

LÍLIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES

**CONTAGEM DE HEMÓCITOS ASSOCIADA AOS PARÂMETROS
DE HIGIEZ DE CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus vannamei***

(Boone, 1931)

RECIFE, 2008

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

LÍLIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES

**CONTAGEM DE HEMÓCITOS ASSOCIADA AOS PARÂMETROS
DE HIGIEZ DE CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus vannamei***

(Boone, 1931)

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

Orientadora:

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes

Co-orientadores:

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes

Profa. Dra. Eneida Willcox Rêgo

**RECIFE
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

G598a Góes, Lílian Maria Nery de Barros
Avaliação dos hemócitos associada aos parâmetros de higidez em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1934) cultivados / Lílian Maria Nery de Barros Góes. -- 2008.
81 f. il.

Orientadora : Emiko Shinozaki Mendes
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 639. 543

1. *Litopenaeus vannamei*
 2. Camarão
 3. Sanidade
 4. Hemolinfa
- I. Mendes, Emiko Shinozaki
 - II. Título

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária

Parecer da comissão examinadora da defesa de tese de doutorado de
LÍLIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES

**CONTAGEM DE HEMÓCITOS ASSOCIADA AOS PARÂMETROS
DE HIGIEZ DE CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus vannamei*
(Boone, 1931)**

Área de concentração: **Medicina Preventiva**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o(a) candidato(a) **LÍLIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES** como aprovado.

Recife, 02 de julho de 2008.

Orientadora: _____
Prof. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (DMV / UFRPE)

Examinador: _____
Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes - Co-orientador (DEPAq / UFRPE)
Membro Externo

Examinadora: _____
Prof. Dra. Eneida Willcox Rêgo - Co-orientadora (DMV / UFRPE)

Examinador: _____
Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos (DMV / UFRPE)

Examinadora: _____
Dra. Alitieni Moura Lemos Pereira (Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte)
Membro Externo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Lucilo Mauro de Barros Góes** (*in memoriam*) e **Lucinda Raquel Nery de Barros Góes** que sempre me apoiaram incomensuravelmente, torcendo pelo meu sucesso.

À minha irmã e sobrinhas **Luciana Góes, Joana Góes e Raquel Góes**, que encheram minha vida de amor e felicidade.

A meu marido **Rodrigo José Delgado Jardim**, que jamais permitiu que eu esmorecesse sempre me impulsionando para novas conquistas.

À minha família pelo amor, incentivo, amizade e apoio durante todo curso.

Jamais teria conseguido sem o apoio de vocês.... Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho e de forma especial:

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

- À 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 principalmente, pela atenção e apoio que nos dispensou durante todo o período do curso sempre incentivando e acreditando no nosso potencial;

- À 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 nas leituras das lâminas e avaliações clínicas realizadas;

- Ao professor Dr. George Chaves Jimenez pela solidariedade e auxílio nas interpretações clínicas do referido trabalho;

- A todos os professores e funcionários que fazem o Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial aos professores Dr. Leucio Câmara, Dra. Míriam Teixeira e Dr. Marcos Lemos pelo ensinamentos, apoio e colaboração durante todo o curso;

- À Médica Veterinária Msc. Verônica Arns da Silva pela dedicação, apoio e incondicional ajuda para realização deste experimento;

- Às Médicas Veterinárias Andréa Christianne Barretto e Ducilene Lacerda Nascimento, pela participação ativa em todas as fases da pesquisa, desde a realização das análises até a conclusão do trabalho escrito;

- À 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 aquacultura 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), Msc. Fernanda Meirelles, Msc. Ângela Lúcia, Msc. Héliida Mélo. Msc. Giana Bastos Gomes, Virgínia Pedrosa, Joanna Dourado, Bruno Nascimento, Danilo Mendes, pelo espírito de equipe, auxílio e parceria;

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

- À Luciana Góes pelo auxílio nas traduções e construção dos *abstracts*.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	8
Lista de figuras.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO I	27
6. ARTIGO CIENTÍFICO II	47

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 1 Contagem total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos em Revisão hemolinfa de camarões	21
TABELA 1 Média dos valores obtidos na contagem total de hemócitos (CTH) em Artigo II hemolinfa de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> associado aos valores preconizados pelo Centro de Serviços para la Acuicultura – CSA.....	68
TABELA 2 Relação entre a média da contagem total de hemócitos (CTH) por cel/mm ³ /dia Artigo II e sexo de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados em Pernambuco durante dois ciclos de cultivo	69

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 Hemócito hialino (HH), hemócito com grânulos grandes (HGG) e hemócitos com grânulos pequenos (HGP) de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> (objetiva de 100).....	19
Revisão	
FIGURA 1 Relação entre a contagem total de hemócitos, intervalo de tempo entre contagens e ciclos de cultivo da hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> em solução de ácido etilenodiaminotetracético de sódio a 10%.....	34
Artigo I	
FIGURA 2 Hemócitos de <i>L. vannamei</i> em solução de ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10% imediatamente após a coleta (objetiva de. 100).....	34
Artigo I	
FIGURA 3 Hemócitos de <i>L. vannamei</i> em solução de ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10% cinco horas após a coleta (objetiva de 100).....	34
Artigo I	
FIGURA 1 Relação entre a contagem total de hemócitos, a idade e o sexo dos camarões cultivados no viveiro A durante o inverno.....	70
Artigo II	
FIGURA 2 Relação entre a contagem total de hemócitos, a idade e o sexo dos camarões cultivados no viveiro A durante o verão.....	71
Artigo II	

RESUMO

O conhecimento dos valores normais das células sanguíneas é uma das mais valiosas técnicas de laboratório clínico, que permite a identificação de anormalidades morfológicas e sistêmicas, não aparentes, no organismo. Em mamíferos estes valores são amplamente conhecidos, porém em camarões, ainda há muito que se desvendar a respeito da hemolinfa. 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 dos 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 anatomo-histopatológicas, ainda são desconhecidas. Diante do exposto, objetivou-se verificar o comportamento dos hemócitos nas diferentes fases de desenvolvimento de camarões *L. vannamei* cultivados, a existência de variação quantitativa entre sexos, a eficácia do citrato de sódio e do ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) como anticoagulantes, além de sua relação com alterações detectadas aos exames a fresco e histopatológico. Semanalmente, coletaram-se 20 amostras de hemolinfa, sendo dez (cinco machos e cinco fêmeas) utilizando o anticoagulante citrato de sódio e dez utilizando o anticoagulante EDTA. As coletas foram realizadas em dois viveiros (A e B), nos períodos de inverno e verão numa carcinicultura comercial localizada em Goiana estado de Pernambuco. De cada camarão foi coletado 0,1mL de hemolinfa na proporção de 1:1 (anticoagulante com concentração de 10%:hemolinfa) para as análises de patologia clínica. As contagens de hemócitos/mm³ foram realizadas imediatamente após a coleta e após intervalo de cinco horas. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se modelos lineares múltiplos ($P < 0,05$). Todos os animais amostrados apresentaram-se hígidos, não havendo interferência significativa das alterações detectadas aos exames a fresco e histopatológico sobre a CTH. Os camarões machos apresentaram maiores CTH do que as fêmeas, assim como a idade dos animais interferiu na CTH, obtendo-se maiores contagens em animais mais velhos. Em relação à sazonalidade, os animais cultivados no inverno apresentaram maiores contagens que os cultivados no verão. Tanto o citrato de sódio quanto o EDTA preservaram adequadamente as amostras destinadas CTH imediatamente após a coleta. Conclui-se que o sexo, a idade e a sazonalidade interferem diretamente sobre a CTH e que o citrato de sódio a 10% e o EDTA a 10% são indicados para a CTH imediatamente após a coleta.

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

ABSTRACTS

The blood cells normal values knowledge is one of the most valuable clinical labs technique which allows the systemic and morphologic anomaly, when identification is not clearly shown in the organism, identification. At the mammals medicine these values are great known, but on the shrimp culture there still be too much to clear up about haemolymph. Several studies have been realized aiming determines the different kinds of cells and their respective functions. However, the important information like the normal values of the hemocytes total counting (HTC) in different development phases to the *Litopenaeus vannamei* species and the existence of hemocytes behavior variations on males and females, as well as its relation to anatomo-histopatologic alterations, still being unknown. In face of the exposed, it was aimed to verify the hemocytes behavior on the different cultivated *L. vannamei* shrimp development phases, the sexual quantitative variation existence, the sodium citrate and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) efficacy as anticoagulant, beyond its relation to the detected alterations at the fresh and histopathology exams. 20 samples of haemolymph were collected weekly, being ten (five males and five females) using the sodium citrate anticoagulant and ten using the EDTA anticoagulant. The collects were realized in two aquariums (A and B), on summer and winter times at a commercial shrimp culture located in Goiana/Pernambuco estate. 0,1mL of haemolymph on a proportion of 1:1 (anticoagulant with 10% concentration:haemolymph) were collected from each shrimp to clinical pathology analyses. The hemocytes/mm³ counting was realized immediately after the collect and after a five hours interval. The results were statistically analyzed using multiple linear moulds ($P < 0,05$). The entire sample animals showed themselves healthy doesn't presenting significant interference of the detected alterations on the fresh and histopathology exams over the HTC. The male shrimps presented bigger HTC than the females, thus the animals age interfered at the HTC, getting bigger counting on elder animals. In relation to the seasonality, the winter cultivated animals presented bigger counting than the summer cultivated. Both the sodium citrate and the EDTA preserved correctly the samples designated to HTC immediately after the collect. It was concluded that the sex, the age and the seasonality interfere directly over the HTC and the sodium citrate at 10% and the EDTA at 10% are indicated to the HTC immediately after the collect.

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

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos valores normais das células sanguíneas é uma das mais valiosas técnicas de laboratório clínico, que permite a identificação de anormalidades morfológicas e sistêmicas, não aparente, no organismo. Na medicina veterinária, esses valores são amplamente conhecidos para mamíferos, não ocorrendo o mesmo para peixes e crustáceos.

Os crustáceos pertencem a um grupo zoológico com mais de 40.000 espécies, sendo a maioria aquática. Este grupo inclui camarões, lagostas, lagostins, caranguejos e siris, todos bastantes apreciados para o consumo humano, conforme relatos de Ranzine-Paiva e Silva-Sousa (2004). Neste contexto, a criação de camarões em cativeiro, carcinicultura, despontou como uma atividade bastante atrativa, que enfrenta, nos últimos anos, problemas severos com enfermidades de etiologias diversas.

A hemolinfa dos crustáceos é constituída por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração humoral, o plasma. De acordo com Soderhäll e Smith (1983), os crustáceos decápodes possuem grandes populações de hemócitos circulantes, os quais têm função de metabolismo de carboidratos, transporte e armazenamento de lipoproteínas e aminoácidos, reparo de lesões e injúrias, coagulação e defesa contra invasão de microrganismos e parasitos.

Apesar de não haver uma classificação uniforme e universalmente aceita, três tipos de hemócitos são descritos em crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (BAUCHAU, 1981). Barracco (2004) ressaltou que a falta de uniformidade na identificação dos hemócitos deriva principalmente do fato destas células serem bastante lábeis e reativas, alterando rapidamente suas características morfofisiológicas *in vitro*, o que torna seu estudo ainda mais difícil do que o dos leucócitos dos vertebrados.

Nos camarões, ainda há muito que se desvendar a respeito da hemolinfa. Muitos estudos têm sido realizados visando determinar os diferentes tipos celulares e suas respectivas funções. Entretanto, 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 histopatológicas, ainda são desconhecidas.

