

ANÁLISE DA CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS E CAPACIDADE COAGULANTE DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *Litopenaeus Vannamei* (BOONE,1931) EM CULTIVOS COM OCORRÊNCIA DE NECROSE MUSCULAR

Andrezza Melo COSTA¹ e Pedro Carlos Cunha MARTINS²

RESUMO

Neste trabalho foram analisados a contagem total de hemócitos (CTH) e o tempo de coagulação. A coleta dos camarões foi feita em uma fazenda situada em Aracati-CE. Foram amostrados 15 camarões, considerados com sinais característicos de necrose muscular, e 15 sem sinais, por cada grupo de peso médio (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 g). A contagem total de células e o tempo de coagulação obtiveram resultados estatisticamente diferentes, segundo ANOVA ($\alpha = 0,05$), tanto entre os diferentes grupos de peso, como também para os grupos sintomático e assintomático. Correlações foram encontradas entre peso e CTH e tempo de coagulação e CTH, a primeira positiva ($R = 0,58$ e $R = 0,65$ para os animais com sinais e sem sinais, respectivamente) e a segunda negativa ($R = -0,22$ e $R = -0,12$). Os resultados encontrados para o grupo de camarões sem sinais de mionecrose, com valores mais altos de CTH e valores menores de tempo de coagulação, confirmam uma melhor condição desse grupo em combater a doença causada por agente infeccioso, presente no ambiente de cultivo. Ao contrário, o grupo dos camarões com sinais de mionecrose obteve um pior desempenho nesta análise imunológica, confirmando o fato destes camarões estarem mais debilitados e com menor capacidade de reação do sistema imune.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*; necrose muscular; sistema imune

ANALYSIS OF TOTAL HEMOCYTES COUNTING AND CAPACITY OF HEMOLYMPH COAGULATION OF SHRIMP *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) IN PONDS WITH OCCURRENCE OF MYONECROSIS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the total haemocytes counting (THC) and the coagulation time of the haemolymph in shrimp *Litopenaeus vannamei*. The animals were analyzed from a farm located in Aracati-CE, Brazil. Fifteen shrimps considered nonsymptomatic for myonecrosis, and fifteen shrimps considered symptomatic, of each weight groups (5, 6, 7, 8, 9 and 10 g) had been sampled. The total haemocyte counting (THC) and the coagulation time of haemolymph had some different results according to the statistic test ANOVA ($\alpha < 0,05$), among the different weight groups, as also for symptomatic and nonsymptomatic ones. The results found for nonsymptomatic shrimps, with generally higher THC and lower coagulation time values, suggest a better condition of these animals, despite the presence of infectious agents in the culture environment. In contrast, the symptomatic shrimps group had a worse performance in immunological analysis, reporting a weaker condition of this group and lower reaction capacity of the immune system.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; myonecrosis; immune system

Artigo Científico: Recebido em: 10/09/2007 – Aprovado em: 19/11/2009

¹ Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – CEP: 88040-900 – Florianópolis - Santa Catarina – Brasil. e-mail: andrezzameloc@yahoo.com.br

² Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade federal do Rio Grande do Norte – Rio Grande do Norte, Brasil

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas pela aquíicultura chamam a atenção do mundo para a potencialidade dessa atividade, a qual deve contribuir cada vez mais com a produção de alimentos e suprir a demanda de proteína animal que vem crescendo juntamente com a população global.

Um dos produtos mais importantes da aquíicultura é o camarão marinho (ROCHA *et al.*, 2004). Desta forma, em todo o mundo, a carcinicultura vem se desenvolvendo de forma crescente nos âmbitos econômico e social, especialmente em países do Sudeste da Ásia, América Central e América do Sul. Porém, o ritmo de desenvolvimento nessas regiões tem diminuído nos últimos anos, em virtude principalmente do surgimento de doenças de origem bacteriana e viral.

