda) e fluorescência (direita). **a-b.** Partículas de látex (fluorescência verde); **c-d.** *E. coli* (fluorescência vermelha). **e-f.** Zymosan A (fluorescência vermelha). Note as partículas no citoplasma dos hemócitos (setas) e o pequeno tamanho de *E. coli* comparado as partículas de zimosan A e látex. Núcleo (ponta de seta). Barra = 20  $\mu\text{m}$

Os hemócitos mostraram diferentes habilidades para fagocitar as partículas oferecidas. Zymosan A foi a partícula mais fagocitada (ANOVA *One-way*,  $P < 0,0001$ ), seguida por esferas de látex e *E. coli* (**Fig. 7a**).

No caso das partículas de látex e *E. coli*, a fagocitose foi analisada para populações separadas, granulócitos versus hialinócitos, mas esta análise não foi realizada para

partículas de zimosan provavelmente devido às formas irregulares. Para partículas de látex, os granulócitos foram significativamente (teste t,  $p < 0,0001$ ) mais fagocíticos do que os hialinócitos. Em contraste, os hialinócitos fagocitaram mais *E. coli* do que os granulócitos (**Fig. 7b**).

**Figura 7** - Taxa de fagocitose de diferentes partículas por hemócitos de *Crassostrea gasar*.



**a.** População total de hemócitos. Letras diferentes denotam diferenças significativas (ANOVA *One-way*,  $P < 0,0001$ , teste post-hoc de Tukey). **b.** Subpopulações de hemócitos: granulócitos (G) e hialinócitos (H). \*\*\* Diferenças significativas (teste t,  $P < 0,0001$ ).  $n = 30$  ostras.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho é a primeira caracterização morfológica e funcional dos hemócitos da hemolinfa da ostra *C. gasar*. Com base na microscopia de luz e na citometria de fluxo, cinco populações de hemócitos foram identificadas: granulócitos grandes e pequenos, hialinócitos grandes e pequenos e células tipo-blásticas, além de uma população não identificada denominada hemócitos vesiculares.

Analisando diversos estudos em bivalves, incluindo mexilhões (DONAGHY; VOLETY, A. K., 2011; PARRINO *et al.*, 2019; ROLTON; RAGG, 2020), amêijoas (DONAGHY; LAMBERT; *et al.*, 2009; ZENG; HUO; YANG, H., 2021) e ostras (ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX; FORD, 2002; ANDREYEVA, A.Y. *et al.*, 2020; DANG, Cécile *et al.*, 2012; DONAGHY; KIM, B.-K.; *et al.*, 2009; HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a; HONG, H.-K.; DONAGHY; CHOI, K.-S., 2014; LI, J. *et al.*, 2018; ROLTON *et al.*, 2020; XUE; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, 2001), pode-se facilmente reconhecer que existem diferenças nas populações de hemócitos entre as espécies de bivalves, mas também semelhanças que levam a um entendimento comum de que três tipos principais de hemócitos estão sempre presentes na hemolinfa e são facilmente distinguíveis nos citogramas, bem como nas preparações para microscopia de luz (granulócitos, hialinócitos e células tipo-blásticas). Isso também foi observado em um estudo recente no Brasil com a ostra *C. rhizophorae* (REBELO *et al.*, 2013) e em nosso primeiro estudo na ostra *C. gasar* (QUEIROGA *et al.*, 2013). No entanto, naquele estudo não tínhamos o objetivo de caracterizar os tipos de hemócitos da ostra *C. gasar*, somente avaliar a resposta frente a infecção *Perkinsus* spp.

No presente trabalho detectamos seis tipos de hemócitos na hemolinfa de *C. gasar*, embora os granulócitos pequenos nem sempre (em todos os animais) foram observados. Este fato foi descrito anteriormente em estudos nas ostras *C. virginica* (ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX; FORD, 2002), *O. edulis* (XUE; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, 2001) e *S. glomerata* (ALADAILEH *et al.*, 2007), quando os estudos foram baseados em um número pequeno de espécimes; três, oito e cinco, respectivamente.

