

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

Avaliação de parâmetros hemato-imunológicos, em fêmeas abladadas de camarão *Litopenaeus vannamei*, em associação a uma dieta com diferentes superdosagens de ácido ascórbico

DANIELA GONÇALVES SOARES MAGGIONI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Aquicultura

Orientador:

Prof.(a) Dr.(a) Margherita Anna Barracco

Co-orientador:

Prof.(a) Dr.(a) Débora Machado Fracalossi

**Florianópolis, Santa Catarina.
Fevereiro de 2002.**

Maggioni, Daniela Soares

Avaliação de parâmetros hemato-imunológicos, em fêmeas ablasadas de camarão *Litopenaeus vannamei*, em associação a uma dieta com diferentes superdosagens de ácido ascórbico.

86 páginas.

Dissertação de Mestrado em Aqüicultura. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

2002.

Orientador: Profa. Dra. Margherita Anna Barracco

Co-orientador: Profa. Dra. Débora Machado Fracalossi

Palavras-chave: crustáceos, *Litopenaeus vannamei*, parâmetros hemato-imunológicos, ablação unilateral, imuno-estimulante, ácido ascórbico.

**Análise de parâmetros hemato-imunológicos, em fêmeas
abladas de camarão *Litopenaeus vannamei* em associação a
uma dieta com diferentes superdosagens de ácido ascórbico**

Por

DANIELA GONÇALVES SOARES MAGGIONI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Jaime Fernando Ferreira, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco - *Orientadora*

Dra. Débora Machado Fracalossi

Dr. Edemar Roberto Andreatta

Dr. Luiz Eduardo Maia Nery

AGRADECIMENTOS

À orientadora profa. Margherita A. Barracco, pelas suas inúmeras qualidades, seu companheirismo, competência, orientação e principalmente por ter tornado realidade essa conquista. Muito obrigado.

Ao prof. Edeamar R. Andreatta pelas sugestões e conhecimentos a mim passados. Ao Laboratório de Camarões Marinhos da Barra da Lagoa (LCM) pelo apoio na utilização do material biológico e suas instalações.

À profa. Débora M Fracalossi pelo valioso auxílio técnico em relação a determinação da vitamina e pelo valioso aprendizado.

Ao prof. Marcelo Reis pelo grande apoio nas análises estatísticas do presente estudo.

À bioquímica Elizabeth M. Hermes pelas análises bioquímicas de glicose e lactato e pela atenção sempre que necessário.

Ao prof. Afonso C. Bainy pela ajuda com os cálculos e pelo material utilizado na análise da vitamina.

Aos funcionários Rodrigo, Adilton, Alessandro, Ana, Andréia, Leomar, Leonardo, Marlene, Rui, Vaninho e Walter pelo apoio, companheirismo e consideração em todos os momentos.

Aos estagiários Alexandre, Jeferson e Marcus pelas noites e madrugadas em que me ajudaram nas coletas.

Aos colegas Adriana Fraga, Adriana Pereira, Carina, Dominique, Franklin, Gabriela, Gilvan, Hugo, Jean, Marcos e Simone pela humildade e companheirismo em vários momentos.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Juliana, Karine, Luciane, Sara e Tânia, pela sincera amizade e valioso apoio.

À todo o pessoal do Departamento de Aqüicultura, pela companhia e ajuda desde o ingresso no curso.

À CAPES pelo apoio financeiro deste estudo.

Ao meu esposo, pessoa que eu admiro, amo muito e um dos principais responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado lindo, te amo!

À minha família, pai, mãe, Fábio e Lene, pelas pessoas maravilhosas que são e que eu amo muito. Agradeço especialmente à minha irmã que ajudou com algumas coletas. Valeu pelo enorme apoio de todos.

Ao meu cunhado Rodrigo por ter possibilitado o ingresso nessa nova área.

À família do meu esposo, hoje minha família também, que é tão importante na minha vida quanto a minha própria família.

Sumário

Lista de figuras da introdução e do artigo científico	vii
Lista de tabelas do artigo científico.....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Resumo	x
Abstract.....	xii
I - Introdução	14
II - Corpo do artigo científico.....	32
Resumo	34
1 Introdução.....	35
2 Material e métodos	39
2.1 Material biológico	39
2.2 Desenho experimental e características da prática de maturação	39
2.3 Coleta de hemolinfa e obtenção do soro	41
2.4 Obtenção de plasma	41
2.5 Hemogramas - Contagem total de hemócitos (THC).....	41
2.6 Determinação da concentração de proteínas totais no soro	42
2.7 Atividade da enzima fenoxidase (PO) no soro.....	42
2.8 Atividade aglutinante	42
2.9 Determinação de glicose e lactato no plasma	43
2.10 Determinação do ácido ascórbico (vitamina C) no hepatopâncreas e na gônada dos camarões	43
2.11 Análise Estatística	44
3 Resultados.....	44

3.1 Hemogramas - Contagem total de hemócitos (THC)	44
3.2 Concentração protéica (CP) do soro	45
3.3 Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro	46
3.4 Título aglutinante do soro	47
3.5 Concentração de glicose no plasma	48
3.6 Concentração de lactato no plasma.....	49
3.7 Concentração de ácido ascórbico nas gônadas e hepatopâncreas.....	50
4 Discussão	51
5 Agradecimentos	57
6 Referências Bibliográficas.....	58
III - Referências Bibliográficas da Introdução	65
IV – Anexo	76
V – Normas de Publicação	79

Lista de figuras da introdução e do artigo científico

Introdução

Figura 1. Desenho esquemático representando os locais da regulação neuroendócrina de crustáceos.	15
--	----

Artigo científico

Figura 1. Contagem total de hemócitos (THC) em fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	39
---	----

Figura 2. Concentração protéica do soro de fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	40
---	----

Figura 3. Atividade da PO (enzima fenoloxidase) em fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
---	----

Figura 4. Título aglutinante (\log_2) em fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	42
---	----

Figura 5. Concentração de glicose em fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
---	----

Figura 6. Concentração de lactato em fêmeas reprodutoras da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	44
---	----

Lista de tabelas do artigo científico

Tabela 1. Concentração de ácido ascórbico (AA) no hepatopâncreas e nas gônadas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	45
--	----

Lista de abreviaturas e símbolos

AA - ácido ascórbico

AAE - ácido ascórbico equivalente a 42% de vitamina C ativa

ApP - ácido ascórbico polifosfatado

Ca⁺² - cálcio

CHH - hormônio hiperglicêmico

CP - concentração protéica

CuSO₄ - sulfato de cobre

DNPH - dinitrofenilhidrazina

DOPA - dihidroxifenilalanina

ERO - espécies reativas de oxigênio

GIH - neuro-hormônio inibidor da gônada

GSH – fator hormonal estimulador da gônada

ha - hectare

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

MF - metil-farnesoato

MIH - neuro-hormônio inibidor da muda

MOIH - neuro-hormônio inibidor do órgão mandibular

NS - grupo não superdosado com vitamina C

PAM - peptídeos anti-microbianos

PC - proteína de coagulação

PO - enzima ativa fenoloxidase

proPO - enzima inativa profenoloxidase

S1 - grupo superdosado com 1.000 mg AAE/kg de dieta

S2 - grupo superdosado com 2.000 mg AAE/kg de dieta

TBS - solução tampão

THC - contagem total de hemócitos

t - tonelada

5-HT - serotonina

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar alguns parâmetros hemato-imunológicos em fêmeas reprodutoras da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidas ao processo de ablação unilateral e cuja dieta foi suplementada com superdosagens de vitamina C, como forma de imunoestimulação. Os parâmetros analisados foram: contagem total de hemócitos (THC), concentração de proteínas plasmáticas, níveis de glicose e lactato, atividade aglutinante e atividade da enzima fenoloxidase. As fêmeas foram analisadas no dia anterior à ablação e nos dias 1, 3, 7 e 14 após à ablação. A suplementação com superdosagens de vitamina C foi oferecida às fêmeas (1x ao dia) juntamente com alimento fresco, durante duas semanas antes e duas semanas após a ablação, sob a forma de ácido ascórbico polifosfatado (ApP). As fêmeas foram divididas em um grupo controle (NS), não suplementado com superdosagens de ApP (200 mg/kg = dose recomendada) e dois grupos (S1 e S2) suplementados com doses de 10 e 20 vezes maiores que a dose recomendada, respectivamente. Surpreendentemente, a grande maioria dos parâmetros hemato-imunológicos analisados não mostrou alteração estatisticamente significativa no grupo NS. Houve apenas uma redução significativa do título aglutinante do soro no terceiro dia subsequente à ablação. As fêmeas suplementadas com superdosagens de vitamina C (S1 e S2) também não apresentaram alterações significativas na maioria dos parâmetros analisados, com exceção do título aglutinante e dos níveis de glicose da hemolinfa. Não houve declínio da atividade aglutinante nos grupos S1 e S2 no terceiro dia da ablação como verificado no grupo NS, sugerindo talvez uma eventual imunoestimulação pela vitamina C. Por outro lado, os grupos S1 e S2 mostraram uma hipoglicemia no primeiro dia após ablação. Esta hipoglicemia decorreu provavelmente de uma diminuição transitória dos níveis do hormônio hiperglicemiante como consequência do processo da ablação peduncular que remove o

complexo glândula do seio - órgão X, responsável pela produção e liberação desse hormônio, entre outros. A ausência de alterações significativas nos parâmetros hemato-imunológicos analisados parece sugerir a ocorrência de um mecanismo compensatório desencadeado pelo pedúnculo ocular não ablado, uma vez que a apedunculção foi apenas unilateral. Pode-se ainda especular que os parâmetros hemato-imunológicos selecionados para este estudo não sejam os mais favoráveis para avaliar esta condição de estresse ou ainda que o *L. vannamei* seja efetivamente uma espécie muito resistente capaz de manter sua homeostase, mesmo quando submetida a um estresse fisiológico severo.

Palavras-chave: parâmetros hemato-imunológicos, ablação unilateral, imuno-estimulante, ácido ascórbico, crustáceos, *Litopenaeus vannamei*.

Abstract

The main purpose of this study was to examine the modulation of some hemato-immunological parameters in females shrimps *L. vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation and whose diet was supplemented with superdoses of vitamin C, as a form of immunostimulation. The analyzed parameters were: total hemocyte counts (THC), protein concentration (PC), agglutinating and PO activities in the serum, and levels of glucose and lactate in the plasma. Broodstock shrimp females were analyzed on the day before ablation and on days 1, 3, 7 and 14 after ablation. The diet was supplemented with superdoses of vitamin C, in the form L-ascorbyl-2-polyphosphate (ApP). The females were divided into a control group (NS), not supplemented with superdoses of ApP, and two other groups (S1 and S2) supplemented with doses 10 and 20 times the recommended dose of 200 mg/kg, respectively. Surprisingly, the great majority of the hemato-immunological parameters analyzed did not exhibit any statistically significant change in relation to eyestalk ablation in NS group. There was only a significant reduction in the agglutinating activity on the third day following ablation. Similarly, in S1 and S2 groups, there was no significant changes in the majority of the parameters analyzed, except for the agglutinating titre and the level of glucose in the plasma. However, unlike the NS group, S1 and S2 did not exhibit a decrease in the agglutinating activity on the third day after ablation. This could possibly suggest a potential immunostimulation in this parameter by vitamin C. The S1 and S2 groups presented a hypoglycemia on the first day after ablation. This hypoglycemia probably resulted from a transitory decrease in the levels of the hyperglycemic hormone as a consequence of eyestalk ablation and removal of X-organ-sinus gland complex which is the responsible for the production and release of this hormone. The absence of significant changes in the hemato-immunological parameters in unilaterally ablated *L. vannamei*

females apparently suggests the existence of a compensatory mechanism induced by the non-ablated eyestalk. It can be further speculated that the hemato-immunological parameters selected in this study were not the most appropriate for the evaluation of this stress condition or, possibly, that *L. vannamei* is a highly resistant species capable of maintaining homeostasis, even when submitted to severe physiological and mechanical stress as the ablation practice.

Key words: hemato-immunological parameters, unilateral eyestalk ablation, immunostimulant, ascorbic acid, shrimps, *Litopenaeus vannamei*.

I - Introdução

1. Alguns aspectos relacionados ao cultivo de camarões.

A produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos alcançou 126,2 milhões de *t* em 1999, com um aumento de 7,2% em relação aos valores alcançados em 1998 (FAO, 2001). Esse aumento deveu-se principalmente à atividade de cultivo, já que o pescado de captura manteve-se estável neste período (FAO, 2000). Não há indícios de que haverá um aumento na produção aquícola por captura à longo prazo e o crescimento das exportações deverá resultar apenas do incremento da produção por aquíicultura ou em decorrência de preços favoráveis (FAO, 2000).

A região asiática tem um domínio evidente da produção mundial de pescado por aquíicultura (particularmente a China, com 17 milhões de *t* em 1999), representando 89% do volume total da produção (33,3 milhões de *t* em 1999) (FAO, 2000).

Em 1999, mais de três quartos (97 milhões de *t*) da produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos foram utilizadas para consumo humano. A produção de pescado por captura representou cerca de 10,7 kg (equivalente ao peso vivo), enquanto a aquíicultura contribuiu com 5,6 kg per capita (FAO, 2000). O camarão é, em valor, o principal produto pesqueiro comercializado, já que representa 20% do valor total dos produtos pesqueiros no comércio internacional (FAO, 2000).

A carcinocultura, atualmente praticada em mais de 50 países, tem como maiores produtores a Tailândia, Indonésia, China e Índia, que em conjunto são responsáveis por 72% da produção mundial. Por outro lado, o continente americano responde pelos 28% restantes, onde o Equador é o principal produtor (150.000 ha) seguido pelo México (30.000 ha) (ROSENBERRY, 1998). Dentre os camarões cultivados, os peneídeos destacam-se de forma absoluta, sendo que em 1995 representaram mais de 96,3% de todas as espécies de camarões cultivados. O camarão-tigre

Penaeus monodon, originário da Ásia e presente no Pacífico Oriental (Japão, Malásia, China) e no Oceano Índico, é a espécie mais cultivada a nível mundial. Sua produção aumentou de 31% (54.000 t) em 1984 para 54% (503.000 t) em 1995, enquanto a produção dos demais camarões peneídeos aumentou de 12% (21.000 t) para 18% (165.000 t) nos mesmos anos (SUBASINGHE et al., 1998). A segunda espécie de peneídeo mais cultivada é o camarão-branco *Litopenaeus vannamei*. Essa espécie, que habita locais de 0 a 72 m de profundidade, distribui-se desde o leste do Pacífico, no Norte do México, até Tumbes, na região norte do Peru (PÉREZ FARFANTE & KENSLEY, 1997). Na fase adulta e de reprodução, os camarões residem em ambientes marinhos, enquanto que, na fase de desova, de desenvolvimento larval e até a fase juvenil, residem em ambientes estuarinos. A espécie atinge um comprimento total máximo de 230 mm (HOLTHUIS, 1980). Os nomes populares dessa espécie variam de acordo com os países onde são cultivados: “camarón blanco” (México), “white shrimp” (México, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Peru), “camarón patiblanco” (Panamá), “camarón café” (Colômbia), “langostino” para todas as espécies de *Litopenaeus* (Peru) (HOLTHUIS, 1980) e “camarão branco” no Brasil.

Segundo dados da FAO (2000), a produção mundial de *L. vannamei*, aumentou de 120.000 para 187.000 t de 1991 para 1999, respectivamente. A produção do camarão de cultivo *L. vannamei* no Brasil, no ano de 2000, chegou a 25 mil t em uma área total cultivada de 6,2 mil ha. Com essa produtividade de 4,03 t/ha, o Brasil passou a assumir a liderança mundial em termos de produtividade (SOUZA, 2001). Nesse mesmo ano, as exportações de camarão cultivado no Brasil representaram US\$ 71,4 milhões e a previsão para 2001 é a de atingir o valor de US\$ 200 milhões (SOUZA, 2001).

