

INFLUÊNCIA DA REFRIGERAÇÃO NA PRESERVAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE HEMÓCITOS DE CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS UTILIZANDO-SE CITRATO DE SÓDIO

ANDRÉA CHRISTIANNE GOMES BARRETTO¹, LILIAN MARIA NERY DE BARROS GÓES², DULCILENE
LACERDA DO NASCIMENTO³, PAULO DE PAULA MENDES¹, ENEIDA WILLCOX RÊGO¹, EMIKO SHINOZAKI
MENDES¹

¹Professores Doutores da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. andreabarretto9@hotmail.com

² Professora Doutora da Escola de Educação Básica e Profissional - Escola de Bodoquena, Miranda, MS, Brasil.

³Pós-graduanda da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Para a realização de contagens de células sanguíneas, faz-se necessário o uso de anticoagulantes e, no caso específico da hemolinfa de camarões, ainda não há uma solução padrão para que não ocorra a coagulação. Emprega-se frequentemente o citrato de sódio como anticoagulante, uma vez que foi verificada a sua eficácia na preservação dos hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*. Em 140 amostras de hemolinfa com citrato de sódio (10%), na proporção de 1:1, coletadas em dois ciclos de cultivo, no período seco e no

chuvoso, realizaram-se CTH imediatamente após a coleta e após um período de armazenamento sob-refrigeração. Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se as técnicas de modelagens matemáticas ($P < 0,05$). Observou-se que, após o armazenamento sob refrigeração, o número de células diminuiu consideravelmente, podendo-se concluir que o anticoagulante citrato de sódio somente preserva adequadamente a hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* para a CTH realizada imediatamente após a coleta.

PALAVRAS-CHAVE: anticoagulante; camarão; hemolinfa; refrigeração.

INFLUENCE OF REFRIGERATION ON THE PRESERVATION OF THE TOTAL NUMBER OF HEMOCYTES OF SEA SHRIMPS *Litopenaeus vannamei* CULTIVATED USING SODIUM CITRATE

ABSTRACT

For carrying out blood cell count, the use anti-coagulants is necessary, and in the specific case of the hemolymph in shrimp, there is still no standard solution to avoid its coagulation. Sodium citrate is frequently used as anti-coagulant, because it has been previously proven to be efficient in the preservation of the hemocytes of the sea

shrimp *Litopenaeus vannamei*. In 140 samples of hemolymph with sodium citrate (10%) in the ratio of 1:1, collected at 2 stages of cultivation, in dry and wet season, were examined for HTC immediately after collection and then again after storage in the refrigerator. All data were analyzed using modeling mathematics formulas ($P <$

0.05). After storage in the refrigerator, the number of cells decreased considerably. Therefore, the anticoagulant sodium citrate only preserved the hemolymph of the

shrimp *Litopenaeus vannamei* for HTC when the count was done immediately after collection.

KEYWORDS: anticoagulant; haemolymph; shrimp.

INTRODUÇÃO

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

Em se tratando do camarão marinho, esse animal é considerado primitivo no que concerne ao sistema imunológico. Todavia, ele apresenta mecanismos de defesa eficientes e é capaz de resistir e eliminar uma variedade de patógenos, preservando, dessa forma, a sua integridade (OLAFSEN, 1988).

Os crustáceos, assim como os demais invertebrados, são desprovidos do sistema imune adaptativo altamente específico, composto pelos linfócitos T e B, receptores, anticorpos e memória imunológica de longo prazo, existentes nos vertebrados, apresentando apenas o sistema imune inato ou natural (BARRACCO et al., 2008).

As reações de defesa dos invertebrados estão relacionadas à sua hemolinfa. Esta é caracterizada por se constituir em um tecido fluido composto por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração líquida, o plasma (GONÇALVES, 2011).

Entende-se por anticoagulantes substâncias utilizadas para prevenir a coagulação sanguínea bem como retardar a deterioração do sangue, e a escolha inadequada pode interferir nas investigações bioquímicas e nas determinações quantitativas. O citrato de sódio é bastante utilizado em transfusões e hemossedimentação, pois atua combinando-se com o cálcio, formando, assim, o citrato de cálcio insolúvel. Além disso, o citrato de sódio é bastante utilizado em diversas práticas nos camarões, embora ele possa interferir em muitos testes bioquímicos (STOCKHAM, 2011).

