

ANDREA CHRISTIANNE GOMES BARRETTO

**CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES
MARINHOS *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

**RECIFE
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

ANDREA CHRISTIANNE GOMES BARRETTO

**CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES
MARINHOS *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes

**RECIFE
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

B274c Barretto, Andréa Christianne Gomes
Contagem total de hemócitos de camarões marinho *Citopenaeus vannamei* (Boone, 1931) no litoral Norte de Pernambuco – Brasil / Andréa Christianna Gomes Barretto. -- 2009.
52 f. : il.

Orientador : Emiko Shinozaki Mendes
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 614.44

1. *Litopenaeus vannamei*
2. Camarão
3. Sanidade
4. Hemolinfa
5. Pernambuco (BR)
 - I. Mendes, Emiko Shinozaki
 - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES
MARINHOS *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

Dissertação de Mestrado elaborada por

ANDREA CHRISTIANNE GOMES BARRETTO

Aprovada em...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dout^a EMIKO SHINOZAKI MENDES
Orientador- Departamento de Medicina Veterinária

Prof Dr. PAULO DE PAULA MENDES
Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^a Dout^a ENEIDA WILCOX RÊGO
Departamento de Medicina Veterinária

Prof Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS
Departamento de Medicina Veterinária

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de realizar mais uma importante etapa da minha vida.

- A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pelos ensinamentos na área;

- A CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudo e a FINEP pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa, através do projeto RECARCINE;

- Ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, na pessoa da Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pelo uso de suas instalações para a realização da parte experimental deste trabalho;

- Aos professores Dra. Emiko Shinozaki Mendes e Dr. Paulo de Paula Mendes, pela orientação e co-orientação, respectivamente, no presente trabalho e pela paciência e atenção que nos dispensou durante todo o período do curso sempre incentivando e acreditando no nosso potencial;

- A professora Dra. Eneida Wilcox do Rêgo, pela co-orientação no presente trabalho;

- Ao professor Dr. Fernando Leandro dos Santos, pelo auxílio, total disposição e solidariedade nesta etapa final;

- A doutora em medicina veterinária Lilian Maria Nery de Barros Góes pela dedicação, apoio e incondicional ajuda para realização deste experimento;

- As Médicas Veterinárias Joanna Dourado, Fernanda Meirelhes e Dulcilene Lacerda Nascimento, pela participação ativa em todas as fases da pesquisa, desde a realização das análises até a conclusão do trabalho escrito;

- A Maricultura Santa Cruz Ltda, na pessoa do proprietário Sr. Rafael Reis Petribu, por toda a infraestrutura da referida carcinicultura disponibilizada, assim como pelo camarões cedidos para esta pesquisa;

- Ao engenheiro de pesca Cezar Augusto Pinzon Vargas e o técnico em aquicultura Josenilson Miranda pela colaboração e auxílio na realização das análises;

- Aos funcionários da Maricultura Santa Cruz, Manoel Alves da Silva e Josenildo José da Silva, pelo colaboração e auxílio na realização dos exame a fresco;

- A todos os estudantes e profissionais que trabalham no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) Bruno Nascimento, Danilo Mendes, Héliida, Rejane, Eduardo, Victor, Verônica, Virgínia, Ângela;

- As funcionárias da UFRPE Cleide e Márcia, pelo auxílio na lavagem e descontaminação de materiais;

- Ao mais novo amigo, médico veterinário Msc. Sérgio Alcantara, por todo apoio concedido.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	08
Lista de figuras.....	09
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	18
5. ARTIGO CIENTÍFICO I.....	22
6. ARTIGO CIENTIFICO II.....	34

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 1 Quadro clínico dos camarões e respectivas contagens de Artigo II hemócitos.....	40
TABELA 2 Contagem total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos em Artigo II hemolinfa de camarões.....	41

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
FIGURA 1	Relação entre a contagem total de hemócitos, peso dos camarões machos.....	27
Artigo I		
FIGURA 2	Relação entre a contagem total de hemócitos, tempo de cultivo das fêmeas.....	28
Artigo I		

RESUMO

O estudo das células sanguíneas, também chamado como hematologia, vem se tornando para a aquicultura um precioso instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas que ocorrem nos organismos, no entanto na carcinicultura, ainda há muito que se desvendar a respeito da hemolinfa. Diante do exposto objetivou-se com este trabalho: avaliar a eficácia do anticoagulante citrato de sódio (10%) nas análises hematológicas, verificar a influência da refrigeração sobre a contagem total de hemócitos (CTH), correlacionar os dados hematológicos com a presença de vibrio na hemolinfa, identificar a influencia da idade e da sazonalidade na contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei*. Foram capturados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* provenientes de dois viveiros de terra (A e B) da Maricultura Santa Cruz, situada no município de Goiana- PE. As coletas se deram semanalmente, durante dois ciclos de cultivo (período seco e período chuvoso). Procedeu-se o exame a fresco (macro e microscópico) em todos os animais amostrados. As contagens totais de hemócitos (células/mm³) foram realizadas imediatamente após a coleta e depois de cinco horas após a refrigeração, em câmara de Neubauer. Imediatamente após a realização das contagens, as amostras destinadas para as análises bacteriológicas foram transportadas, em temperatura ambiente, para o laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os dados referentes a influencia da refrigeração sobre os hemócitos foram analisados utilizando-se as técnicas de modelagens matemáticas ($P < 0,05$), no entanto os dados referentes às análises bacteriológicas, alterações no exame a fresco e CTH, os camarões foram distribuídos em quatro grupos: camarões com lesão e com bactéria (CLCB), com lesão e sem bactéria (CLSB), sem lesão e com bactéria (SLCB) e sem lesão e sem bactéria (SLSB). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de Tukey, para comparação entre as médias, adotando-se o nível de significância de 5%. Ao término da pesquisa concluímos que o anticoagulante citrato de sódio somente preserva adequadamente a hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* para a CTH realizada imediatamente após a coleta, e que a CTH não está associada com a presença de *Vibrio* spp e com lesões detectadas no exame a fresco, e portanto, não é uma boa ferramenta para a constatação imediata de alterações na saúde dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, camarão, sanidade, hemolinfa.

ABSTRACTS

The study of blood cells, also known as hematology, has become for aquaculture a valuable tool in understanding the physiological changes that occur in organisms, however the shrimp, there is still much to discover about if the hemolymph. Considering the above objective of this work: to evaluate the effectiveness of the anticoagulant sodium citrate (10%) in blood tests, to check the influence of cooling on the total count of hemocytes (CTH), haematological data correlate with the presence of *Vibrio* in the hemolymph, to identify the influence of age and seasonality in the total count of haemocytes in shrimp *Litopenaeus vannamei*. The species were caught shrimp *Litopenaeus vannamei* from two nurseries of land (A and B) of mariculture Santa Cruz, located in the city of Goiana-PE. The collections are made weekly, for two cycles of cultivation (dry season and rainy season). It is the examination fresh (macro and microscopic) in all animals sampled. The total counts of hemocytes (cells/mm³) were performed immediately after collection and after five hours of chilling in a Neubauer chamber. Immediately after the counting, the samples intended for bacteriological analysis were transported in temperature to the laboratory of health of aquatic animals (LASAQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco. The data concerning the influence of cooling on the hemocytes were analyzed using the techniques of mathematical modeling ($P < 0.05$), however the data for the bacteriological analysis, examining changes in the fresh and CTH, the shrimps were divided into four groups: cameroon with injury and with bacteria (CLCB), with injury and without bacteria (CLSB) without injury and with bacteria (SLCB) and without injury and without bacteria (SLSB). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and when significant, the Tukey test for comparison between means, is adopting a significance level of 5%. At the end of the research concluded that the anticoagulant sodium citrate only adequately preserves the hemolymph of the shrimp *Litopenaeus vannamei* to CTH performed immediately after collection, and the CTH is not associated with the presence of *Vibrio* spp and examination with lesions detected in the fresh and therefore not a good tool for immediate recognition of changes in the health of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, shrimp, health, haemolymph.

1. Introdução

O estudo das células sanguíneas, também chamado como hematologia, vem se tornando para a aquicultura um precioso instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas que ocorrem nos organismos cultivados, causadas, principalmente por fatores internos como sexo, estágio de maturação gonadal, idade, modo de vida e pelas alterações de fatores de água. No entanto, salientaram que conhecimentos básicos nessa área ainda são escassos, o que dificulta maiores discussões sobre o tema. (RAZINE-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Na carcinicultura, ainda há muito que se desvendar a respeito da hemolinfa dos camarões. Muitos estudos têm sido realizados visando determinar os diferentes tipos celulares e suas respectivas funções. Todavia, informações importantes como os valores normais da contagem total de hemócitos (CTH) em diferentes fases do desenvolvimento para a espécie *Litopenaeus vannamei* e a existência de variações no comportamento dos hemócitos de indivíduos machos e fêmeas, bem como sua relação com alterações físicas e microbiológicas ainda são desconhecidas.