A carcinocultura brasileira concentra-se no nordeste devido às condições geográficas favoráveis à atividade. Já, em Santa Catarina, o camarão *L. vannamei* foi introduzido em 1998 na

região de Laguna pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Experiências anteriores com o cultivo da espécie nativa de camarão *Farfantepenaeus paulensis*, ou “camarão rosa”, no estado de Santa Catarina não foram bem sucedidas. A produção de *L. vannamei* em 2001, em Santa Catarina, foi de 572,1 t (SOUZA, 2001), em 270 ha de tanques distribuídos em 23 fazendas. Esta produção superou em 200% a produção do ano 2000. O crescimento da atividade de cultivo de *L. vannamei* nestes quatro anos foi de 1044%, passando de 50 t em 1998 para 572,1 t em 2001 (SOUZA, 2001). A carcinocultura destaca-se no estado de Santa Catarina nas regiões circunvizinhas ao Complexo Lagunar (compreendendo os municípios de Laguna, Jaguaruna, Garopaba e Imaruí), Grande Florianópolis (Biguaçu) e Baía da Babitonga (Barra do Sul).

2. A prática da ablação e a maturação gonádica em fêmeas de camarões.

O processo utilizado mundialmente para a indução da maturação de camarões em cativeiro é o da ablação peduncular unilateral (CAILLOUET, 1973; PRIMAVERA, 1978; BROWDY, 1992; FINGERMAN, 1997a). Essa técnica consiste na retirada de um dos pedúnculos oculares, que proporciona um desequilíbrio hormonal nos camarões e que reverte na aceleração do desenvolvimento ovariano (YANO, 1984; SADAHARU & PRIMAVERA, 1987; NASCIMENTO et al., 1991). A regulação hormonal é feita através do sistema neuro-endócrino, que é um importante sistema efetor, constituído de vários grupos de neurônios, com função glandular, que secretam mensageiros químicos específicos como neuro-hormônios lançados na circulação. Os hormônios podem ser secretados em baixas concentrações nos fluidos corporais onde circulam e elicitam uma resposta em células alvo específicas. Estes hormônios controlam

muitas funções, incluindo o metabolismo celular, o crescimento, a reprodução, a pigmentação, a função cardiovascular e a digestão, entre outras (FINGERMAN, 1997a).

Em cada pedúnculo ocular estão localizados a glândula do seio e o órgão X, formando o conhecido complexo *órgão X - glândula do seio* (FINGERMAN, 1997a). Esse complexo é tido como análogo ao complexo hipotálamo-neurohipofisial dos vertebrados (FINGERMAN, 1997a). A glândula do seio é um órgão neurohemal constituído por vasos sanguíneos e pela porção final dos axônios neurosecretores das células do lobo óptico, bem como de axônios do cérebro. Esta glândula armazena e libera, de forma controlada, os produtos de secreção do órgão X. Este, por sua vez, constitui-se de corpúsculos celulares neurosecretores, que desembocam na glândula do seio, sendo o órgão responsável pela produção do MIH (neuro-hormônio inibidor da muda), do MOIH (neuro-hormônio inibidor do órgão mandibular), do GIH (neuro-hormônio inibidor da gônada, ou hormônio inibidor da vitelogênese - VIH) e do CHH (hormônio hiperglicêmico), que é conhecido como fator diabetogênico por causar efeito hiperglicêmico na hemolinfa de crustáceos (vide revisão de FINGERMAN, 1997a), dentre outros. Os neuro-hormônios CHH, MIH e GIH já foram isolados e parcialmente seqüenciados no camarão *Litopenaeus vannamei* (WANG et al., 2000). O MIH é um neuro-hormônio peptídico responsável pela inibição da produção do hormônio da muda (ecdisona) por uma outra glândula, denominada *órgão Y* (vide revisão de LACHAISE et al., 1993). Este órgão, encontra-se no segmento maxilar e é responsável pela produção e secreção do hormônio da muda na hemolinfa, na forma inativa (α -ecdisona), que, por sua vez, é convertido na forma ativa (β -ecdisona ou 20-hidroxi-ecdisona) nos tecidos periféricos (vide revisão de SUBRAMONIAM, 2000). A ação do β -ecdisona no processo de muda de *L. vannamei* já foi demonstrada (CHAN, 1995). Existe ainda, o *órgão mandibular*, situado próximo, mas em uma região mais anterior ao órgão Y, que produz o neuro-hormônio MF (metil-farnesoato) responsável por regular positivamente a atividade do órgão Y (vide Figura

1) (HOMOLA & CHANG, 1997; CHAVES, 2001). A muda é um importante processo fisiológico nos crustáceos e resulta na troca do exoesqueleto rígido para permitir o crescimento. Além de ser controlada por fatores intrínsecos, como estado nutricional e hormônios, é também influenciada por fatores extrínsecos, como a intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, salinidade, disponibilidade alimentar e poluentes (vide revisão de KLEINHOLZ, 1985). A maioria dos crustáceos adultos continua a realizar a muda junto com a reprodução (SUBRAMONIAM, 2000).

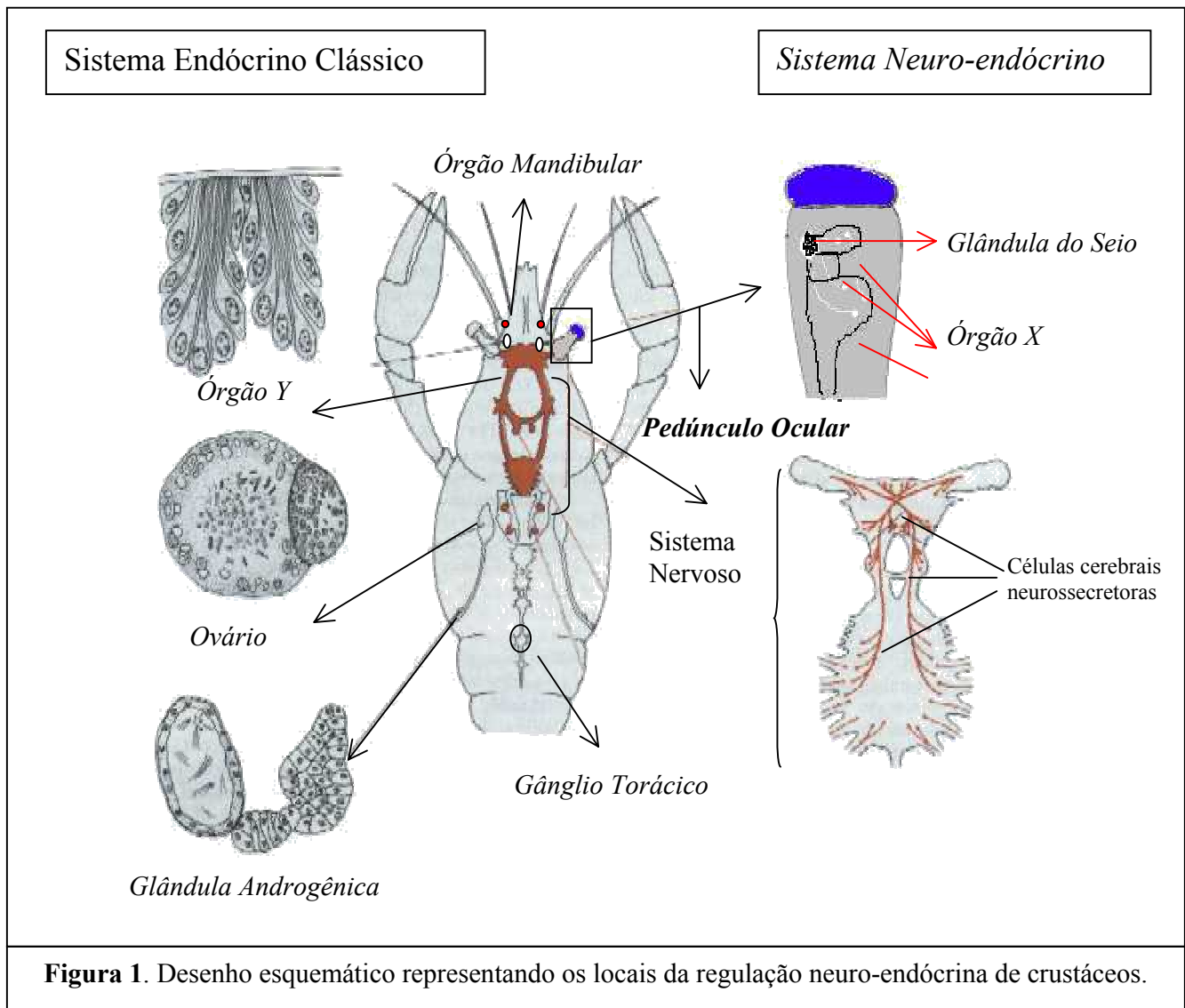


Figura 1. Desenho esquemático representando os locais da regulação neuro-endócrina de crustáceos.

A maturação sexual de crustáceos pode decorrer da liberação do GSH (“fator hormonal estimulador da gônada”) pelo cérebro e gânglios torácicos (VACA & ALFARO, 2000). Segundo estes autores, o GSH é uma molécula abstrata pois ainda não foi convenientemente identificada, nem medida diretamente. A liberação deste hormônio é regulada positivamente pelo neurotransmissor 5-HT (serotonina ou 5-hidroxi-triptamina) e pelo RPCH (hormônio concentrador de pigmento vermelho) (SAROJINI et al., 1995). Por outro lado, sua liberação é regulada negativamente pelos neurotransmissores DA (dopamina) e MET-ENK (encefalina-metionina) (FINGERMAN, 1997b).

Cabe ainda salientar que a serotonina ou 5-HT tem especial relevância na regulação dos sistemas de muda, maturação e transporte de glicose em crustáceos, uma vez que controla positivamente o CHH, o GSH e o MIH e negativamente o MF. Por sua vez, o MF, produzido pelo *órgão mandibular*, pode estimular a maturação gonadal (LAUFER et al., 1993), além de induzir ao processo da muda (FINGERMAN, 1997b).

Como exposto acima, o *complexo órgão X - glândula do seio* é um centro neuro-endócrino da mais alta importância para o ciclo vital dos camarões, regulando atividades cruciais de sua fisiologia, como os processos de reprodução e muda. Ao realizar a ablação em fêmeas, mesmo que unilateral, ocorre um desequilíbrio hormonal considerável, que as leva a uma maturação ovariana precoce, tornando-as mais aptas para a reprodução, característica esta muito conveniente aos carcinocultores. Esta maturação precoce decorre de um decréscimo do GIH, secretado pelo *complexo órgão X - glândula do seio*, favorecendo talvez a ação do fator GSH sobre as gônadas. Além do mais, ocorre uma diminuição dos níveis de MIH e MOIH plasmáticos, que induz ao processo de muda. A remoção do *complexo órgão X - glândula do seio* pode provocar ainda um decréscimo do CHH, o que talvez resultasse na diminuição de glicose na hemolinfa.

Deve-se ainda ressaltar que, embora a prática da ablação, mesmo que unilateral, induza picos previsíveis de maturação e desova, traz também desvantagens, como a deterioração na qualidade e quantidade da desova (EMMERSON, 1980; PRIMAVERA, 1985; TSUKIMURA & KAMEMOTO, 1991). Além do mais, os resultados quanto ao tamanho da desova e sucesso da eclodibilidade são ainda conflitantes (BROWDY, 1992). A manipulação e a grave perturbação fisiológica causadas às fêmeas submetidas à ablação, representam uma condição potencialmente estressante à saúde desses animais. Surpreendentemente, estudos relativos ao efeito da apenduculação unilateral no sistema imune de fêmeas de peneídeos são praticamente inexistentes. Como exceção, foi realizado um estudo em nosso laboratório, relacionando à prática de ablação e à modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos no camarão nativo *Farfantepenaeus paulensis* (PERAZZOLO et al., 2002). Este trabalho serviu de prefácio para o presente estudo, que focalizou especificamente a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos no camarão *Litopenaeus vannamei*, atualmente utilizado nos programas de cultivo no Brasil.

3. O sistema imune de crustáceos.

Assim como outros invertebrados, os crustáceos também são considerados portadores de um sistema imune simples e primitivo, desprovidos de um sistema imune adaptativo com memória imunológica, como ocorre nos vertebrados. Apresentam, porém, mecanismos eficientes de proteção, sendo capazes não apenas de resistir, mas também de eliminar uma ampla variedade de microorganismos e outros parasitas invasores, preservando assim sua integridade.

O sistema imune dos crustáceos conta com reações celulares e humorais, tal como ocorre nos vertebrados. Ambas reações estão associadas à hemolinfa ou sangue, que é um tecido fluido, composto por uma fração celular, constituída pelos hemócitos, e por uma fração líquida,

representada pelo plasma, onde residem os fatores humorais (vide revisão de SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992). Os hemócitos dos crustáceos são tidos como análogos funcionais dos leucócitos dos vertebrados e estão relacionados às reações imune-celulares. A tendência atual é de reconhecer três tipos de hemócitos em crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos com grânulos grandes (HGG) (BAUCHAU, 1981; HOSE et al., 1990; GARGIONI & BARRACCO; 1998). Em *Litopenaeus vannamei* também parecem ocorrer estes três tipos celulares (DESTOUMIEUX et al., 1997).

As reações imune-celulares, mediadas pelos hemócitos, englobam mecanismos como a fagocitose de corpos estranhos, a formação de nódulos em torno de uma grande quantidade de microorganismos invasores, o encapsulamento de corpos estranhos de grande tamanho e a cicatrização de ferimentos. Além do mais, estas células produzem ainda uma variedade de moléculas citotóxicas e microbicidas, capazes de lisar e/ou degradar os patógenos fagocitados ou aprisionados em nódulos ou cápsulas (vide revisões de BAUCHAU, 1981; HOSE et al., 1990; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; ROCH, 1999).

Dentre as moléculas citotóxicas e microbicidas produzidas pelos hemócitos destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO) e os peptídeos anti-microbianos (PAM). As ERO são usualmente produzidas durante o processo de fagocitose, que é acompanhado de uma reação conhecida como estresse oxidativo ou “burst respiratório” onde a principal protagonista é a enzima de membrana NADPH-oxidase (BABIOR et al., 1973). O primeiro produto formado nesse processo é o ânion superóxido (O_2^-). Reações subseqüentes produzirão outras ERO, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^\cdot) e o oxigênio singlet (1O_2), além de outros subprodutos originados a partir destes compostos (vide revisão de ANDERSON, 1996). A capacidade dos hemócitos em produzir ERO, mediante estimulação celular ou fagocitose, foi recentemente demonstrada em *L. vannamei* (MUÑOZ et al., 2000).

Por outro lado, os PAM vêm despontando recentemente, como as moléculas mais promissoras na atualidade, no combate a infecções em crustáceos e outros invertebrados (vide revisão de BACHÈRE et al., 2000). Os PAM corresponderiam a antibióticos naturais endógenos e, em camarões, foram primeiramente isolados, seqüenciados e clonados em *L. vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997). Infelizmente, os PAM presentes em *L. vannamei* não mostraram atividade contra bactérias Gram negativas, incluindo às do gênero *Vibrio*, que são as bactérias mais prejudiciais aos cultivos de camarões na atualidade (DESTOUMIEUX et al., 1999, 2000).

Os fatores humorais incluem moléculas dissolvidas no plasma, como as lectinas, os fatores de coagulação e as moléculas do sistema pró-fenoloxidase (proPO).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de ocorrência ubíqua, que reconhecem especificamente açúcares da superfície celular ou de glicoconjugados, causando sua aglutinação ou precipitação. A presença de lectinas de ocorrência natural na hemolinfa de crustáceos já está bem estabelecida (vide revisão de MARQUES & BARRACCO, 2000). Devido a sua propriedade de aglutinar células estranhas, as lectinas de invertebrados foram consideradas como sendo potencialmente análogas funcionais dos anticorpos dos vertebrados, tendo importante papel no reconhecimento do não-próprio (MARQUES & BARRACCO, 2000). De uma forma geral, as lectinas de camarões parecem ser específicas para açúcares N-acetilados e em especial para derivados do ácido siálico e sialoglicoconjugados (MARQUES & BARRACCO, 2000). Surpreendentemente, as lectinas da hemolinfa do camarão *L. vannamei* ainda não foram isoladas e caracterizadas.