De acordo com BACHÉRE (2000), nos últimos anos, o desenvolvimento de soluções anticoagulantes específicas possibilitou avanços nos

estudos dos hemócitos de crustáceos. PERAZZOLO et al. (2002) e ALBORES et al. (2005) desenvolveram soluções anticoagulantes compostas por várias substâncias, porém de difícil aplicação em fazendas, devido às condições do seu preparo. Assim sendo, objetivou-se avaliar a eficácia do anticoagulante citrato de sódio na preservação dos hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados, para a leitura imediata e em associação com a refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Após a captura, os camarões foram transportados vivos ao laboratório da propriedade e examinados clinicamente, de acordo com o método preconizado por MORALES-COVARRUBIAS (2010). Posteriormente, coletou-se 0,1mL hemolinfa de cada animal, por meio de seringa estéril, contendo 0,1mL do anticoagulante citrato de sódio a 10%. A hemolinfa foi extraída por punção na região ventral do abdômen. Os animais foram divididos em dois grupos distintos para a realização do estudo e, como critério para separação, utilizou-se a divisão a partir do sexo, separando-os em machos e fêmeas.

O experimento foi desenvolvido sob a aprovação da comissão de ética no uso de animais da UFRPE, sob processo nº 019127, tendo sido respeitados todos os preceitos éticos de proteção dos animais.

As contagens totais de hemócitos (células/mm³) foram realizadas imediatamente após a coleta e cinco horas após a refrigeração a 4° C, de forma semelhante à utilizada para eritrócitos de mamíferos (SCHALM, 1974) em câmara de Neubauer, sendo, contudo, adaptada para hemolinfa diluída em citrato de sódio, na proporção de 1:1, através da seguinte fórmula:

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

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

Para se correlacionar os resultados da contagem total de hemócitos (CTH) nos camarões amostrados em função do tempo, ou seja, imediatamente após a coleta e cinco horas após a coleta das amostras refrigeradas do viveiro (A e B), dos ciclos de cultivo (1º e 2º ciclos), da higidez dos animais amostrados (ENF), do peso dos animais e do tempo de cultivo (TC), adotou-se o seguinte modelo matemático:

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

Em que se lê: CTH – contagem total de hemócitos; $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_5$ - parâmetros do modelo; mc – contagem de hemócitos no momento da coleta; V – viveiro; CL – ciclo de cultivo; ENF – enfermidade, TC - tempo de cultivo dos camarões; ε - erro

associado a cada observação; i – i-ésima observação.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens totais de hemócitos utilizando-se o citrato de sódio como anticoagulante, destacando-se o tempo de cultivo, os dois viveiros amostrados (A e B) e a interferência do tempo e da refrigeração sob as contagens para, respectivamente, machos e fêmeas, estão apresentadas nas Figuras 1 e 2:

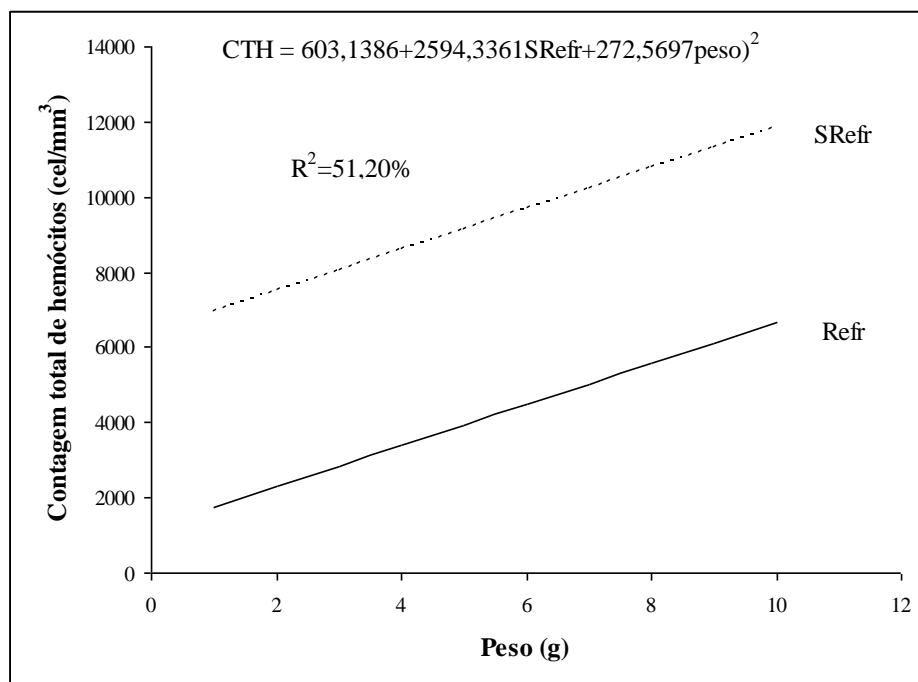


Figura 1. Relação entre a contagem total de hemócitos, peso dos camarões machos. SRefr- sem refrigeração; Refr- amostra refrigerada (após 5 horas).

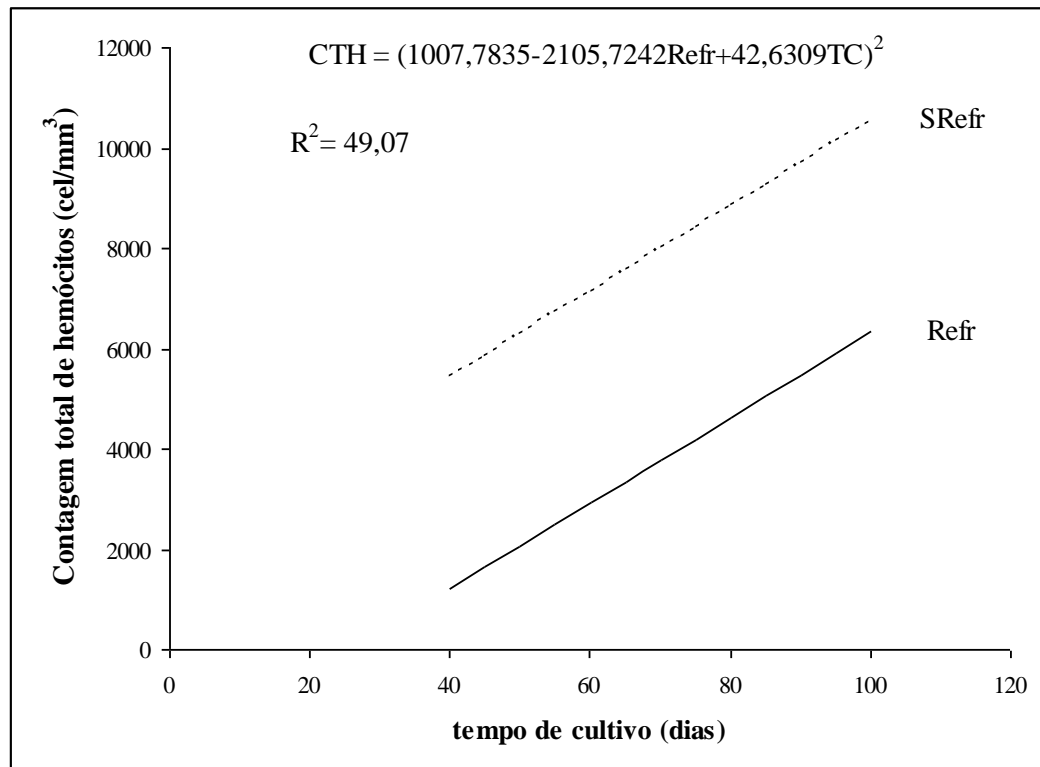


Figura 2. Relação entre a contagem total de hemócitos, tempo de cultivo das fêmeas.

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

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

De acordo com os valores preconizados pelo Centro de Serviços para a Aquicultura (CSA, 2006), as médias dos valores obtidos são consideradas boas quando os hemócitos foram contados imediatamente após a coleta, ficando entre $10-15 \times 10^6$ hem/mm³. As amostras processadas após um período sob refrigeração apresentaram contagens consideradas baixas ou muito baixas, girando em torno de 5×10^6 cel/mm³, o que significa que o armazenamento em temperatura de refrigeração deve ser evitado quando se utilizar o citrato de sódio como anticoagulante para a realização de contagem de hemócitos.

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

jovens apresentam menores concentrações celulares que animais mais velhos, semelhante ao que ocorre em mamíferos (THRALL, 2006).