Assim, as diferenças nos tipos de hemócitos entre as espécies de bivalves detectadas por citometria de fluxo podem estar relacionadas à preparação da amostra. (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a) chamaram a atenção para este fato quando notaram que hialinócitos pequenos e grandes apareciam como uma população única em

amostras frescas em vez de duas populações na hemolinfa da ostra *C. virginica* fixada com formaldeído. Isso também aconteceu no presente estudo para hialinócitos grandes e pequenos e hemócitos vesiculares que muitas vezes eram indistinguíveis em amostras fixadas em formaldeído e totalmente sobrepostos em amostras frescas usadas para ensaios de fagocitose por citometria de fluxo. De fato, células vivas sofrem alterações morfológicas para desempenhar suas funções ou responder a sinais dificultando a distinção entre populações com diferenças morfológicas sutis.

Os hialinócitos constituíram a população mais abundante da hemolinfa de *C. gasar*, enquanto as populações de granulócitos (pequenos e grandes juntos) ocorreram em proporção semelhante à das células tipo-blásticas. Essa observação foi coincidente em citometria de fluxo e microscopia de luz e reflete o que ocorre para muitas espécies de ostras *Crassostrea* spp. (Allam et al., 2002; Chang et al., 2005; Ludovic Donaghy et al., 2009a; H.-K. Hong et al., 2014; Li et al., 2018; Rebelo et al., 2013), *Saccostrea* spp. e *Ostrea* spp. (ALADAILEH et al., 2007; HONG, H. et al., 2013; ROLTON; RAGG, 2020; XUE; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, 2001).

As células tipo-blásticas na hemolinfa da ostra *C. gasar* apresentou características de células imaturas, indica que a população hemocitária da hemolinfa está se renovando (CIMA; MATOZZO, 2018), ainda que os mecanismos de diferenciação celular dos hemócitos ainda sejam desconhecidos.

Hemócitos vesiculares foram descritos na hemolinfa de *C. gigas* como células sem grânulos, mas com vacúolos transparentes (CHANG; TSENG; CHOU, 2005). Foram considerados hemócitos degranulados na hemolinfa de *O. edulis* (AUFFRET, 1989) e granulócitos vacuolados em ostras *S. kegati* (HONG, H. et al., 2013). Hemócitos vesiculares também foram relatados ocorrendo de forma rara na hemolinfa do molusco canivete *Ensis directus* e eles tinham abundantes vesículas ao redor do núcleo (PREZIOSI; BOWDEN, 2016). No presente trabalho, um tipo celular escasso que apresentou características semelhantes às células descritas foi detectado e por isso denominado de célula vesicular. A função dos hemócitos vesiculares ainda é desconhecida. O conteúdo dos vacúolos/vesículas citoplasmáticas, provavelmente de natureza química diferente - devido à forma e às características de coloração - poderia indicar um papel na degradação de materiais. No entanto, isso deve ser investigado.

Os granulócitos de *C. gasar* continham grânulos exclusivamente basófilos, enquanto três tipos de granulócitos (grânulos eosinófilos, basófilos e com os dois tipos de grânulos) foram descritos para ostras *Crassostrea* spp. (CHANG; TSENG; CHOU, 2005;

ITTOOP *et al.*, 2006; REBELO *et al.*, 2013), e *S. glomerata* (ALADAILEH *et al.*, 2007). Além disso, hemócitos com grânulos basofílicos e refringentes também foram descritos em *C. ariakensis* (DONAGHY; KIM, B.-K.; *et al.*, 2009).

Os hemócitos desempenham inúmeras funções fisiológicas e imunológicas, portanto, monitorá-los pode representar uma aproximação da saúde animal. Mudanças nas contagens totais de hemócitos e na proporção de tipos de hemócitos têm sido usadas para esse fim. Esses parâmetros variam sazonalmente (DONAGHY; LAMBERT; *et al.*, 2009) em resposta a infecção (CHOI, H. J. *et al.*, 2011; QUEIROGA *et al.*, 2013; SILVA, P. DA *et al.*, 2008), à suscetibilidade à doenças (COMESAÑA *et al.*, 2012) e em resposta a diferentes condições ambientais (ANDREYEVA, A.Y. *et al.*, 2020; LASSUDRIE *et al.*, 2020; LI, S. *et al.*, 2015; RENAULT, T, 2015; XIE, Z. *et al.*, 2021). Assim, o conhecimento dos tipos de hemócitos de *C. gasar* será útil para entender o impacto de infecções, bem como a influência das condições ambientais nos locais onde esta ostra é cultivada.