As reações celulares de defesa de muitos crustáceos são freqüentemente acompanhadas por um processo de melanização. Em artrópodes, a produção de melanina está envolvida no processo de esclerotização da cutícula e reparo de feridas, assim como nas reações imune-celulares, como a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas em torno de microorganismos e outros parasitas

(SÖDERHÄLL & CERENIUS; 1992; ASHIDA & BREY, 1997). A biossíntese da melanina é um processo complexo, que envolve uma série de reações proteolíticas em cascata, envolvendo a oxidação de compostos fenólicos como a α -di-hidroxi-fenilalanina (DOPA) e gerando como produto final um pigmento escuro, a melanina (vide revisões de SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; ASHIDA & BREY, 1997). A principal enzima envolvida no processo de melanização é a fenoloxidase (PO) e esta tem sido detectada tanto na hemolinfa quanto na cutícula de crustáceos (SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998). A PO existe usualmente sob uma forma inativa (proPO) que pode ser ativada por componentes da superfície de microorganismos (vide revisão de SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; ASHIDA & BREY, 1997). O sistema de ativação da proPO tem sido bem estudado em vários crustáceos (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1996; SÖDERHÄLL et al., 1996; PERAZZOLO & BARRACCO, 1997; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998). Este sistema é ativado por quantidades extremamente baixas de β -1,3-glicanas da superfície de fungos (SÖDERHÄLL & UNESTAM, 1979; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1996; PERAZZOLO & BARRACCO, 1997; VARGAS-ALBORES et al., 1997) e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas (SÖDERHÄLL & HÄLL, 1984; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1996; PERAZZOLO & BARRACCO, 1997). Estes compostos induzem à clivagem proteolítica da proPO por uma serino-protease endógena (enzima ativadora da profenoloxidase, ppA), que foi isolada e purificada em alguns artrópodes, como crustáceos (ÁSPAN et al., 1990) e insetos (vide revisão de ASHIDA & BREY, 1997). Uma vez gerada, a PO catalisa a hidroxilação de monofenóis, como o aminoácido tirosina, à σ -difenois (DOPA ou DOPAMINA), seguido da oxidação destes, para *O*-quinonas (DOPAQUINONA e DOPAMINOQUINONA) (NAPPI & VASS, 1993). Durante este processo, em cascata, forma-se o pigmento vermelho-coral DOPA-cromo, que pode ser detectado em espectrofotômetro (absorbância 490 nm) e que precede à

formação do pigmento escuro melanina. Nos camarões peneídeos, as enzimas do sistema proPO estão localizadas no interior dos hemócitos (HERNÁNDEZ-LOPES et al., 1996; PERAZZOLO & BARRACCO, 1997), o que está de acordo com evidências recentes que demonstraram que, em *P. monodon*, o RNAm da proPO é expresso somente nos hemócitos (SRITUNYALUCKSANA et al., 1999). O papel preciso da melanina nas respostas imunológicas dos artrópodes, ainda não está claramente elucidado. No entanto, sabe-se que a via que leva à síntese deste componente gera provisoriamente moléculas tóxicas, como as quinonas, acima mencionadas, e vários radicais livres (ERO), que podem funcionar como potentes destruidores de parasitas (NAPPI & VASS, 1993). Por outro lado, o composto final melanina é descrito como fungistático (JOHANSSON & SÖDERHÄLL, 1989) e funciona ainda como “scavenger” de radicais livres (NAPPI & VASS, 1993) auxiliando, assim, na eliminação destes compostos altamente reativos, que poderiam provocar danos importantes também aos tecidos internos dos invertebrados.

Vertebrados e invertebrados têm um mecanismo molecular eficiente para formar coágulos a partir de componentes do sangue ou da hemolinfa. Este mecanismo é necessário para prevenir a perda dos líquidos corporais, em decorrência de uma lesão no exoesqueleto e para prevenir a disseminação de microorganismos pelo corpo (vide revisão de SÖDERHALL & CERENIUS, 1992). Entre os invertebrados, existem diferentes tipos de sistema de coagulação (vide revisão de SRITUNYALUCKSANA & SÖDERHÄLL, 2000). Em crustáceos, assim como nos insetos, o sistema de coagulação envolve um componente celular, a enzima transglutaminase (TGase), dependente de Ca^{+2} , contida no interior dos grânulos dos hemócitos (DURLIAT, 1985), e uma lipoglicoproteína plasmática denominada proteína de coagulação (PC) (KOPÁCEK et al., 1993). Algumas vezes, esta lipoglicoproteína é chamada de coagulogênio ou fibrinogênio (MADARAS et al., 1981; MARTIN et al., 1991). A PC de crustáceos parece ainda atuar no transporte de pigmentos, lipídeos e carboidratos e serve como proteína de reserva em condições de jejum

(DURLIAT, 1985; KOMATSU & ANDO, 1998). A base da coagulação é a reação catalisada pela TGase que resulta na polimerização de várias PC através de ligações intermoleculares entre os resíduos de lisina de uma PC com os resíduos de glutamina de outra PC, formando assim um processo denominado de gelificação (LORAND & CONRAD, 1984). A PC já foi detectada em vários crustáceos como no peneídeo *P. monodon* (YEH et al., 1998), no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (HALL et al., 1999) e na lagosta *Panulirus interruptus* (DOOLITTLE & RILEY, 1990). A PC foi primeiro clonada e caracterizada em *P. leniusculus* (HALL et al., 1999) e em seguida nos camarões peneídeos *P. monodon* (YEH et al., 1999) e *L. vannamei* (MONTAÑO-PEREZ et al., 1999). No entanto, a reação de coagulação só foi totalmente caracterizada até o momento em *P. leniusculus* (HALL et al., 1999). Situações de estresse geralmente provocam um desequilíbrio no processo de coagulação da hemolinfa resultando numa coagulação mais lenta e deficiente, fenômeno este bem conhecido pelos criadores de camarão. Como exemplo, podemos citar a observação de JUSSILA et al. (2001) que ao submeter a lagosta *Panulirus cygnus* a um intenso exercício observou um aumento no tempo de coagulação em relação aos animais não submetidos a esta condição estressante.

4. Parâmetros hemato-imunológicos como indicadores de estresse.

É interessante observar, sendo talvez um paradoxo, que a hematologia e a bioquímica clínica, duas das principais ferramentas da medicina humana e veterinária, sejam tão raramente utilizadas como ferramentas de diagnóstico em patologias de camarões peneídeos. Apesar dos poucos estudos que se referem a alterações dos parâmetros da hemolinfa em relação a doenças infecciosas em camarões e lagostas, quase nenhum desses testes tem sido adotado como diagnóstico de rotina (LIGHTNER & REDMAN, 1998). Somente o tempo de coagulação e

mudanças na contagem total de hemócitos (THC) parecem ser usados atualmente para o diagnóstico de doenças em camarões (LIGHTNER, 1996). Contudo, outros parâmetros hematoimunológicos, como a atividade da PO, índice fagocítico e produção de ERO, níveis de proteína totais, título da atividade aglutinante, concentração de glicose e lactato poderiam também ser úteis para avaliar as condições de saúde de camarões em cultivo.

A THC consiste na contagem total dos hemócitos presentes num determinado volume de hemolinfa, facilmente feita em um hemocítômetro ou câmara de Neubauer. Embora a literatura disponha de resultados controversos e os camarões apresentem alta variabilidade individual (SUNG et al., 1994; JOHANSSON et al., 2000), a THC é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde de crustáceos (CHENG & CHEN, 2001). Diferentes relatos têm demonstrado alterações da THC nas mais diversas condições físico-químicas e biológicas em crustáceos, como situações de hipóxia (Le MOULLAC et al., 1998), baixa temperatura (Le MOULLAC & HAFFNER, 2000), baixa salinidade (PERAZZOLO et al., 2002), estágios da muda (TSING et al., 1989), aclimatação em cativeiro (SÀNCHEZ et al., 2001), presença de xenobiontes (SMITH & JOHNSTON, 1992; SMITH et al., 1995) e infecções (SMITH & SÖDERHÄLL, 1983; MARTIN et al., 1993; HAUTON et al., 1997; HENNIG et al., 1998; GOARANT & BOGLIO, 2000; RENGPIPAT et al., 2000). Diferentes autores concordam que um aumento da THC poderia conferir maior proteção contra doenças em crustáceos decápodes (TRUSCOTT & WHITE, 1990; Le MOULLAC et al., 1998; Le MOULLAC & HAFFNER, 2000).

A concentração protéica (CP) do plasma de camarões também parece variar em relação a mudanças ambientais e/ou fisiológicas (RODRIGUEZ & Le MOULLAC, 2000). Alguns relatos descrevem a alteração da CP em crustáceos em função da temperatura da água (CHISHOLM &

SMITH, 1994; SÀNCHEZ et al., 2001), níveis de oxigênio dissolvido (ENGEL et al., 1993), dieta (ROSAS et al., 2000) e ciclo da muda (CHEN & CHENG, 1993).

Por outro lado, condições de estresse provocadas por fatores ambientais e/ou fisiológicos podem também resultar numa alteração da concentração de lectinas na hemolinfa de camarões. Efetivamente, um aumento da atividade aglutinante do plasma foi relatado no plasma de ostras *Crassostrea gigas* expostas à bactéria *Vibrio anguillarum* (HARDY et al., 1977; OLAFSEN et al., 1992), no caranguejo *Callinectes sapidus* injetados com eritrócitos de invertebrados (PAULEY, 1973) e no camarão *Penaeus monodon* após infecção pelo *Vibrio vulnificus* (RATANAPO & CHULAVATNATOL, 1992). Um aumento da atividade aglutinante foi também descrito em adultos de *Macrobrachium rosenbergii* em relação aos estágios mais jovens (AGUNDIS et al., 2000).

A PO é também um imuno-parâmetro que vem sendo progressivamente muito utilizado para avaliar o estado de saúde de crustáceos. Alguns estudos têm demonstrado que a atividade da PO em crustáceos pode variar em função da alteração da temperatura (Le MOULLAC & HAFFNER, 2000), hipóxia (Le MOULLAC et al., 1998), ciclo de muda (Le MOULLAC et al., 1997), presença de contaminantes (SMITH & JOHNSTON, 1992; SMITH et al., 1995), infecções (HAUTON et al., 1997) e estresse fisiológico (PERAZZOLO et al., 2002).

Por outro lado, situações de estresse podem causar não apenas alterações em parâmetros imunológicos mas também em parâmetros fisiológicos, como por exemplo, nos níveis plasmáticos de glicose e lactato. Alteração nos níveis de glicose foi relatada em crustáceos submetidos à hipóxia (HALL & HAM, 1998), variações de temperatura e salinidade (CHANG et al., 1998), ou quando expostos a diferentes metais pesados (LORENZON et al., 2000).

O lactato forma-se a partir do metabolismo de carboidratos (glicose). Nesta via, forma-se usualmente o piruvato, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico e na fosforilação oxidativa. O

acúmulo de lactato em crustáceos significa que o metabolismo anaeróbico foi maior do que o aeróbico. Para evitar danos associados ao acúmulo de cristais de lactato no músculo, o lactato é usualmente estocado na hemolinfa. Quando o estresse diminui, o lactato é transportado para o músculo para ser metabolizado e sua concentração na hemolinfa diminui (SPOTTS & LUTZ, 1981; PATERSON, 1993). Em alguns crustáceos foi demonstrado que os níveis de lactato podem aumentar com a hipóxia (TAYLOR & WHITELEY, 1987; ZOU et al., 1996) e com a variação de temperatura (SÀNCHEZ et al., 2001).

5. Imunoestimulantes - Vitamina C

O aumento da resistência imunológica de camarões de importância econômica frente a situações de estresse causado por infecções e outros fatores ambientais e/ou fisiológicos, desponta atualmente como uma das áreas mais promissoras de investigação em aquicultura. Como mencionado anteriormente, os invertebrados não possuem um sistema imune adaptativo, com memória imunológica e com a imensa variedade de anticorpos específicos característicos dos vertebrados. Desta forma, o sistema imune de camarões não tem como ser estimulado especificamente por diferentes antígenos, nem há possibilidade de se desenvolver vacinas protetoras específicas. A busca de uma maior resistência imunológica em camarões reside, assim, na tentativa de se estimular suas defesas naturais, através do desenvolvimento e utilização de moléculas potencialmente imunoestimulantes, que possam ser fornecidas na sua dieta.

Existem evidências que a vitamina C ou ácido ascórbico (AA) atua não somente como um potente antioxidante (BLOCK & LANGSETH, 1994; MOREL & BAROUKI, 1999), mas pode também atuar como imunoestimulante em vertebrados (DURVE & LOVELL, 1982; HALVER, 1985; BLAZER, 1992; VERLHAC et al., 1996; MULERO et al., 1998) e invertebrados

(KONTARA et al., 1997; MERCHIE et al., 1997). Existem ainda relatos que a vitamina C melhora o desempenho reprodutivo de peixes (SANDNES et al., 1984; SOLIMAN et al., 1986) e de peneídeos (CHAMBERLAIN, 1988; ALAVA et al., 1993; CAHU et al., 1995; WOUTERS et al., 1999). Contudo, estudos sobre uma suplementação apropriada de vitamina C na dieta de peneídeos, com o intuito de otimizar seu sistema imunológico e desempenho reprodutivo são extremamente escassos.

A maioria dos crustáceos não sintetizam vitamina C, pois carecem da enzima gulonolactona oxidase (GLO), que cataliza o passo final da conversão da glicose a ácido ascórbico (BURNS et al., 1956; SATO & UDENFRIEND, 1978). No entanto, a possibilidade de uma síntese limitada de AA em algumas espécies de camarões peneídeos foi relatada por LIGHTNER et al. (1979). De qualquer forma, as espécies de camarões testadas até o momento exigem uma fonte de AA na dieta. Conseqüentemente, mesmo que os crustáceos possuam uma limitada habilidade de sintetizar AA, esta síntese é largamente insuficiente para atender as suas exigências metabólicas (CONKLIN, 1997).

Os alimentos utilizados na dieta de reprodutores apresentam conteúdos muito variáveis de AA. As algas, por exemplo, podem ser ricas em AA, mas a concentração desta vitamina varia muito entre as diferentes espécies (MERCHIE et al., 1995). Por outro lado, alimentos frescos usualmente oferecidos na dieta de reprodutores, como mexilhões, ostras e lulas, apresentam valores muito baixos ou negligenciáveis de AA, possivelmente pelas condições impróprias de estocagem (SANGHA et al., 2000). Sendo assim, um adequado suplemento vitamínico utilizado na ração da dieta dos camarões torna-se crucial.

A deficiência de AA nos camarões é extremamente prejudicial, podendo resultar em diversas anomalias, como crescimento reduzido, baixa conversão alimentar, lesões esbranquiçadas ou escurecidas sob o exoesqueleto abdominal, redução da freqüência de muda ou

muda incompleta, decréscimo da resistência imunológica, diminuição da síntese de colágeno e deficiência no reparo de feridas (DESHIMARU & KUROKI, 1976; LIGHTNER, 1977; MAGARELLI & COLVIN, 1978; SHIGUENO & ITOH, 1988; CATA CUTAN & De La CRUZ, 1989; HE & LAWRENCE, 1993). A ocorrência de lesões melanizadas no exoesqueleto (chamadas de “black death”), em consequência de uma dieta deficiente de AA, já foi relatada em *Litopenaeus vannamei* (MONTROYA & MOLINA, 1995). O AA é instável e degradável, sendo facilmente afetado pela temperatura da água, oxidação, pH, luz e tempo de exposição ao ambiente (GRANT et al., 1989). Portanto, uma forma mais estável de AA torna-se necessária, tanto para as etapas do processamento e estoque de alimento quanto para o processo de alimentação destes animais aquáticos. Atualmente, existem vários derivados de ácido ascórbico, como os ésteres de fosfato, que têm se demonstrado altamente resistentes à oxidação e degradação e conseqüentemente mais biodisponíveis para peixes e crustáceos (GRANT et al., 1989; WILSON et al., 1989; HE & LAWRENCE, 1993). Muitos nutricionistas têm utilizado o L-ascorbil-2-polifosfato (ApP) como uma fonte de vitamina C (GRANT et al., 1989; HE & LAWRENCE, 1993; CHEN & CHANG, 1994; KONTARA et al., 1997; SANGHA et al., 2000), já que é uma forma resistente à oxidação e degradação durante o processamento e estoque do alimento (CASTILLE et al., 1996).