Esses resultados são discordantes dos encontrados por OWENS & O'NEILL (1997), os quais, ao trabalharem com *Penaeus monodon*, não observaram diferença entre a CTH em diferentes fases de vida.

As alterações detectadas durante o exame a fresco – lesões nos túbulos do hepatopâncreas e presença de parasitas – não interferiram significativamente nas contagens ($P > 0,05$), assim como os viveiros onde estavam sendo cultivados os camarões e a época da coleta (seco e chuvoso). Existe, contudo, uma dificuldade de se comparar resultados de CTH com as demais pesquisas e revisões da área, pois os métodos adotados são extremamente diferentes, como afirmado por VAN DE BRAAK et al. (1996).

Ao se comparar as contagens encontradas nos machos com as encontradas nas fêmeas, observou-se que eles apresentaram cerca de 31% de células circulantes a mais que as fêmeas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os machos serem maiores que as fêmeas e, conseqüentemente, refletirem uma maior capacidade de se protegerem contra agentes patógenos.

BARRACCO (2004) afirmou que a CTH

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

De acordo com PERAZOLLO (1994), não há interferência do sexo sobre a contagem total de hemócitos na espécie *Penaeus paulensis*, porém vale ressaltar que, no referido trabalho, além de ter sido utilizada uma espécie diferente, foram utilizados *pools* das amostras, o que provavelmente veio a interferir no resultado da pesquisa.

CONCLUSÕES

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

O armazenamento por 5 horas em condição de refrigeração a 4°C da hemolinfa com o anticoagulante citrato de sódio a 10% não é indicado para a contagem total de hemócitos, devido à não preservação das células.

REFERÊNCIAS

- ALBORES, F.V.; GOLLAS-GALVÁN, T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Functional characterization of *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus vannamei* e *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. **Aquaculture Research**, Oxford, n.36, p.352-360, 2005.
- BACHÉRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p.3-11. 2000.
- BARRACCO, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; 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.; ROSA, R.D. Immunología del camarón. In: Vielka M.Q., Cuéllar-Anjel J. **Guía técnica - Patología y Inmunología de camarones**. Panamá: Ed. CYTED, 2008. p. 169-224.
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformation. **Journal of Royal Statistic Society**, [s.l.], Ser.B, v. 26, 1964, p. 211 – 243.
- CSA. CENTRO DE SERVIÇOS PARA LA ACUACULTURA. União Européia disponível em <http://www.csa.gov.hk/indexe.html>. Acesso em 15 junho de 2006.
- GONÇALVES, P. **Expressão de genes imunológicos associados à defesa antifúngica em *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com *Fusarium solani***. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/95953/299994.pdf?sequence=1>, acesso em 05 de novembro de 2012.
- MENDES, P.P. et al. Análise estatística dos parâmetros aquícolas, com fins a otimização da produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa SBZ, 2006. v.35, p.886-903. Disponível em http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/arq_reuniao_anual/sbz2006.rar, acesso em 05 de novembro de 2012.
- MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades Del camarón**: detection mediante análisis em fresco e histopatología. (Diseases shrimp detection by means of Gross analysis and histopathology). México: Ed. Trilhas, 2010. 23p.
- OLAFSEN, J.A. Role of lectins in invertebrate humoral defense. **Newsletter American Fisheries Society**, Washington, US, v.1, p.189- 2005, 1988.
- OWENS, L.; O'NEILL, A. Use of a clinical cell flow cytometer for differential counts of prawn *Penaeus monodon* haemocytes. **Diseases of Aquatic Organisms**, Hawaii, USA, v.31, p.147-153. 1997.
- PERAZZOLO, L. M.; GARGIONE, R ; OGLIARI, P. ; BARRACCO, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 214, p. 19-33. 2002.
- RANZINE-PAIVA, M.J. T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINE-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M; LIZAMA, M.A.P. (Org). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. 88-120p.
- SCHALM, O.W. **Veterinary Hematology**. 3 ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1974. 807p.
- STOCKHAM, S.L. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011. 314p.
- THRALL, M. A., **Hematologia e bioquímica veterinária**- São Paulo: Roca, 2006.
- VAN DE BRAAK, C.B.T.; FABER, R.; BOON, J.H. Celular and humoral characteristics of *Penaeus Monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. **Comparative Hematology International**, London: Springer-Verlag, v.6, p.194-203. 1996.