No presente estudo também investigamos a capacidade fagocítica dos hemócitos de *C. gasar* usando diferentes partículas. A fagocitose é a principal resposta de defesa celular desencadeada por parasitas de pequeno porte e pode ser inibida ou potencializada por um agente infeccioso (ALLAM, Bassem; RAFTOS, D., 2015; SOUDANT *et al.*, 2013) como demonstrado em *C. gasar* infectada por *Perkinsus* sp. (QUEIROGA *et al.*, 2013) e em *Anadara trapezia* infectada por trematódeos (DANG, Cécile; *et al.*, 2013).

No presente estudo, independentemente do tipo de hemócito, partículas de zimosan e látex foram as partículas mais fagocitadas quando comparadas à bactéria *E. coli*. Isto demonstra que os hemócitos de *C. gasar* são capazes de reconhecer moléculas não próprias, como fungos e bactérias, além de partículas inertes (como o látex) e por outro lado, que uma partícula biológica (zymosan) foi mais engolfada do que a partícula inerte. Este resultado difere de outros estudos, onde os hemócitos engolfaram mais ou semelhantes quantidades de partículas de látex que de zimosan, como no mexilhão *M. galloprovincialis* (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2008), ou no caso do molusco *R. decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2012). Em ambos os estudos, a *E. coli* foi a partícula menos fagocitada entre as partículas testadas (zymosan, látex e *Vibrio alginolyticus* ou *V. splendidus*). A menor fagocitose das partículas de *E. coli* pelos hemócitos pode estar relacionada à sua não patogenicidade aos bivalves. De fato, um estudo em hemócitos de *C. gigas* descobriu que o reconhecimento e a fagocitose diferem de acordo com a espécie de *Vibrio* (ZHANG, T. *et al.*, 2014). Além disso, os autores observaram que o *V.*

*splendidus* induziu um aumento específico da fagocitose após um desafio secundário. Ainda, é possível que os hemócitos de *C. gasar* sejam mais eficientes no reconhecimento de componentes fúngicos (como o zymosan) que de outros microorganismos, por isso a maior taxa de fagocitose observada. Sabe-se que a hemolinfa de ostras tem uma ampla capacidade e de reconhecimento de partes de fungos como  $\beta$ 1-3 glicanas (ALLAM, Bassem; RAFTOS, D., 2015; BACHÈRE, Evelyne *et al.*, 2015). Um trabalho recente na ostra *C. gigas* descreve uma nova glicoproteína transmembrana da subfamília das tetraspaninas (CgCD63H) com alta expressão nos hemócitos e que reconhece vários PAMPs, entre eles de fungos (LIU, Conghui *et al.*, 2020). A CgCD63H foi recrutada nos fagossomos contendo a levedura *Yarrowia lipolytica* e os autores sugerem que ela possa funcionar fazendo a ligação entre o reconhecimento e as respostas imunes subsequentes, neste caso, aumento da fagocitose, inclusive sugerem ela como um marcador de células fagocíticas. Foi demonstrado que os granulócitos são os hemócitos mais fagocíticos em bivalves, incluindo os mexilhões (DONAGHY; VOLETY, A. K., 2011; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2008), as amêijoas (DONAGHY; LAMBERT; *et al.*, 2009) e ostras (DANG, Cécile *et al.*, 2012; DONAGHY; KIM, B.-K.; *et al.*, 2009; HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003b; HONG, H.-K.; DONAGHY; CHOI, K.-S., 2014), o que também foi confirmado aqui. Além disso, curiosamente, no presente estudo, as populações de hemócitos mostraram uma capacidade fagocitária diferente de acordo com o tipo de partícula. Os hialinócitos fagocitaram mais *E. coli* do que látex em contraste com os granulócitos, o que pode estar relacionado a uma função diferente dos hialinócitos e deve ser mais investigado no futuro.