A identificação dos valores normais para CTH em camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, juntamente com os achados histopatológicos e resultados bacteriológicos correlacionados a sazonalidade, 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 nos 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 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a contagem total de hemócitos (CTH) de camarões *Litopenaeus vannamei* em diferentes fases do cultivo;
- Identificar a influência do sexo, peso, idade e sazonalidade na contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei*;
- Avaliar a eficácia dos anticoagulantes citrato de sódio a 10% e do ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10% nas análises hematológicas;
- Correlacionar os dados hematológicos com os achados histopatológicos;

3. REVISÃO DE LITERATURA

A aquíicultura destaca-se no cenário mundial como uma atividade produtora de alimento de alto valor nutritivo e em grande escala, contribuindo, desta forma, para o crescimento do agronegócio e diminuição do déficit na produção de alimentos do mundo.

Dentre as atividades da aquíicultura, destaca-se a carcinicultura, que a partir dos anos 90 despontou no cenário nacional como uma atividade altamente rentável e promissora. A promessa de grandes lucros ocasionou um crescimento desordenado da atividade por empresários pouco especializados no assunto. Este fato resultou na super exploração dos cultivos, com altas densidades e grande nível de estresse dos animais (MENDES et al., 2005), com conseqüentes problemas sanitários.

Segundo Brock (1986), o confinamento de animais e a necessidade da utilização de altas densidades de estocagem ocasionam o estabelecimento de várias doenças de etiologia infecciosa e não-infecciosa devido ao elevado nível de estresse dos animais. De acordo com o autor, os agentes estressantes podem ser de ordem física, química ou biológica (infeccioso ou nutricional) e o contato com estes agentes culmina na redução da resistência dos animais e no aumento da ocorrência e severidade de inúmeras enfermidades.

O estresse causa depressão no sistema imunológico dos camarões, gerando animais débeis e frágeis, susceptíveis a agentes patógenos presentes no ambiente. Figueiredo et al. (2008) destacaram que a menor capacidade dos animais estressados responderem aos desafios do ambiente, está associada a mudanças em seu perfil hormonal, caracterizado principalmente pelo aumento dos níveis de glicose, catecolaminas (estresse agudo) e cortisol (estresse crônico), o que leva a susceptibilidade às infecções. 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.

Os invertebrados são considerados animais primitivos 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). Maldonado et al. (2004) destacaram que a primeira linha de defesa dos crustáceos é a cutícula, a qual consiste numa barreira física e biologicamente ativa,

estando associada a atividade microbicida. De acordo com estes autores, o reconhecimento do não-próprio estimula a resposta de defesa, sendo um mecanismo de defesa inato.

Classicamente, o sistema imune é dividido em inato (ou inespecífico) e adaptativo (ou específico), os quais atuam de maneira conjunta para destruir os agentes invasores e controlar a disseminação dos mesmos pelo organismo. A resposta inata, em geral, precede a resposta imune adaptativa. Destaca-se que o sistema imune dos camarões não tem capacidade de montar uma resposta imune específica contra patógenos, não detendo a capacidade de produzir anticorpos e por isso, esses animais desenvolveram outros mecanismos para detectar e responder às infecções bacterianas e virais (FIGUEIREDO et al., 2008).

As reações de defesa dos invertebrados, incluindo o camarão, estão relacionadas a sua hemolinfa. Esta é caracterizada por se constituir em um tecido fluido de coloração azul-esverdeada (MALDONADO et al., 2004), composto por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração líquida, o plasma (PERAZZOLO, 1994). A fisiologia de camarões peneídeos, assim como a hematologia destes crustáceos, ainda apresenta lacunas que precisam ser desvendadas. Estudos relacionados ao comportamento dos hemócitos durante a fase de ecdise ainda são escassos, podendo-se citar os de Moullac et al. (1997) com *Penaeus stylirostris*, Tsing et al. (1989) com *Penaeus japonicus* e Hose et al. (1992) com *Sicyonia ingentis*.

Em relação à interferência da ecdise sobre a dinâmica da hemolinfa, Pathak (1985) descreveu o comportamento dos hemócitos de insetos durante a fase de muda, em que há uma diminuição repentina do volume sanguíneo após a ecdise, possibilitando a adesão de um grande número de hemócitos aos tecidos. Provavelmente, o retorno dos hemócitos para a circulação ocorra quando o volume sanguíneo retorna ao normal depois da alimentação que, usualmente, tem duração de um estágio.

Moullac et al. (1997) observaram, nos diferentes estágios da ecdise (pré-muda, inter-muda e pós-muda), o comportamento dos hemócitos de *Penaeus stylirostris* e detectaram variações significativas na contagem total de hemócitos (CTH) entre as fases da pré-muda e inter-muda, sendo as menores contagens obtidas na inter-muda. Todavia, os autores salientaram que em relação à contagem diferencial, as maiores contagens para os HGG foram obtidas na inter-muda.

Crossley (1968) relatou que o número de hemócitos circulantes em hemolinfa de insetos é resultado do balanço dinâmico entre quatro fatores: (a) mitoses dos hemócitos na circulação, (b) morte ou fragmentação dos hemócitos da circulação, (c) liberação ou retenção de hemócitos nos reservatórios hemocíticos e (d) liberação de hemócitos pelos tecidos hematopoiéticos. É importante destacar que não há relatos na literatura específica com ênfase para crustáceos aquáticos.

Dentre as funções dos hemócitos estão a resposta inflamatória, de defesa contra agentes externos e de coagulação (BARBIERI e OSTRENSKY, 2002). Em relação à oxigenação, a hemocianina é a proteína respiratória responsável pelo transporte de oxigênio, constituindo 60-95% da proteína total do plasma (MALDONADO et al., 2004). São conhecidas pelo menos quatro tipos de reações celulares de defesa: fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento e cicatrização de ferimentos. Destaca-se que vários autores (ABBAS et al., 1991; ROCH, 1999 e MALDONADO et al., 2004) descreveram semelhanças morfológicas e funcionais dos hemócitos com os glóbulos brancos dos vertebrados.

De acordo com Barracco (2004), a fagocitose constitui-se no englobamento do antígeno com conseqüente interiorização e destruição pelos hemócitos através de vários mecanismos degradativos e microbicidas. Ainda existem controvérsias sobre qual ou quais os tipos de hemócitos envolvidos diretamente no processo fagocítico. Soderhäll et al. (1986) e Muñoz et al. (2002) defenderam a participação dos hemócitos hialinos, entretanto Hose et al. (1990) e Gargione e Barracco (1998) atribuíram esta função aos granulócitos.

A formação de nódulos, segundo Millar e Ratcliffe (1994), desencadeia-se quando a cavidade corpórea do crustáceo (hemocele) é invadida por uma grande quantidade de microrganismos. Estes são aprisionados por várias camadas de hemócitos com a finalidade de impedir sua disseminação dentro da cavidade corpórea, podendo-se observar dentro dos nódulos áreas de necrose e sinais de fagocitose celular. As cápsulas hemocíticas se assemelham aos nódulos e são formadas quando o organismo invasor (helmintos, parasitos, hifas de fungos ou protozoários) é de tamanho grande, sendo necessária migração dos hemócitos para a área parasitada. Várias camadas de hemócitos imobilizam e segregam o organismo invasor dos tecidos do hospedeiro (MILLAR e RATCLIFFE, 1994).

De acordo com Perazzolo (1994), é extremamente confusa a terminologia utilizada para a identificação e classificação dos hemócitos de decápodes, por dificilmente ser possível estabelecer comparações entre as diferentes espécies. Por isso, tende-se a classificar os hemócitos dos crustáceos com base em aspectos morfofisiológicos. Ressalta-se que a maioria dos autores não leva, muitas vezes, em consideração que estes tipos celulares têm uma estrutura morfológica dinâmica conforme a fase de desenvolvimento e de atividade fisiológica. Van de Braak et al. (1996) destacaram ainda que as diferentes metodologias empregadas pelos pesquisadores dificultam maior discussão sobre este tema.

A classificação mais atualizada dos hemócitos circulantes dos decápodes foi realizada por Hose et al. (1990), que propuseram três tipos básicos (Figura 1): hemócitos hialinos (HH), hemócitos com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos com grânulos grandes (HGG). Dentre estes tipos celulares, os autores destacaram que os HH, normalmente apresentam grande variabilidade morfológica e podem ser diferenciados dos demais devido ao pequeno tamanho, a forma ovalada, a grande relação núcleo-citoplasmática e ao citoplasma tipicamente eletrôn-denso. Hose et al. (1990), Hose e Martins (1989) e Omori et al. (1989) destacaram que os HH pertencem a uma linhagem celular distinta dos hemócitos granulares, estando essencialmente relacionados aos mecanismos de coagulação, entretanto, Van de Braak et al. (2002) citaram que a efetiva ocorrência de uma ou mais linhagens de hemócitos em crustáceos é ainda controversa.

Quanto à diferenciação dos granulócitos, Bauchau (1981) classificou os HGP ou semi-granulares como células sob forma ovalada a fusiforme, contendo grande quantidade de grânulos pequenos e os HGG ou granulares, sob forma ovalada com grânulos grandes e eletron-densos no interior do citoplasma, altamente refringentes ao microscópio de contraste de fase. Soderhäll e Cerenius (1992) e Gargioni e Barracco (1998) relataram que os HGP são células imaturas capazes de amadurecer e se transformarem em HGG na hemolinfa e, de acordo com Johansson e Söderhäll (1989), Gargione e Barracco (1998) e Destoumieux et al. (2000), estariam envolvidos principalmente na fagocitose de microrganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas tóxicas e microbicidas capazes de destruir patógenos invasores.

A exemplo dos vertebrados, os invertebrados possuem o sistema imune dividido em reações celulares e humorais (ABBAS et al., 1991). As lectinas, os fatores anti-bacterianos

(lisozimas) e o sistema pró-fenoxidase constituem a resposta humoral dos camarões (PERAZZOLO, 1994).

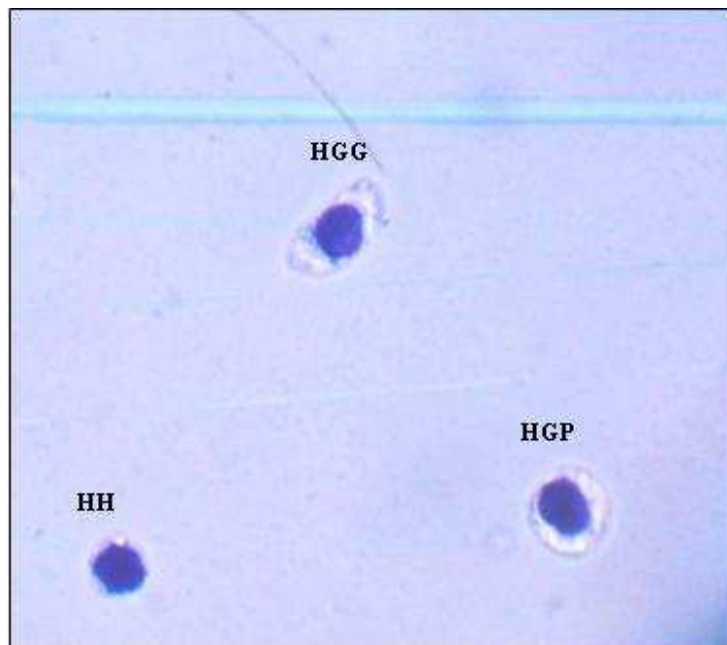


Figura 1: Hemócito hialino (HH), hemócito com grânulos grandes (HGG) e hemócitos com grânulos pequenos (HGP) de camarões *Litopenaeus vannamei* (objetiva de 100).

Olafsen (1988) relatou que as lecitinas são proteínas e/ou glicoproteínas que reconhecem estruturas da superfície de diferentes patógenos, ligando-se aos carboidratos. Muitas lecitinas causam aglutinação de diferentes tipos celulares, podendo representar um sistema imune primitivo de reconhecimento do não-próprio, de acordo com Söderhall e Cerenius (1992).