Em 2002 surgiu uma nova doença causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e que afetou inicialmente fazendas do Estado do Piauí. A partir de 2003, essa doença se alastrou por praticamente todo o Nordeste, levando a uma queda acentuada na produção, de 2003 para 2004, e abalando a exportação de camarões brasileiros de forma substancial (RODRIGUES, 2005). A doença causada pelo IMNV se desenvolve especialmente em condições de estresse ambiental, isto é, em condições de má qualidade da água. Os camarões com essa enfermidade apresentam perda da transparência do músculo abdominal, a qual começa a partir do segundo ou terceiro segmento e vai se estendendo em direção ao telson. Com o avanço da doença, a cauda do camarão adquire aspecto leitoso (mionecrose), chegando a apodrecer no estágio mais avançado, com a liquefação dos músculos necrosados (aparência de camarão cozido) (NUNES *et al.*, 2004). Em alguns outros países, foram também recentemente observados sinais clínicos semelhantes aos do IMNV em camarões de cultivo. Em 2006, a presença deste vírus foi confirmada pela primeira vez fora do Brasil, em viveiros da Indonésia. Análises posteriores revelaram uma alta identidade (99,6%) da seqüência gênica do vírus diagnosticado na Indonésia com o IMNV brasileiro (SENAPIN *et al.*, 2007).

O acompanhamento de parâmetros imunológicos durante o cultivo pode funcionar

como indicador do estado de saúde dos camarões (BARRACCO, 2004). Esses parâmetros são afetados rapidamente pela resposta do sistema imune frente a condições ruins, como nos casos de má qualidade da água ou manejo alimentar ineficiente. Essas condições debilitam os organismos cultivados, afetando o metabolismo, o crescimento e o processo de ecdise, e tendo como consequência o aumento da susceptibilidade destes animais a doenças infecciosas. Sem o acompanhamento desses parâmetros, os problemas de saúde geralmente só conseguem ser detectados em um estágio já avançado, quando o crescimento dos camarões se compromete ou quando começam a aparecer mortos no viveiro.

Dentre os parâmetros imunológicos, o hemograma, o qual consiste nas contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH, respectivamente), é um dos parâmetros mais afetados por condições de estresse, quer seja ambiental ou por infecções, ou pelo período de ecdise (muda), servindo, portanto, como um indicativo do estado de saúde do animal (PERAZOLLO *et al.*, 2002; SMITH e SÖDERHÄLL, 1983; TSING; ARCIER; BREHELIN, 1989).

O fato dos crustáceos apresentarem circulação aberta torna o sistema de coagulação um dos mais importantes mecanismos de defesa para esses animais, pois este sistema impede a perda excessiva de hemolinfa e a disseminação de patógenos para dentro do organismo (BARRACCO, 2004). Em análises presuntivas, o tempo de coagulação é um procedimento bastante utilizado, sendo o tempo de 20 segundos tido como padrão para este tipo de análise, funcionando como o limite de tolerância para camarões sadios (PEREGRINO, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade de hemócitos e o tempo de coagulação da hemolinfa em camarões pesando de 5 a 10 gramas, aparentemente infectados com o IMNV, o qual se encontrava em surto no ambiente de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os camarões usados nesse estudo foram coletados em uma fazenda localizada no município de Aracati, Estado do Ceará, no período de 12 a 16 de setembro de 2005. Para esta coleta foram selecionados diferentes viveiros,

apresentando camarões com pesos médios de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 e 10 gramas. Em cada viveiro foram coletados 15 camarões com sinais de necrose muscular (sintomáticos) e 15 camarões sem sinais de necrose muscular (assintomáticos), totalizando 30 camarões por grupo de peso. Foram, portanto, coletados 180 camarões em seis viveiros (um viveiro para cada grupo de peso). Vale ressaltar que na época ainda estava sendo preparado o protocolo de PCR para a detecção do vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), portanto, devido à necessidade de avaliação da mionecrose, esta foi baseada no quadro sintomatológico. Esse quadro sintomatológico obteve correspondência com os achados através de análise histopatológica (MARTINS e GESTEIRA, 2006).

Os camarões foram coletados com tarrafa, selecionados segundo a ausência ou não de sintomatologia de mionecrose, e levados em baldes com água para o laboratório de análises da própria fazenda.