A quantidade atualmente recomendada de AA, sob forma fosfatada ou sulfatada, na dieta de peneídeos é de 200 mg/kg de dieta (CONKLIN, 1997). Nestes animais, tem sido proposto que os principais órgãos de reserva de vitamina C sejam primeiramente os ovários e em seguida o hepatopâncreas. Em reprodutores de *L. vannamei*, SANGHA et al. (2000) encontraram valores na faixa de 6 a 93 µg de AA/g no tecido ovariano e de 14 a 40 µg/g no hepatopâncreas, enquanto o músculo continha quantidades negligenciáveis (<1,0 µg/g). Com base nesse estudo, utilizamos os

ovários e o hepatopâncreas de fêmeas de *L. vannamei* para detectar a deposição de ácido ascórbico em nossos ensaios.

O objetivo desse estudo foi analisar alguns parâmetros hemato-inumológicos (THC, concentração de proteínas totais, lectinas, glicose e lactato e atividade da enzima PO na hemolinfa) em fêmeas adultas do camarão *Litopenaeus vannamei* submetidas ao processo de ablação e cuja dieta foi suplementada com superdosagens de vitamina C.

O Artigo Científico será submetido para publicação no periódico Aquaculture. Em anexo, encontram-se as normas para a publicação do periódico.

II – ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de parâmetros hemato-imunológicos em fêmeas abladadas de camarão *Litopenaeus vannamei* em associação a uma dieta com diferentes superdosagens de ácido ascórbico.

Daniela S. Maggioni ^a, Edemar R. Andreatta ^b, Elizabeth M. Hermes ^c, Margherita A. Barracco ^{a*}

^a Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), SC, CEP 88.040-900, Brasil

^b Departamento de Aquicultura, UFSC

^c Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário, UFSC.

(* Corresponding author address:

e-mail address: barracco@mbx1.ufsc.br

Fone: +55 48 331.8951

Fax: +55 48 331.5148

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar alguns parâmetros hemato-imunológicos em fêmeas reprodutoras da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidas ao processo de ablação unilateral e cuja dieta foi suplementada com superdosagens de vitamina C, como forma de imunestimulação. Os parâmetros analisados foram: contagem total de hemócitos (THC), concentração de proteínas plasmáticas, níveis de glicose e lactato, atividade aglutinante e atividade da enzima fenoloxidase. As fêmeas foram analisadas no dia anterior à ablação e nos dias 1, 3, 7 e 14 após à ablação. A suplementação com superdosagens de vitamina C foi oferecida às fêmeas (1x ao dia) juntamente com alimento fresco, durante duas semanas antes e duas semanas após a ablação, sob a forma de ácido ascórbico polifosfatado (ApP). As fêmeas foram divididas em um grupo controle (NS), não suplementado com superdosagens de ApP (200 mg/kg = dose recomendada) e dois grupos (S1 e S2) suplementados com doses de 10 e 20 vezes maiores que a dose recomendada, respectivamente. Surpreendentemente, a grande maioria dos parâmetros hemato-imunológicos analisados não mostrou alteração estatisticamente significativa no grupo NS. Houve apenas uma redução significativa do título aglutinante do soro no terceiro dia subsequente à ablação. As fêmeas suplementadas com superdosagens de vitamina C (S1 e S2) também não apresentaram alterações significativas na maioria dos parâmetros analisados, com exceção do título aglutinante e dos níveis de glicose da hemolinfa. Não houve declínio da atividade aglutinante nos grupos S1 e S2 no terceiro dia da ablação como verificado no grupo NS, sugerindo talvez uma eventual imunestimulação pela vitamina C. Por outro lado, os grupos S1 e S2 mostraram uma hipoglicemia no primeiro dia após ablação. Esta hipoglicemia decorreu provavelmente de uma diminuição transitória dos níveis do hormônio hiperglicemiante como consequência do processo da ablação peduncular que remove o complexo glândula do seio -

órgão X, responsável pela produção e liberação desse hormônio, entre outros. A ausência de alterações significativas nos parâmetros hemato-imunológicos analisados parece sugerir a ocorrência de um mecanismo compensatório desencadeado pelo pedúnculo ocular não ablado, uma vez que a apedunculção foi apenas unilateral. Pode-se ainda especular que os parâmetros hemato-imunológicos selecionados para este estudo não sejam os mais favoráveis para avaliar esta condição de estresse ou ainda que o *L. vannamei* seja efetivamente uma espécie muito resistente capaz de manter sua homeostase, mesmo quando submetida a um estresse fisiológico severo.

Palavras-chave: parâmetros hemato-imunológicos, ablação unilateral, imuno-estimulante, ácido ascórbico, crustáceos, *Litopenaeus vannamei*.

1. Introdução

O camarão *Litopenaeus vannamei* representa 90 % da produção total de camarão de cultivo na América Latina (FAO, 2002). No Brasil, esta espécie exótica vem sendo cultivada há anos no nordeste do país, graças às suas condições geográficas favoráveis. Esta espécie foi recentemente introduzida, há cerca de 5 anos, na região sul do país (estado de Santa Catarina), onde vem sendo cultivada com surpreendente sucesso, apesar das águas mais frias, podendo atingir até 14^oC no inverno. No Brasil, a maturação de fêmeas de *L. vannamei* é realizada em laboratório, utilizando o processo de ablação ou apedunculção ocular unilateral, técnica esta mundialmente utilizada nos programas de reprodução de camarões de cultivo (vide revisão de FINGERMAN, 1997).

Em crustáceos, o pedúnculo ocular abriga um importante centro neuro-endócrino denominado *complexo glândula do seio - órgão X*, que controla vários processos fisiológicos cruciais como a

reprodução e o ciclo de muda destes animais. Este complexo secreta uma variedade de neuro-hormônios, entre os quais o GIH (hormônio inibidor da gônada), o MIH (hormônio inibidor da muda) e o CHH (hormônio hiperglicêmico) (FINGERMAN, 1997). O processo de ablação, mesmo que unilateral, resulta num desequilíbrio hormonal considerável nas fêmeas, induzindo-as a uma maturação ovariana e tornando-as precocemente aptas para a reprodução, no período programado pelo manejador. Além do mais, o processo de apedunculção é uma prática mecanicamente agressiva e mutilatória, podendo levar estas fêmeas a um estresse fisiológico severo. Surpreendentemente, o estresse causado nas fêmeas pelo processo de ablação foi muito pouco investigado. Em nosso conhecimento, o único estudo que relata alterações de alguns parâmetros hemato-imunológicos em camarões submetidos ao processo de ablação foi realizado em nosso laboratório com a espécie *Farfantepenaeus paulensis* (PERAZZOLO et al., 2002).

Como já é bem conhecido, situações de estresse resultam geralmente numa baixa da resistência imunológica, tornando os animais mais vulneráveis a alterações ambientais e a contrair infecções. O sistema imune dos crustáceos está basicamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa, que contém células circulantes ou hemócitos e fatores humorais dissolvidos no plasma. Os hemócitos são os principais responsáveis pelas reações imune celulares, que compreendem a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas em torno de corpos estranhos e a produção de moléculas citotóxicas e microbidas capazes de lisar e/ou degradar os invasores. Os fatores humorais incluem, por sua vez, as lectinas, os fatores de coagulação e os componentes do sistema pró-fenoxidase (proPO) (vide revisões de MILLAR & RATCLIFFE, 1994; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; ROCH, 1999; SRITUNYALUCKSANA & SÖDERHÄLL, 2000).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de causar a aglutinação de células, ligando-se especificamente a açúcares de sua superfície. Devido à sua propriedade de aglutinar

células estranhas, as lectinas de invertebrados, incluindo as de crustáceos, foram consideradas como sendo potencialmente análogas funcionais dos anticorpos dos vertebrados, tendo importante papel no reconhecimento do não-próprio. De uma maneira geral, as lectinas de camarões parecem ser específicas para açúcares N-acetilados, em especial para derivados do ácido siálico e sialoglicoconjugados (vide revisão de MARQUES & BARRACCO, 2000).

O sistema proPO é um sistema complexo, composto de uma cascata proteolítica desencadeada pela enzima fenoxidase (PO) que, em crustáceos, encontra-se compartimentalizada nos grânulos dos hemócitos. A PO ocorre usualmente sob uma forma inativa (proPO) e é ativada por componentes da superfície de fungos e/ou bactérias Gram positivas e negativas, culminando com a formação de um pigmento escuro denominado melanina. O sistema de ativação da proPO tem sido particularmente bem estudado em crustáceos, incluindo peneídeos (vide revisão de SRITUNYALUCKSANA & SÖDERHÄLL, 2000). O papel preciso da melanina nas respostas imunológicas dos crustáceos não está ainda claramente elucidado. No entanto, sabe-se que durante sua biossíntese ocorre a produção transitória de moléculas tóxicas, como quinonas e vários radicais livres que podem funcionar como potentes destruidores de microorganismos e outros patógenos (NAPPI & VASS, 1993). Por outro lado, o composto final melanina é descrito como fungistático (JOHANSSON & SÖDERHÄLL, 1989) e funciona ainda como “scavenger” de radicais livres (NAPPI & VASS, 1993), auxiliando, assim, na eliminação destes compostos altamente reativos, que poderiam provocar danos importantes aos próprios tecidos dos hospedeiros.

É interessante observar, sendo talvez um paradoxo, que a hematologia e a bioquímica clínica, duas das principais ferramentas da medicina humana e veterinária, sejam ainda tão raramente utilizadas como ferramentas para o diagnóstico das condições de saúde em camarões peneídeos (LIGHTNER & REDMAN, 1998). Contudo, alguns parâmetros hemato-imunológicos como, por

exemplo, os hemogramas, a atividade da PO, o índice fagocítico e a produção de ERO (espécies reativas de oxigênio), vêm sendo recentemente selecionados em crustáceos para esta finalidade (HAUTON et al., 1997; Le MOULLAC et al., 1997; HENIG et al., 1998; SRITUNYALUCKSANA et al., 1999; MUÑOZ et al., 2000; SÀNCHEZ et al., 2001; PERAZZOLO et al., 2002).

O aumento da resistência imunológica de camarões de importância econômica frente a situações de estresse causadas por infecções e outros fatores ambientais e/ou fisiológicos é, atualmente, um dos grandes desafios da imunologia de crustáceos, já que esses animais são desprovidos de um sistema imunológico adaptativo com anticorpos específicos e memória imunológica. Desta forma, o desenvolvimento e a utilização de moléculas potencialmente imunoestimulantes, poderiam auxiliar estes animais a superar certas condições de estresse como, por exemplo, a ablação peduncular unilateral. Neste contexto, a vitamina C desponta como um suplemento nutricional promissor, uma vez que já está bem estabelecido que esta vitamina, além de funcionar como um potente antioxidante (BLOCK & LANGSETH, 1994; MOREL & BAROUKI, 1999), atua ainda como imunoestimulante tanto em vertebrados (DURVE & LOVELL, 1982; MULERO et al., 1998) quanto em invertebrados (KONTARA et al., 1997; MERCHIE et al., 1997; LEE & SHIAU, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi o de analisar alguns parâmetros hemato-inumológicos básicos, tais como a contagem total de hemócitos (THC), a concentração de proteínas totais, glicose e lactato, a atividade aglutinante e a atividade da enzima PO na hemolinfa de fêmeas de *Litopenaeus vannamei*, submetidas ao processo de ablação e cuja dieta foi suplementada com superdosagens de vitamina C.

2. Material and Métodos

2.1 Material biológico

Nesse estudo foram utilizadas fêmeas de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (PÉREZ FARFANTE & BRIAN KENSLEY, 1997), durante o período reprodutivo e aparentemente saudáveis. Os animais foram utilizados no Setor de Maturação e Reprodução do Laboratório de Cultivo de Camarões Marinhos da Barra da Lagoa (LCM), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.2 Desenho Experimental

Foram preparados 12 tanques circulares de maturação (quatro por tratamento), com 4 m de diâmetro, contendo cada um 100 animais (45 fêmeas e 55 machos). Os camarões foram tratados com uma dieta basal, constituída de ração peletizada para reprodutores (ZEIGLER BROS. INC: crude protein 40% min., crude fat 9% min., crude fiber 4% max.), acrescida de alimento fresco (lula - *Loligo* sp., bivalves picados – *Perna perna* e *Artemia*) e de uma suplementação em ácido ascórbico polifosfatado, (ApP, AQUASTAB - 42% de atividade = AAE). Foram estabelecidos 3 grupos de fêmeas em relação à dieta: *grupo NS* (controle), dieta basal contendo 200 mg AAE/kg (ZEIGLER BROS INC., dose recomendada para reprodutores); *grupo S1*, dieta basal com suplemento de 1.000 mg AAE/kg; *grupo S2*, dieta basal com suplemento de 2.000 mg AAE/kg. A quantidade de alimento oferecida correspondeu a uma faixa entre 3 a 7% da biomassa. Nos horários de arraçoamento foram oferecidos: ração peletizada às 14 e 23 h., *Artemia* às 10 h, lula e marisco às 3 e 17 h. O suplemento de ApP foi oferecido uma vez ao dia, sempre no horário de pico de consumo alimentar (17 h, período de escuro) e misturado com farinha de trigo (numa relação de 1:10 de ApP e farinha de trigo) e gelatina incolor diluída junto com o alimento fresco

(lula e marisco picados). Da mesma forma, os ingredientes supracitados, sem a suplementação de ApP, foram adicionados ao alimento fresco do grupo controle (NS). Antes do processo de ablação, os animais permaneceram nos tanques por um período de quatro semanas, duas semanas para aclimação, recebendo apenas a dieta basal e mais duas semanas recebendo suplementação de ApP (grupos S1 e S2). Após a ablação, os camarões receberam por mais duas semanas a suplementação vitamínica (grupos S1 e S2).

A salinidade da água foi de $32 \pm 2^{0/00}$ e a temperatura de $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A taxa diária de renovação de água foi de 200%. A sala de maturação foi mantida em sistema “dark house” com os horários de luz e escuro invertidos, numa relação de 12:12 h.

As fêmeas foram utilizadas (coleta de hemolinfa) no dia anterior e posterior à ablação peduncular, e nos dias 3, 7 e 14 após a ablação. Estes intervalos de tempo foram escolhidos levando em conta, o período anterior (1 dia antes) ao estresse provocado pelo processo de ablação e os períodos posteriores, envolvendo um curto intervalo de tempo (1 dia), ou intervalos mais longos, quando os animais estariam potencialmente recuperados (3, 7 e 14 dias). Todas as coletas foram realizadas no estágio de intermuda. Cada fêmea foi utilizada uma única vez. O número de mudas por tanque oscilou em torno de $4 (\pm 2)$ por dia, durante o período experimental. O peso úmido inicial das fêmeas variou de 42 a 44 g e ao final do período de 50 a 58 g. Um total de 396 fêmeas foi utilizado nos diferentes ensaios (180 para a análise dos hemogramas; 180 para a análise da fenoloxidase, atividade aglutinante e concentração protéica no soro; e 36 para as análises de lactato e glicose no plasma). As amostragens foram feitas no período de julho a setembro.

2.3 Coleta de hemolinfa e obtenção de soro

A hemolinfa das fêmeas dos diferentes tratamentos foi coletada através de uma agulha 21G acoplada a uma seringa de 1 ml, inserida na região do primeiro segmento abdominal. Após a coleta, a hemolinfa foi deixada coagular por 24 h a 4°C, sendo então repetidamente centrifugada a 2.000xg por 10 min. O coágulo foi desprezado e o sobrenadante, correspondente ao soro, foi removido e utilizado imediatamente nos ensaios, ou congelado a -20°C para uso posterior.

2.4 Obtenção de plasma

A hemolinfa das fêmeas foi coletada em seringa mantida sobre gelo e imediatamente transferida para um tubo contendo solução anticoagulante liofilizada (9 mM EDTA) e submetida a agitação intensa. A solução foi então centrifugada a 800xg durante 3 min e o sobrenadante ou plasma separado e mantido a 4°C de 12 a 24 h. O plasma assim obtido, foi utilizado para determinação da concentração de glicose e lactato (vide abaixo).

2.5 Hemogramas - Contagem total de hemócitos (THC)

A hemolinfa das fêmeas (4 pools de 5 animais por tratamento) foi coletada diretamente dentro de uma solução anticoagulante MAS (solução de Alsever modificada: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0), numa diluição conhecida (4x). As estimativas da THC foram realizadas em câmara de Neubauer.