Em relação aos fatores anti-bacterianos da hemolinfa, Chaswick e Dunphy (1986) citaram que o plasma dos invertebrados apresenta, em geral, leve atividade antimicrobiana, decorrente fundamentalmente das lisozimas. Todavia, Hoffman e Hoffman (1990) observaram o aparecimento de outras proteínas induzíveis, além das lisozimas, em algumas espécies de artrópodes. Segundo Perazzolo (1994), os peptídeos antibacterianos são comprovadamente induzíveis em insetos, fato que despertou o interesse de pesquisas na área da imunologia em crustáceos cultivados.

O sistema pró-fenoloxidase consiste numa seqüência de reações enzimáticas em cascata iniciada, por exemplo, por polissacarídeos da parede microbiana. Estes polissacarídeos induzem a atividade de uma ou mais serino-proteases intracelulares, que clivam a pró-enzima inativada, pró-fenoloxidase (proPO), para a sua forma ativa (PO), culminando na produção do pigmento melanina. Frequentemente, é possível visualizar reações de melanização nas respostas de defesa contra invasão de parasitas que penetram na hemocele de insetos e crustáceos (PERAZZOLO, 1994).

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). Bachère (2000) destacou que o desenvolvimento de soluções anticoagulantes específicas nos últimos anos possibilitou avanços nos estudos dos hemócitos. Todavia, a maioria dos autores (PERAZZOLO, 1994; PERAZZOLO et al., 2002; ALBORES et al., 2005) utilizaram soluções anticoagulantes compostas por várias substâncias, de difícil preparo e aplicação em fazendas.

Os anticoagulantes são substâncias usadas para prevenir a coagulação e retardar a deterioração do sangue, podendo a escolha inapropriada destes interferir nas investigações bioquímicas e nas determinações quantitativas. Alguns anticoagulantes se prestam melhor à hematologia pelas suas propriedades conservadoras da morfologia celular e dos componentes do plasma, especialmente os fatores da coagulação. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é o anticoagulante de eleição para as análises hematológicas em humanos por ser um excelente preservador, impedindo a coagulação ao formar quelatos com o cálcio (FERREIRA NETO et al., 1978). Outro anticoagulante bastante utilizado em transfusões e hemossedimentação é o citrato de sódio, que atua combinando-se com o cálcio para formar citrato de cálcio insolúvel. O citrato de sódio é bastante utilizado nas carcinoculturas, todavia previne a coagulação por poucas horas e interfere em muitos testes químicos de acordo com Ferreira Neto et al. (1978).

Henning et al. (1999) avaliaram a contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados em diferentes salinidades no estado do Ceará e concluíram que a salinidade da água de cultivo influenciou diretamente na CTH, sugerindo o uso desta ferramenta para a avaliação do grau de estresse dos camarões

cultivados e, possivelmente, na seleção de reprodutores, considerando os animais com maiores contagens mais resistentes.

O Centro de Serviços para a Aquicultura (CSA, 2006) destacou a importância da hemolinfa como um indicador da saúde geral dos animais, por possibilitar a detecção precoce de problemas patológicos. Valores obtidos na contagem total de hemócitos (CTH) e contagem diferencial de hemócitos (CDH) considerados ideais para camarões saudáveis, bem como valores de animais com suspeita de alterações patológicas, propostos pelo CSA, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Contagem total de hemócitos e contagem diferencial de hemócitos em hemolinfa de camarões.

Contagem total de hemócitos (CTH)	Conceito	Contagem diferencial de hemócitos (CDH)	Conceito
<5 x 10 ⁶ hem/mL	Muito baixo	<10% de HH	Baixo
5 x 10 ⁶ hem/mL	Baixo	>10% HH	Regular
10-15 x 10 ⁶ hem/mL	Regular	>20% HH	Bom
15-20 x 10 ⁶ hem/mL	Bom	>35% HH	Muito bom
>20 x 10 ⁶ hem/mL	Muito bom	>20% de deformidades	Problema com os animais

* HH – Hemócitos hialinos

Adaptado de CSA (2006)

Ainda há muito que se pesquisar 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 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, ainda são desconhecidas.

4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. 417p.

ALBORES, F.V. et al. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* e *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. **Aquaculture Research**, Oxford, v.36, p.352-360, 2005.

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

BARBIERI, R.C.; OSTRENSKY A. N. **Reprodução, maturação e larvicultura. Camarões marinhos**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. v.1, 258p.

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.

BAUCHAU, A.G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (Ed.) **Invertebrate blood cells**. London: Academic Press Inc., v.2, p. 385-420. 1981.

BROCK, J.A. **An introduction to shrimp diseases**. Guayaquil: Escuela Superior Politecnica del Litoral, 1986. 13p.

CHASWICK, J.S.; DUNPHY, G.B. Antibacterial and antiviral factors in arthropods hemolymph. In: GUPTA, A. P. **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. New York: John Wiley e Sons, 1986. cap.10, p.287-330.

CROSSLEY, A.C. The fine structure and mechanism of breakdown of larvae intersegmental mucies int the biowfly *Calliphora erythrocephala*. **Journal of Insect Physiology**, Ohio: Pergamon, v.14, p. 1389-1407, 1968.

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.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, antimicrobial, peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Biochemistry**, Tóquio, v. 266. p. 335-346. 2000.

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

FIGUEIREDO, H.C.P. et al. Imunidade de animais aquáticos. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.18, n.106, Março/abril, p.14-19. 2008.

GARGIONE, R.; BARRACCO, M.A. Haemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosebergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, New York, v.236, p. 209-221, 1998.

JOHANSSON, M.W.; SÖDEHÄLL, K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.5, n.6, p.171-176. 1989.

HENNING, O. L. et al. Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado em diferentes salinidades. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA (CONBEP), 11.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA (CONLAEP), 1., 1999, Olinda. **Anais...** Olinda, 1999. p.589-593.

HOFFMAN, J.A.; HOFFMAN, D. The inducible antibacterial peptides of dipteran insects. **Research in immunol**, Paris, v.141, p.910-918, 1990.

HOSE, J.E. et al. Pattern of haemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Biological Bulletin**, Woods Hole, n.183, p.185-199. 1992.

HOSE, J.E. et al. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. **Biologic Bulletin**, Woods Hole, v.178, p.33-45. Feb. 1990.

HOSE, J.E.; MARTINS, G.G. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.53, p.335-346, 1989.

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.

MALDONADO, M. et al. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. **Revista AquaTIC**, [s.l.], n.21, p.78-91, 2004.

MENDES, E.S. et al. Os víbrios na carcinicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**, São Paulo: v. 91. set/out. p.26-29 2005.

MILLAR, D.A.; RATCLIFFE, N.A. Invertebrates. In: TURNER, R.J. (Ed.) **Immunology: a comparative approach**. Chichester: John Wiley e Sons. p.46-51. 1994.

MOULLAC, G. et al. 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. 1997.

MUÑOZ, M. et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, New York, v.269. p. 2678-2689. 2002.

OLAFSEN, J. A. Role of lectins in invertebrate humoral defense. **Newsletter American Fisheries Society**, Washington, US, v.1, p.189-205, 1988.

OMORI, S.A. et al. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. **Cell and Tissue Research**, New York, v.255, p.117-123, 1989.

PATHAK, J.P.N. Haemogram and its endocrine control in insects. In: BREHÉLIN M. (Ed.). **Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions**. Berlin: Springer-Verlag. 1985. p.49-59.

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.

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

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, Amsterdam, n.172, p. 125-145, 1999.

SODERHÄLL, K.; SMITH, V.J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental and Comparative Immunology**. v.7, p. 229-239, 1983.

SODERHÄLL, K. et al. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of 2 crustaceans – evidence for cellular cooperation in the defense reactions of arthropods. **Cells and Tissue Research**, New York, v.245. p. 43-49, 1986.

SODERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Annual Review of Fish Disease**, v.2, p. 3-23, 1992.

TSING, A. et al. Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. **Journal of Invertebrates Pathology**, San Diego, n.53, p. 64-77.1989.

VAN DE BRAAK, C.B.T. et al. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus Monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. **Comparative Haematology International**, London: Springer-Verlag, v.6, p.194-203. 1996.

VAN DE BRAAK, C. B. T. et al. The roles of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish and Shellfish Immunology**, Aberdeen: Academic press, n.12, p.253-272. 2002.

5. ARTIGO I

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado **“CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus vannamei* CONSERVADOS COM ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO DE SÓDIO”** (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

**“CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES MARINHOS
Litopenaeus vannamei CONSERVADOS COM ÁCIDO
ETILENODIAMINOTETRACÉTICO DE SÓDIO”**

Manuscrito a ser submetido à

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

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

**Contagem total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*
conservados com ácido etilenodiaminotetracético de sódio¹**

*Hemocytos total counting on Litopenaeus vannamei marine shrimps conserved with sodium
ethylenediaminetetraacetic acid*

Lílian M.N.B. Góes^{1,3}, Andréa C.G.Barretto^{1,3}, Verônica A. Silva¹, Ducilene L.
Nascimento¹, Paulo P. Mendes², Emiko S. Mendes¹.

¹Depto. de Medicina Veterinária/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, SN. 52171-900, Dois Irmãos,
Recife/PE/Brasil, fone/fax: 081 33206404, lablasaq@yahoo.com.br

²Depto. de Pesca e Aquicultura/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, SN. 52171-900, Dois Irmãos,
Recife/PE/Brasil, fone/fax: 081 33206515, lablasaq@yahoo.com.br

³Pós-graduandas bolsistas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Resumo

A utilização de anticoagulantes para processamento de contagens de células sanguíneas, incluindo-se a hemolinfa de camarões, é indispensável frente à rápida coagulação dos hemócitos. Dentre as substâncias que tem atuação anticoagulante, destaca-se o ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA), cuja eficácia na preservação dos hemócitos de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, cultivados, bem como o período de viabilidade das amostras preservadas para a contagem global (CTH) foram avaliados. Em 140 amostras de hemolinfa com EDTA a 10%, na proporção de 50% (1:1), coletadas em dois ciclos de cultivo, no período de estio (verão) e no chuvoso (inverno), realizaram-se CTH imediatamente e cinco horas após a coleta. Para todas as informações obtidas e análises realizadas foram utilizadas as técnicas de modelagem matemáticas ($P < 0,05$). Observou-se grande decréscimo no número de hemócitos nas contagens realizadas após cinco horas da coleta, assim como interferência direta da sazonalidade sobre as contagens. Conclui-se o anticoagulante

¹ Trabalho extraído de tese.

ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) na concentração de 10% viabiliza a hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* para a contagem total de hemócitos e a avaliação citomorfológica logo após a coleta.

Palavras-chave: Hemócitos, hemolinfa, anticoagulante.

Abstract

The use of anticoagulants to the blood cells counting process, including the shrimp haemolymph, is indispensable face to the quick hemocytes coagulation. Among the substances that acts as anticoagulants, the sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is highlighted, which efficacy on marine shrimps hemocytes preservation, *Litopenaeus vannamei*, cultivated, as well as the preserved samples viability period to the global counting (HTC) were evaluated. On 140 haemolymph samples with EDTA at 10%, at the proportion of 50% (1:1), collected in two cultivate cycles, at the dry and rainy periods, HTC was realized immediately and five hours after the collect. For all the obtained information and realized analysis were used the mathematic mould techniques ($P < 0,05$). A great decrease was noticed at the realized counting after five hours from collect, such as the direct seasonality interference on the counting. It was concluded that the EDTA anticoagulant at 10% makes possible the *Litopenaeus vannamei* shrimp haemolymph on a proper way to the hemocytes total counting and the citomorphologic evaluation as soon after the collect.

Key-Words: Haemocytes, haemolymph, anticoagulant.

INTRODUÇÃO

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre sangue e, grande parte das informações, consiste em medidas de valores e parâmetros em condições orgânicas normais e anormais. A aplicação da hematologia em pesquisa

animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnóstico (Ranzine-Paiva & Silva-Sousa, 2004). Contudo, em aquicultura ainda são poucos os trabalhos relacionados à esta área.