No laboratório da fazenda os camarões foram mantidos nos baldes, sob aeração, e a coleta da hemolinfa foi feita em seguida. Para a coleta, que seria utilizada na CTH, foram utilizadas seringas de 1 ml acrescidas de 50 µl de solução tamponada Tris-HCl (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,25M; Citrato de Sódio 0,1M; pH 7,6 e formalina a 5%), usada como anticoagulante na proporção de 1:1 (COSTA *et al.*, 2009). A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo, no início do primeiro segmento abdominal de cada animal. O material foi colocado individualmente em microtubos e mantido sob refrigeração (HENNIG *et al.*, 1999).

Em outros camarões, foram retiradas amostras de hemolinfa sem anticoagulante, também individualmente, para a análise do tempo de coagulação. Este método empírico não é o mais adequado para se avaliar o tempo de coagulação, porém utilizamos esta técnica por ser bastante usada entre os produtores, além de simples e passível de ser feita a campo. Neste procedimento, foi extraída uma pequena quantidade de hemolinfa e colocada sob uma lâmina, onde, com a ponta da agulha da seringa, a amostra coletada era esfregada contra a lâmina até que houvesse a coagulação. O tempo era determinado com a ajuda de um cronômetro.

A contagem total dos hemócitos (CTH) foi feita no laboratório do CEDECAM (Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho), no LABOMAR (Instituto de Ciências do Mar), em Fortaleza. O transporte do material da fazenda ao laboratório foi feito em caixas de isopor com gelo para a manutenção da temperatura. Ao chegar ao CEDECAM, as amostras foram acondicionadas em geladeira. A CTH foi determinada, individualmente, em câmara de Neubauer e microscópio óptico comum, seguindo a metodologia usada na contagem de células sanguíneas humanas. Para tal, as amostras foram diluídas de quatro a seis vezes com a mesma solução tamponada citada anteriormente.

Os dados referentes às contagens totais de hemócitos e tempo de coagulação foram submetidos ao teste-t dentro de cada grupo, à análise de variância (ANOVA), entre os grupos, e correlação ($\alpha < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem total de hemócitos e o tempo de coagulação da hemolinfa obtiveram alguns resultados estatisticamente diferentes, segundo teste-t (Figuras 1 e 2) e ANOVA (Tabela 1) ($\alpha < 0,05$), entre os diferentes grupos de peso, e também entre os grupos com sinais e sem sinais de mionecrose. Neste último, pode-se perceber valores muito variáveis, mesmo dentro de um mesmo grupo de camarões (altos desvios da média), o que dificultou a avaliação dos resultados (Tabela 1).

No presente estudo, o CTH de dois grupos dos camarões assintomáticos (6 e 9 gramas) se manteve significativamente maior em comparação ao grupo dos camarões sintomáticos dos mesmos grupos (Figura 1), demonstrando uma possível melhor reação e maior resistência daqueles grupos diante da presença de agentes infecciosos no ambiente. Já a tendência para valores mais baixos de CTH, apresentada pelos camarões sintomáticos, pode indicar uma menor capacidade de reação hemocitária por parte do sistema imune destes camarões. Essa aparente menor capacidade pode ser resultado de uma menor eficiência imunológica, fator este de ordem fisiológica e/ou genética, prejudicada por

condições desfavoráveis de cultivo, que implicariam em uma situação de estresse mais agravante, demonstrando uma maior suscetibilidade deste grupo a manifestar mionecrose. Os resultados encontrados aqui corroboram com outros resultados obtidos com

camarões infectados pelo IMNV, onde os camarões com sinais clínicos mais aparentes (mionecrose em todo o abdômen) também tinham valores de CTH mais baixos que os camarões assintomáticos, mesmo estando infectados (COSTA *et al.*, 2009).