## 6 CONCLUSÕES

- A ostra *C. gasar* apresenta dois tipos básicos de hemócitos circulantes na hemolinfa, os granulócitos e os hialinócitos e, essencialmente, como em outras espécies de ostras, os granulócitos e os hialinócitos apresentam subtipos.
- A ostra *C. gasar* apresentou um tipo raro, mas já descrito em outros bivalves, o hemócito vesicular.
- A citometria de fluxo e a microscopia de luz trouxeram clareza e segurança para a classificação dos tipos de hemócitos da ostra *C. gasar* pois tanto os resultados morfológicos quanto os quantitativos obtidos com estas duas técnicas foram semelhantes.
- Tanto os granulócitos como os hialinócitos da ostra *C. gasar* são hábeis em defender a ostra de organismos invasores pelo mecanismo de fagocitose, ainda que de forma diferente.
- A presença de células tipo-blásticas na hemolinfa da ostra *C. gasar* com características de células imaturas, pode indicar que a população hemocitária da hemolinfa está se renovando, ainda que os mecanismos de diferenciação celular dos hemócitos ainda sejam desconhecidos.

## REFERÊNCIAS

ABABOUC, L. *et al.* **Value chains and market access for aquaculture products.** [S.l.]: [s.n.], 2021.

ABCC. As Cadeias Produtivas: Carcinicultura e Aquicultura, confiantes no crescimento setorial, estarão presentes. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC)**, 2021. p. 72.

ALADAILEH, S. *et al.* Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. **Journal of Invertebrate Pathology**, set. 2007. v. 96, n. 1, p. 48–63.

ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX, K. A.; FORD, S. E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, ago. 2002. v. 13, n. 2, p. 141–158.

ALLAM, Bassem; ESPINOSA, E. P. Mucosal immunity in mollusks. **Mucosal Health in Aquaculture.** [S.l.]: Elsevier, 2015, p. 325–370.

\_\_\_\_\_; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of Invertebrate Pathology**, out. 2015. v. 131, p. 121–136.

ANDRADE, G. J. P. O. DE. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, 23 dez. 2016. v. 13, n. 24, p. 204.

ANDREYEVA, A.Y. *et al.* Functional Characterization of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), Hemocytes Under Normoxia and Short-Term Hypoxia. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 28 dez. 2020. v. 21, n. 03, p. 125–133.

\_\_\_\_\_; EFREMOVA, E. S.; KUKHAREVA, T.A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters. **Fish & Shellfish Immunology**, jun. 2019. v. 89, n. April, p. 361–367.

ANDREYEVA, Alexandra Y. Morphological and Functional Characterization of Hemocytes of the Black Sea Bivalves: Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and Mussel (*Mytilus galloprovincialis*). **Journal of Siberian Federal University. Biology**, jun. 2021. v. 14, n. 2, p. 182–194.

AUFFRET, M. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Journal of Shellfish Research**, 1989. v. 8, n. 2, p. 367–373.

BACHÈRE, E. *et al.* Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. **Aquaculture**, abr. 1995. v. 132, n. 1–2, p. 17–32.

BACHÈRE, Evelyne *et al.* The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish & Shellfish Immunology**, set. 2015. v. 46, n. 1, p. 50–64.

BARRACCO, M.; MEDEIROS, I.; MOREIRA, F. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. **Fish & Shellfish Immunology**, jul. 1999. v. 9, n. 5, p. 387–404.

\_\_\_\_\_; SILVA, P. DA. Hemolinfa e sistema imune. **O Mexilhão Perna perna**, 2008. p. 85–103.

BARTH, T.; MORAES, N.; BARRACCO, Margherita Anna. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. **Aquatic Living Resources**, 15 abr. 2005. v. 18, n. 2, p. 179–186.

CAVALLI, L. S. *et al.* Major Sustainable Development Goals applied to Aquaculture. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, jul. 2021. v. 27, n. 1, p. 110–126.

CHANG, S.; TSENG, S.; CHOU, H. Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: A comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). [S.l.]: 2005. V. 44, p. 144–153.

CHENG, T. C. Hemocytes: forms and functions. *In*: KENNEDY, V.S.; NEWELL, R.I.E.; EBLE, A.F.(Org.). **The Eastern Oyster: Crassostrea virginica**. College Park, MD, USA: Maryland Sea Grant, 1996, p. 299–333.