O tecido sanguíneo dos artrópodes é denominado hemolinfa, o qual é responsável pela nutrição, oxigenação e defesa dos invertebrados, dentre os quais se destacam os crustáceos. Os hemócitos constituem sua fração celular e o plasma a fração humoral. De acordo com Perazzolo et al. (2002), a contagem de hemócitos circulantes é uma ferramenta de monitoramento da saúde devido a maioria das enfermidades infecciosas modificarem a composição da hemolinfa dos crustáceos.

Bachére (2000) destacou que o desenvolvimento de soluções anticoagulantes específicas nos últimos anos possibilitou avanços nos estudos dos hemócitos de crustáceos. Alguns autores, como Perazzolo et al. (2002) e Albores et al. (2005) utilizaram soluções anticoagulantes compostas por várias substâncias, de difícil aplicação em fazendas devido às condições do seu preparo.

Os anticoagulantes são substâncias usadas para prevenir a coagulação e retardar a deterioração do sangue, podendo a escolha inapropriada destes interferir nas investigações bioquímicas e nas determinações quantitativas. Dentre os anticoagulantes destaca-se o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o qual é um composto orgânico que atua formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos (manganês, cobre, ferro e cobalto), sendo amplamente usado como preservante do sangue, por inativar os íons de cálcio, que promovem a coagulação sanguínea. Ressalta-se que o EDTA é o anticoagulante de eleição para as análises hematológicas em humanos (Ferreira Neto et al., 1978).

Maldonado et al. (2004) salientaram que a rápida coagulação é um processo importante nos crustáceos aquáticos para prevenir perdas substanciais de hemolinfa e evitar o ingresso de microrganismos na hemocele. Por isso, a utilização de anticoagulantes para a preservação das amostras de hemolinfa faz-se necessário, principalmente quando se deseja quantificar hemócitos. Desta forma, objetivou-se avaliar a eficácia do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) na preservação dos hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados, assim como verificar o período de viabilidade das amostras de hemolinfa preservadas com este anticoagulante para realização de contagem total de hemócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Camarões da espécie *L. vannamei* foram capturados de dois viveiros de terra (A e B) de uma carcinicultura comercial, situada no município de Goiana/Pernambuco/BR. As coletas foram realizadas semanalmente, de 10 animais totalizando 140, durante dois ciclos de cultivo (início do período de estio - set a out/2007 e início do período chuvoso - fev a mar/2008).

Imediatamente após a captura, os camarões foram transportados vivos ao laboratório da propriedade, onde foram pesados e clinicamente examinados seguindo o método de exame a fresco preconizado por Morales-Covarrubias (2004). Após a confirmação da higidez dos animais coletou-se hemolinfa, de cada animal, na quantidade de 0,1mL, por meio de uma seringa estéril de 1mL contendo 0,1mL do anticoagulante EDTA a 10%. (Schalm et al., 1975; Jain, 1993; Coles, 1984; Duncan, 1982 e Hendrix, 2006). A extração da hemolinfa foi realizada por punção na câmara hemolinfática, localizada na região ventral do abdômen, realizando-se anteriormente a desinfecção da região abdominal com algodão embebido com álcool 70°GL.

Foram realizadas contagens total de hemócitos (células/mm³) imediatamente após a coleta no laboratório da fazenda e depois de cinco horas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq/UFRPE), de maneira semelhante à descrita por Schalm (1974) para eritrócitos de mamíferos em câmara de Neubauer, sendo adaptado para hemolinfa diluída na proporção de 1:1 (hemolinfa:anticoagulante) através da fórmula abaixo descrita:

$$NH = 150.000 \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{5}$$

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

Realizaram-se esfregaços de hemolinfa para avaliação citomorfológica, conforme o método preconizado por Carvalho (1999). Utilizou-se o conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia “Instant Prov” da Newprov.

Para relacionar a contagem total de hemócitos (CTH) nos camarões em função do intervalo de tempo entre contagens (ITC_{0h} e ITC_{5h}), do viveiro (A e B), dos ciclos de

cultivo (estio e chuvoso), da higidez dos animais amostrados (ENF) e da idade dos camarões (Id), utilizou-se o modelo matemático I:

$$CTH^{\lambda}_i = \beta_0 + \beta_1 ITC_i + \beta_2 V_i + \beta_3 CL_i + \beta_4 ENF_i + \beta_5 Id_i + \varepsilon_i$$

Em que: CTH – contagem total de hemócitos; $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_5$ - parâmetros do modelo; ITC – intervalo de tempo entre contagens (horas); V – viveiro amostrado; CL – ciclo de cultivo; ENF – enfermidades; Id - idade dos camarões (dias); 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 ($P < 0,05$) no modelo o processo de *Stepwise (forward)*, 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 idade. Para a variável enfermidade (ENF), os resultados obtidos no exame a fresco e histopatológicos foram interpretados como 1 apenas quando detectada alguma alteração. Associado ao processo de *Stepwise* foi utilizado o transformador de Box e Cox (Box & Cox, 1964), objetivando minimizar a variância experimental. Para realizar os cálculos utilizou-se o pacote Estatístico SysEapro versão 1,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao relacionar a contagem total de hemócitos em função intervalo de tempo entre contagens, do viveiro, dos ciclos de cultivo, da higidez dos animais amostrados e da idade dos camarões para avaliar a eficácia do EDTA obteve-se a equação I.

$$CTH = (934,8933 + 420,5828 ITC_{0h} + 1604,4707 chuvoso)^2$$

Em que: CTH – Contagem total de hemócitos (cel/mm^3); ITC_{0h} – Contagem de hemócitos imediata à coleta; Chuvoso – inverno.

Destaca-se que apesar de aparentemente baixo o índice determinístico ($R^2 = 63,73\%$) é significativo, visto que o experimento foi realizado a campo. De acordo com a equação I, verificam-se maiores contagens nas amostras processadas imediatamente após as coletas (Figura 1), evidenciando a inadequação do armazenamento de hemolinfa para processamento posterior. As contagens verificadas no período chuvoso, que variaram de $1,2 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ hemócitos por mm^3 , foram maiores do que as do período de estio, que variaram de $0,34 \times 10^6$ a $0,52 \times 10^6$ hemócitos por mm^3 .

Van de Braak et al. (1996) destacaram a dificuldade de comparação dos resultados obtidos em CTH com as demais pesquisas e revisões da área, devido às diferenças entre

métodos adotados. Adverte-se que não há relatos de estudos com a utilização apenas do EDTA na preservação de hemócitos de camarões, o que dificulta maiores comparações.

Em relação à avaliação citomorfológica, o EDTA conservou adequadamente a hemolinfa como pode ser observado na Figura 2. No entanto, não houve preservação dos hemócitos por um período de cinco horas (ITC_{5h}) como pode ser observado na Figura 3, detectando-se diferença de 110% e de 35% entre as contagens imediatas e as realizadas após intervalo de cinco horas nos períodos de estio e chuvoso, respectivamente.

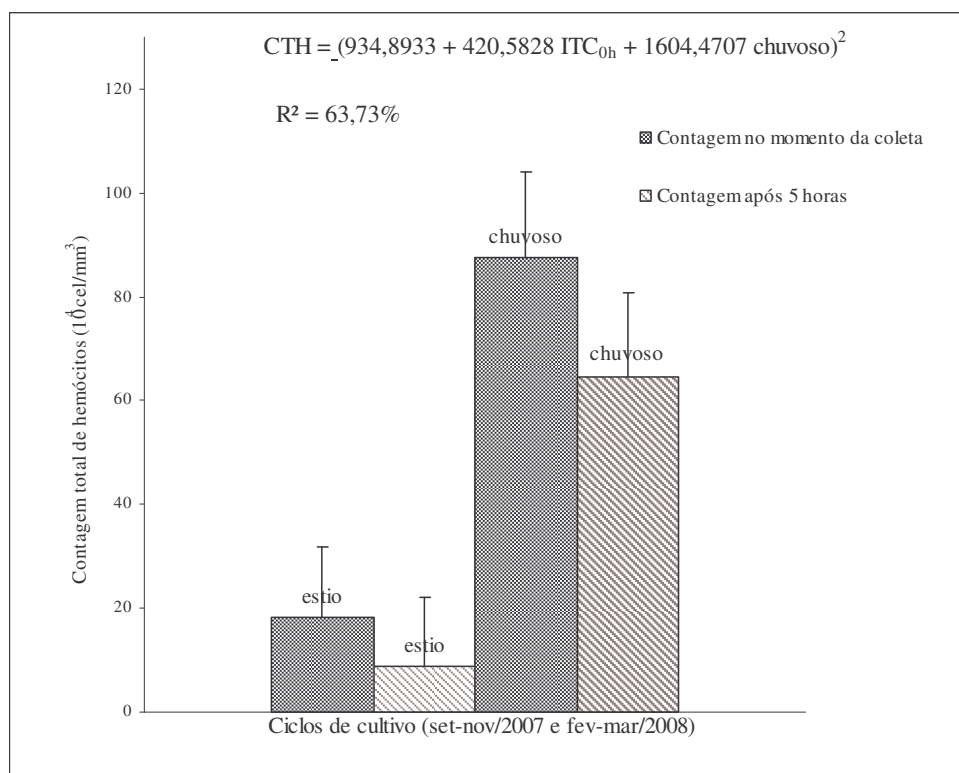


Figura 1: Relação entre a contagem total de hemócitos, intervalo de tempo entre contagens e ciclos de cultivo da hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* em solução de ácido etilendiaminotetracético de sódio a 10%

Figure 1: Relationship between haemocyte total counting, counting time and cultivar cycles of *Litopenaeus vannamei* haemolymph with sodium ethylenediaminetetraacetic acid at 10%

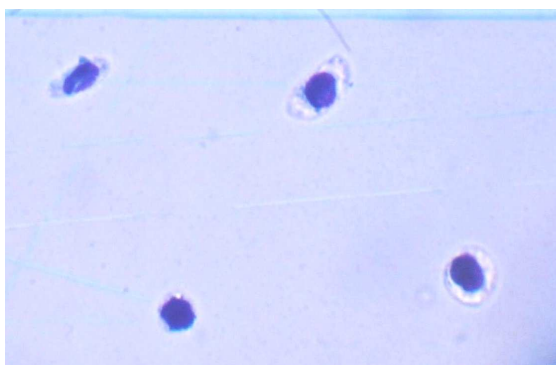


Figura 2: Hemócitos de *L. vannamei* em solução de ácido etilendiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10% imediatamente após a coleta (obj. 100)

Figure 2: *L. vannamei* haemocytes with sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 10% after the collection (obj 100)

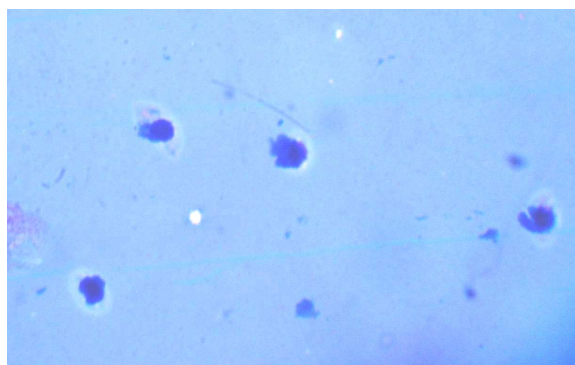


Figura 3: Hemócitos de *L. vannamei* em solução de ácido etilendiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10% cinco horas após a coleta (obj. 100)

Figure 3: *L. vannamei* haemocytes with sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 10% five hours after the collection (obj 100)

Barracco (2004) ressaltou que a falta de uniformidade na identificação de hemócitos deriva principalmente do fato destas células serem muito lábeis e reativas, alterando rapidamente suas características morfológicas *in vitro*, o que torna seu estudo mais difícil quando comparado ao exame dos vertebrados. Van de Braak et al. (2000) ressaltaram que a microscopia óptica, aliada à microscopia eletrônica, permitiu uma classificação mais segura dos tipos celulares, podendo ser o primeiro passo para a melhor obtenção de uma maior uniformidade na caracterização dos hemócitos de camarões. Ressalta-se que foi possível diferenciar os hemócitos à microscopia óptica conforme descrição de Van de Braak (2002).