A construção de uma escala para CTH do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e a identificação dos valores normais, juntamente com os achados bacteriológicos correlacionados a uma série temporal, auxiliarão no diagnóstico precoce de alterações sistêmicas dos camarões, assim como, possibilitarão maior monitoramento e controle da higidez dos animais em cultivo. Desta forma, a biossegurança dos cultivos terá uma nova e segura ferramenta contra as doenças infecto-contagiosas que, atualmente, preocupam e ameaçam o crescimento da atividade.

2. Objetivos

2.1 Geral

Estabelecer a contagem total de hemócitos como ferramenta de avaliação da higidez do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado.

2.2 Específicos

- Avaliar a eficácia do anticoagulante citrato de sódio (10%) nas análises hematológicas.
- Verificar a influencia da refrigeração sobre a contagem total de hemócitos (CTH).
- Correlacionar os dados hematológicos com a presença de vibrio na hemolinfa.
- Identificar a influencia da idade e da sazonalidade na contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei*.

3. Revisão de literatura

3.1 Aqüicultura e o camarão marinho cultivado

A aqüicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresce em todo o mundo, a uma taxa média de 8,8% ao ano desde 1970. Projeções para 2010 indicam que a aqüicultura será responsável por mais de 50% do total de pescado disponível para consumo humano no mundo. (FAO, 2006)

Dentro da aqüicultura, temos como destaque a produção de camarão, conhecida como carcinicultura, que vem se expandindo vertiginosamente nos últimos 50 anos. Atualmente, cerca de 30% dos camarões consumidos no mundo são provenientes do cultivo, e as espécies marinhas mais cultivadas são os peneídeos *Litopenaeus vannamei* (40,66%), *Penaeus monodon* (37,41%) e *Fenneropenaeus chinensis* (10,97%). (FAO, 2007).

O Nordeste brasileiro proporciona condições ideais de cultivo de camarão, pois apresenta pouca variação climática, salinidade e temperatura estáveis, bem como uma grande incidência de luz solar, fatores esses que favorecem o desenvolvimento adequado do camarão em condições de cativeiro. (SALIM, 2002).

O desenvolvimento da carcinicultura tem-se fundamentado no cultivo do camarão branco marinho *Litopenaeus vannamei*, que é pertencente à Família Penaeidae e à Ordem Decapoda, é uma espécie exótica no Brasil e tem como origem a região equatorial e tropical do Pacífico, na costa do continente americano. Esta espécie apresenta uma grande capacidade de adaptação às variáveis ambientais que envolvem o meio de cultivo (pH, salinidade, alimentação) e está entre as cinco espécies de camarão marinho cultivadas no mundo. (NUNES, 2001).

No entanto, o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura em nível mundial consiste atualmente no controle das infecções, isso ocorre devido às altas densidades populacionais, usualmente utilizadas nos cultivos, pois propiciam o alastramento dos agentes infecciosos, resultando em mortalidades maciças e levando a prejuízos incalculáveis. Nesse contexto o estudo do sistema imune de crustáceos desponta como uma estratégia recente e promissora, pois nos permite conhecer tanto a susceptibilidade como a resistência desses animais a microrganismos patogênicos. (BARRACCO, 2004).

Dentre as diversas variáveis encontradas no ambiente de cativeiro, a densidade é tida como um fator estressante relevante e pode promover alterações fisiológicas e

comportamentais importantes para o crescimento e sobrevivência dos camarões. (COMAM et al, 2004).

3.2 A importância do *Vibrio* na carcinicultura

As doenças que acometem os camarões cultivados são de etiologia diversas, podendo ser ocasionadas, tanto por agentes biológicos como por não biológicos (BELL; LIGHTNER, 1987; COUCH, 1978; JOHNSON, 1989).

Dentre as doenças causadas por agentes biológicos, as mais comuns em peneídeos cultivados são as ocasionadas por microrganismos patogênicos oportunistas encontrados na água e sedimentos marinhos, podendo também estar fazendo parte da microbiota intestinal de muitas espécies aquáticas, inclusive camarão (LIGHTNER, 1983). Moss et al. (2000) observaram que os microrganismos do gênero *Vibrio*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* eram predominantes no intestino de camarões, quando cultivados em água de viveiro e em água de poço, não se verificando diferença no número de microrganismos nos camarões cultivados nos dois ambientes.

As bactérias marinhas do gênero *Vibrio* são bons exemplos de oportunistas, uma vez que ocorrem naturalmente em águas, sedimentos e camarões marinhos (SONG e LEE, 1983), algumas espécies como o *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus*, são frequentemente implicadas em doenças de peneídeos (DE LA PEÑA et al., 1992).

Doenças causadas por *Vibrio* spp. têm muita importância para fazendas de camarão ao redor do mundo. São capazes de afetar todos os estádios de vida do camarão e em larvicultura pode significar 100% de perda dos tanques afetados (PEREIRA, 2002).

Segundo Pereira (2002), historicamente, a epidemia de vibrio em camarão de cultivo está associada com fatores adicionais que predisõem o camarão à infecção e a doença. Os principais fatores sugeridos incluem manejo, ferimentos na carapaça, infecções prévias por outros patógenos incluindo vírus, rickettsia, *Fusarium* sp, *Gregarina* spp., danos do tecido intestinal por bloom de algas tóxicas, deficiência de vitamina C, estresse fisiológico químico ou físico (baixos níveis de oxigênio, altas concentrações de amônia, temperaturas elevadas, alta salinidade).

As larvas infectadas apresentam trato digestivo vazio, hepatopâncreas enrugado com nódulos melanizados, ferimentos melanizados nos apêndices ou na superfície do

corpo, concentrações de bastonetes na hemolinfa e colonização abundante da superfície da carapaça.

A vibriose é caracterizada por sinais de desorientação, natação lenta, aglomeração nas margens do viveiro, opacidade da musculatura, coloração avermelhada dos apêndices, flexão do terceiro segmento abdominal, dificuldade de coagulação da hemolinfa.

Bachère (2000) relatou que considerando a importância das doenças de camarão causadas por bactérias, atenção especial deve ser dada ao estudo do mecanismo que envolve o seu reconhecimento principal e aquelas pertinentes ao grupo vibrionáceo. Numa outra vertente, deve-se relevar a possibilidade, também, do envolvimento de agentes virais, mesmo considerando que as doenças, cujo quadro anatomohistopatológico é compatível, como o IHHNV e HPV. Porém, com epidemiologia semelhante, podendo se enquadrar na situação referida ou fazer parte de uma complexa síndrome (BELL e LIGHTNER, 1984; LIGHTNER e REDMAN, 1985; BONAMI et al., 1995; LIGHTNER, 1997).

3.3 Exame clínico dos camarões marinhos

Um recurso de grande valia e largamente empregado são as análises a fresco, que viabilizam a avaliação e o monitoramento da saúde dos camarões, podendo ser realizado tanto a campo quanto num laboratório, conforme de Pereira e Santos (2003).

O exame clínico fundamenta-se na observação visual e *in situ* de exemplares vivos ou moribundos, podendo, depois de se proceder o sacrifício dos animais, ser realizado um estudo mais detalhado, visando a indicação da presença de alterações (GAMEZ, 2001).

Os exames a fresco de amostras ao microscópio, das brânquias, apêndices orais, animais completos, como larvas e pós-larvas, hemolinfa, fragmentos de alguns tecidos e órgãos, são muito úteis para demonstração de algumas enfermidades bacterianas, micóticas e parasitárias (HERZBERG, 1996).

3.4 O sistema Imunológico:

O sistema imunológico dos invertebrados é formado por barreiras físicas (cutícula e epitélio) somadas a defesas celulares. (PINHEIRO E ELLAR, 2006). Esse sistema conta com reações celulares e humorais, tal como ocorre nos vertebrados, essas duas reações estão associadas à hemolinfa ou sangue que é um tecido fluido, composto por uma fração celular, constituída pelos hemócitos, e por uma fração líquida

representada pelo plasma, onde residem os fatores humorais. (vide revisão de SORDERHALL & CERENIUS, 1992).

Os fatores humorais incluem moléculas dissolvidas no plasma, como as lectinas, os fatores de coagulação e as moléculas do sistema pró-fenoloxidase (proPO). Sendo as lectinas proteínas que reconhecem açúcares da superfície celular causando aglutinação ou precipitação, devido essa característica as lectinas são consideradas potenciais análogos dos anticorpos nos vertebrados. (MARQUES E BARRACO, 2000).

Os hemócitos constituem a primeira linha de defesa contra invasores e são cruciais nas reações imunes dos camarões. Estas células são responsáveis principalmente pela fagocitose, encapsulação, formação de nódulos e produção de moléculas tóxicas. Durante uma infecção bacteriana os hemócitos migram para as regiões da infecção fazendo com que o número de hemócitos na circulação caia, essa quantidade é restabelecida ou até aumentada depois do controle da infecção aparentemente pela produção de novos hemócitos pelo sistema hematopoiético. (VAN DE BRAACK et al, 2002).