CHOI, H. J. *et al.* Non-specific Defensive Factors of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* against Infection with *Marteilioides chungmuensis*: A Flow-Cytometric Study. **The Korean Journal of Parasitology**, 2011. v. 49, n. 3, p. 229.

CIMA, F.; MATOZZO, V. Proliferation and differentiation of circulating haemocytes of *Ruditapes philippinarum* as a response to bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, out. 2018. v. 81, n. June, p. 73–82.

COMESAÑA, P. *et al.* Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster

*Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**, mar. 2012. v. 109, n. 3, p. 274–286.

DANG, Cécile; *et al.* Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia*. **Fish & Shellfish Immunology**, set. 2013. v. 35, n. 3, p. 951–956.

DANG, Cécile *et al.* Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish & Shellfish Immunology**, jul. 2012. v. 33, n. 1, p. 138–142.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease: Table 1. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 26 maio. 2016. v. 371, n. 1695, p. 20150300.

DONAGHY, L.; KIM, B.-K.; *et al.* Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, ago. 2009. v. 27, n. 2, p. 296–301.

\_\_\_\_\_; LAMBERT, C.; *et al.* Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. **Aquaculture**, dez. 2009. v. 297, n. 1–4, p. 10–24.

\_\_\_\_\_ *et al.* Assessment of the fitness of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* two years after the Hebei Spirit oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, dez. 2016. v. 113, n. 1–2, p. 324–331.

\_\_\_\_\_; VOLETY, A. K. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *In vitro* impacts of temperature. **Fish & Shellfish Immunology**, jul. 2011. v. 31, n. 6, p. 808–814.

DYACHUK, V. A. Hematopoiesis in Bivalvia larvae: Cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia. **Developmental & Comparative Immunology**, dez. 2016. v. 65, p. 253–257.

ESTRADA, N. *et al.* Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. **Immunobiology**, ago. 2013. v. 218, n. 8, p. 1093–1103.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action**. Rome, Italy: FAO, 2020.

FISHER, W. S. Structure and Functions of Oyster Hemocytes. [S.l.]: [s.n.], 1986, p. 25–35.

FONSECA, V. B. *et al.* Morphological characterization of hemocytes of the brown mussel *Perna perna*: An update. **Fish & Shellfish Immunology**, jan. 2022. v. 120,

n. November 2021, p. 139–141.

FOURNIER, M. *et al.* Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. **American Zoologist**, 2000. v. 40, p. 412–420.

GALLARDI, D. Effects of Bivalve Aquaculture on the Environment and Their Possible Mitigation: A Review. **Fisheries and Aquaculture Journal**, 2014. v. 05, n. 03.

GARCÍA-GARCÍA, E. *et al.* Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. **Developmental and comparative immunology**, jan. 2008. v. 32, n. 6, p. 637–53.

GIEHL, A. L. *et al.* Números da agropecuária catarinense - 2020. **Documentos**, 2020. n. 313 SE-, p. 67.

GOMES, C. *et al.* The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**, nov. 2014. v. 74, n. 4, p. 967–976.

GONZÁLEZ, M.; ARENAS, G. Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). **Ciencias Marinas**, 6 mar. 2002. v. 28, n. 3, p. 247–255.

GUO, X. *et al.* Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. **Fish & Shellfish Immunology**, set. 2015. v. 46, n. 1, p. 107–119.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. I. Haemocyte types and morphology. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, set. 2003a. v. 293, n. 2, p. 237–248.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, set. 2003b. v. 293, n. 2, p. 249–265.

HINE, P. M. The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, 1999. v. 9, n. 5, p. 367–385.

HONG, H.-K.; DONAGHY, L.; CHOI, K.-S. Flow cytometric studies on the morphology and immunological functions of hemocytes in the Iwagaki oyster *Crassostrea nippona*. **Fisheries Science**, 11 set. 2014. v. 80, n. 5, p. 969–976.

HONG, H. *et al.* Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpicta* (Pilsbry, 1904), and *Hytotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: Morphology and functional

aspects. **Fish & Shellfish Immunology**, dez. 2013. v. 35, n. 6, p. 2020–2025.