Foi constatada diferença significativa nas contagens entre as estações do ano, com os camarões avaliados no período chuvoso apresentando mais hemócitos e, provavelmente, com maior imunidade que os animais examinados no período de estio. Este resultado vem de encontro com a afirmação de Moullac et al. (1997), de que camarões com alto número de hemócitos resistem melhor às infecções do que aqueles com baixo número de hemócitos.

Oliver & Fisher (1995) citaram que fatores ambientais, como o aumento da salinidade e da temperatura da água, podem alterar a CTH em ostras *Crassostrea virginica* na natureza. A média da salinidade da água dos viveiros variou de 33,16‰ (estio) a 36,06‰ (chuvoso) no viveiro A com aumento de 8% entre os períodos e de 33,94 (estio) a 39,95‰ (chuvoso) no viveiro B com aumento de 17% entre os períodos, o que também justifica a variação das contagens entre as estações.

Em relação à temperatura da água, houve variação de 27,40 a 33°C (média de 30,45°C) no período de estio e de 25,60 a 31,70°C (média de 28,8°C) no período chuvoso no viveiro A e de 28,10 a 32,80°C (média de 30,44°C) no período de estio e de 10 a 31,20°C (média de 28,47°C) no período chuvoso no viveiro B. Podem-se associar as baixas contagens obtidas no período de estio à elevada temperatura da água, a qual ocasionou estresse térmico nos camarões culminando na imunossupressão observada na Figura 1. Destaca-se a afirmação de Figueiredo et al. (2008) de que no Nordeste brasileiro, a temperatura da água pode atingir ou ultrapassar 30°C no período do verão, provocando situação de estresse nos animais. Esses autores reforçaram ainda que animais heterotérmicos (não possuem capacidade de manter a temperatura corporal estável) em águas com temperaturas fora da sua faixa de conforto, têm o consumo alimentar diminuído, o que reforça a imunossupressão. Todavia, Van de Braak et al.

(1996) explicaram que a interferência do aumento da temperatura pode elevar a CTH devido ao aumento do ritmo e da força de bombeamento do coração.

Owens & O'Neill (1997) também perceberam diferenças significativas na contagem de hemócitos em camarões *Penaeus monodon* quando compararam a produção entre as estações do ano (inverno e verão) e obtiveram diminuição nas contagens diferenciais de granulócitos realizadas no inverno. Enfatiza-se que esses autores não observaram hemocitopenia, porém substituição dos granulócitos por não-granulócitos, associando este fato à ativação do sistema pró-fenoxidase, ou seja, ocorrência de enfermidade. É importante destacar que na região onde esses autores realizaram as pesquisas, no inverno, ocorre queda significativa na temperatura da água.

Os viveiros A e B não influenciaram nas contagens ($P \geq 0,05$), o que demonstra a uniformidade e eficiência dos procedimentos de manejo da propriedade. As alterações detectadas nos animais durante o exame clínico também não interferiram significativamente nas contagens, apesar Morales-Covarrubias (2004) ter afirmado que mudanças no ambiente de cultivo e diversos fatores estressantes podem alterar as funções anatômicas dos camarões, tornando-os susceptíveis a manifestação de enfermidades.

CONCLUSÕES

O anticoagulante ácido etilendiaminotetracético de sódio (EDTA) na concentração de 10% viabiliza a hemolinfa do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* para a contagem total de hemócitos e a avaliação citomorfológica logo após a coleta.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos pelo financiamento da Rede de Pesquisas em Carcinicultura do Nordeste (RECARCINE), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento de bolsas. À maricultura Santa Cruz pelo uso das instalações e doação de camarões. À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela disponibilidade das instalações.

REFERÊNCIAS

- ALBORES, F.V.; GOLLAS-GALVÁN, T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *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.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (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.
- CARVALHO, W. F. *Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia*. 7. ed. Belo Horizonte: Coopmed Editora Médica, 1999. 340p.
- COLES, E. H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.
- DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. *Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.
- FERREIRA NETO, J.M. et al. *Patologia Clínica Veterinária*. Belo Horizonte, MG: Rabelo e Brasil, 1978, 293p.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; LOPES, C.O.; LEAL, C.A.G. Imunidade de animais aquáticos. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.18, n.106, p.14-19, Mar./abr. 2008.
- HENDRIX, C. M. *Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários*. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006. 556 p.
- JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 417 p.
- MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; BLAS, I. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC*, [s.l.], n.21, p.78-91. 2004.

MENDES, P.P.; MENDES, E.S.; BEZERRA, A.M. 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.

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. 1997.

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

OLIVER, L. M.; FISHER, W. S. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Diseases of Aquatic Organisms*, Hawaii, USA, v. 22, p. 217-225, 1995.

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.; 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-SOUSA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Org.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, 2004. p. 88-120.

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

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. *Veterinary hematology*. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975, 153p.

VAN DE BRAAK, C.B.T. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Thesis, Wageningen, 2002. 168p. Wageningen University.

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

VAN DE BRAAK, C.B.T.; TAVERNE, N.; BOTTERBLOM, M.H.A.; VAN DER KNAAP, W.P.W; ROMBOUT, J.H.W.M. Characterization of different morphological features of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes using monoclonal antibodies. Fish and Shellfish Immunology, Aberdeen: Academic press, v.10, p.515-530, 2000.

NORMAS DA 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 oC; 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 (1ºs 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.

6. ARTIGO II

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado **“CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS NA AVALIAÇÃO DA HIGIEZ EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) E FATORES INTERFERENTES”**. (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

**“CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS NA AVALIAÇÃO DA
HIGIEZ EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) E
FATORES INTERFERENTES”**

Manuscrito a ser submetido à revista
Fish and Shell Fish Immunology.
ISSN 1050-4648

Contagem total de hemócitos na avaliação da higidez em camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) e fatores interferentes.

Lílian Maria Nery de Barros Góes¹, Andréa Christianne Gomes Barretto¹, Verônica Arns da Silva¹, Ducilene Lacerda Nascimento¹, Paulo de Paula Mendes², George Chaves Jimenez¹, Fernando Leandro dos Santos¹, Emiko Shinozaki Mendes¹.

¹Depto. de Medicina Veterinária/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, SN. 52171-900, Dois Irmãos, Recife/PE/Brasil, fone/fax: 55 81 33206404, lablasaq@yahoo.com.br / nerygoes@yahoo.com.br

²Depto. de Pesca e Aquicultura/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, SN. 52171-900, Dois Irmãos, Recife/PE/Brasil, fone/fax: 55 81 33206515, lablasaq@yahoo.com.br

RESUMO

Problemas relacionados à sanidade dos animais cultivados e perdas econômicas decorrentes de altas mortalidades são frequentes na carcinicultura Brasileira, o que denota a necessidade de meios preventivos para minimizar a sua ocorrência. Neste contexto, o estudo do quadro hematológico dos camarões pode ser uma alternativa, com possibilidades de rápida detecção de alterações e efetiva ação para prevenção de doença. Diante do exposto, objetivou-se averiguar a utilização da contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados, como ferramenta de avaliação da higidez, em consonância com a avaliação da interferência do sexo, idade e anticoagulantes citrato de sódio a 10% e o ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) a 10%. Contagens total de hemócitos (CTH) foram realizadas em camarões a partir do 40º dia de cultivo, com peso acima de 1g, logo após a retirada da hemolinfa e cinco horas após para verificar a eficácia dos anticoagulantes testados. Para todas as informações obtidas e análises realizadas foram utilizadas as técnicas de modelagem matemáticas ($P < 0,05$). Concluiu-se que o sexo, a idade e a sazonalidade interferem diretamente sobre a CTH e que tanto o citrato de sódio a 10% como o EDTA a 10% são

indicados para a contagem total de hemócitos logo após a coleta, porém não após cinco horas, por não ocorrer preservação adequada.

Palavras-chave: camarão, hemolinfa, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético de sódio.

ABSTRACT

Problems related to the cultivated animals sanity and economic lost due to the high mortality are frequent on the Brazilian shrimp culture, which indicates the necessity of prevent ways to minimize its occurrence. On this context, the shrimp hematologic board study can be an alternative, with quick detection of alterations possibility and effective action to prevent the illness. In face to the exposed, it was aimed to inquire the hemocytes total counting using on cultivated *Litopenaeus vannamei* shrimps, as a health evaluation tool, on accordance to the sex, age and sodium citrate anticoagulant at 10% and the sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 10% interference evaluation. Hemocytes total counting (HTC) were realized on shrimps from the 40° day of cultivate, at the weight over 1g, as soon after the haemolymph retreat and five hours after to verify the tested anticoagulant efficacy. To all the obtained information and realized analysis were used the mathematic mould techniques ($P < 0,05$). It was concluded that the sex, the age and the seasonality direct interfere on the HTC and that both the sodium citrate at 10% and the EDTA at 10% are indicated to the hemocytes total counting as soon after the collect, however not after five hours, for don't happen adequate preservation.

Key-Words: Shrimp, haemolymph, sodium citrate, sodium ethylenediaminetetraacetic acid.

Introdução

No Brasil, a carcinicultura, que a partir dos anos 90 despontou no cenário nacional como uma atividade altamente rentável e promissora, nos últimos anos enfrenta sérios problemas relacionados à sanidade dos animais cultivados, com perdas econômicas significativas decorrentes de altas mortalidades freqüentes. A promessa de grandes lucros ocasionou um crescimento desordenado da atividade por empresários pouco especializados no assunto. Este fato resultou na super exploração dos cultivos, com altas densidades e grande nível de estresse dos animais (MENDES et al., 2005), com conseqüentes problemas sanitários.

Diante deste quadro, enfermidades que, até então, não ocasionavam transtornos, tornam-se extremamente perigosas, gerando a necessidade de pesquisas para estabelecimento de medidas profiláticas que permitam maior controle da sanidade dos animais, assim como auxiliar no monitoramento das condições imunológicas dos camarões. Neste contexto, o estudo do quadro hematológico dos camarões, pode ser uma boa ferramenta para a avaliação da higidez.

Van de Braak (2002) destacou que a transmissão de doença no ambiente aquático é extremamente fácil, especialmente sob condições de cultivo intensivo e que perdas devido a doenças, seja por estresse contínuo e lento ou através de epizootias súbitas, são problemas comuns com os quais se confronta o setor de aquicultura. O combate a doenças, de acordo com Figueiredo et al. (2008), aumenta o custo de produção e diminui a produtividade, inviabilizando o negócio, por isso faz-se necessário o estabelecimento de medidas profiláticas que propiciem a manutenção da higidez dos animais, possibilitando o monitoramento desta como procedimento de rotina nas propriedades.

Ranzine-Paiva e Silva-Souza (2004) destacaram que na aquicultura a hematologia vem se tornando um precioso instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas em organismos aquáticos cultivados, causadas, principalmente por fatores intrínsecos como sexo, estágio da maturação gonadal, idade, modo de vida e pelas alterações de fatores da água, como teor de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e condutividade elétrica. Todavia, salientaram que ainda são escassas pesquisas nesta área, o que dificulta maiores discussões sob o tema.

Diante do exposto objetivou-se avaliar a interferência do sexo, idade e diferentes anticoagulantes sobre a contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados comercialmente.