A classificação das células circulantes do camarão gira em torno de duas terminologias principais: hemócitos hialinos (HHs) e hemócitos granulares (HGs) que ainda podem ser diferenciados em hemócitos com grânulos pequenos e hemócitos com grânulos grandes. (JOHANSSON et al 2000). Supõe-se que os hemócitos hialinos são de linhagens diferentes dos hemócitos granulares e estão envolvidos com reações de coagulação (SORDERHALL e CERENIUS, 1992; GARGIONI e BARRACCO, 1998). Os hemócitos granulares estariam relacionados à formação de nódulos, fagocitose e produção de moléculas tóxicas. (DESTOUMIEUX et al, 2000 e VAN DE BRAACK et al, 2002).

Nos últimos anos ocorreram grandes progressos nos estudos dos hemócitos, devido ao desenvolvimento de várias soluções anticoagulantes específicas e meios de cultivo capazes de estabilizar adequadamente os hemócitos *in vitro*. No entanto, essas soluções são de difícil elaboração, sendo com isso impraticável sua reprodução.

O ciclo de muda dos camarões pode influenciar nos números de hemócitos, sendo que os animais apresentam maiores concentrações dessas células na fase pós-ecdise e menores valores durante a intermuda na espécie *Penaeus stylirostris*. (Le MOULLAC et al , 1997).

Em cativeiro, as concentrações celulares e humorais do sistema imune decrescem em *Litopenaeus setiferus* (SÁNCHEZ et al, 2001) Há também redução na

concentração de hemócitos quando a concentração é deficiente em carboidratos (PASCUAL et al, 2004) e/ou quando são infectados por vírus. (SONG et al, 2003).

A determinação do hemograma em crustáceo consiste na contagem total e diferenciação dos hemócitos circulantes e funciona como um dos principais imunoparâmetros a expressar a condição de saúde desses animais.

Observa-se variações nos hemogramas de camarões em muitas situações de estresse como infecções bacterianas (MARTIN et al, 2003) virais (VAN DE BRAACK et al, 2002), ciclo de mudas (LIU et al, 2004) salinidade (PERAZZOLO et al, 2002), toxidez por enxofre (CHENG et al, 2006) e temperatura (WANG E CHENG, 2006).

A contagem total de hemócitos é realizada a partir de um determinado volume de hemolinfa onde facilmente é realizada utilizando-se a câmara de Neubauer ou hemocitômetro, essa constitui um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde dos crustáceos. (CHENG & CHENG, 2001). Diferentes autores concordam que um aumento na contagem total de hemócitos poderia conferir maior proteção contra doenças em crustáceos. (TRUSCOTT & WHITE, 1990; Le MOULLAC et al. 1998; Le MOULLAC & HAFFNER, 2000).

4.Referencias Bibliográficas:

BACHÉRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p.3-11. 2000.

BARRACCO, M.A. Mecanismos de resistência a doença em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, TAKEMOTO, R.; LIZAMA, M. **Sanidade dos organismos aquáticos**. São Paulo: Ed. Varela, p.51-74, 2004.

BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. IHHN vírus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 38, p. 185 – 194. 1984.

BELL, T.A., LIGHTNER, D.V. An outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatments. **Veterinary and Human Toxicology**, [s.l.], v.29, suplemento 1, p.37-43, 1987.

BONAMI, J.R; MARI, J; POULOS, B.T; LIGHTNER, D.V. characterization of hepatopancreatic parvo-like vírus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. **J. General Virology**. v.76, p. 813 – 817, 1995.

CHENG, W.; CHENG, J.C. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 11, p.53-63, 2001.

CHENG, S.Y.; HSU, S.W.; CHENG, J.C.; Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Fish Shellfish Immunology**. 2006.

COMAN, G.J. Crocos, P.J., Preston, N.P., Fielder, D. The effects of density on the growth and survival of different families of juvenile *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 229:215-223. 2004.

COUCH, J.A. Diseases, parasites and toxic responses of commercial penaeid shrimp of the Gulf of Mexico and South American Coasts of North America. **Fish. Bull.**, [s.l.], v.76, p.1, 1978.

DESTOUMIEAUX, D. MUÑOZ, M.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). Review. **CMLS, Cellular and Molecular Life Science**, v.57, p.1260-1271, 2000.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus**. Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3, Rome, 2006.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus**. Universal software for fishery statistical time series. Rome, 2007.

GAMEZ, J.C.I. Manual de practicas de laboratorio de sanidad de camarón. **Instituto Tecnológico de Sonora**. 2001. p. 18-23.

GARGIONI, R.; BARRACCO, M.A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M.acanthurus*, and of the penaeid *P.paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, p. 209-221, 1998.

HERZBERG, M.Z. Enfermedades mas frecuentes em cultivos regionales de camarón. **Centro de Ciências de Sinaloa**. 1996. p.1-12.

JOHNSON, S.K. **Handbook of shrimp diseases**. Galveston: Texas A & M University, 25p, 1989.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustaceans haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v.191, p.45-52, 2000.

Le MOULLAC, G.; SOYEZ, C. ; SAULNIER, D. ; ANSQUER, J.C. ; LEVY, P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Paenaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunology**, v.8, p. 621-629, 1998.

Le MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture**, v.191, p.121-131, 2000.

LIGHTNER, D.V. **Diseases of cultured penaeid shrimp**. In: McVey, J.P. CRC Handbook of mariculture. Crustacean aquaculture. Boca Raton: CRC Press, v.1, p. 239-320, 1983.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 45, p. 47 – 53. 1985.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201-220, 1998.

LIU, C.H.; CHEN, J.C.; Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* **Fish Shellfish Immunology**, v.16, p.321-334, 2004.

MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v.191, p. 23-44, 2000.

NUNES A.J.P. O cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. **Panorama da Aqüicultura**. 2001

NUNES, A.J.P. O cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. (www.aqualider.com.br)- 2004.

PEREIRA, A.R. **Patologia de camarões marinhos**. Apostila, 57p. 2002.

PEREIRA, A.M.L.; SANTOS, M.L. Relatório do Treinamento em Patologias de Camarões Marinhos, realizado no Instituto Tecnológico de Sonora, Obregón - México, Parnaíba-Pi, 2003. 19-29p.

PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P. BARRACO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, v.214, p-19-33, 2002.

SALIM, J. Panorama da Carcinicultura Potiguar- Sua importância e perspectiva de crescimento. **Revista Panorama da Aqüicultura**. p. 38-40, 2002.

SANCHEZ, A.; PASCUAL, C.; VARGAS- ALBORES, F.; MOULLAC, G. & ROSAS, C. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. **Aquaculture**, v. 198, p. 13-28, 2001

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. Annual **Reviews of fish diseases**, p. 3-23, 1992.

SONG, Y.L.; CHUN, I, Y.; LIEN, T, W.; HUANG, C.C. ; LIN, M.N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish Shellfish Immunology**, v.14, p.2003.

SONG, Y-L., LEE, S-P. Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from giter shrimp (*Penaeus monodon*). **Bull. Inst. Zool.**, Academia Sinica, [s.l.], v.32, n.3, p.217-220, July 1983.

TRUSCOTT, R; WHITE, K. N. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. **Functional Ecology**, v.4, p.455-461, 1990.

VAN DE BRAAK, C.B.; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W.B.; ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER KNAAP, W.P.W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish Shellfish Immunology**, v.13, p.293-309, 2002.

WANG, L.O. & CHENG, J.C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. **Fish & Shellfish Immunology**, 18: 269-278, 2005

ARTIGO I

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa dissertação será apresentada no artigo intitulado “**Contagem total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* conservados com citrato de sódio**” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

“Contagem total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* conservados com citrato de sódio”

Manuscrito a ser submetido à revista
Ciência Animal Brasileira
ISSN versão impressa: 1518-2797
ISSN versão on-line: 1089-6891

Contagem total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* conservados com citrato de sódio

Andrea Christianne Gomes Barretto¹, Lilian Maria Nery de Barros Góes², Dulcilene Lacerda do Nascimento³, Paulo de Paula Mendes⁴, Eneida Wilcox Rêgo⁴, Emiko Shinozaki Mendes⁴.

¹Médica veterinária, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária – UFRPE. ²Doutora em Ciência Veterinária ³Médica Veterinária. ⁴Professor adjunto da UFRPE. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife- PE. (andreabarretto9@hotmail.com)

Resumo- Para a realização de contagens de células sanguíneas, se faz necessário o uso de anticoagulantes e no caso específico da hemolinfa de camarões, ainda não há uma solução padrão para que não ocorra a coagulação dos hemócitos. Utiliza-se bastante o citrato de sódio, uma vez que foi verificada a sua eficácia na preservação dos hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* utilizando-se o citrato de sódio como anticoagulante. Em 140 amostras de hemolinfa com citrato de sódio (10%), na proporção de 1:1, coletadas em dois ciclos de cultivo, no período seco e no chuvoso, realizaram-se CTH imediatamente após a coleta e após o armazenamento por um período sob refrigeração. Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se as técnicas de modelagens matemáticas ($P < 0,05$). Observou-se que após o armazenamento sob refrigeração, o número de células diminuiu consideravelmente, podendo-se concluir que o anticoagulante citrato de sódio somente preserva adequadamente a hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* para a CTH realizada imediatamente após a coleta.