2.6 Determinação da concentração de proteínas totais no soro

A concentração protéica do soro dos camarões foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976) utilizando soro-albumina bovina (BSA) como padrão. O soro (4 pools de 3 animais por tratamento) foi diluído (1:500) em água destilada antes das análises.

2.7 Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro

A atividade da PO das amostras de soro foi realizada espectrofotometricamente (490 nm), pela formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (PERAZZOLO & BARRACCO, 1997). Amostras de soro (4 pools de 3 animais por tratamento) foram diluídas (1:8) em TBS-1 (10 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7,6) e uma alíquota de 50 µl dessa solução foi pré-incubada com um volume igual do indutor enzimático tripsina (SIGMA, 1mg/ml) por 15 min a 20⁰C em microplacas de 96 poços (fundo chato). Nos controles, o indutor foi substituído por TBS-1. Após incubação, adicionou-se 50 µl de L-DOPA (3 mg/ml)) e a formação de DOPA-cromo foi monitorada após 0, 5, 15, 25 min e 1 h. A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância (490 nm) por minuto e por miligrama de proteínas totais nas amostras. Uma (1) unidade de atividade enzimática equivale ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20⁰C (SÖDERHALL e HÄLL, 1984).

2.8 Atividade Aglutinante

Amostras de 50 µl de soro (4 pools de 3 animais por tratamento) foram diluídas serialmente em TBS-2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, pH 7,4) em placas de microtitulação (96 poços, fundo em “U”) e incubadas com um mesmo volume de uma suspensão

de eritrócitos frescos humanos do tipo A 2% (em TBS-2) por 2 a 3 h a 20°C. Nos controles, o soro foi substituído por TBS-2. Os títulos aglutinantes foram convertidos para valores de \log_2 . Cada teste foi realizado em triplicata.

2.9 Determinação de glicose e lactato no plasma

As determinações de glicose e lactato do plasma das fêmeas foram realizadas individualmente (3 animais por tratamento) até o terceiro dia após a ablação. Para tal, foi utilizado um sistema automatizado da Dimension®, com kits comerciais (DADE BEHRING), junto ao Hospital Universitário. A detecção da glicose foi realizada segundo o método da hexoquinase-glicose-6-fosfato desidrogenase (KUNST et al., 1983). A detecção do lactato foi realizada pelo método enzimático-UV, adaptado do método MARBACH e WEIL que emprega a oxidação do L-lactato a piruvato.

2.10 Determinação do nível de ácido ascórbico depositado no hepatopâncreas e nas gônadas dos camarões.

Nos dias anterior, posterior e 14 dias após o processo de ablação, algumas fêmeas reprodutoras (2 fêmeas por tratamento) foram sacrificadas para determinar a quantidade de ácido ascórbico depositado no hepatopâncreas e nas gônadas. Os camarões foram dissecados sobre gelo e os órgãos pesados e imediatamente congelados a -80°C . A determinação da vitamina C nos tecidos foi realizada pela sua homogeneização em presença de 5% de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C (1 g de tecido para 9 ml de TCA). O homogeneizado foi centrifugado (4°C) durante 20 min a $3.500\times g$ e o ácido ascórbico foi detectado através do método da dinitrofenilhidrazina ou DNPH (OMAYE et al, 1979). Resumidamente, uma amostra de 0,5 ml de sobrenadante dos tecidos

homogeneizados foi incubada com 0,1 ml da solução reagente (0,4 g de tiouréia, 0,05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ e 3,0 g de DNPH, dissolvidos em 100 ml de 9 N de H_2SO_4) por 3 h a 37°C . A seguir, as amostras receberam 0,75 ml de H_2SO_4 65% (4°C) sob agitação. A amostra foi incubada por 30 min a 20°C e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 520 nm.

2.11 Análise estatística

A combinação dos efeitos de dose e de tempo, entre todos os parâmetros, foi calculada utilizando o teste de análise de variância bifatorial (ANOVA). Quando a ANOVA indicou diferença estatística ($P < 0,05$) entre os fatores, aplicou-se o teste de Tukey ou Duncan.

3. Resultados

3.1. Hemogramas - Contagem total de hemócitos (THC)

A THC das fêmeas reprodutoras de *L. vannamei* do grupo controle (NS) variou de 33 a 45×10^6 hemócitos/ml de hemolinfa, sendo os valores máximos atingidos após 14 dias da ablação (Fig. 1). Não houve alteração significativa em relação ao processo de ablação havendo, contudo, uma elevação discreta dos valores no terceiro dia, que se acentuou aos 14 dias após a ablação. Por outro lado, a THC do grupo S1 apresentou um declínio progressivo dos valores até três dias após a ablação, apesar desta diminuição não ter sido estatisticamente significativa. Já no grupo S2, o perfil da THC permaneceu bastante constante, com discreta oscilação até os 14 dias após a ablação.

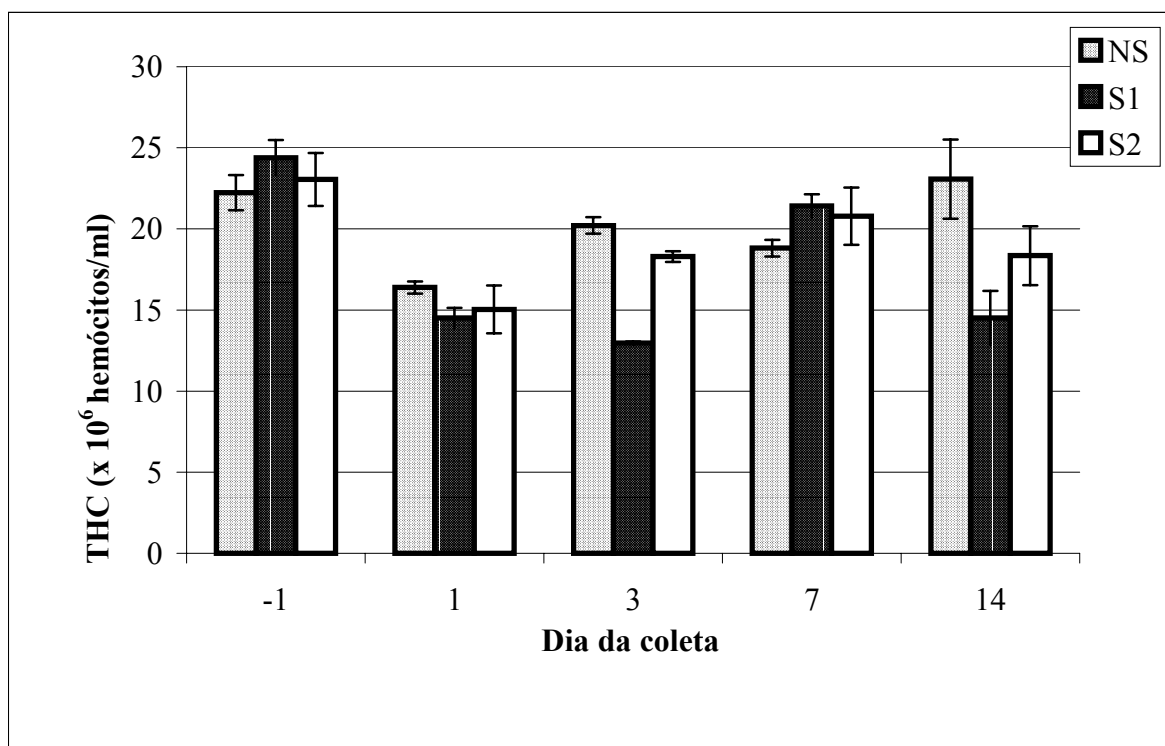


Figura 1. Contagem total de hemócitos (THC) em fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações de ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média e o desvio padrão (n=5), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação.

3.2. Concentração proteica (CP) do soro

A CP das fêmeas do grupo NS variou de 260 a 308 mg/ml ao longo do experimento (Fig. 2), não havendo diferenças significativas em relação ao processo de ablação. O tratamento dos camarões com superdosagens de ApP (S1 e S2) resultou num aumento significativo da concentração protéica (26-27%) em relação ao grupo NS, no terceiro dia após a ablação (Fig. 2). Não houve contudo diferença entre ambas superdosagens. Camarões tratados com a maior superdosagem de ApP mostraram ainda uma elevação significativa da concentração protéica (cerca de 30%), duas semanas após a ablação.

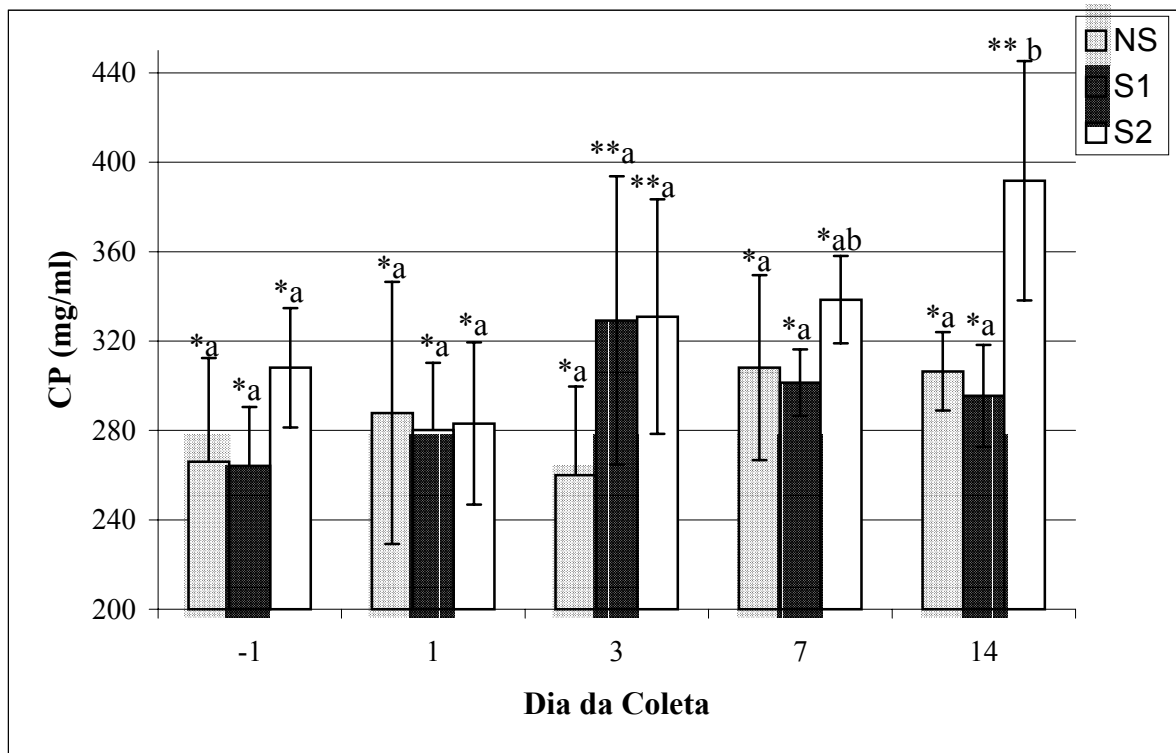


Figura 2. Concentração protéica do soro de fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações de ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão (n=4), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação. Os asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os dias de coleta e as letras entre as diferentes doses de vitamina C.

3.3. Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro

A atividade da PO no soro dos camarões do grupo NS variou de 17 a 20 U/min/mg de proteína (Fig. 3) não havendo diferença estatística em relação ao processo de ablação. Houve, no entanto, uma discreta queda da atividade enzimática neste grupo no primeiro dia após a ablação. A atividade da PO do grupo S2 mostrou valores mais baixos em relação aos demais grupos, apesar das diferenças não serem significativas (Fig. 3).

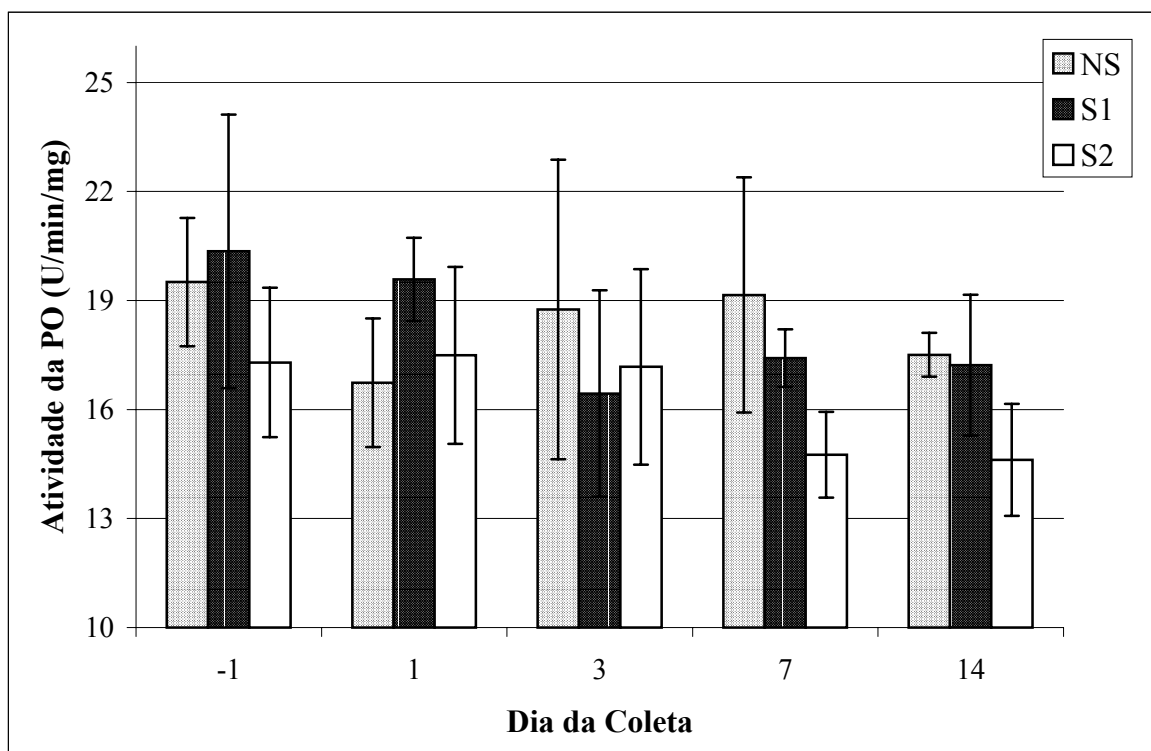


Figura 3. Atividade da PO em fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações de ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão (n=4), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação.

3.4 Título aglutinante do soro

O título aglutinante do soro dos camarões do grupo NS variou de 512 a 2.048 ($= \log_2 9$ a 11), havendo uma redução significativa ($P < 0,05$) dos valores no terceiro dia após a ablação (Fig. 4). Já, os camarões suplementados com ApP mostraram uma diminuição significativa da atividade aglutinante ($P < 0,05$) apenas em S2 e somente a partir do sétimo dia após ablação.