Material e métodos

A contagem total de hemócitos foi realizada em camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei*, com peso acima de 1g a partir do 40º dia de cultivo em viveiro de terra. Após a coleta de hemolinfa, foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas (exames a fresco e histopatológico), para a confirmação da higidez dos indivíduos amostrados, por somente camarões aparentemente sadios serem utilizados. Os animais foram transportados vivos para o laboratório da fazenda Maricultura Santa Cruz, localizada em Goiana-Pernambuco/BR, onde se procederam as análises. Concomitantemente, coletou-se amostra constituída de um *pool* de cinco animais para as análises histopatológicas.

Semanalmente, coletaram-se 20 amostras de hemolinfa, sendo dez (cinco camarões machos e cinco fêmeas) utilizando o anticoagulante citrato de sódio e dez utilizando o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA). As

coletas foram realizadas em dois viveiros (A e B), nos períodos chuvoso (inverno) e de estio (verão), sendo 180 amostras no verão e 100 no inverno, totalizando 280 amostras. Destaca-se que no segundo ciclo os viveiros foram despescados antes do tempo previsto, devido à demanda do mercado local.

De cada camarão foi coletado 0,1mL de hemolinfa, com auxílio de seringa estéril com agulha hipodérmica 30x8mm, na região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal de cada animal. A desinfecção da região abdominal dos camarões foi realizada com algodão embebido com álcool 70°GL, antes das coletas.

Os anticoagulantes testados foram o citrato de sódio a 10% e o EDTA a 10%, ambos utilizados na proporção de 1:1 (anticoagulante:hemolinfa) para as análises de patologia clínica. As contagens de células/mm³ foram realizadas imediatamente após a coleta na fazenda e após intervalo de cinco horas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LASAq/UFRPE), de maneira semelhante à utilizada para eritrócitos de mamíferos (SCHALM, 1974) em câmara de Neubauer, adaptado para camarão, sendo o número de hemócitos/mm³ obtido através da seguinte fórmula:

$$NH = 150.000 \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{5}$$

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

Para avaliação citomorfológica realizaram-se esfregaços de hemolinfa, os quais foram preparados conforme orientação de Carvalho (1999). Foi utilizado o conjunto

para coloração diferencial rápida em hematologia “Instant Prov” da Newprov. Procedeu-se o exame a fresco (macro e microscópicos) em todos os camarões amostrados, conforme o método descrito por Morales Covarrubias (2004).

Os espécimes foram examinados macroscopicamente para identificação de lesões e posteriormente, sacrificados por choque térmico, infiltrados com solução de Davison’s AFA (HUMASON, 1972) e mergulhados em recipiente com o mesmo fixador. Posteriormente, no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, foram recortados e diafanizados, incluídos em parafina, cortados a 5µm, corados pelo método da hematoxilina-eosina e examinados à microscopia óptica, de acordo com as recomendações de Luna (1968) e Lightner (1996).

Para relacionar os resultados da contagem total de hemócitos (CTH) nos camarões em função do sexo dos animais, do intervalo de tempo entre contagens, da idade, do peso, da sazonalidade, da higidez dos animais amostrados e do anticoagulante, utilizou-se o seguinte modelo matemático:

$$CTH^{\lambda}_i = \beta_0 + \beta_1 Sx_i + \beta_2 ITC_i + \beta_3 V_i + \beta_4 EA_i + \beta_5 ENF_i + \beta_6 Id_i + \beta_7 P + \beta_8 AC_i + \varepsilon_i$$

Em que: CTH – contagem total de hemócitos; λ – Transformador de Box e Cox; $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_8$ - parâmetros do modelo; Sx – sexo dos camarões (macho e fêmea); ITC – Intervalo de tempo entre contagens (0 e 5 horas); V – viveiro amostrado (A e B); EA – estação do ano (inverno e verão); ENF – enfermidades; Id – idade dos camarões (dias); P – Peso dos animais (mg); AC – anticoagulante utilizado (cit e EDTA); ε - erro associado a cada observação; i – i-ésima observação.

Todas as variáveis, com exceção da idade e do peso dos camarões (Id), foram incluídas no modelo sob a forma de variável muda (0 ou 1). Para a variável enfermidade (ENF), os resultados obtidos no exame a fresco e histopatológicos foram interpretados como 1 apenas quando detectada alguma alteração. Para estimar os parâmetros do referido modelo utilizou-se a técnica dos mínimos quadrados e para selecionar as

variáveis significativas no modelo ($P < 0,05$) o processo de *Stepwise (forward)*, de acordo com Mendes et al. (2006). Associado ao processo de *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

Ao relacionar os resultados da contagem total de hemócitos (CTH) em função do sexo dos animais (macho e fêmea), do intervalo de tempo entre contagens (ITC_{0h} e ITC_{5h}), do viveiro amostrado (A e B), da estação do ano (inv ou ver), da idade (dias), do peso (mg), da higidez dos animais amostrados (ENF) e do anticoagulante (cit ou EDTA) utilizado obteve-se a seguinte equação:

$$CTH = (219,5614 + 367,2214mc + 3388,0214ITC_{0h} - 381,2977V_A + 733,8114inv + 19,4477Id + 1994,5702cit.ITC_{0h})^2$$

Em que: CTH – Contagem total de hemócitos (cel/mm³); mc – macho; ITC_{0h} – contagem imediata à coleta (tempo 0); V_A – viveiro A; inv – inverno; Id – idade dos camarões (dias); cit – citrato de sódio; cit.ITC_{0h} – interação entre citrato de sódio e contagem imediata a coleta.

A maximização do coeficiente de determinação (R^2) do modelo de estimação da CTH foi obtido ao utilizar o transformador raiz quadrada e ao introduzir interação entre a variável citrato de sódio e contagem imediata. Destaca-se que apesar de aparentemente baixo o índice determinístico ($R^2 = 45\%$) é significativo, visto que o experimento foi realizado a campo. Observando-se a equação acima, verifica-se que o citrato de sódio a 10% preservou melhor as células do que o EDTA a 10%, em média, 219% (Figuras 1 e 2), sendo mais indicada a sua utilização quando a contagem total de hemócitos for realizada em câmara de Neubauer.

Baseando-se nos valores preconizados pelo Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA, 2006) , apresentados na Tabela 1, foram obtidas contagens, em média, classificadas como bom para as amostras coletadas com citrato de sódio e baixo para as amostras coletadas com EDTA processadas imediatamente após a coleta (ITC_{0h}). As amostras processadas após o intervalo de tempo de cinco horas foram classificadas, em média, como muito baixo para ambos os anticoagulantes, sendo desta forma desaconselhado a utilização deste intervalo de tempo. Todos os animais examinados estavam sobre as mesmas condições de cultivo e estresse, o que possibilita afirmar que o citrato de sódio preservou melhor os hemócitos que o EDTA em relação às CTH. Todavia, quanto à avaliação citomorfológica, o EDTA conservou a integridade celular por até sete meses, fato não observado quando se utilizou o citrato de sódio.

Brehélin e Zachary (1985) relataram que vários fatores extrínsecos podem interferir na avaliação das características citomorfológicas em hemócitos de artrópodes, tendo sido destacadas a metodologia empregada na pesquisa, o método de preparação das células e da afinidade tintorial das células perceptíveis à microscopia óptica. Citaram ainda que a própria fisiologia dos hemócitos, os quais podem se diferenciar na circulação sanguínea, também pode interferir. Diversos autores que trabalharam com diferenciação celular na hemolinfa de artrópodes (BAUCHAU, 1981; HOSE et al., 1990; SODERHÄLL e CERENIUS, 1992 e GARGIONI e BARRACCO, 1998) afirmaram que os hemócitos de grânulos pequenos (HGP) são formas intermediárias que se transformam quando amadurecem em hemócitos de grânulos grandes (HGG).

Van de Braak et al. (1996) ressaltaram que a nomenclatura dos hemócitos de crustáceos não é uniforme, devido aos vários métodos e critérios adotados pelos pesquisadores. Sugeriram a padronização dos métodos e alertaram que uma mesma

linhagem de células pode apresentar diferenças morfológicas possíveis de serem detectadas apenas à microscopia eletrônica, desaconselhando, desta forma, a diferenciação de hemócitos pela microscopia óptica. Estes autores diferenciaram cinco tipos celulares à microscopia óptica em hemolinfa de *Penaeus monodon*. Todavia, nas mesmas amostras analisadas à microscopia eletrônica verificaram que se tratavam apenas de três tipos celulares (HH, HGP e HGG). No presente experimento, foi possível a visibilização, à microscopia óptica, dos cinco tipos celulares citados por Van de Braak et al. (1996).

Em relação ao sexo, observou-se que tanto nas amostras tratadas com citrato de sódio quanto nas tratadas com EDTA, os machos apresentaram maiores quantidades de hemócitos (em média 18% e 22% a mais para amostras com citrato e 37% e 63% para amostras com EDTA, nos 1º e 2º ciclos, respectivamente). Esta constatação é indicativo de que os animais do sexo masculino apresentam maior capacidade de reagir a agentes patógenos, visto que os hemócitos conferem a imunidade dos animais (Figuras 1 e 2).

Perazzolo (1994) não observou diferença significativa no número total de hemócitos circulantes em juvenis e adultos de camarões *Penaeus paulensis*, machos e fêmeas, afirmando que não há interferência do sexo. É possível que a idade dos animais amostrados e o fato de terem sido realizados *pools* na pesquisa com *Penaeus paulensis* tenha interferido nesse resultado. Assim como, é admissível a hipótese de diferença entre espécies. Todavia, na presente pesquisa tanto para as amostras conservadas com citrato de sódio quanto para as conservadas com EDTA, foi evidenciada diferença entre sexo para *Litopenaeus vannamei*.

Owens e O'Neill (1997) não observaram interferência significativa do peso e comprimento sobre a contagem total e diferencial de hemócitos em *Penaeus monodon*,

no entanto, verificaram diferença entre sexo. Observaram que as fêmeas possuem um maior número de hemócitos devido ao dimorfismo sexual presente na população dos camarões desta espécie, onde as fêmeas apresentaram-se bem maiores que os machos de mesma idade. Sequeira et al. (1995) também observaram a interferência do sexo na composição hemocitária em *Penaeus japonicus* durante a ecdise.

As contagens realizadas imediatamente após a extração da hemolinfa foram em média 36% e 40% maiores, do que as realizadas após intervalo de cinco horas para as amostras de citrato e de EDTA, respectivamente. As amostras de hemolinfa não devem ser armazenadas para processamento posterior, como se faz com amostras de sangue de mamíferos, pois os anticoagulantes testados não apresentaram conservação adequada nestas condições, verificando-se lise celular ao exame citomorfológico.

Em relação à idade dos animais (juvenis e adultos), pode-se observar influência positiva sobre as contagens, o que indica que animais mais jovens apresentam menores concentrações celulares do que os animais mais velhos, assemelhando-se ao comportamento verificado em mamíferos (JAIN, 1993).

Observando-se as Figuras 1 e 2, também pode-se retratar alguns aspectos interessantes relacionados com a taxa de produção de hemócitos em função da idade dos camarões. A variação da CTH em função da idade dos camarões foi constante ao longo do período de observação, independentemente da condição sexual dos espécimes examinados ou da condição de conservação da hemolinfa. Ou seja, tanto o citrato de sódio a 10% como o EDTA a 10% não afetaram a taxa de produção dos hemócitos ao longo do desenvolvimento dos camarões (a inclinação das retas foi muito similar), embora as preparações com EDTA estivessem partindo de um número de hemócitos bem inferior às preparações efetuadas a base de citrato de sódio. Esta diferença,

avaliada em termos percentuais, demonstra que as preparações a base de citrato de sódio iniciaram com, aproximadamente, 74% mais células quando comparadas às preparações com EDTA.