Termos para indexação: hemolinfa, anticoagulante, camarão, refrigeração.

Hemocytes total counting on *Litopenaeus vannamei* marine shrimps conserved with sodium citrate

Summary- For a blood cell count it is necessary to use anti coagulants and in the specific case of hemolymph in shrimp, there is still no standard solution for avoiding coagulation of the haematocytes. The use of sufficient sodium citrate, which was previously proven to be efficient in the preservation of haematocytes of sea shrimp *Litopenaeus vannamei* continues to be used as an anticoagulant. In 140 samples of hemolymph with sodium citrate (10%) in the ratio of 1:1, collected at 2 stages of cultivation, one dry and one wet, were examined for CTH immediately after collection and then again after a storage period in the refrigerator. All the data were analysed using model mathematics formulas ($P < 0.05$). It was observed that after storage in the refrigerator the number of the cells diminished considerably. The conclusion was that

the anticoagulant sodium citrate only adequately preserved the hemolymph of the shrimp *Litopenaeus vannamei* for CTH when the count was done immediately after collection.

Key words : haemolymph, anticoagulant, shrimp.

INTRODUÇÃO

A hematologia vem se tornando para a aquicultura um precioso instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas que ocorrem nos organismos cultivados, causadas, principalmente por fatores internos como sexo, estágio de maturação gonadal, idade, modo de vida e pelas alterações de fatores de água. No entanto, ainda são escassos artigos sobre o tema, o que dificulta maior discussão a respeito. (RAZINE-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Em se tratando do camarão marinho, esse é considerado animal primitivo no que concerne ao sistema imunológico. Todavia, apresentam mecanismos de defesa eficientes e são capazes de resistir e eliminar uma variedade de patógenos, preservando desta forma a sua integridade, segundo Olafsen (1988).

As reações de defesa dos invertebrados estão relacionadas a sua hemolinfa. Esta é caracterizada por se constituir em um tecido fluido composto por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração líquida, o plasma. (PERAZZOLO, 1994).

Entende-se por anticoagulantes substâncias utilizadas para prevenir a coagulação sanguínea bem como retardar a deterioração do sangue, podendo a escolha inadequada destas interferir nas investigações bioquímicas e nas determinações quantitativas. O citrato de sódio é bastante utilizado em transfusões e hemossedimentação, pois atua combinando-se com o cálcio, formando assim o citrato de cálcio insolúvel. Além disso, o citrato de sódio é bastante utilizado em diversas práticas nos camarões, mas sabe-se que pode interferir em muitos testes bioquímicos de acordo com Ferreira Neto et al. (1978).

De acordo com Bachére (2000), nos últimos anos o desenvolvimento de soluções anticoagulantes específicas possibilitou avanços nos estudos dos hemócitos de crustáceos. Perazzolo et al (2002) e Albores et al (2005) desenvolveram soluções anticoagulantes compostas por várias substâncias, porém de difícil aplicação em fazendas devido as condições do seu preparo. Assim sendo, objetivou-se avaliar a eficácia do anticoagulante citrato de sódio na preservação dos hemócitos de camarões

marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados, para a leitura imediata e em associação com a refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram capturados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* provenientes de dois viveiros de terra (A e B) da Maricultura Santa Cruz, situada no município de Goiana- PE. As coletas se deram semanalmente, durante dois ciclos de cultivo (período seco e período chuvoso) onde se obteve um total de 140 camarões analisados.

Os camarões após a captura foram transportados vivos ao laboratório situado na propriedade, onde foram examinados clinicamente de acordo com o método de exame a fresco preconizado por Morales-Covarrubias (2004). Em seguida ao exame a fresco, coletou-se 0,1mL hemolinfa de cada animal, por meio de seringa estéril, contendo 0,1mL do anticoagulante citrato de sódio a 10%. A hemolinfa foi extraída por punção na região ventral do abdômen.

As contagens totais de hemócitos (células/mm³) foram realizadas imediatamente após a coleta e depois de cinco horas após a refrigeração, de forma semelhante a utilizada para eritrócitos de mamíferos (SCHALM, 1974) em câmara de Neubauer, sendo contudo adaptado para hemolinfa diluída na proporção de 1:1 através da seguinte fórmula:

$$N^{\circ}\text{hemócitos} = \Sigma x_i / 5 \times 25 \times 30.000$$

Em que: NH- Número total de hemócitos (cel/ mm³); xi- Número de hemócitos no iésimo campo da câmara de Neubauer; n- número de campos contados (5 campos); i- iésimo campo da câmara de Neubauer.

Para correlacionar os resultados da contagem total de hemócitos (CTH) nos camarões amostrados em função do tratamento térmico (refrigerado e não refrigerado), do viveiro (A e B), dos ciclos de cultivo (1º e 2º ciclos), da higidez dos animais amostrados (ENF), peso dos animais e tempo de cultivo (TC), utilizou-se o seguinte modelo matemático:

$$CTH_i = \beta_0 + \beta_1 mc_i + \beta_2 V_i + \beta_3 CL_i + \beta_4 ENF_i + \beta_5 TC_i + \varepsilon_i$$

Em que: CTH – contagem total de hemócitos; $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_5$ - parâmetros do modelo; mc – Contagem de hemócitos no momento da coleta; V – viveiro; CL – ciclo de cultivo; ENF –

enfermidade, TC - tempo de cultivo dos camarões; ε - erro associado a cada observação; i - i -ésima observação.

Para estimar os parâmetros do referido modelo utilizou-se a técnica dos mínimos quadrados e para selecionar as variáveis significativas no modelo ($P < 0,05$), processo de *Stepwise*, de acordo com Mendes et al (2006). Todas as variáveis foram incluídas no modelo sob a forma de variável binária (0 ou 1), com exceção da variável tempo de cultivo e peso. Associado ao processo *Stepwise* foi utilizado o transformador de Box e Cox (BOX e COX, 1964), objetivando minimizar a variância experimental. Para realizar os cálculos utilizou-se o pacote Estatístico SysEapro versão 1,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as contagens totais de hemócitos utilizando-se o citrato de sódio como anticoagulante, destacando-se o período (chuvoso e seco), os dois viveiros amostrados (A e B) e a interferência da refrigeração sob as contagens para machos e fêmeas estão apresentadas nas figuras 1 e 2 respectivamente:

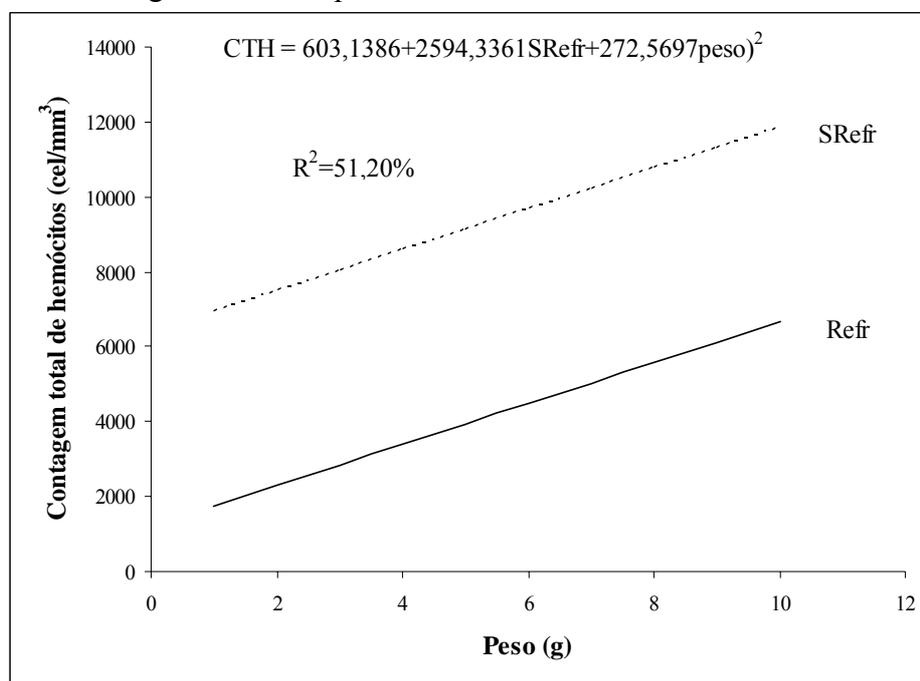


Figura 1. Relação entre a contagem total de hemócitos, peso dos camarões machos.

Observa-se na Figura 1 que as obtiveram maiores contagens nas amostras processadas imediatamente após as coletas, demonstrando que as amostras não devem ser armazenadas para posterior contagem. Podemos observar também que, além da refrigeração a variável peso foi significativa no referido modelo.