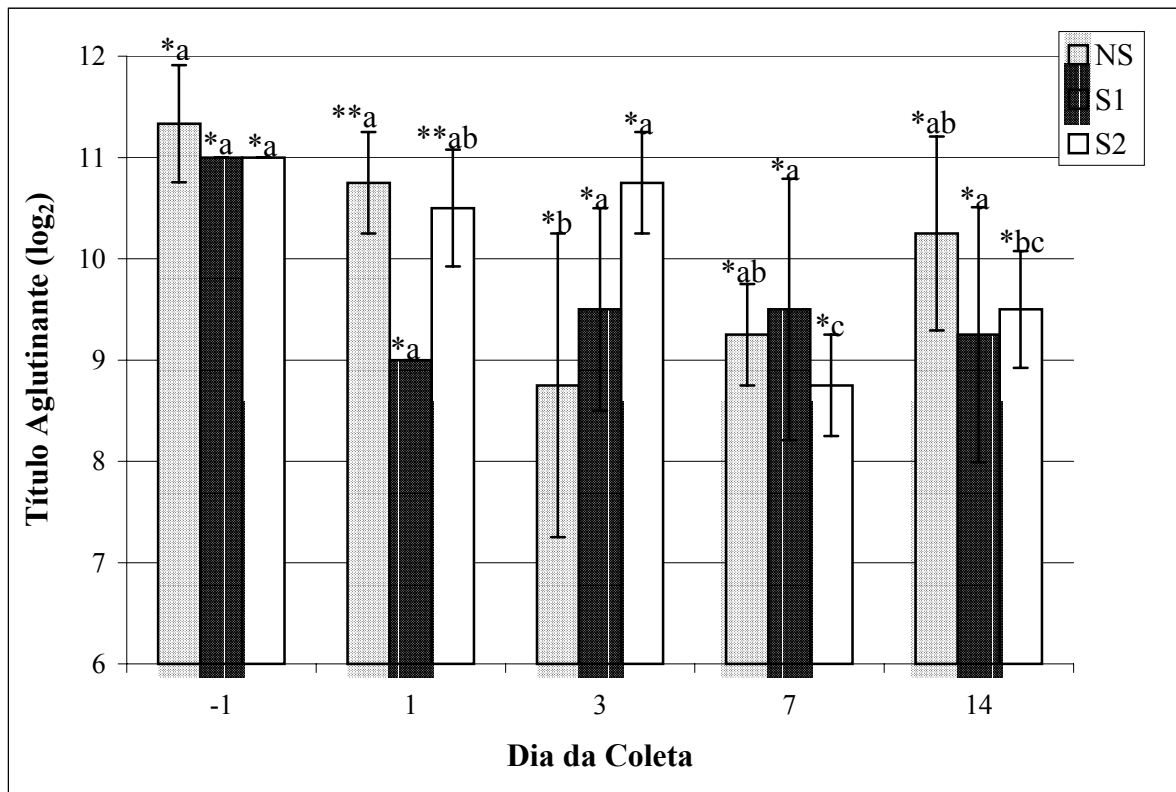


Figura 4. Título aglutinante (\log_2) em fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão ($n=4$), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação. Os asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os dias de coleta e as letras entre as diferentes doses de vitamina C.

3.5. Concentração de glicose no plasma

A concentração de glicose no plasma dos camarões do grupo NS decresceu progressivamente (30%) do dia anterior ao terceiro dia após ablação (Fig. 5), embora este decréscimo não tenha sido significativo. Já, nos animais tratados com ambas superdosagens de ApP, houve uma diminuição significativa da concentração de glicose de 30 e 43%, nos grupos S1 e S2

respectivamente, no primeiro dia após ablação, havendo uma tendência de recuperação no terceiro dia após ablação (Fig. 5).

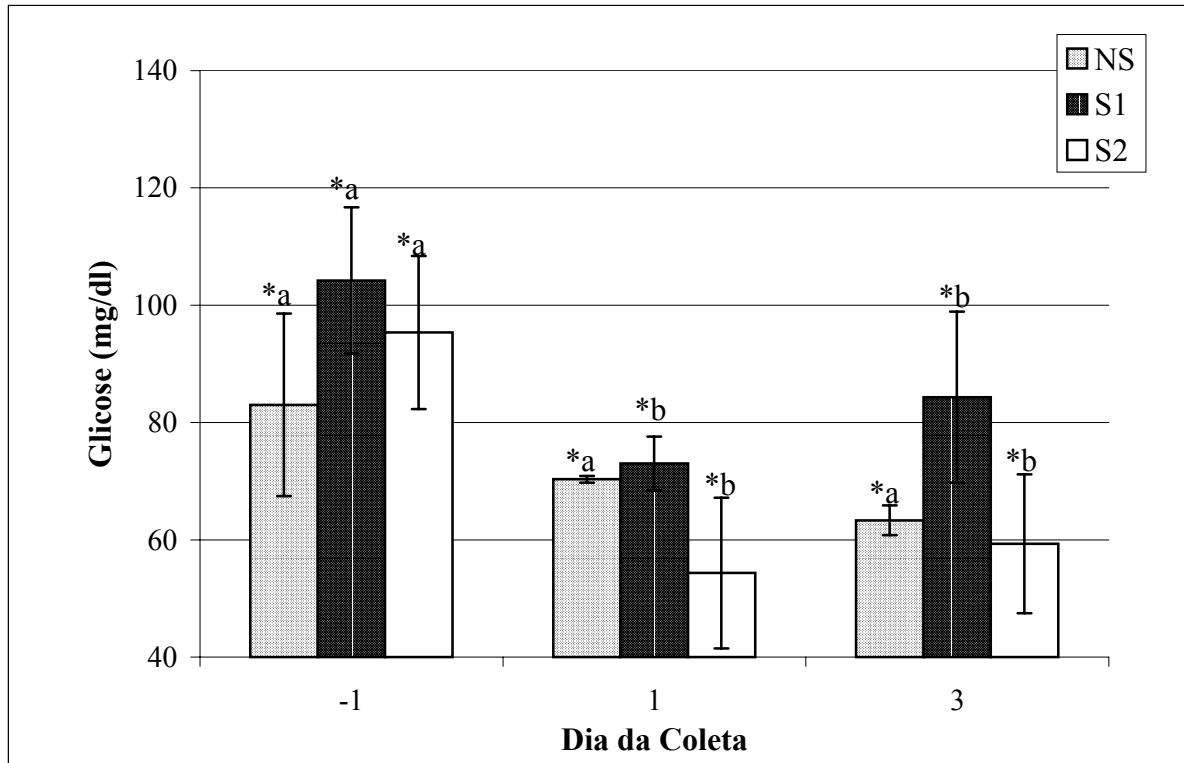


Figura 5. Concentração de glicose em fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão (n=4), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação. Os asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os diferentes dias de coleta.

3.6 Concentração de lactato no plasma

A concentração de lactato no plasma do grupo de camarões do grupo NS aumentou progressivamente (em até 100%) até o terceiro dia após a ablação (Fig. 6), embora este aumento não tenha sido significativo ($P > 0,05$). Já nos grupos S1 e S2, a tendência de aumento, 100 e 35% respectivamente, ocorreu apenas no terceiro dia após a ablação (Fig. 6).

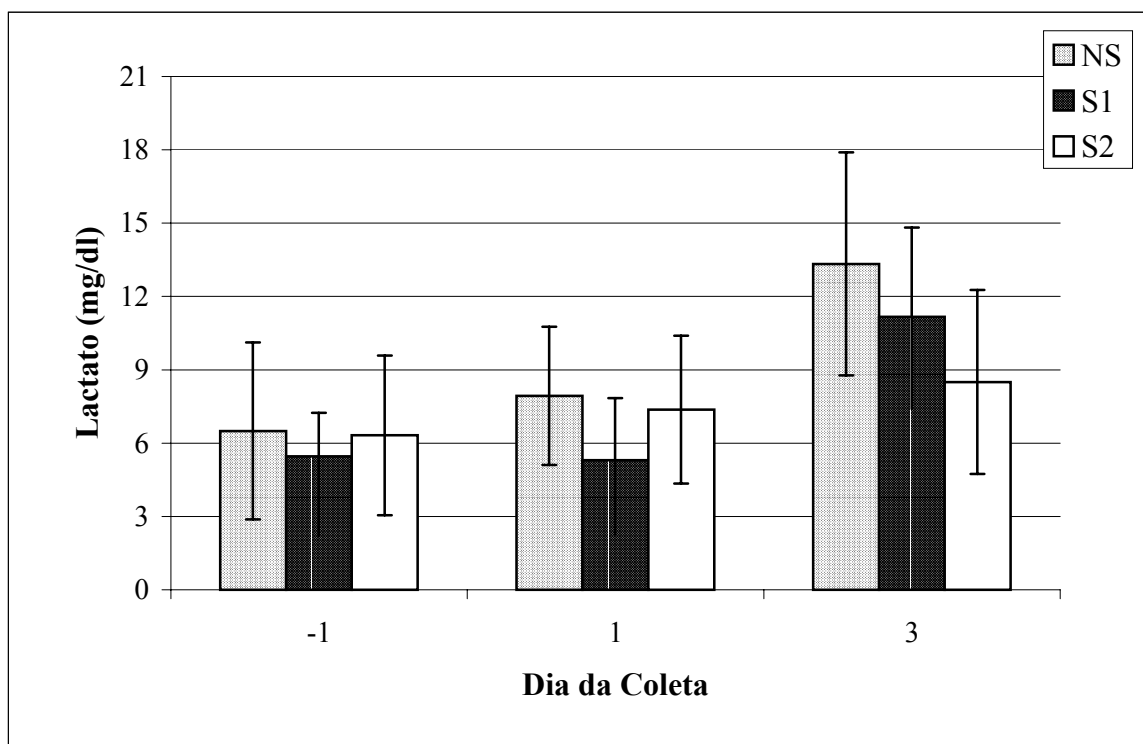


Figura 6. Concentração de lactato em fêmeas reprodutoras da espécie *L. vannamei* submetidas a uma dieta contendo três diferentes concentrações de ApP: NS - não tratadas com superdosagem (200 mg AAE/kg), S1 - superdosagem 1 (1000 mg AAE/kg) e S2 - superdosagem 2 (2000 mg AAE/kg). As barras verticais representam a média \pm desvio padrão (n=4), no dia anterior (- 1) e em dias sucessivos após a ablação.

3.7 Concentração de ácido ascórbico nas gônadas e hepatopâncreas

A concentração de ácido ascórbico (AA) no hepatopâncreas dos camarões suplementados com ApP (S1 e S2) foi quase o dobro daquela dos animais não suplementados (NS), antes do processo de ablação (Tab. 1), sugerindo um maior depósito desta vitamina nos animais que receberam a suplementação vitamínica. Não foi possível dosar os níveis de AA nas gônadas dos camarões antes do processo de ablação devido ao pequeno desenvolvimento destas. Após a ablação, a concentração de AA nos tecidos analisados mostrou valores muito variados, sendo que os maiores valores nas gônadas foram encontradas no grupo S1.

Tabela 1. Concentração de ácido ascórbico (AA) no hepatopâncreas e nas gônadas de *L. vannamei* (n=2).

Dia da Coleta (a partir da ablação)	Grupo	Hepatopâncreas		Gônadas	
		(μ Mol)	(μ g/g)	(μ Mol)	(μ g/g)
-1	NS	0,029 \pm 0,008	5,19 \pm 1,349	nd	
	S1	0,058 \pm 0,003	10,26 \pm 0,549	nd	
	S2	0,050 \pm 0,009	9,74 \pm 1,523	nd	
1	NS	0,051 \pm 0,022	8,96 \pm 3,923	0,042 \pm 0,030	7,43 \pm 3,00
	S1	0,041 \pm 0,010	5,54 \pm 2,050	0,061 \pm 0,028	10,71 \pm 4,95
	S2	0,043 \pm 0,009	7,57 \pm 1,340	0,048 \pm 0,032	8,50 \pm 5,71
14	NS	0,046 \pm 0,010	8,07 \pm 1,674	0,040 \pm 0,019	7,00 \pm 3,34
	S1	0,057 \pm 0,009	10,01 \pm 1,594	0,069 \pm 0,005	12,21 \pm 0,86
	S2	0,040 \pm 0,006	7,08 \pm 1,108	0,045 \pm 0,003	7,85 \pm 0,50

nd: resultados não determinados.

4. Discussão

Como mencionado anteriormente, segundo nossos registros, o único trabalho a ter estudado a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos em fêmeas de camarões submetidas ao processo de ablação peduncular unilateral foi realizado em nosso laboratório, com o peneídeo

Farfantepenaeus paulensis (PERAZZOLO et al., 2002). Contudo, neste primeiro trabalho, as análises foram realizadas apenas após uma semana da ablação, enquanto o presente estudo envolveu um período de análise mais longo e completo, abrangendo o dia anterior e vários dias após o processo de apedunculacão unilateral. Muito surpreendentemente, nossos resultados não mostraram alterações significativas em relação ao processo de ablação, na grande maioria dos parâmetros analisados, com exceção do título aglutinante do soro que diminuiu significativamente no terceiro dia após a apedunculacão. A suplementação da dieta dos camarões, com superdosagens de ApP, também não resultou em alterações evidentes, com exceção da redução dos níveis de glicose no plasma dos animais tratados com ambas superdosagens e do decréscimo da atividade aglutinante em fêmeas S2 (2.000 mg AAE/kg) a partir do sétimo dia após ablação.

A THC dos crustáceos é usualmente um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde destes animais, apesar de haver uma grande variabilidade individual no número destas células. A diminuição e, mais raramente, o aumento da THC foram descritos em crustáceos em relação a diferentes fatores de estresse, como hipóxia (Le MOULLAC et al., 1998), aclimatação em cativeiro (SÀNCHEZ et al., 2001), variação de temperatura (TRUSCOTT & WHITE, 1990; Le MOULLAC & HAFFNER, 2000; CHENG & CHEN, 2001), tipo de dieta (CHENG E CHEN, 2001), ciclo de muda (TSING et al., 1989; Le MOULLAC et al., 1997), presença de xenobiontes (SMITH & JOHNSTON, 1992; SMITH et al., 1995) e infecções (HENNIG et al., 1998; LORENZON et al., 1999; GOARANT & BOGLIO, 2000; RENGPIPAT et al., 2000; CHENG & CHEN, 2001). Entretanto, a alteração da THC em relação ao processo de ablação, com o intuito de induzir uma maturação ovariana precoce em camarões, não foi praticamente relatada. PERAZZOLO et al. (2002) encontraram uma marcante redução da THC (43,7%) em fêmeas de *F. paulensis*, uma semana após o processo de ablação peduncular

unilateral. Esses dados contrastam com os resultados obtidos no presente estudo, onde não houve surpreendentemente uma variação significativa da THC de *L. vannamei* em decorrência do processo mutilatório da ablação.

A CP do soro/plasma de crustáceos também pode variar em função de alterações ambientais e/ou fisiológicas, como temperatura (CHISHOLM & SMITH, 1994; SÀNCHEZ et al., 2001), salinidade (CHEN et al., 1994), níveis de oxigênio (ENGEL et al., 1993), quantidade de amônia (CHEN & CHENG, 1995), dieta (ROSAS et al., 2000), ciclo de muda (CHEN & CHENG, 1993) e infecções virais (HENNIG et al., 1998). Novamente, apenas o trabalho de PERAZZOLO et al. (2002) parece ter analisado este parâmetro em relação ao processo de ablação unilateral em camarões. Contrariamente aos resultados do presente estudo, os autores relataram uma redução de 50% na CP de fêmeas de *F. paulensis*, após uma semana de apedunculção.

Muitos estudos relatam alterações na atividade da PO em camarões submetidos à diferentes condições de estresse, como hipóxia (Le MOULLAC et al., 1998), variação de temperatura (VARGAS-ALBORES et al., 1998; Le MOULLAC & HAFFNER, 2000), salinidade (VARGAS-ALBORES et al., 1998; PERAZZOLO et al., 2002), amônia (Le MOULLAC & HAFFNER, 2000), aclimatação em cativeiro (SÀNCHEZ et al., 2001), ciclo de muda (Le MOULLAC et al., 1997), extrusão do espermatóforo em machos (PERAZZOLO et al., 2002) e processos infecciosos (HAUTON et al., 1997). Interessantemente, de forma similar aos resultados deste estudo, PERAZZOLO et al. (2002) também não detectaram alteração significativa da atividade da PO em fêmeas de *F. paulensis* submetidas ao processo de ablação peduncular unilateral. Os valores mais baixos da atividade da PO nas fêmeas do grupo S2, poderiam ser o reflexo de um potencial efeito antioxidante da superdosagem de ácido ascórbico (20x) sobre o funcionamento desta enzima.