Destaca-se que o resultado supracitado pode ser justificado, provavelmente, em função do forte efeito quelante que o EDTA exerceu sobre as estruturas dos hemócitos (SILVA, 2006), principalmente contra íons bivalentes que estabilizam a estrutura das membranas celulares nas concentrações em que foram empregadas neste experimento. Este fato nos remete a necessidade de ampliarmos as discussões sobre os efeitos e as conseqüências do uso do EDTA nas preparações por nós realizadas, tomando-se como referências os trabalhos de Schalm et al., (1975), Jain, (1993), Coles (1984), Duncan (1982) e Hendrix (2006). Pode-se observar a interferência do sexo e da idade sobre as contagens dos hemócitos em camarões *L. vannamei* na Tabela 2.

Moullac et al. (1997), ao pesquisar as reações de resistência a patógenos baseadas no número de hemócitos circulantes na hemolinfa de camarões, afirmaram que camarões com alto número de hemócitos resistem melhor às infecções do que aqueles com baixo número de hemócitos.

Owens e O'Neill (1997) não observaram diferença entre a CTH de *Penaeus monodon* juvenis e adultos, entretanto esses autores relataram incongruência destes resultados, advertindo para a possibilidade do grau de liberdade utilizado ter interferido na comparação entre juvenis e adultos, ocasionando resultado anormal, visto que o esperado era que houvesse diferença entre idade.

A sazonalidade interferiu significativamente nas contagens de hemócitos, sendo observado maiores contagens no período chuvoso. Destaca-se a afirmação de Figueiredo et al. (2008), de que a temperatura da água no verão nordestino pode

ultrapassar 30°C, provocando situação de estresse para os animais, diminuindo o consumo alimentar e ocasionando imunossupressão. Nesse experimento, a temperatura da água variou de 27,40 até 33°C (média 30,45°C) no verão e de 25,60 até 31,70°C (média 28,80°C) no inverno, para o viveiro A. Para o viveiro B a variação foi de 28,10 e 32,80°C (média 30,44°C) no verão e de 10 até 30,20°C (média 28,47) no inverno.

Silva (2007a) observou maior ocorrência de enfermidades de origem viral em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em quatro carciniculturas do estado de Pernambuco, no período do verão e relacionou este achado à conjunção de diferentes fatores como o manejo empregado e às condições ambientais, destacando que no período do inverno no estado de Pernambuco/Brasil se obtêm animais mais saudáveis.

Diferenças significativas na contagem diferencial de hemócitos de camarões *Penaeus monodon* foram observadas por Owens e O'Neill (1997), quando compararam a produção do inverno e verão. Afirmaram que apesar dos animais apresentarem comprimento semelhante, os camarões cultivados no inverno geralmente têm qualidade inferior.

Silva (2007b) não verificou interferência da sazonalidade sobre higidez de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados e associou este fato à baixa oscilação da temperatura (<5°C) durante a fase experimental.

Ranzine-Paiva e Silva-Sousa (2004) citaram que nos peixes, podem ser observadas numerosas estratégias adaptativas desenvolvidas frente às variações sazonais extremas (temperatura, salinidade, pressão, pH, oxigênio e CO₂) do ambiente aquático. Assim, a quantidade de diferentes células no sangue periférico (vascular) reflete o estado fisiológico específico do organismo nos diferentes períodos da vida. Camarões são invertebrados e possuem sistema circulatório, assim como a constituição da

hemolinfa, completamente diferente dos peixes, porém como animais aquáticos, também estão expostos as intempéries supracitadas, podendo por estas razões, terem sido verificadas diferenças entre os ciclos de cultivo deste experimento.

Todas as variáveis inseridas na equação influenciaram de forma positiva a contagem total de hemócitos, excetuando-se a variável viveiro A (V_A), tendo sido observadas menores contagens de hemócitos nos animais oriundos do viveiro A. Este fato possivelmente está atrelado às condições do ambiente de cultivo, indicando que no viveiro B os animais apresentavam-se mais resistentes, devido ao maior número de hemócitos.

Alves (2007) ao avaliar a higidez de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em Pernambuco, observou a interferência da variável viveiro na carga de *Vibrio* spp. em camarões oriundos de uma mesma propriedade. Morales-Covarrubia et al. (2006) relataram que fatores exógenos, como temperatura e salinidade, interagem com fatores internos (nível nutricional, nível de stress, imunidade), no desenvolvimento de enfermidades e imunidade dos animais. Outro exemplo de interferência das condições ambientais sobre a concentração de hemócitos é a diminuição da CTH em camarões *Litopenaeus vannamei* submetidos a salinidades de 5 e 15‰, verificadas por Wang e Chen (2005). Desta forma, pode-se afirmar que é possível que numa única carcinicultura sejam observadas diferenças significativas entre viveiros, por se tratar de ambientes distintos, apesar da água ter a mesma origem (ALVES, 2007; SILVA, 2007a; WANG e CHEN, 2005).

Não houve influência significativa das alterações detectadas ao exame a fresco e nas análises histopatológicas com as contagens de hemócitos (ENF), assim como da variável peso (P) dos animais, por isso não permaneceram na equação, sugerindo-se que

todos os animais amostrados apresentavam-se hígidos e que o peso não interfere na CTH.

Estudos com hematologia de camarões são escassos no Brasil, destacando-se os de Perazzolo (1994) com *Penaeus paulensis*; Perazzolo e Barracco (1997) com *Penaeus paulensis*; Gargione e Barracco (1998) com *Macrobrachium rosenbergii*, *M. acanthurus* e *Penaeus paulensis*; Barracco et al. (2001) com *Farfantepenaeus paulensis* e Barracco (2004) com crustáceos. Contudo, fazem-se necessários maiores investimentos nesta área de pesquisa visando sedimentação dos conceitos e instrumentalização dos técnicos para uma maior compreensão da fisiologia dos camarões e melhor monitoramento da saúde dos animais cultivados.

Conclusões

Ao averiguar a utilização da contagem total de hemócitos em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados como ferramenta de avaliação da higidez, em consonância com a avaliação da interferência do sexo, idade, sazonalidade e anticoagulantes, conclui-se que:

- Camarões *Litopenaeus vannamei* machos têm mais hemócitos que as fêmeas;
- A idade dos animais interfere na CTH, obtendo-se maiores contagens em animais mais velhos;
- Os animais cultivados no inverno apresentam maiores contagens de hemócitos que os cultivados no verão;
- O citrato de sódio a 10% e o EDTA a 10% viabilizam a contagem total de hemócitos logo após a coleta, não ocorrendo o mesmo após intervalo de cinco horas;

- O citrato de sódio a 10% conservou melhor os hemócitos do que o EDTA a 10% para a CTH.

Agradecimentos: À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento da Rede de Pesquisas em Carcinicultura do Nordeste (RECARCINE), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento de bolsas. À maricultura Santa Cruz pelo uso das instalações e doação dos camarões utilizados. À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela disponibilização das instalações.

Referências

- 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.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.51-73.
- BARRACCO, M.A. PERAZZOLO, L.M.; ANDREATTA, E.R. Produção de moléculas microbidas (anion superóxido) pelos hemócitos de camarões *Farfantepenaeus paulensis*, durante o processo de fagocitose. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2001, Caxambu. **Resumos...** Caxambú, 2001.

BAUCHAU, A.G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (Ed.) **Invertebrate blood cells**. London: Academic Press Inc. 1981. v.2, p. 385-420.

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.

BREHÉLIN, M.; ZACHARY, D. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: BREHÉLIN M. (Ed.). **Immunity in invertebrates. Cells, molecules, and defense reactions**. Berlin: Spring-Verlag. 1985. p.36-48.

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 7. ed. Belo Horizonte: Coopmed Editora Médica, 1999. 340p.

COLES, E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.

CSA. CENTRO DE SERVICIOS PARA LA ACUICULTURA. Unidade de diagnóstico. Disponível em <http://www.fimcm.espol.edu.ec/csa>. Acesso em 01 de fevereiro de 2006.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LOPES, C.O.; LEAL, C.A.G. Imunidade de animais aquáticos. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.18, n.106, Março/abril, p.14-19. 2008.

GARGIONE, R.; BARRACCO, M.A. Haemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, New York, v.236, p. 209-221, 1998.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006. 556 p.

HOSE, J.E.; MARTIN, G.G.; GERARD, A.S. A decapod haemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v.178, p.33-45, 1990.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. 3ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 1972.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 417 p.

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.

LUNA, L. G. **Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology**. New York:Mcgraw-Hill, 1968. 258p

MENDES, E.S.; MENDES, P.P.; GÓES, L.M.N.B.; SANTOS, S.B.; VIEIRA, K.P.B.A. Os víbrios na carcinicultura. **Revista Panorama da Aqüicultura**, São Paulo: v. 91. set/out. p.26-29, 2005.

MENDES, P.P.; MENDES, E.S.; BEZERRA, A.M. 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**: detección mediante análisis en fresco e histopatología. (Diseases shrimp detection by means of gross analysis and histopathology). México, Ed. Trillas, 2004. 122pp.

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.

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.

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.; BARRACCO M.A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Development and Comparative Immunology**, New York, v.21, n.5, p.385-395, 1997.

RANZINE-PAIVA, M. J. T; SILVA-SOUSA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.88-120.

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

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary hematology**. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975, 153p.

SEQUEIRA, T.; VILANOVA, M.; LOBO-DA-CUNHA, A.; BALDAIA, L.; ARLA-CHAVES, M. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocyte type in

male and female *Penaeus japonicus*. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v.189, p.376-380. 1995.

SILVA, P. Drogas anticoagulantes. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2006. p.535-542.

SILVA, V. A. **Estudo anatomopatológico da Mionecrose Infecçiosa Viral (IMNV) no camarão cultivado, *Litopenaeus vannamei*, em Pernambuco, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura). 2007a, 56f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

SILVA, R.P.P. **Fatores interferentes na ocorrência da vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) no litoral sul de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura). 2007b, 45f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

SODERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustaceans immunity. **Annual Review of Fish Disease**, [s.l.], v.2, p. 3-23. 1992.

VAN DE BRAAK, C.B.T. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. Thesis, Wageningen, 2002. 168p. Wageningen University.

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

WANG, L.U.; CHEN, J.C. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. **Fish and Shellfish Immunology**, Aberdeen: Academic press, v.18, p. 269-278. 2005.

Tabela 1: Média dos valores obtidos na contagem total de hemócitos (CTH) em hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* associado aos valores preconizados pelo Centro de Serviços para la Acuacultura – CSA.

Média dos valores da CTH (cel/mm ³)	Anticoagulante e ITC ^a	Valores preconizados para peneídeos pelo CSA (2006)	
		CTH (cel/mm ³)	Conceito
$(3,83 \pm 0,62^d) \times 10^6$	EDTA/ITC _{5h} ^b	<5 x 10 ⁶	Muito baixo
$(4,62 \pm 7,90^d) \times 10^6$	Citrato/ ITC _{5h} ^b		
$(5,95 \pm 0,97^d) \times 10^6$	EDTA/ITC _{0h} ^c	5 x 10 ⁶	Baixo
$(19,64 \pm 2,20^d) \times 10^6$	Citrato/ ITC _{0h} ^c	15-20 x 10 ⁶	Bom

^aITC – Intervalo de tempo entre contagens; ^bITC_{5h} – Contagem realizada após intervalo de cinco horas; ^cITC_{0h} – Contagem realizada imediatamente após a coleta; ^dValores válidos para um intervalo de confiabilidade de 95%

Tabela 2: Relação entre a média da contagem total de hemócitos (CTH) por cel/mm³/dia e sexo de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em Pernambuco durante dois ciclos de cultivo.