HORODESKY, A. *et al.* Effects of salinity on the survival and histology of oysters *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757). **Bioscience Journal**, 2019. v. 35, n. 2, p. 586–597.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal: Tabela 3940 - Produção da aquicultura. 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>>.

ITTOOP, G. *et al.* Characterization of haemocytes of the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). **Aquaculture Research**, dez. 2006. v. 37, n. 16, p. 1636–1643.

JEMAA, M. *et al.* Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. **Journal of Experimental Biology**, 2014. v. 217, n. 17, p. 3067–3077.

KENNEDY, Victor S.; NEWELL, Roger I. E.; EBLE, Albert F. **The eastern oyster: *Crassostrea virginica***. [S.l.]: College Park, MD : Maryland Sea Grant College, ©1996, 1996.

KIM, J.-H. *et al.* Flow cytometric characterization of the hemocytes of blood cockles *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867), *Anadara kagoshimensis* (Lischke, 1869), and *Tegillarca granosa* (Linnaeus, 1758) as a biomarker for coastal environmental monitorin. **Marine Pollution Bulletin**, nov. 2020. v. 160, n. August, p. 111654.

KLADCHENKO, E.S. *et al.* Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, mar. 2020. v. 98, n. August, p. 1030–1032.

LAPÈGUE, S. *et al.* Trans-atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, 2002. v. 202, n. 3, p. 232–242.

LASSUDRIE, M. *et al.* Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases: A review. **Developmental & Comparative Immunology**, jul. 2020. v. 108, n. March, p. 103660.

LAU, Y.-T. *et al.* Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Fish & Shellfish Immunology**, dez. 2017. v. 71, n. May, p. 372–379.

LEGAT, J. F. A. *et al.* Effects of salinity on fertilization and larviculture of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* in the laboratory. **Aquaculture**, fev. 2017. v. 468, p. 545–548.

\_\_\_\_\_ *et al.* Reproductive cycle of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), in tropical and temperate climates. **Aquaculture Research**, mar. 2021.

v. 52, n. 3, p. 991–1000.

LI, J. *et al.* The first morphologic and functional characterization of hemocytes in Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, out. 2018. v. 81, n. June, p. 423–429.

LI, S. *et al.* Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming. **Fish & Shellfish Immunology**, jul. 2015. v. 45, n. 1, p. 194–202.

LI, Y. *et al.* The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental & Comparative Immunology**, jun. 2017. v. 71, n. April 2018, p. 59–69.

LIU, Conghui *et al.* A CD63 Homolog Specially Recruited to the Fungi-Contained Phagosomes Is Involved in the Cellular Immune Response of Oyster *Crassostrea gigas*. **Frontiers in Immunology**, 22 jul. 2020. v. 11, n. July, p. 1–12.

LOPES, G. R. *et al.* Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, ago. 2013. v. 48, n. 8, p. 975–982.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. **Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture**. [S.l.]: CRC Press, 2018, p. 125–134.

OLIVERA, A. *et al.* Oyster culture in the state of Pernambuco, Brazil: perspectives and barriers. **World Aquaculture**, 2006. v. 37, n. 1, p. 13–15.

PAIXÃO, L. *et al.* Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture**, 2013. v. 380–383, p. 6–12.

PARRINO, V. *et al.* Flow cytometry and micro-Raman spectroscopy: Identification of hemocyte populations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Faro Lake and Tyrrhenian Sea (Sicily, Italy). **Fish & Shellfish Immunology**, abr. 2019. v. 87, n. September 2018, p. 1–8.

PEIXE BR. Anuário 2022. Peixe BR da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2022.

PILA, E. A. *et al.* Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. **Developmental & Comparative Immunology**, maio. 2016. v. 58, p. 119–128.

PORTELLA, C. De G. Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliiana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial. **Unesp**, 2005. p. 66.

PRADO-ALVAREZ, M. *et al.* Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. **Fish & Shellfish Immunology**, jan. 2012. v. 32, n. 1, p. 69–78.

PREZIOSI, B. M.; BOWDEN, T. J. Morphological characterization via light and electron microscopy of Atlantic jackknife clam (*E directus*) hemocytes. **Micron**, maio. 2016. v. 84, p. 96–106.