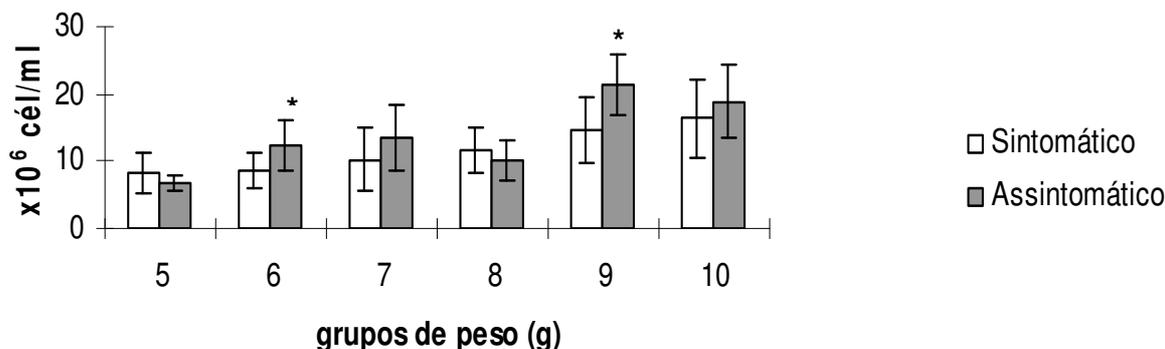


Figura 1. Médias e desvios-padrão da contagem total de hemócitos (CTH) para os diferentes grupos de peso de camarões sintomáticos (n = 15) e assintomáticos (n = 15). Asteriscos indicam diferença significativa dentro de cada grupo

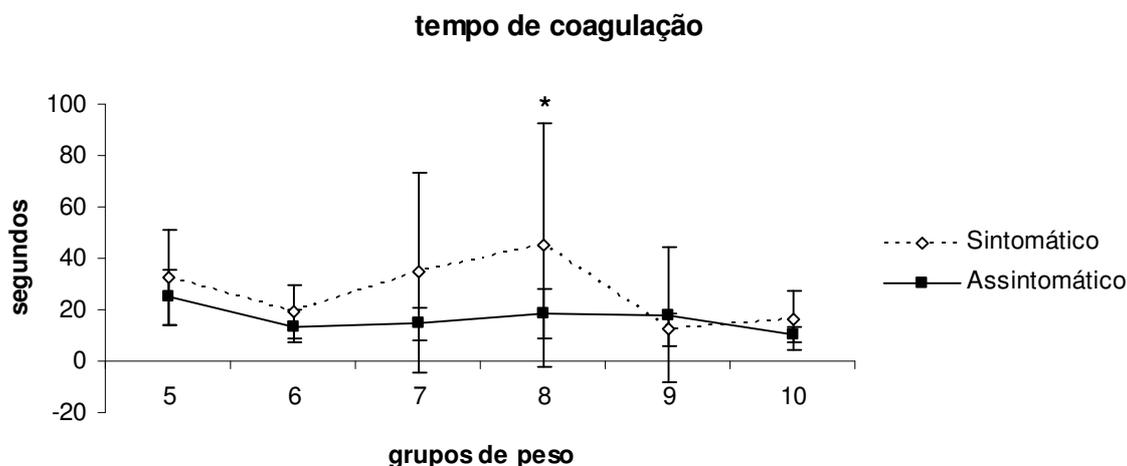


Figura 2. Média e desvio padrão do tempo médio de coagulação para os diferentes grupos de peso de camarões sintomáticos (n = 15) e assintomáticos (n = 15). Asteriscos indicam diferença significativa dentro de cada grupo

Valores baixos de CTH resultam em uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas, e períodos prolongados nessa situação levam a uma depleção do sistema imune, o que aumenta o risco de infecções tanto por microrganismos patogênicos como por microrganismos oportunistas (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002). Ao contrário, uma maior quantidade de hemócitos presentes na circulação confere uma maior resistência a patógenos (LE MOULLAC *et al.*, 1998).