Valores médios da CTH (cel/mm ³ /dia) x 10 ⁴	Sexo	AC ^a	Viveiro	Estação do ano
43,74138 ± 8,025862 ^b	macho	Citrato	A	Verão
42,81034 ± 6,135057 ^b	fêmea			
2,836207 ± 0,600575 ^b	macho	EDTA	B	
3,551724 ± 0,652299 ^b	fêmea			
43,6927 ± 11,75111 ^b	macho	Citrato	B	
19,98946 ± 5,365844 ^b	fêmea			
2,140954 ± 1,929245 ^b	macho	EDTA	B	
2,545505 ± 0,332547 ^b	fêmea			
17,48416 ± 5,541855 ^b	macho	Citrato	A	Inverno
20,58824 ± 5,07994 ^b	fêmea			
13,04864 ± 8,176094 ^b	macho	EDTA	B	
13,99321 ± 4,768854 ^b	fêmea			
44,98824 ± 10,23237 ^b	macho	Citrato	B	
35,99295 ± 11,29036 ^b	fêmea			
25,6681 ± 5,748041 ^b	macho	EDTA	B	
27,43966 ± 8,686129 ^b	fêmea			

^aAC – anticoagulantes; ^bValores válidos para um intervalo de confiabilidade de 95%.

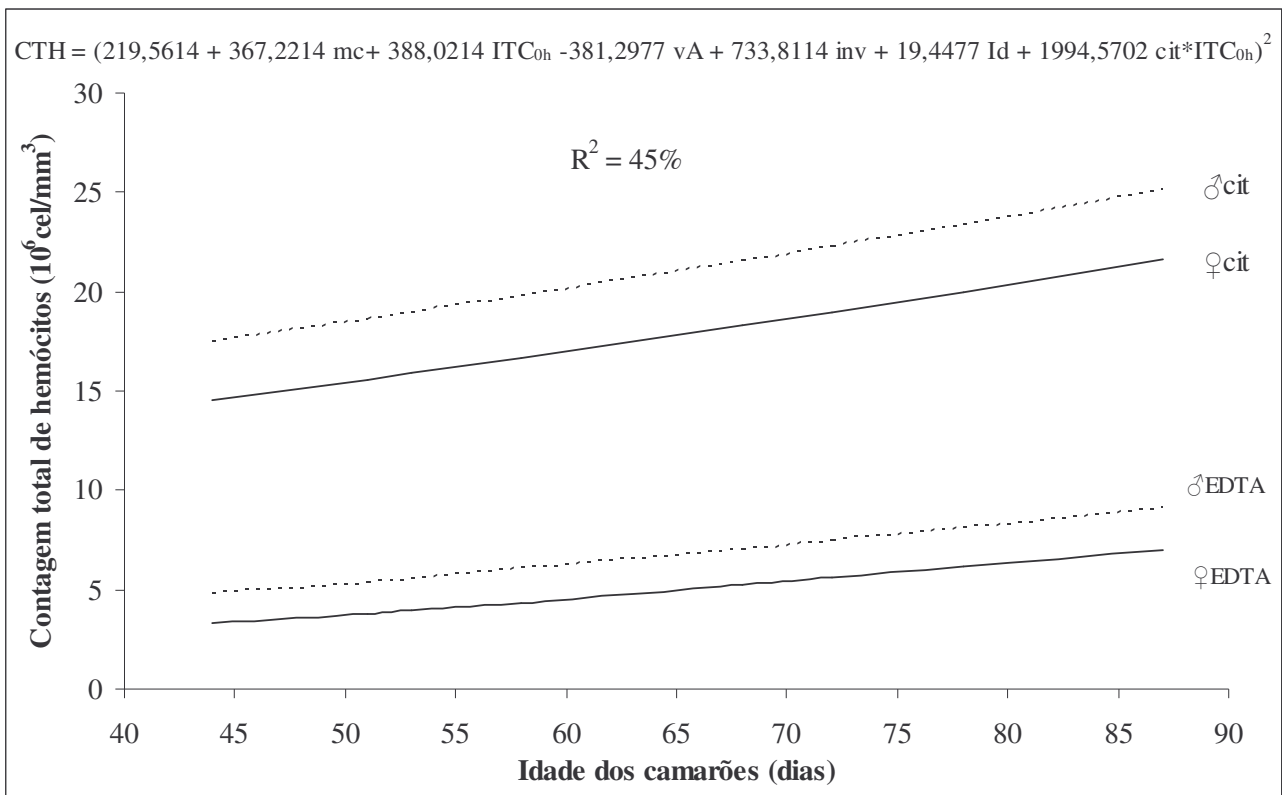


Figura 1: Relação entre a contagem total de hemócitos, a idade e o sexo dos camarões cultivados no viveiro A durante o inverno.

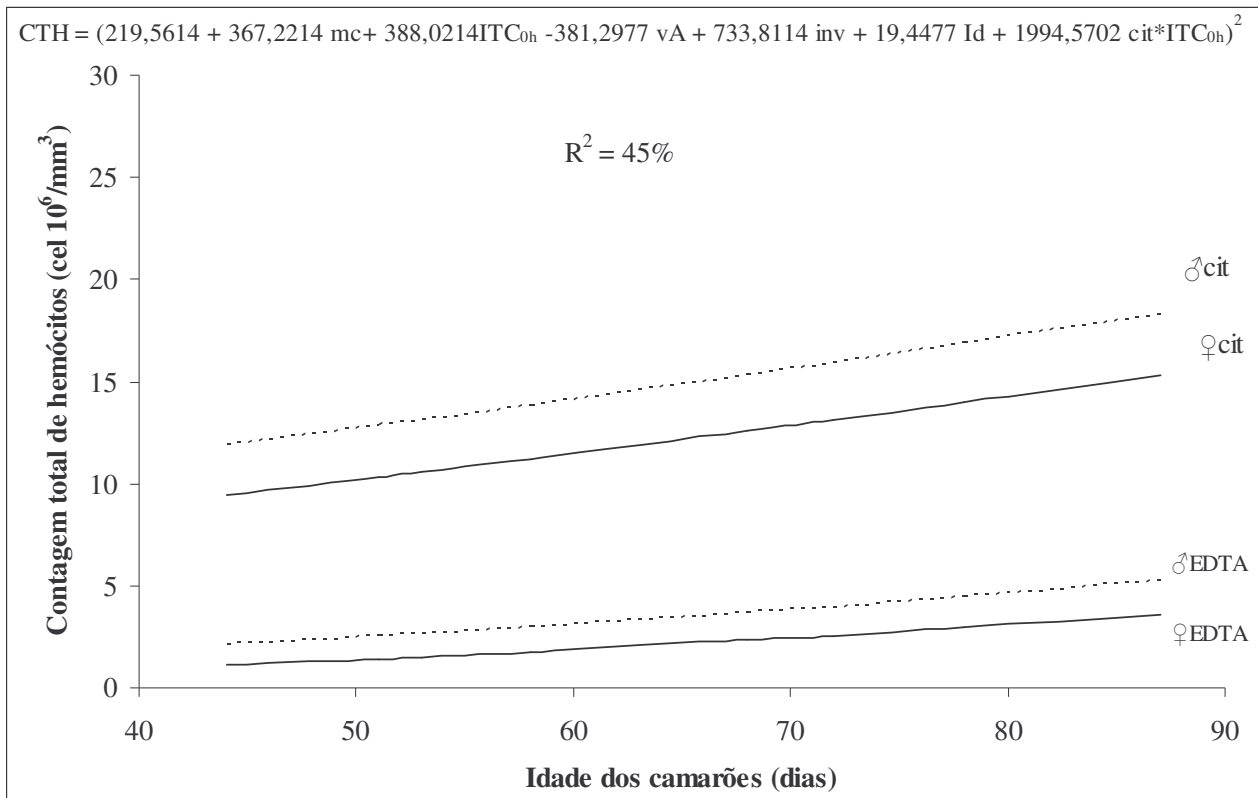


Figura 2: Relação entre a contagem total de hemócitos, a idade e o sexo dos camarões cultivados no viveiro A durante o verão

FISH AND SHELL FISH IMMUNOLOGY

Guide for Authors

SUBMISSION CHECKLIST

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:**

- One author designated as corresponding author:
- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

FURTHER CONSIDERATIONS

- Manuscript has been "spellchecked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white

1 SUBMISSION OF ARTICLES

1.1 General

1.1.1 It is essential to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript.

1.1.2 Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or

academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

1.1.3 Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact ES Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

1.1.4 Short Communications: Where the subject matter does not warrant a full paper, a Short Communication is more likely to be acceptable for publication. Communications should be restricted in length to no more than the equivalent of two printed pages of *Fish and Shellfish Immunology*, that total length to include references and normally no more than one illustration and one short table. No abstract will be required, nor should a communication necessarily have subheadings or be subdivided as are full papers, but an introductory sentence or sentences must make its purport clear. In other respects submitted manuscripts should comply with the instructions given above. A Short Communication may be concerned with any subject within the scope of *Fish and Shellfish Immunology* but should be confined to a single point or issue of progress, and to such as an unusual occurrence, an interesting observation or a topical and timely finding.

1.1.5 Short Sequence Reports: Where the reporting of a novel fish or shellfish sequence with limited functional analysis does not warrant a full paper, a Short Sequence Report is more likely to be acceptable for publication. Communications should be restricted in length as for Short Communications

(see 1.1.4). No abstract or subheadings are required but an introductory sentence or sentences must make it clear why the sequence is novel and the approach used to obtain the gene. In other respects the submitted manuscripts should comply with the instructions given above, and be within the subject scope of the journal. Accepted reports will undergo rapid publication

1.2 Submission to the journal prior to acceptance

1.2.1 Authors should submit their papers electronically via *Fish & Shellfish Immunology*'s online submission website: <http://ees.elsevier.com/fsim>. This electronic version will be used for the review process and all correspondence will be by e-mail, with no paper correspondence necessary.

1.2.2 We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. No changes to the accepted version are permissible without the explicit approval of the Editor.

2 PREPARATION OF TEXT

2.1 Presentation of Manuscript

2.1.1 Please write your text in good English (Only British usage is accepted). Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. The following external services are offered here for your consideration only:

Language Polishing. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more

information please refer to our Terms & Conditions
http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above). Names of fish and shellfish should be given in full, i.e. common name and Latin name with authority. Italics are required for species names which are written in full the first time they appear in the text

(e.g. *Cyprinus carpio* L.) but abbreviated at subsequent mention (e.g. *C. carpio*).

2.1.2 Please use double spacing and wide (3 cm) margins. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively.

2.1.3 Provide the following data on the title page (in the order given).

2.1.4 *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

2.1.5 *Author names and affiliations*. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

2.1.6 *Corresponding author*. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

2.1.7 *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The

address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

2.1.8 *Abstract*. A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

2.1.9 *Keywords*. Immediately after the abstract, provide 5-10 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, ‘and’, ‘of’). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

2.1.10 *Subdivision of the article*. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, . . .), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to ‘the text’. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

2.1.11 *Footnotes*. Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

2.1.12 *Tables*. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

2.1.13 *Nomenclature and units*. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

2.1.14 *DNA sequences and GenBank Accession numbers*. Many Elsevier journals cite “gene accession numbers” in their running text and footnotes. Gene accession

numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "(GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link**. In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

2.2 Preparation of supplementary data.

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Support

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622832/authorinstructions

2.3 *Policy and ethics*. The authors must state that their work adheres to the appropriate national ethical review procedures.

3 REFERENCES

Please use the Vancouver reference system as shown by the examples below. In the text references should be numbered consecutively within square brackets (e.g. [1]). If you cite a reference more than once in the text, please use the same number each time. References in the reference list should accord with the system in uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (N Engl J Med 1991;34:424-428). Please ensure that references are complete and that all references that appear in the text also appear in the list, and vice versa.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2000;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by ‘et al’. For further details you are referred to “Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical

Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–934) (see also <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>).

4 PREPARATION OF ILLUSTRATIONS

4.1 Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as “graphics” or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

4.2 A detailed guide on electronic artwork is available on our website.

4.3 Captions: Ensure that each illustration has a caption. Supply captions on a separate sheet, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

4.4 If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print Elsevier will not charge authors for one page of colour per paper, where it's use is integral to useful illustration of the data. For more than

one page of colour you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

5 PROOFS

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

6 OFFPRINTS

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.