QUEIROGA, F. R. *et al.* Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & Shellfish Immunology**, ago. 2013. v. 35, n. 2, p. 319–327.

RAMOS, C. D. O. *et al.* Maturation of the Mangrove Oyster *Crassostrea gasar* at Different Temperatures in the Laboratory. **Journal of Shellfish Research**, abr. 2014. v. 33, n. 1, p. 187–194.

REBELO, M. De F. *et al.* New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. **PLoS ONE**, 25 fev. 2013. v. 8, n. 2, p. e57384.

RENAULT, T. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. **Fish & Shellfish Immunology**, set. 2015. v. 46, n. 1, p. 88–93.

ROLTON, A. *et al.* Flow cytometric characterization of hemocytes of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, fev. 2020. v. 97, n. December 2019, p. 411–420.

\_\_\_\_\_; RAGG, N. L. C. Green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) hemocytes: A flow cytometric study of sampling effects, sub-populations and immune-related functions. **Fish & Shellfish Immunology**, ago. 2020. v. 103, n. May, p. 181–189.

SCARDUA, M. P. *et al.* Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, nov. 2017. v. 26, n. 4, p. 401–410.

SCHLEDER, D. D. *et al.* Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, ago. 2008. v. 280, n. 1–4, p. 256–263.

SEAFISH. **Oysters**.

SEAFISH. Oysters. 2022. Disponível em: <<https://www.seafish.org/responsible->

sourcing/aquaculture-farming-seafood/species-farmed-in-aquaculture/aquaculture-profiles/oysters/sources-quantities-and-cultivation-methods/>. Acesso em: 11 jan. 2022.

SILVA, P. DA *et al.* Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. **Fish & Shellfish Immunology**, maio. 2008. v. 24, n. 5, p. 551–563.

SONG, L. *et al.* Bivalve Immunity. In: SÖDERHÄLL, K. (Org.). **Invertebrate Immunity**. USA, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC. Landes Bioscience, 2010, p. 44–65.

SOUDANT, P. *et al.* Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, out. 2013. v. 114, n. 2, p. 196–216.

TAHIM, E. F.; DAMACENO, M. N.; ARAÚJO, I. F. Trajetória tecnológica e sustentabilidade ambiental na cadeia de produção da carcinicultura no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 2019. v. 57, n. 1, p. 94–107.

TROELL, M. *et al.* Does aquaculture add resilience to the global food system? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014. v. 111, n. 37, p. 13257–13263.

VALENTI, W. C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, mar. 2021. v. 19, n. January, p. 100611.

VIEIRA, G. C. *et al.* Morphological and functional characterization of the hemocytes from the pearl oyster *Pteria hirundo* and their immune responses against *Vibrio* infections. **Fish & Shellfish Immunology**, nov. 2017. v. 70, p. 750–758.

WORMS. *Crassostrea gasar* (Deshayes, 1830). 2022. Disponível em: <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=532678>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

XIE, Z. *et al.* Hemocyte Responses of the Oyster *Crassostrea hongkongensis* Exposed to Diel-Cycling Hypoxia and Salinity Change. **Frontiers in Marine Science**, 16 set. 2021. v. 8, n. September, p. 1–17.

XING, J.; ZHAN, W.-B.; ZHOU, L. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop (*Chlamys farreri*). **Fish & Shellfish Immunology**, out. 2002. v. 13, n. 4, p. 271–278.

XUE, Q.-G.; RENAULT, Tristan; CHILMONCZYK, S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*,

haemolymph. **Fish & Shellfish Immunology**, out. 2001. v. 11, n. 7, p. 557–567.

ZANNELLA, C. *et al.* Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense. **Marine Drugs**, 17 jun. 2017. v. 15, n. 6, p. 182.

ZENG, Y.; HUO, Y.; YANG, H. Immunological assays of hemocytes in the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria*. **Fish & Shellfish Immunology**, nov. 2021. v. 118, n. June, p. 261–269.

ZHANG, T. *et al.* The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental & Comparative Immunology**, jul. 2014. v. 45, n. 1, p. 141–150.

ZHANG, W.; WU, X.; WANG, Ming. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. **Aquaculture**, jan. 2006. v. 251, n. 1, p. 19–32.