Em se tratando das fêmeas, observa-se na Figura 2, que também as maiores contagens foram obtidas quando as amostras foram processadas imediatamente após as coletas. E diferentemente dos machos, a outra variável significativa em relação as fêmeas foi o tempo de cultivo.

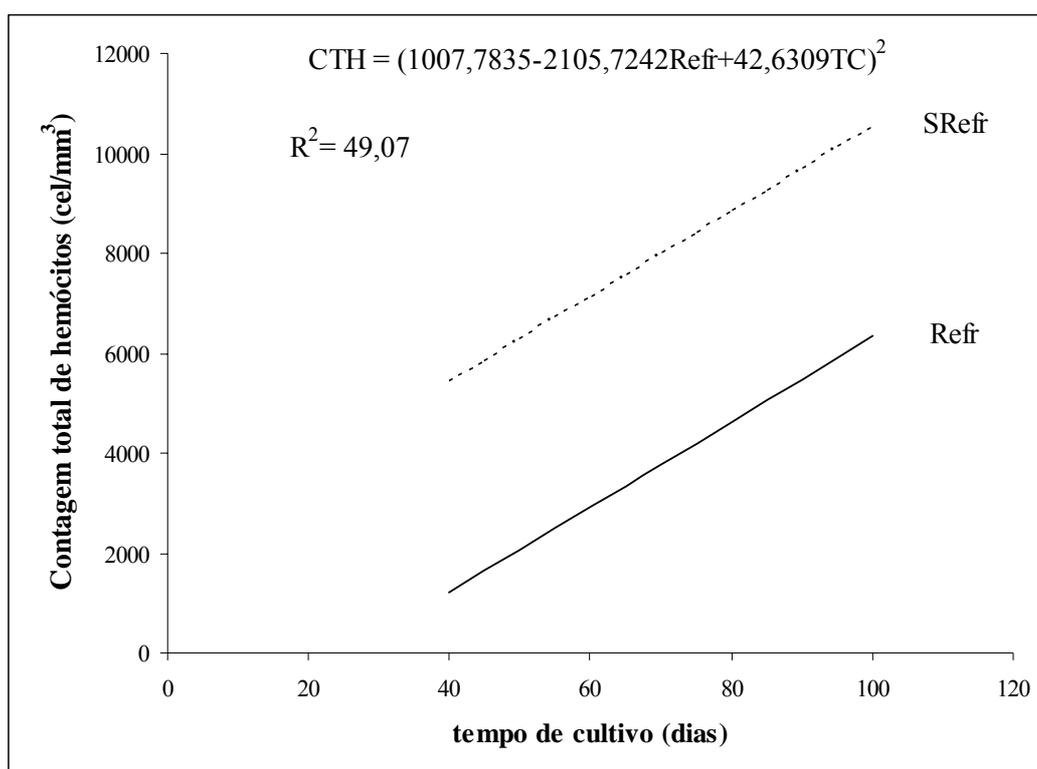


Figura 2. Relação entre a contagem total de hemócitos, tempo de cultivo das fêmeas

De acordo com os valores preconizados pelo Centro de Serviços para a Aqüicultura (CSA, 2006), as médias dos valores obtidos são consideradas boas, quando os hemócitos são contados imediatamente após a coleta ficando entre $10-15 \times 10^6$ hem/ml. As amostras processadas após um período sob refrigeração apresentaram contagens consideradas baixas ou muito baixas girando em torno de 5×10^6 cel/ml, o que significa dizer que a refrigeração deve ser evitada quando se utilizar o citrato de sódio como anticoagulante para a realização de contagem de hemócitos.

Em relação ao tempo de cultivo, pode-se observar influência positiva sobre as contagens, o que pode ser um indicativo de que animais mais jovens apresentam

menores concentrações celulares que animais mais velhos, de modo semelhante com que ocorrem em mamíferos.

Esses resultados são discordantes dos encontrados por Owens e O'Neill (1997) que não observaram diferença entre a CTH em diferentes fases de vida ao trabalharem com *Penaeus monodon*.

As alterações detectadas durante o exame a fresco não interferiram significativamente nas contagens ($P > 0,05$), assim como os viveiros onde estavam sendo cultivados os camarões. Existe, contudo, uma dificuldade de se comparar resultados de CTH com as demais pesquisas e revisões da área, pois os métodos adotados são extremamente diferentes, como afirmado por Van de Braak et al (1996).

Ao se comparar as contagens encontradas nos machos com as das fêmeas, observa-se que os machos apresentaram cerca de 31% células circulantes a mais que as fêmeas, esse fato pode ter ocorrido devido aos machos serem maiores que as fêmeas e conseqüentemente refletir a capacidade maior dos machos de se protegerem contra agentes patógenos.

Barraco (2004) afirmou que a CTH pode aumentar ou diminuir seus valores dependendo do tempo e tipo de estresse. Nas injúrias e processos infecciosos usualmente ocorre diminuição durante as primeiras horas, havendo em seguida um aumento de seus valores possivelmente devido a liberação de novas células a partir dos órgãos hematopoiéticos.

De acordo com Perazollo (1994) não há interferência do sexo sobre a contagem total de hemócitos na espécie *Penaeus paulensi*, porém vale ressaltar que no referido trabalho além de ter sido utilizada uma espécie diferente fora utilizado *pools* das amostras o que provavelmente tenha interferido no trabalho.

Conclusões

1-O anticoagulante citrato de sódio (10%) mantém viável a hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* para a contagem total de hemócitos.

2- A refrigeração de hemolinfa com o anticoagulante citrato de sódio a 10% não é indicada para a contagem total de hemócitos, devido a não preservação das células.

Referências

ALBORES, F.V.; GOLLAS-GALVÁN, T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Functional characterization of *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus vannamei* e *L.stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. **Aquaculture Research**, Oxford, n.36, p.352-360, 2005.

BACHÉRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p.3-11. 2000.

BARRACCO, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T. et al. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.51-73.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformation. **Journal of Royal Statistic Society**, [s.l.], Ser.B, v. 26, p. 211 – 243, 1964.

CSA. CENTRO DE SERVIÇOS PARA LA ACUACULTURA. União Européia disponível em <http://www.csa.gov.hk/indexe.html>. Acesso em 15 junho de 2006.

FERREIRA NETO, J.M. et al. Patologia Clínica Veterinária. Belo Horizonte, MG: Rabelo e Brasil, 1978, 293p.

MENDES, P.P. et al. Análise estatística dos parâmetros aquícolas, com fins a otimização da produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa SBZ, 2006. v.35, p.886-903.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades Del camarón**: detection mediante análisis em fresco e histopatología. (Diseases shrimp detection by means of Gross analysis and histopathology). México: Ed. Trilhas, 2004. 122p.

OLAFSEN, J.A. Role of lectins in invertebrate humoral defense. **Newsletter American Fisheries Society**, Washington, US, v.1, p.189- 2005, 1988.

OWENS, L.; O'NEILL, A. Use of a clinical cell flow cytometer for differential counts of prawn *Penaeus monodon* haemocytes. **Diseases of Aquatic Organisms**, Hawaii, USA, v.31, p.147-153. 1997.

PERAZZOLO, L. M. **Estudo do sistema imune do camarão marinho *Penaeus paulensis*, com ênfase no sistema pró-fenoloxidase**. 1994. 121f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PERAZZOLO, L. M.; GARGIONE, R ; OGLIARI, P. ; BARRACCO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, p. 19-33. 2002.

RANZINE-PAIVA, M.J. T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINE-PAIVA, M.J.T. et al. (Org). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 88-120.

SCHALM, O.W. **Veterinary Hematology**. 3 ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1974, 807p.

VAN DE BRAAK, C.B.T.; FABER, R.; BOON, J.H. Celular and humoral characteristics of *Penaeus Monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. **Comparative Hematology International**, London: Springer-Verlag, v.6, p.194-203. 1996.

Submissões

- [» Submissões Online](#)
- [» Diretrizes para Autores](#)
- [» Política de Privacidade](#)

Submissões Online

Já possui um Login/Senha para a revista Ciência Animal Brasileira?

[ACESSO](#)

Não tem Login/Senha?

[CADASTRO DE USUÁRIOS](#)

Cadastro e login são obrigatórios para submissão de documentos online e verificar o estágio de submissões.

Diretrizes para Autores

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Os textos devem ser organizados da seguinte forma: 1- título; 2- nomes dos autores (por extenso); 3- filiação científica (informar departamento, instituto ou faculdade, universidade, CEP, cidade, estado país e e-mail); 4- resumo (na língua principal do texto e em inglês - Summary, com um máximo de 200 palavras); 5- palavras-chave (máximo de cinco, apresentadas na língua do texto e em inglês - Keywords); 6- introdução; 7- material e métodos; 8- resultados e discussão (separados se necessário); 9- conclusões; 10- agradecimentos (se necessário) e 11- referências bibliográficas, em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e seguir a NBR 6023, da ABNT.