A concentração de aglutininas no soro de fêmeas ablasadas de *L. vannamei* do grupo NS mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no terceiro dia após a ablação, podendo sugerir uma eventual imunodeficiência nestas proteínas de reconhecimento, em decorrência do estresse causado pela apedunculação. Já, nos camarões que receberam superdosagens de ApP (S1 e S2), não houve este declínio no terceiro dia após ablação, podendo sugerir uma eventual proteção/imunoestimulação em relação a este parâmetro. A alteração da atividade aglutinante em camarões sob condições de estresse tem sido muito pouco estudada e os relatos que existem a este respeito referem-se principalmente à indução desta atividade por microorganismos e partículas estranhas. No caranguejo *Callinectes sapidus* (PAULEY, 1973), por exemplo, foi encontrado um aumento da atividade aglutinante após injeção de eritrócitos de mamíferos na hemolinfa deste crustáceo. Também no camarão *Penaeus monodon* foi verificado uma aumento da atividade aglutinante em animais infectados com a bactéria *Vibrio vulnificus* (RATANAPO & CHULAVATNATOL, 1992). Por outro lado, a mesma espécie de camarão, quando tratada com diferentes imunoestimulantes, acrescentados na dieta, não mostrou alteração de seu título aglutinante (SRITUNYALUCKSANA et al., 1999). Mais uma vez, o trabalho de PERAZZOLO et al. (2002) com *F. paulensis* parece ter sido o único a analisar a atividade aglutinante do soro em relação ao processo de ablação unilateral. Contudo, neste peneídeo os resultados foram extremamente variáveis e inconclusivos em relação a este parâmetro. PERAZZOLO et al. (2002) sugeriram que esta grande variabilidade deva ter ocorrido pela utilização de eritrócitos de carneiro, que provavelmente não eram as melhores células para este tipo de ensaio. No caso de *L. vannamei*, não podemos descartar, porém, a possibilidade de que a diminuição significativa da atividade aglutinante após o processo de ablação, possa ter sido apenas a uma flutuação fortuita e isolada.

O aumento nos níveis de lactato em crustáceos já foi descrito em animais submetidos a hipóxia (TAYLOR & WHITELEY, 1987; SANTOS & KELLER, 1993; WEBSTER, 1996; ZOU et al., 1996) e variação de temperatura (SÁNCHEZ et al., 2001). Não temos registros de estudos que correlacionaram os níveis de lactato com a prática da ablação em camarões. No presente estudo não foi observada uma alteração significativa na produção de lactato em decorrência da apenduculação,

Vários trabalhos relatam a ocorrência de uma hiperglicemia em diferentes crustáceos submetidos a algum tipo de estresse, como hipóxia (ZOU et al., 1996; HALL & HAM, 1998), alterações de temperatura e salinidade (CHANG et al., 1998), elevadas concentrações de amônia (RACOTTA & HERRERA, 2000), exposição a metais pesados (REDDY et al., 1994, 1996) ou a poluentes orgânicos (REDDY et al., 1996). Por outro lado, o processo de ablação em crustáceos deveria, contrariamente, resultar numa resposta hipoglicêmica, uma vez que a apenduculação remove o *complexo glândula do seio – órgão X*, que secreta o hormônio hiperglicemiante (CHH). Efetivamente, KELLER (1974) relatou a ocorrência de hipoglicemia em crustáceos submetidos a ablação bilateral. Por outro lado, LORENZON et al.(2000) observaram que não havia uma resposta hiperglicêmica em camarões *Palaemon elegans* ablados bilateralmente e expostos a metais pesados, contrariamente aos animais não ablados, mas tratados com estes contaminantes. Valores decrescentes na concentração de glicose foram observadas nas fêmeas abladas de *L. vannamei* não suplementadas com superdosagens de vitamina C, mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, uma hipoglicemia foi observada nos animais tratados com superdosagens de ApP, sugerindo que a apenduculação, mesmo que unilateral, pode provocar uma diminuição nos níveis de CHH.

A concentração de AA no hepatopâncreas das fêmeas de *L. vannamei* tratadas com superdosagens de ApP foi efetivamente maior do que nos animais tratados apenas com a dose

recomendada. Esse fato demonstrou que as fêmeas desta espécie foram capazes de depositar mais vitamina C nos seus órgãos, quando em presença de uma suplementação vitamínica. O depósito de AA no hepatopâncreas dos animais do grupo S1 foi tão efetivo quanto nos animais do grupo S2, no dia anterior a ablação. A concentração de AA no hepatopâncreas e gônadas do grupo NS diferiu muito pouco, entre si, contrariamente aos resultados obtidos por SANGHA et al. (2000) que registraram valores de cerca duas vezes mais AA nas gônadas do que no hepatopâncreas em fêmeas de *L. vannamei* que receberam superdosagens de ApP. Contudo, SANGHA et al. (2000) encontraram valores de AA muito semelhantes no hepatopâncreas e gônadas em fêmeas que haviam sofrido desova. Esta situação pode também ter ocorrido no presente estudo, uma vez que a desova não foi avaliada em nossas análises, em função do depósito de AA nas gônadas. Cabe ainda ressaltar, que fêmeas selvagens de *L. vannamei* parecem conter níveis bem mais altos de AA nas gônadas do que fêmeas em condições de cativeiro (SANGHA et al., 2000; WOUTERS et al., 2001). Estes resultados vêm reforçar a importância de se oferecer uma suplementação apropriada de AA na dieta de camarões cultivados. De qualquer modo, apesar da vitamina C ter sido depositada de forma aumentada nos animais tratados com superdosagens de ApP, não houve uma correlação evidente entre esta suplementação e os parâmetros hemato-imunológicos analisados. Um estudo muito recente investigou o efeito imunoestimulante de diferentes dosagens de diferentes derivados de ácido ascórbico na dieta de camarões juvenis da espécie *Penaeus mondon* (LEE & SHIAU 2002). Os autores mostraram que a THC e a atividade da PO da hemolinfa atingiam valores mais altos quando eram oferecidas na dieta doses recomendadas dos derivados L-ascorbyl-2-polyphosphate (C2PP) ou L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg (C2MP-Mg). Entretanto, a utilização de superdosagens destes derivados de ácido ascórbico não resultava em uma maior imunoestimulação. Estes resultados assemelham-se, de certa forma, aos obtidos

em *L. vannamei*, onde superdosagens de ApP, não alteraram praticamente os parâmetros hemato-imunológicos investigados, em comparação à dose recomendada..

Em suma, a ausência de alterações significativas, na maioria dos parâmetros analisados, parece sugerir a ocorrência de um mecanismo compensatório, desencadeado pelo pedúnculo ocular não ablado, uma vez que a apedunculação foi apenas unilateral. Esta situação é ainda reforçada pelo fato de que, durante todo o processo de maturação, apenas 14 animais morreram num total aproximado de 500 fêmeas. Por outro lado, não deve também ser descartada a possibilidade de que os parâmetros hemato-imunológicos selecionados para este estudo possam não ter sido os mais sensíveis para avaliar esta condição de estresse. Finalizando, pode-se ainda especular, que o sucesso de *L. vannamei* em aquicultura, constituindo no momento atual a segunda espécie de camarão mais cultivada a nível mundial decorra, pelo menos em parte, da sua considerável resistência às diversas práticas de manejo, que incluem técnicas agressivas, supostamente capazes de provocar estresses fisiológicos severos.

5. Agradecimentos

Somos gratos à Dra. Débora M. Fracalossi do Departamento de Aquicultura pelo valioso auxílio técnico na utilização e determinação da vitamina C e ao Dr. Marcelo Reis do Departamento de Estatística pelo seu grande apoio na parte estatística deste trabalho. Agradecemos também à CAPES, pela concessão de uma bolsa de Mestrado à D. S. Maggioni e à Comunidade Econômica Européia (Research Project ERBIC18CT97-0209) por propiciar o Intercâmbio Científico de dois autores deste trabalho.

6. Referências Bibliográficas

- Block, G., Langseth, L., 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.*, 80-84.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chang, E., Keller, R., Sharon, C., 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *Gener. Comp. Endocrinol.* 111, 359-366.
- Chen, J.C., Chen, C.T. Cheng, S.Y., 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin protein and free amino acids levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Serv.* 110, 85-94.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., 1993. Studies on hemocyanin and hemolymph proteins levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and molting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 293-296.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *J. Comp. Physiol.* 164B, 530-535.
- Cheng, W., Chen, J.C., 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellf. Immunol.* 11, 53-63.
- Chisholm, J.R.S., Smith, V., 1994. Variation of antibacterial activity in the hemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *J. Mar. Biol. Ass., U.K.* 74, 979-982.

- Durve, V.S., Lovell, R.T., 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish Aquat. Scien.* 39, 948-951.
- Engel, D.W., Brower, M., McKenna, S., 1993. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93, 235-244.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), 2002. Review of the state of world Aquaculture. FAO Fisheries Circular n° 886, Rev 2. Rome, Italy. 130 p.
- Fingerman, M., 1997. Crustacean Endocrinology: A retrospective, prospective and analysis. *Physiol. Zool.* 70, 257-269.
- Goarant, C. and Boglio, E., 2000. Changes in hemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. *J. World Aquacult. Soc.* 31, 123-129.
- Hall, M.R., Ham, E.H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 290-299.
- Hauton, C., Williams, J.A., Hawkins, E., 1997. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.) *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 211, 115-128.
- Hennig, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natuskari, Y., Takahashi, Y., 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.* 33, 389-393.
- Johansson, M.W., Söderhall, K., 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology*, 5, 171-176.
- Keller, R. 1974. Stoffwechselregulation durch neurohormone bei crustaceen. *Fortschr. Zool.* 22:344-54.
- Kontara, E.K., Merchie, G., Lavens, P., Robles, R., Nelis, H., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1997. Improved production of postlarval white shrimp through supplementation of L-

- ascorbyl-2-polyphosphate in their diet. *Aquacult. Int.* 5, 127-136.
- Kunst, A., Draeger, B., Ziegenhorn, J., 1983. UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Meth. Enzym. Anal.* 6, 163-172.
- Lee, M.H. and Shiau, S.Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellf. Immunol.* 12, 119-129.
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-131.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M.; Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., *Aquacop.*, 1997. Hematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellf. Immunol.* 7, 227-234.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, J.C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellf. Immunol.* 8, 621-629.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220.
- Lorenzon, S., Francese, M., Ferrero, E.A., 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 167-176.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 1999. Effects of LPS injection on circulating hemocytes in crustaceans in vivo. *Fish Shellf. Immunol.* 9, 31-50.
- Marques, M.R.F., Barracco, M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191, 23-44.
- Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture* 155, 165-181.

- Millar, D.A., Ratcliffe, N.A., 1994. Invertebrates. In: Turner R. J. (Ed.) Immunology: A Comparative Approach. Chichester, John Wiley & Sons, pp. 46-51.
- Morel, Y., Barouki, R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 342, 481-496.
- Mulero, V., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1998. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 185-199.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.
- Nagabhushanam, R., Kulkarni, G.K., 1981. Freshwater palaemonid prawn, *Macrobrachium kistenensis* (Tiwari) - effect of heavy metal pollutants. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 47B, 380-386.
- Nappi, A., Vass, E., 1993., Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigm. Cell Res.* 6, 117-126.
- Omaye, S.T., Turnbull, J.D., Sauberlich, H.E., 1979. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Meth. Enzymol* 62, 3-14.
- Pauley, G.B., 1973. An attempt to immunize the blue crab, *Callinectes sapidus*, with vertebrate red blood cells. *Experientia* 29, 210-211.
- Perazzolo, L.M., Barracco, M.A., 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 385-395.
- 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 or physiological stress. *Aquaculture*, 214, 19-33.

- Pérez-Farfante, J., Kensle, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. In: Key of diagnoses for the families and genera. Washington, NOA, 233 pp.
- Racotta, I.S., Herrera, R.H., 2000. Metabolic response of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 437-443.
- Ratanapo, S., Chulavatnatol, M., 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B, 855-859.
- Reddy, P.S., Devi, M., Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1994. Cadmium chloride induced hyperglycemia in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: possible role of crustacean hyperglycemic hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C, 57-61.
- Reddy, P.S., Katayayani, R.V., Fingerman, M., 1996. Cadmium and naphthalene-induced hyperglycemia in the fiddler crab *Uca pugilator*: differential modes of action on the neuroendocrine system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 425-431.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture* 191, 271-288.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 249, 181-198.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus vannamei* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.

- Sangha, R.S., Sánchez, M.C.C., Palacios, C.A.M., Rodríguez, I.E.M., 2000. Effect of supplementing ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in broodstock diet of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 31, 134-144.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustaceans species: A role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 343-347.
- Smith, V.J., Johnston, P.A., 1992. Differential hemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 641-649.
- Smith, V.J., Swindlehurst, R.J., Johnston, P.A., Vethaak, A.D., 1995. Disturbance of host defence capability in the common shrimp, *Crangon crangon*, by exposure to harbor dredge spoils. *Aquatic Toxicol.* 32, 43-58.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 3-23.
- Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of proPO activating system in crayfish hemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta* 797, 99-104.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in hemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellf. Immunol.* 9, 21-30.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 53-69.
- Taylor, E.W., Whiteley, N.M., 1987. Respiratory responses of the lobster (*Homarus gammarus*) to prolonged periods of aerial exposure during commercial shipment. *J. Physiol. Soc.* 394, p.162.
- Truscott, R., White, K.N., 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct. Ecol.* 4, 455-461.

- Tsing, A., Arcier, J.M., Bréhélin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *J. Invert. Pathol.* 53, 64-77.
- Vargas-Albores, F., Baltazar, P.H., Clark, G.P., Barajas, F.M., 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquacult. Res.* 29, 549-553.
- Webster, S.G., 1996. Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199, 1579-1585.
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J., 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture* 198, 307-323.
- Zou, E., Du, N., Lai, W., 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 114A, 105-109.

III - Referências Bibliográficas da Introdução

ALAVA, V.R.; KANAZAWA, A.; KOSHIO, S. Effect of dietary vitamins A, E and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, n.7, p.1235-1241, 1993.

ANDERSON, R.S. Production of reactive oxygen intermediates haemocytes. Immunological significance. In: SÖDERHÄLL, K., SADAOKI, I., VASTA, G. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, p.109-129, 1996.

ASHIDA, M.; BREY, P.T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. **Molecular Mechanism Immunology Research Insect**, p.135-172, 1997.

ASPÁN, A.; HALL, M.; SÖDERHÄLL, K. The effect of endogeneous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzymes, a serine proteinase from crayfish haemocytes. **Insect Biochemistry**, v.20, n.5, p.485-492, 1990.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNETTE, J.T. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **Journal Clin. Invest.**, v.52, p.741-744, 1973.

BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v.191, p.71-88, 2000.

BAUCHAU, A.G. Crustaceans. In: *Invertebrate Blood Cells*. RATCLIFFE, N.A., ROWLEY, A.F. (Eds.), Academic Press Inc., London, v.2, p.385-420, 1981.

BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review Fish Disease**, v.2, p.309-323, 1992.

BLOCK, G.; LANGSETH, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**, july, p.80-84, 1994.

BROWDY, C.L. A review of the reproduction biology of penaeus species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: WYBAN, J. (Ed.), *Proc. of the Special Session on Shrimp Farming*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, p.22-51, 1992.

BURNS, J.J.; PEYSER, P.; MOLTZ, A. Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. **Science**, v.124, p.1148-1149, 1956.

CAHU, C.L.; CUZON, G.; QUAZUGUEL, P. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.112, p.417-424, 1995.

CAILLOUET, A.C. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duodorum* Burkenroad. **Proc. World Mariculture Society**, v.3, p.205-225, 1973.

CASTILLE, F.L.; LAWRENCE, A.L.; SEIB, P.A.; WANG, X.Y. Effect of ascorbyl-2-polyphosphate on survival, growth and tissue ascorbic acid in the shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931. Books of Abstracts, Aquaculture '96, February, World Aquaculture Society, Bangkok, Thailand, 1996.

CATACUTAN, M.R.; De La CRUZ, M. Growth and mid-gut cells profile of *Penaeus monodon* juvenile fed water-soluble vitamin deficient diets. **Aquaculture**, v.81, p.137-144, 1989.

CHAMBERLAIN, G.W. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. PhD dissertation, Department Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A&M University, TX, USA, 1988.

CHAN, S.-M. Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.112C, n.1, p.51-59, 1995.

CHANG, E.; KELLER, R.; SHARON, C. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. **General and Comparative Endocrinology**, v.111, p.359-366, 1998.

CHAVES, A.R. Effects of sinus gland extract on mandibular organ size and methyl farnesoate synthesis in the crayfish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128A, p.327-333, 2001.

CHEN, H.Y.; CHANG, C.F. Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. **Journal of Nutrition**, v.124, p.2033-2038, 1994.

CHEN, J.C.; CHENG, S.Y. Studies on hemocyanin and haemolymph proteins levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.106B, n.2, p.293-296, 1993.

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

CHISHOLM, J.R.S.; SMITH, V. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. **Journal Marine Biological Association**, U.K., v.74, p.979-982, 1994.