A tendência demonstrada pelos camarões que não apresentavam sinais de mionecrose, geralmente com valores mais altos do CTH podem ser decorrentes de uma maior imunocompetência dos animais frente à presença de agentes patológicos no ambiente, pois um número maior de hemócitos circulantes sugere um maior grau de ativação dos mesmos contra os processos infecciosos. Portanto, para um bom funcionamento dos

fatores celulares de defesa é importante não só a quantidade de hemócitos presentes na circulação, mas também a intensidade de resposta ao primeiro estímulo, resultando em

uma proliferação adequada para a manutenção de níveis ideais do número de hemócitos e grau de ativação das células (MALDONADO *et al.*, 2003).

Tabela 1. Resultados da análise de variância ($\alpha < 0,05$) do CTH e tempo de coagulação entre grupos de peso sintomáticos e assintomáticos para mionecrose. Letras diferentes indicam diferença significativa

Grupos de peso (g)	CTH ($\times 10^6$ cél ml^{-1})		Tempo de coagulação (seg)	
	Sintomático	Assintomático	Sintomático	Assintomático
5	8,23 \pm 2,9 ^a	6,84 \pm 1,2 ^a	32,73 \pm 18,8 ^{ab}	24,87 \pm 10,5 ^a
6	8,78 \pm 2,6 ^a	12,28 \pm 3,8 ^b	19,33 \pm 10,3 ^{ab}	13,67 \pm 6,1 ^{ab}
7	10,20 \pm 4,8 ^a	13,60 \pm 4,9 ^b	34,67 \pm 38,8 ^{ab}	14,73 \pm 6,4 ^{ab}
8	11,64 \pm 3,4 ^{ab}	10,26 \pm 3,2 ^{ab}	45,07 \pm 47,5 ^b	18,67 \pm 9,5 ^{ab}
9	14,70 \pm 4,8 ^{bc}	21,24 \pm 4,4 ^c	12,27 \pm 6,2 ^a	18,04 \pm 26,2 ^{ab}
10	16,34 \pm 5,8 ^c	18,89 \pm 5,4 ^c	16 \pm 11,6 ^a	10,47 \pm 2,9 ^b

Os camarões assintomáticos dos grupos de 5 e 8 gramas apresentaram valores de CTH menores que os dos camarões sintomáticos, porém sem diferença significativa (Figura 1). Esse resultado pode indicar possíveis picos de atividade microbiana e/ou viral no ambiente, o que resultaria em um maior requerimento dos hemócitos nas reações celulares para combater a infecção, ou ainda, um aumento do nível de estresse dos animais com relação a outros fatores ambientais presentes no cultivo naquele momento.

Dados na literatura sobre tempo de coagulação, avaliado por gotejamento sobre lâmina, são escassos devido, principalmente, a este ser um procedimento empírico de campo, utilizado para monitorar o estado de saúde dos animais. Normalmente os fatores que influenciam o número de hemócitos também influenciam no tempo de coagulação. Neste trabalho apenas um grupo (8 gramas) que apresentava sinais de mionecrose também apresentou um aumento significativo no tempo de coagulação em comparação ao grupo dos camarões assintomáticos (Figura 2). O tempo de coagulação utilizado como padrão para camarões sadios foi de 20 segundos (PEREGRINO, 2005). Dessa forma, os camarões com sinais de mionecrose apresentou o maior número de grupos de peso com tempo de coagulação acima desse limite (grupos 5, 7 e 8 gramas). O pico ocorreu no grupo 8 gramas, com um tempo médio de 45 segundos.

Não foram encontrados dados na literatura que correlacione CTH e tempo de coagulação. Foi verificada, neste trabalho, uma pequena correlação negativa entre estes dois parâmetros nos camarões sintomáticos ($R = -0,22$, significativa para $n = 90$). Como a enzima responsável pela indução do processo de coagulação (transglutaminase) (LEE e SÖDERHÄLL, 2002) está presente em hemócitos, essa correlação pode indicar que uma menor quantidade de hemócitos na circulação prejudicaria os processos de coagulação, aumentando o tempo de exposição dos organismos em casos de injúria. Esta situação resultaria numa menor capacidade do sistema de defesa em proteger os organismos contra patógenos presentes no meio.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse estudo, com alguns grupos de camarões assintomáticos apresentando valores mais altos de CTH e valores menores de tempo de coagulação, podem indicar uma melhor condição desse grupo em combater o agente patológico presente no ambiente de cultivo. A falta de sinais aparentes não implica que o camarão esteja livre de doenças, que pode estar doente e conseguir conter a infecção. O resultado obtido nesse trabalho sugere que camarões de alguns grupos de peso, sem sinais aparentes de mionecrose, possivelmente estavam em melhores condições imunológicas do que aqueles com sinais evidentes da doença, pelo