Nota Científica (inclui o formato de Relato de Caso, Comunicação de Pesquisa ou Nota Prévia): --Aviso: temporariamente não estão sendo aceitos para submissão artigos destes tipos--

Contempla principalmente áreas médicas ou achados que devam ser divulgados anteriormente à publicação do artigo, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Podem ser considerados como elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos ou Casuística (de acordo com a situação), Resultados, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). No geral, essas publicações estão sujeitas às mesmas características de avaliação dos artigos científicos, respeitadas suas peculiaridades.

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão com todas os itens listados a seguir. Serão devolvidas aos autores as submissões que não estiverem de acordo com as normas.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.

2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
3. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
4. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor. Em caso de citação de autores, "Autor" e ano são usados na bibliografia, ao invés de Nome do autor, título do documento, etc.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

ARTIGO II

Parte dos resultados obtidos no trabalho experimental dessa dissertação será apresentada no artigo intitulado “**Contagem total de hemócitos associada com a presença de vibrios na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

Contagem total de hemócitos associada com a presença de vibrios na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Manuscrito a ser submetido à

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (ON LINE) 1981-0997- ISSN (IMPRESSO) 1981-1160

Contagem total de hemócitos associada com a presença de vibrios na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Andréa C.G. Barretto¹, Lílian M.N.B. Góes², Dulcilene L. Nascimento³,
Paulo P. Mendes⁴, Eneida W. Rêgo³, Emiko S. Mendes³.

¹ Pós-graduanda de mestrado, bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Email:andreabarretto9@hotmail.com

² Médica Veterinária, Dra em Ciência Veterinária.

³ Depto. de Medicina Veterinária/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n. 52171-900, Dois Irmãos, Recife/PE/Brasil, fone: 081 33206419.

⁴ Depto. de Pesca e Aqüicultura/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n. 52171-900, Dois Irmãos, Recife/PE/Brasil, fone: 081 33206507.

Resumo

A vibriose é reconhecidamente uma das causas de prejuízos consideráveis à carcinicultura. A doença produz alterações visíveis no camarão, quando em estágio avançado, mas poderá ser detectado precocemente se estiver relacionada com a contagem total de hemócitos, podendo ser utilizado como ferramenta no monitoramento da enfermidade nos peneídeos. Objetivou-se verificar a relação entre a presença de *Vibrio* spp. e de lesões físicas no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com a contagem total de hemócitos. Cento e cinquenta camarões cultivados em uma carcinicultura do litoral de Pernambuco foram submetidos ao exame a fresco, ao exame hematológico (contagem total de hemócitos) e análise bacteriológica, no período chuvoso e seco. Para as análises dos dados os camarões foram distribuídos em quatro grupos: camarões com lesão e com bactéria (CLCB), com lesão e sem bactéria (CLSB), sem lesão e com bactéria (SLCB) e sem lesão e sem bactéria (SLSB). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de Tukey, para comparação entre as

médias, adotando-se o nível de significância de 5%. Concluiu-se que a contagem total de hemócitos é bastante variável e por isso, faz-se necessário uma amostragem maior para melhor definição. Constatou-se que a contagem não está associada com a presença de *Vibrio* e com lesões detectadas no exame a fresco, e, portanto, não é uma boa ferramenta para a constatação imediata de alterações na saúde dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*.

Palavras-chave: camarão, víbrios, hemócitos, contagem.

Abstract

Vibrosis is admittedly one of the causes of considerable loss in shrimp farming. A total haemocyte count could be used as a tool for the control of the disease in the penaeidae. The objective is to verify the action of the presence of *Vibrio* spp. and the physical lesions on the sea shrimp *Litopenaeus vannamei* against the total haemocyte count. One hundred and fifty fresh cultivated shrimp of the species *Litopenaeus vannamei* were examined for a total haematocyte count and and bacteriological analysis during the rainy and dry period. The data for analysis were grouped into 4 groups: with lesion and with bacteria (CLCB), with lesion and no bacteria (CLSB), without lesion and with bacteria (SLCB), without lesion and without bacteria (SLSB). The results were examined for analysis of variance (ANOV) and when significant the Tukey test was used for the comparison between means with a 5% level of significance. It was concluded the the total laemocyte count is very variable and thus a larger sample number is necessary for a better definition. This study is not about research on *Vibrio* ssp and the examination of a fresh sample and thus it is not a reason for any immediate changes in the health of sea shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Key-words: shrimp, víbrios, haemocytes, counting.

Introdução

A carcinicultura, que a partir dos anos 90, despontou no cenário nacional como altamente rentável e promissora, vem atualmente enfrentando grandes problemas no que diz respeito à sanidade dos animais cultivados. A promessa de grandes lucros ocasionou um crescimento desordenado da atividade por empresários pouco especializados, o que resultou numa grande exploração dos cultivos, com altas densidades e conseqüente elevado nível de estresse dos animais (MENDES et al, 2005).

O estresse causa depressão do sistema imunológico dos camarões, gerando animais débeis e frágeis, susceptíveis a patógenos presentes no ambiente. Segundo Lightner (1983), as mais importantes doenças de etiologia infecciosa, que ocorrem em peneídeos cultivados, são ocasionadas por microrganismos classificados como patógenos oportunistas, tais como, bactérias, fungos, protozoários e vírus.

A rápida expansão do cultivo de camarões peneídeos está sendo ameaçada por doenças provocadas por bactérias do gênero *Vibrio*, que afetam a sua sobrevivência e crescimento. Estes microrganismos oportunistas fazem parte da microbiota normal dos peneídeos, provocando doenças quando condições ambientais desfavoráveis se estabelecem nos sistemas de cultivo (AGUIRRE-GUZMÁN et al. 2001).

A vibriose, também conhecida como “síndrome da gaiivota” foi causa de grandes perdas para a indústria de camarão no México, talvez por desconhecimento das técnicas de diagnóstico e do tratamento adequado. As espécies mais comuns associadas a essa doença são *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*. Podendo ocasionalmente apresentar o *V. damsela*, *V. fluvialis* e *V. splendidus* (PEREIRA e SANTOS, 2003).

Um recurso de grande valia e largamente empregado são as análises a fresco, que fundamenta-se na observação visual e *in situ* de exemplares vivos ou moribundos, podendo, depois de se proceder ao sacrifício dos animais, ser realizado um estudo mais detalhado, visando a indicação da presença de alterações (GAMEZ, 2001).

Segundo Herzberg (1996), os exames a fresco de amostras ao microscópio, das brânquias, apêndices orais, animais completos, como larvas e pós-larvas, hemolinfa, fragmentos de alguns tecidos e órgãos, são muito úteis para demonstração de algumas enfermidades bacterianas, micóticas e parasitárias.

Foi relatado por Barbieri Jr e Ostrensky Neto (2002) que as reações de resistência aos patógenos no camarão estão baseadas no número de hemócitos circulantes na

hemolinfa, que desempenham diversas funções, destacando as respostas inflamatórias, de defesa contra agentes externos, de coagulação e de oxigenação do organismo.

A contagem de hemócitos circulantes pode ser uma ferramenta de monitoramento da saúde dos camarões devido à maioria das enfermidades infecciosas modificarem a composição da hemolinfa dos crustáceos (PERAZZOLO et al., 2002).

Diante do exposto, objetivou-se verificar a interferência da presença de *Vibrio* spp. e de lesões físicas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* na contagem total de hemócitos.

Material e métodos

As amostras de hemolinfa foram coletadas de 150 camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em uma carcinicultura do litoral pernambucano, em dois períodos diferentes, sendo o primeiro em 2007 no período seco e o segundo em 2008, no período chuvoso. Utilizaram-se seringas estéreis de 1,0mL contendo citrato de sódio a 10% como anticoagulante e alíquotas de 0,1mL de hemolinfa foram coletadas através de punção da região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, após desinfecção com algodão embebido com álcool a 70° GL. As contagens de hemócitos foram realizadas em câmara de Neubauer, segundo método adaptado de Jain (1993), onde o número de células por ... (mmb) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$NH = \sum X_i / n \times 25 \times 30.000$$

Em que: NH - Número total de hemócitos (cel/ mm³); X_i - Número de hemócitos no iésimo campo da câmara de Neubauer; n - número de campos contados (5 campos); i - iésimo campo da câmara de Neubauer.

Imediatamente após a realização das contagens, as amostras foram transportadas, em temperatura ambiente, para o laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde se procederam as análises bacteriológicas, que constaram de pesquisa direta e indireta de *Vibrio* spp.

Para a pesquisa direta de *Vibrio* spp inoculou-se uma alçada da amostra de hemolinfa diretamente em Agar Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sacarose (TCBS) e incubou-se por 18 a 24 horas em estufa a 35 - 37° C. O surgimento de colônias características indicou positividade da amostra. Na leitura, as colônias característica

foram repicadas em Agar Trypticase de Soja (TSA) com 2% de cloreto de sódio (NaCl), a partir da qual foram submetidas ao estudo do perfil bioquímico (motilidade, indol, desenvolvimento a 0, 1, 3, 6, 8, 10% de NaCl, oxidase e catalase), conforme a orientação do FDA (1998).

Em se tratando da pesquisa indireta de *Vibrio* spp. procedeu-se uma etapa de pré-enriquecimento em Caldo Trypticase de Soja (TSB) com 2% de NaCl, com incubação por 18-24 h a 35 - 37° C. Após o pré-enriquecimento, realizou-se o mesmo procedimento anteriormente citado para a realização da pesquisa indireta de *Vibrio* spp.

Procedeu-se ao exame a fresco (macro e microscópico) em todos os animais amostrados, conforme o método descrito por Morales-Covarrubias (2004).

Para a realização da análise estatística, os resultados foram divididos em quatro grupos: o primeiro contendo animais com lesão e com bactéria (CLCB), o segundo com lesão e sem bactéria (CLSB), o terceiro sem lesão e com bactéria (SLCB) e o último com camarões sem lesão e sem bactéria (SLSB). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de Tukey, para comparação entre as médias, adotando-se o nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

Ao se comparar as médias dos quatro grupos obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 1, na qual se verifica que não existiu diferença significativa entre os grupos, ou seja, foi à presença de víbrios e de lesões não interferiram na contagem de hemócitos. Também não foi verificada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os métodos de pesquisa direta e indireta para detecção de *Vibrio* spp., o que demonstra que os dois métodos são confiáveis.

Tabela 1 – Quadro clínico dos camarões e respectivas contagens de hemócitos.

Quadro clínico	CTH
	Média ± desvio padrão
SLSB	15,8224±1,3714 a ¹
CLCB	15,9945±1,0538 a

CLSB	16,3281±1,1178 a
SLCB	16,6818±0,5256 a

SLSB – Sem lesão e sem bactéria; CLCB – Com lesão e com bactéria; CLSB – Com lesão e sem bactéria; SLCB – Sem lesão e com bactéria; CTH – Contagem total de hemócitos (valores logaritmizados); 1 – Letras iguais entre as contagens não diferem significativamente ($P \geq 0,05$) os quadros clínicos pelo teste de Tukey.

Por se tratar de dados em forma de contagem, foi utilizado transformador logarítmico para normalizar os erros. Para verificar a homogeneidade das variâncias foi utilizado teste de Bartlett (ZAR, 1999) e aplicou-se análise de variância com designer experimental inteiramente casualizado (MENDES et al., 2006).

Os números de hemócitos verificados encontram-se consonantes com os relacionados pelo Centro de Serviços para a Aquicultura (CSA, 2006) sendo classificadas como boas ou muito boas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Contagem total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos em hemolinfa de camarões.

Contagem total de hemócitos (CTH)	Conceito
<5 x 10 ⁶ hem/ML	Muito baixo
5 x 10 ⁶ hem/mL	Baixo
10-15 x 10 ⁶ hem/mL	Regular
15-20 x 10 ⁶ hem/mL	Bom
>20 x 10 ⁶ hem/mL	Muito bom

Camarões com presença de vibrio na hemolinfa não apresentaram alterações no seu número de células, ou seja, apesar de se ter constatado a presença de bactérias na hemolinfa, não foi detectado hemocitose ou hemocitopenia significativa. Não foi

observada variação das CTH provavelmente pelo fato desses animais se encontrarem aparentemente saudáveis, tendo em vista que tanto a diminuição quanto o aumento do número de células circulantes já foram descritos em crustáceos quando esses foram desafiados a diferentes tipos de estresse, como por exemplo: hipóxia, aclimação em cativeiro e tipo de dieta (LE MOULLAC ET AL, 1998; CHENG E CHEN, 2005; SANCHEZ et al, 2001).

Contrariando o relatado por Ligtner (1996), de que apenas a presença da bactéria na hemolinfa possibilita a caracterização de um diagnóstico sugestivo de sepse, só a presença de bactérias na hemolinfa não foi suficiente para determinar a doença com sinais clínicos visíveis nos animais do estudo.

Morales-Covarrubias et al. (2006) relataram que fatores exógenos, como temperatura e salinidade, interagem com fatores internos no desenvolvimento de enfermidades e imunidade dos animais, confirmando a idéia de que o ambiente de cultivo pode ser responsável ou não pelo desencadeamento da doença, o que também foi observado por Alves et al (2008), quando constatou a interferência na carga de *Vibrio* spp.

Conforme citado por Perazzolo (1994), os hemócitos são responsáveis pela defesa do organismo e pelo reconhecimento do não próprio, sendo esperados maiores contagens relacionadas a casos de sepse.

De acordo com Barraco (2004) a CTH pode aumentar ou diminuir seus valores dependendo do tempo e tipo de estresse. Nas injurias e processos infecciosos usualmente ocorre diminuição durante as primeiras horas, havendo em seguida um aumento de seus valores, possivelmente devido a liberação de novas células a partir dos órgãos hematopoiéticos, destacando com isso a necessidade de realização periódica de hemograma nos camarões cultivados.

É importante destacar a afirmação de Olafsen (1988), de que o líquido corporal dos crustáceos marinhos se apresenta normalmente estéreis, apesar destes animais comumente ocuparem ambientes ricos em parasitas e patógenos potenciais, confirmando assim a importância da pesquisa de *Vibrio* spp. na hemolinfa de camarões marinhos.

Não houve diferença significativa entre os achados hematológicos e clínicos, entre o período seco e o chuvoso, resultado concordante com os encontrados por Silva (2007), que não verificou interferência da sazonalidade sobre a higidez de camarões marinhos cultivados no estado de Pernambuco.

Ainda há muito que se pesquisar em relação aos parâmetros hematológicos dos crustáceos de modo geral, pois segundo Barraco (2008), a comparação dos índices hematoimunológicos dos crustáceos saudáveis e infectados, não apresenta muitas vezes diferenças significativas, semelhante aos resultados obtidos com este trabalho.

Conclusão

A contagem total de hemócitos é bastante variável e por isso, faz-se necessário uma amostragem maior para melhor definição. No presente trabalho, constatou-se que não está associada com a pesquisa de *Vibrio* e ao exame a fresco, e portanto, não é uma boa ferramenta para a constatação imediata de alterações na saúde dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*.

Referências

- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VAZQUEZ-JUAREZ, R. & ASCENCIO, F. **Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 78, n. 4, p. 215-219, 2001.
- ALVES, C.A.B. **Fatores interferentes na ocorrência de vibriose em camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado no litoral norte de Pernambuco.** Recife, 2007. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BARRACCO, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T. et al. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos.** São Paulo: Varela, 2004. p.51-73.
- BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R.D. Imunología del camarón. In: Guia técnica – **Patología e imunología de camaronês penaeidos.** Panamá . 2008.
- BARBIERI, R.C.; OSTRENSKY A. N. **Reprodução, maturação e larvicultura. Camarões Marinhos.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil,, v.1, 258p. 2002.
- CHENG, W., WANG, L., CHEN, J. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v. 250, p. 592-601, 2005.

CSA. CENTRO DE SERVICIOS PARA LA ACUACULTURA. União Européia, Disponível em <http://www.csa.gov.hk/indexe.html>. Acesso em 01 de fevereiro de 2006.

GAMEZ, J.C.I. Manual de practicas de laboratorio de sanidad de camarón. **Instituto Tecnológico de Sonora**. 2001. p. 18-23.

HERZBERG, M.Z. Enfermidades mas frecuentes em cultivos regionales de camarón. **Centro de Ciências de Sinaloa**. 1996. p.1-12.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Maryland: Henslyl, 9a ed. 1994. p.192-193.

JAIN, N.C. **Essential of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Fibiger, 1993. Comparative hematology of common domestic animals.

Le MOULLAC, G.; GROUMELLE, M.; ANSQUER, D.; FROISSARD, S.; LEVY, P.; AQUACOP. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. **Fish and Shellfish Immunology**, Aberdeen: Academic press, n.7, p.227-234, nov. 1997.

LIGHTNER, D.V. **Diseases of cultured penaeid shrimp**. In: McVey, J.P. CRC Handbook of mariculture. Crustacean aquaculture. Boca Raton: CRC Press, v.1, p. 239-320, 1983.

LIGHTNER, D.V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World aquaculture society**. Baton Rouge: Louisiana. 1996. 304p.

MENDES, E.S. et al. Os víbrios na carcinicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**, São Paulo: v.91. set/out. p26-29. 2005.

MENDES, P. P. et al. Análise estatística dos parâmetros aquícolas, com fins a otimização da produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa – PB. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006. v. 35, p. 886-903.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermidades del camarón**: detection mediante análisis em fresco e histopatología. (Diseases shrimp detection by means of Gross analysis and histopathology). México: Ed. Trilhas, 2004. 122p

MORALES-COVARRUBIAS, M.S., OSUMA DUARTE, A.G., GARCIA GASCA, A., LIGHTNER, D.V. Prevalence of Necrotizing Hepatopancreatitis in female broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 18, p. 019-025, 2006.

- MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Enfermidades bacterianas. In: Guia técnica – **Patologia e imunología de camaronês penaeidos**. Panamá . 2008.
- OLAFSEN, J. A. Role of lectins in invertebrate humoral defense. **Newsletter American Fisheries Society**, Washington, US, v.1, p.189-205, 1988.
- PEREIRA, A.M.L.; SANTOS, M.L. **Relatório do treinamento em patologias de camarões marinhos**. Parnaíba; ITS, p.19-29. 2003.
- PERAZZOLO, L. M. **Estudo do sistema imune do camarão marinho *Penaeus paulensis*, com ênfase no sistema pró-fenoloxidase**. 1994. 121f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- PERAZZOLO, L.M. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, p.19-33. 2002.
- SANCHEZ, A. PASCUAL, C. SANCHEZ, A., VARGAS- ALBORES, F., MOULLAC, G., ROSAS, C. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. **Aquaculture**, v. 198, p.13-28. 2001.
- SILVA, R. P. P. Fatores interferentes na ocorrência de vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vanamei*, Boone 1931) no litoral sul de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2007.

REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Diretrizes para Autores

O trabalho submetido à publicação deverá ser cadastrado no portal da revista. O cadastro deverá ser preenchido apenas pelo autor correspondente que se responsabilizará pelo artigo em nome dos demais autores. Só serão aceitos trabalhos depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados ou submetidos em publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo. Os trabalhos subdivididos em partes I, II..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores. Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos.

Composição sequencial do artigo

- a) Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula. Como chamada referente ao título, deve-se usar nota-índice que poderá indicar se foi trabalho extraído de tese, ou apresentado em congresso, entidades financiadoras do projeto e, necessariamente, a data (Recebido para publicação em //) em que o trabalho foi recebido para publicação;
- b) Nome(s) do(s) autor(es): por extenso apenas o primeiro nome e o sobrenome e separados por vírgula, e somente a primeira letra do nome e dos sobrenomes deve ser maiúscula. Colocar referência de nota no final do sobrenome de cada autor para fornecer, logo abaixo, endereço institucional, incluindo telefone, fax e e-mail. Os autores pertencentes a uma mesma instituição devem ser referenciados por uma única nota. A condição de bolsista poderá ser incluída. Não deve ser colocado ponto ao final de cada nota;
- c) Os artigos deverão ser compostos por, no máximo, 6 (seis) autores;

- d) Resumo: no máximo com 15 linhas;
- e) Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título;
- f) Título em inglês no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula;
- g) Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo;
- h) Key words: no mínimo três e no máximo cinco;
- i) Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura;
- j) Material e Métodos;
- k) Resultados e Discussão;
- l) Conclusão devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa;
- m) Agradecimentos (facultativo);
- n) Literatura Citada. Quando o artigo for escrito em Inglês ou em Espanhol, o título, resumo e palavras-chave deverão também constar, respectivamente, em Português e em Inglês, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma principal.

Edição do texto

- a) Processador: Word for Windows;
- b) Texto: fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverá existir no texto palavras em negrito;
- c) Espaçamento: duplo entre o título, nome(s) do(s) autor(es), resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5;
- d) Parágrafo: 0,5 cm;
- e) Página: Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,54 cm, e esquerda e direita de 3,00 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas;
- f) Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, Palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula;

g) As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão;

h) Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos);

- Títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos em português e inglês. O título em português deverá ser escrito em fonte Times New Roman, estilo normal e tamanho 9. O título em inglês deverá ser inserido logo abaixo com fonte Times New Roman, estilo itálico e tamanho 8;

- As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1. Tabelas e figuras que possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma tabela ou figura criando-se, no entanto, um indicador de diferenciação. A letra indicadora de cada sub-figura numa figura agrupada deve ser maiúscula e com um ponto (exemplo: A.), e posicionada ao lado esquerdo superior da figura e fora dela. As figuras agrupadas devem ser citadas no texto da seguinte forma: Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C.

- As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal. Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final). Em tabelas que apresentam a comparação de médias, mediante análise estatística, deverá existir um espaço entre o valor numérico (média) e a letra. As unidades deverão estar entre parêntesis.

- As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figuras, deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O(s) autor(es) deverá(ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis, mas, sem separação do título por vírgula.

Exemplos de citações no texto

a) Quando a citação possuir apenas um autor: ... Freire (1997) ou .(Freire, 1997).

b) Quando possuir dois autores: ... Freire & Nascimento (1997), ou ... (Freire & Nascimento, 1997).

c) Quando possuir mais de dois autores: Freire et al. (1997), ou (Freire et al., 1997).

Literatura citada

As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por ponto e vírgula. As citações devem ser, preferencialmente, de publicações em periódicos dos últimos dez anos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a) Livros

Michereff, S.J.; Andrade, D.E.G.T. de; Menezes, M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. 1.ed. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 398p.

b) Capítulo de livros

Ribeiro, M.R.; Freire, F.J.; Montenegro, A.A. de A. Solos halomórficos no Brasil: ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: Alvares V., V.H.; Melo, J.W.V. de (org.). Tópicos especiais em ciência do solo. Viçosa/MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. v.3, p.165-208.

c) Revistas

Santana, D.F.Y.; Lira, M. de A.; Santos, M.V.F. dos; Dubeux Júnior, J.C.B.; Silva, M. da C. da; Santos, V.F. dos; Fernandes, A. de P. Métodos de recuperação de pastagens de *Brachiaria decubens* Stapf no agreste pernambucano. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.35, n.3, p.699-705, 2006.

d) Citações no prelo (aceitas para publicação) devem ser evitadas e só referenciadas quando forem imprescindíveis à elaboração dos artigos

Costa, J.V.T; Lira Junior, M.A.; Ferreira, R.L.C.; Stamford, N.P.; Campanharo, M.; Souza, C.A. Relacionamento entre tamanho do nódulo e medições convencionais da nodulação. Acta Scientiarum, Maringá, 2007. No prelo.

e) Dissertações e teses

Santos, M.H.B dos. Diagnóstico precoce do sexo de fetos caprinos e ovinos pela ultrasonografia em tempo real. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006. 193p. Tese Doutorado.

f) Trabalhos apresentados em congressos (Anais, Resumos, Proceedings, Disquetes, CD ROMS)

Fischer, A.F.; Hazin, F.H.V.; Viana, D.; Albanez, F.; Carvalho, F.C de; Pacheco, J.C. Dados preliminares da biologia reprodutiva do tubarão flamengo (*Carcharinus acronotus*) capturados na costa pernambucana. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2, 2005, Vitória. Resumos ... Vitória: SBOC, 2005. p. 130.

No caso de disquetes ou CD Rom, o título da publicação continuará sendo Anais, Resumos ou Proceedings, mas o número de páginas serão substituídas pelas palavras Disquetes ou CD Rom.

g) WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol) Burka, L.P. A hipertext history of multi-user dimensions; MUD history. <http://www.ccs.neu.edu/home/lpb/mud-history-html>. 10 Nov. 1997.

h) Citações de comunicação pessoal deverão ser referenciadas como notas de rodapé, quando forem imprescindíveis à elaboração dos artigos.

Outras informações sobre a normatização de artigos

1) Os títulos das bibliografias listadas devem ter apenas a primeira letra da primeira palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverão ter apenas a primeira letra de cada palavra maiúscula;

2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a primeira letra maiúscula;

3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, key words e títulos de tabelas e figuras. Todas as letras das palavras-chave devem ser minúsculas, incluindo a primeira letra da primeira palavra-chave;

4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula;

5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto;

6) Evitar parágrafos muito longos;

- 7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos de animais e culturas agrícolas, assim como, nos títulos das tabelas e figuras escritos em inglês;
- 8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e subitens;
- 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado;
- 10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada nome;
- 11) Nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL; l/s = L s⁻¹; 27°C = 27 °C; 0,14 m³/min/m = 0,14 m³ min⁻¹ m⁻¹; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave; 2 toneladas = 2 t; mm/dia = mm d⁻¹; 2x3 = 2 x 3 (deve ser separado); 45,2 - 61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto). A % é unidade que deve estar junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no 1º valor (Exs.: 20 e 40 m; 56, 82,5 e 90,2%). Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais;
- 12) No texto, quando se diz que um autor citou outro, deve-se usar apud em vez de citado por. Exemplo: Walker (2001) apud Azevedo (2005) em vez de Walker (2001) citado por Azevedo (2005);
- 13) Na definição dos parâmetros e variáveis de uma equação, deverá existir um traço separando o símbolo de sua definição. A numeração de uma equação deve estar entre parêntesis e alinhada esquerda. Uma equação deve ser citada no texto conforme os seguintes exemplos: Eq. 1; Eq. 4.;
- 14) O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo 25 citações bibliográficas, sendo a maioria em revistas/periódicos recentes (os 5 anos). Seguir rigorosamente os exemplos, apresentados nestas normas, dos formatos das citações bibliográficas no texto e da listagem.
- 15) Quando o artigo for submetido não será mais permitida mudança de nome dos autores, seqüência de autores e quaisquer outras alterações que não sejam por solicitado do editor.

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.