menos ao que se refere a uma maior quantidade de hemócitos circulantes e a uma melhor capacidade coagulante da hemolinfa.

Quanto à correlação negativa encontrada entre CTH e tempo de coagulação no grupo dos camarões sintomáticos, há necessidade de maiores estudos, já que para os camarões assintomáticos não foi encontrada correlação neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) da Universidade Federal do Ceará, e ao pessoal da antiga fazenda Compescal, que cederam os camarões e deram todo o suporte necessário para viabilizar a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARRACCO, M.A. 2004 Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA; TAKEMOTO, R.; LIZAMA M. *Sanidade de organismos acuáticos*. São Paulo: Ed. Varela, p. 51-74.
- COSTA, A.M.; BUGLIONE, C.C.; BEZERRA, F.L.; MARTINS, P.C.C.; BARRACCO, M.A. 2009 Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE, Brazil. *Aquaculture*, Amsterdam, 291: 141-146.
- HENNIG, O.L.; VASCONCELOS, T.C.; ANDRADE, T.P.; CARVALHO, R.L.; CAVALCANTE, F.A.M.; ARAÚJO, P.H.G.; MARTINS, P.C.C.; MARQUES, L.C. 1999 Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado em diferentes salinidades. In: CONBEP, 11. e CONLEAP, 1., Recife, 17/jan./1999. *Anais... Recife*: v. 2, p. 589-593.
- LE MOULLAC, G.; SOYEZ, C.; SAULNIER, D.; ANSQUER, D.; AVARRE, J.C.; LEVY, P. 1998 Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*, Amsterdam, 8: 621-629.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. 2000 Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*, Amsterdam, 191: 121-131.
- MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; BLAS, I.; ECHEVERRIA, F. 2003 Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. In: CIVA 2003, Zaragoza, 01/set./2003. *Anais do Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura 2003*, Zaragoza, p. 891-899.
- MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. 2006 Investigação sobre a ocorrência das principais enfermidades na carcinicultura marinha no Estado do Ceará, através de histopatologia, durante o período de 1999 a 2003.. In: FENACAM 2006, Natal, 16/jun./2006. *Anais...* p. 43-48.
- NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. 2004 Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV). *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, 83: 37-51.
- PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M.A. 2002 Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, Amsterdam, 214: 19-33.
- PEREGRINO, L.H. 2005 Importância da utilização de análises presuntivas como ferramenta de prevenção e controle de enfermidades no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. *Revista da ABCC*, Natal, 3: 47-51
- RODRIGUES, J. 2005 Carcinicultura marinha - desempenho em 2004. *Revista da ABCC*, Natal, 2: 38-44.
- ROCHA, I.R.C.B.; LIMA, F.M.; GONÇALVES, F.A.; SAMPAIO, A.H.; COSTA, F.H.F. 2004 Las camaroneras de *Litopenaeus vannamei* em el estado de Ceará (Brasil): la problemática ambiental. In: CIVA 2004, Zaragoza, 19/nov./2004. *Anais do Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura 2004*, p. 680-688.
- SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T.W. 2007 Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia

confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, Amsterdam, 266: 32-38.

SMITH, V.J.; SÖDERHÄLL, K. 1983 β -1,3- glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biological Bulletin*, Woods Hole, 164: 299-314.

TSING, A.; ARCIER, J.M.; BREHELIN, M. 1989 Haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps, morphology, cytochemistry and haemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, Amsterdam, 53: 64-77.