CONKLIN, D.E. Vitamins. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, The World Aquaculture Society, v.6, Baton Rouge, Louisiana, p. 123-149, 1997.

DESHIMARU, O.; KUROKI, K. Adequate dietary levels of ascorbic acid for prawn. **VII Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.42, p.571-576, 1976.

DESTOUMIEAUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; DORSSELAER, A. V.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398-28406, 1997.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; STRUB, J.M.; DORSSELAER, A.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **Eur. Journal Biochemistry**, v.266, p.335-346, 1999.

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

DURLIAT, M. Clotting processes in crustacea decapoda. **Biology Review**, v.60, p.473-498, 1985.

DURVE, V.S.; LOVELL, R.T. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Can. Journal Fish Aquatic Science**, v.39, p.948-951, 1982.

EMMERSON, W.D. Induced maturation of prawn *Penaeus indicus*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v.2, p.121-131, 1980.

ENGEL, D.W.; BROWER, M.; McKENNA, S. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v.93, p.235-244, 1993.

FAO - Fisheries resources: trends in production, utilization and trade. In: Part 1: The State of the World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Rome, Italy, 2000.

FAO - Fisheries: Production, Utilization and Trade. In: THIRTY-FIRST SESSION CONFERENCE THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE, Rome, Italy, 70 p., 2001.

FINGERMAN, M. Crustacean Endocrinology: A Retrospective, Prospective and Analysis. **Physiological Zoology**, v.70, n.3, p.257-269, 1997a.

FINGERMAN, M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. **Invertebr. Reprod. Dev.**, v.31, p.47-54, 1997b.

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

- GOARANT, C. & BOGLIO, E. Changes in hemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal and to vaccination. **Journal of the World Aquaculture**, v.31, n.1, p.123-129, 2000.
- GRANT, B.F.; SEIB, P.A.; LIAO, M.-L.; CORPRON, K.E. Polyphosphorylated L-ascorbic acid: a stable form of vitamin C for aquaculture feeds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.20, n.3, p.143-157, 1989.
- HALL, M.R.; HAM, E.H. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.29, n.3, 1998.
- HALL, M.; WANG, R.; VAN ANTWERPEN, R.; SOTTRUP-JENSEN, L.; SÖDERHÄLL, K. The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein for clot formation in crustaceans blood. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, USA, v.96, p.1965-1970, 1999.
- HALVER, J.E. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. In: Nutrition and Feeding in Fish. COWEY, A.M., MACKIE, A.M., BELL, J.C. (Eds.), Academic Press Inc., London, p.415-429, 1985.
- HARDY, S.W.; GRANT, P.T.; FLETCHER, T.C. A hemagglutinin in the tissue fluid of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* with specificity for sialic acid residues in glycoproteins. **Experientia**, v.33, p.767-769, 1977.
- HAUTON, C., WILLIAMS, J.A., HAWKINS, E. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.) **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v.211, p.115-128, 1997.
- HE, H.; LAWRENCE, A.L. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.114, p.305-316, 1993.
- HENNIG, O.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; KONDO, M.; NATUSKARI, Y.; TAKAHASHI, Y. Analyses of haemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected whit penaeid rod-shaped DNA virus. **Fish Pathology**, v.33, p.389-393, 1998.
- HERNANDÉZ-LÓPEZ, J.; GOLLAS-GALVAN, T.; VARGAS-ALBORES, F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). **Comparative Biochemistry Physiology**, v.113C, n.1, p. 61-66, 1996.
- HOLTHUIS, L.B. FAO species catalogue, v.1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish. Synop., (125) v.1, 261 p. The "Interest to Fisheries" section has been updated according to recent FAO fishery statistics, 1980.
- HOMOLA, E.; CHANG, E.S. Crustacean juvenile hormone in search of functions. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.117B, p.347-356, 1997.
- HOSE, J.E.; MARTIN, G.G.; GERARD, A.S. A decapod classification scheme integrating morphology, citochemistry and function. **Biological Bulletin**, v.178, p.185-199, 1990.

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

JOHANSSON M.W.; SÖDERHÄLL, K. Cellular immunity in crustaceans and the proper system. **Parasitology Today**, v.5, p. 171-176, 1989.

JUSSILA, J.; McBRIDE, S.; JAGO, J.; EVANS, L.H. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* Geroge). **Aquaculture**, v.199, n.185-193, 2001.

KLEINHOLZ, L. Biochemistry of crustacean hormones. In: Bliss, D.E.; Mantel, L.H. (Eds.) The Biology of Crustacea, v.9, Orlando: Academic Press, p.464-522, 1985.

KOMATSU, M.; ANDO, S. A very-high-density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, p.459-463, 1998.

KONTARA, E.K.; MERCHIE, G.; LAVENS, P.; ROBLES, R.; NELIS, H.; De LEENHEER, A.; SORGELLOS, P. Improved production of postlarval white shrimp through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in their diet. **Aquaculture International**, v.5, p.127-136, 1997.

KOPÁČEK, P.; HALL, M.; SÖDERHÄLL, K. Characterization of a clotting proteins isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **European Journal Biochemistry**, v.213, n.1, p.591-597, 1993.

LACHAISE, F.; Le ROUX, A.; HUBERT, M.; LAFONT, R. The molting glands of crustaceans: localization, activity, and endocrine control. **Journal Crustacean Biology**, v.13, p.198-234, 1993.

LAUFER, H., JONNA, J.S.B., SAGI, A. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. **Am. Zool.**, v.33, p.365-374, 1993.

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

Le MOULLAC, G., LE GROUMELLE, M.; ANSQUER, D., FROISSARD, S., LEVY, P., AQUACOP. Hematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellf. Immunol.* 7, 227-234, 1997.

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

LIGHTNER, D.V. Black death disease of shrimp. In: Shrimp Diseases Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture (ed. C.j. Sinderman) Elsevier Scientific Publications Corporation, New York, p.65-68, 1977.

LIGHTNER, D.V. (Ed.) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 305 p., 1996.

LIGHTNER, D.V.; HUNTER, B.; MAGARELLI, P.C.J.; COLVIN, L.B. Ascorbic acid: nutritional requirements and role in wound repair in penaeid shrimp. **Proceeding of the World Aquaculture Society**, v.10, p.513-528, 1979.

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

LORAND, L.; CONRAD, S.M. Transglutaminases. **Mol. Cell. Biochem.**, v.58, p.9-35, 1984.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; FERRERO, E.A. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. **Archive Environmental Contamination Toxicology**, v.39, p.167-176, 2000.

MADARAS, F.; CHEW, M.Y.; PARKIN, J.D. purification and characterization of the sand crab (*Ovalipes bipustulatus*) coagulogen (fibrinogen). **Thromb. Haemost.**, v.45, p.77-81, 1981.

MAGARELLI, P.C.; COLVIN, L.B. Depletion/repletion dynamics of ascorbic acid in two species of penaeid : *Penaeus californiensis* and *Penaeus stylirostris*. **Proceedings of the World Mariculture Society**, v.9, p.235-241, 1978.

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

MARTIN, G.G.; HOSE, J.E.; OMORI, S.; CHONG, C.; HOODBHOY, T.; McKRELL, N. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.100B, p517-522, 1991.

MARTIN, G.G.; POOLE, D.; HOSE, J.E.; REINOLDS, L.; McKRELL, N.; WHANG, A. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.62, p.308-315, 1993.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; DHERT, Ph.; DEHASQUE, M.; NELIS, H.; De LEENHEER, A.; SORGELOOS, P. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. **Aquaculture**, v.134, p.325-337, 1995.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. **Aquaculture**, v.155, p.165-181, 1997.

MONTAÑO-PEREZ, K.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; HIGUERA-CIAPARA, I.; VARGAS-ALBORES, F. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122B, p.381-387, 1999.

MONTOYA, N.; MOLINA, C. Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fisheries Science*, v.61, n.6, p.1045-1046, 1995.

MOREL, Y.; BAROUKI, R. Repression of gene expression by oxidative stress. **Review Biochemistry Journal**, v.342, p.481-496, 1999.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.66, p.185-199, 1998.

MUÑOZ, M.; CEDEÑO, R.; RODRÍGUEZ, J.; KNAAP, W.P.W.; MIALHE, E., BACHÈRE, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.191, p.89-107, 2000.

NAPPI, A.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. **Pigm. Cell Research**, v.6, p.117-126, 1993.

NASCIMENTO, I.A.; BRAY, W.A.; TRUJILLO, J.R.L.; LAWRENCE, A. Reproduction of ablated and unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. **Aquaculture**, v.99, p.387-398, 1991.

OLAFSEN, J.A.; FLETCHER, T.C.; GRANT, P.T. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental Comparative Immunology*, v.16, p.123-138, 1992.

PATERSON, B.D. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.106B, p.395-400, 1993.

PAULEY, G.B. An attempt to immunize the blue crab, *Callinectes sapidus*, with vertebrate red blood cells. **Experientia**, v.29, p.210-211, 1973.

PERAZZOLO, L.M.; BARRACCO, The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulsensis* and associated factors. **Developmental Comparative Immunology**, v.21, p.385-395, 1997.

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

PÉREZ-FARFANTE, J., KENSLE, B.. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. In: Key of diagnoses for the families and genera. Washington, NOA, 233 pp, 1997.

PRIMAVERA, J.H. Induced maturation and spawning in five-month-old *Penaeus monodon* Fabricius by eyestalk ablation. **Aquaculture**, v.13, p.355-359, 1978.

PRIMAVERA, J. H. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: TAKI, Y., PRIMAVERA, J.H., LLOBRERA, J.A. (Eds.), Primeira Conferência Internacional no cultivo de camarões peneídeos. Aquaculture Department, SEAFDEC, Iloilo, Filipinas, p.47-64, 1985.

RATANAPO, S.; CHULAVATNATOL, M. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v.102B, n.4, p.855-859, 1992.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p.271-288, 2000.

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

RODRIGUEZ, J.; Le MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.191, p.109-119, 2000.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; ARENA, L.; LEMAIRE, P.; SOYEZ, C.; van WORMHOUDT, A. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v.249, p.181-198, 2000.

ROSENBERRY, B. World Shrimp Farming. Aquaculture Digest, San Diego, California, USA. SINGHT, T. Benefits of sustainable shrimp culture. FAO FISHERIES REPORT, n.572, (Supplement), p.150-157, 1998.

SADAHARU, M.; PRIMAVERA, J.H. Maturation and spawning of *Penaeus indicus* using different ablation methods. **Aquaculture**, v.62, p.73-81, 1987.

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

SANDNES, K.; ULGENES, Y.; BRAEKKAN, O.R.; UTNE, F. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v.43, p. 167-177, 1984.

SANGHA, R.S.; SÀNCHEZ, M.C.C.; PALACIOS, C.A.M.; RODRÍGUEZ, I.E.M. Effect of supplementing ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in broodstock diet of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.31, n.1, p.134-144, 2000.

SAROJINI, R.; NAGABHUSHANAM, R.; FINGERMAN, M. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: an in vivo and in vitro study. **Journal Experimental Zoology**, v.271, p.395-400, 1995.

SATO, P.; UDENFRIEND, S. Scurvy-prone animals, including man, monkey, and guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.187, p.158-162, 1978.

SHIGUENO, K.; ITOH, S. Use of Mg-L-ascorbyl-2-phosphate as a vitamin C source in shrimp diets. **Journal of the World Aquaculture**, v.19, n.4, p.168-174, 1988.

SMITH, V.J.; JOHNSTON, P.A. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.101C, p.641-649, 1992.

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

SMITH, V.J.; SWINDLEHURST, R.J.; JOHNSTON, P.A.; VETHAAK, A.D. Disturbance of host defence capability in the common shrimp, *Crangon crangon*, by exposure to harbor dredge spoils. **Aquatic Toxicology**, v.32, p.43-58, 1995.

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

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. **Current Opin. Immunology**, v.10, p.23-28, 1998.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L.; JOHANSSON, M.W. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: SÖDERHÄLL, K., IWANAGA, S., VASTA, G.R. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, p.229-253, 1996.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of proPO activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochemistry Biophys Acta**, v.797, p.99-104, 1984.

SÖDERHÄLL, K.; UNESTAM, T. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. **Can. Journal Microbiology**, v.25, p.406-414, 1979.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture**, v.59, p.197-208, 1986.

SOUZA, J. Desempenho da Pesca e da Aquicultura. In: *Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina*, Instituto CEPA/SC, p.150-153, 2000-2001.

SPOTTS, D.; LUTZ, P. L-lactic acid accumulation during activity. **Journal Marine Society**, v.12, p.244-249, 1981.

SRITUNYALUCKSANA, K.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, v.23, p.179-186, 1999.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, v.191, p.53-69, 2000.

SUBASINGHE, R.P.; BARTLEY, D.M.; McGLADDERY, S.; BARG, U. Sustainable shrimp culture development: biotechnological issues and challenges. In: *Advances in shrimp biotechnology*. Tailândia, p.13-18, 1998.

SUBRAMONIAM, T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis, Review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.125C, p.135-156, 2000.

SUNG, H.H.; KOU, G.H.; SONG, Y.L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, v.29, n.1, p.11-17, 1994.

TAYLOR, E.W.; WHITELEY, N.M. Respiratory responses of the lobster (*Homarus gammarus*) to prolonged periods of aerial exposure during commercial shipment. *Journal of the Physiological Society*, v.394, p.162, 1987.

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

TSING, A.; ARCIER, J.M.; BRÉHÉLIN, M. Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.53, p.64-77, 1989.

TSUKIMURA, B.; KAMEMOTO, F.I. In vitro stimulation of oocytes by preemptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.92, p.59-66, 1991.

VACA, A.; ALFARO, J. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*, v.182, p.373-385, 2000.

VARGAS-ALBORES, F.; JIMÉNEZ-VEJA, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry Physiology*, v.116B, p.453-458, 1997.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, v.143, p.123-133, 1996.

WANG, Y.J.; HAYES, T.K.; HOLMAN, G.M.; CHAVEZ, A.R.; KEELEY, L.L. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. *Peptides*, v.21, p.477-484, 2000.

WILSON, R.P.; POE, W.E.; ROBINSON, E.H. Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for channel catfish. **Aquaculture**, v.81, p.129-136, 1989

WOUTERS, R.; GÓMEZ, L.; LAVENS, P.; CALDERÓN, J. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. **Journal. Shellfish Research**, v.18, p.651-656, 1999.

YANO, I. Induction of rapid spawning in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, through unilateral eyestalk enucleation. **Aquaculture**, v.40, p.265-268, 1984.

YEH, M.S.; CHEN, Y.L.; TSAI, I.H. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.121B, p.169-176, 1998.

YEH, MS.; HUANG, C.J.; LEU, J.H.; LEE, Y.C.; TSAI, I.H. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **European Journal Biochemistry**, v.266, p.624-633, 1999.

ZOU, E.; DU, N.; LAI, W. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). **Comparative Biochemistry Physiological**, v.114A, n.2, p.105-109, 1996.

IV – Anexo

Teste de homogeneidade de variâncias de Levene				
THC por Dose e Tempo - Variâncias HETEROGÊNEAS				
Graus de liberdade para todos F's: 14,36				
Variável	QM Efeito	QM Erro	F	p-level
THC	296940E2	122040E2	2.433138	.015977

Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para THC				
Apenas Fêmeas - Por Dose e Tempo-Variâncias HETEROGÊNEAS				
Graus de liberdade para todos F's: 5,18				
Variável	QM Efeito	QM Erro	F	p-level
THC	318624E3	349242E2	9.123291	.000185

Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene para Proteína				
Por Dose e Tempo - Variâncias HOMOGÊNEAS				
Graus de liberdade para todos F's:14,45				
Variável	QM Efeito	QM Erro	F	p-level
PROTEINA	558.2469	367.3474	1.519670	.142952

ANOVA de Proteína por Dose e Tempo						
Diferenças SIGNIFICATIVAS devido à Dose e Tempo						
Interação não significativa						
Efeito	gl Efeito	QM Efeito	gl Erro	QM Erro	F	p-level
Dose	2	11339.27	45	1579.828	7.177538	.001970
Tempo	4	5714.19	45	1579.828	3.616974	.012221
Dose-Tempo	8	2605.55	45	1579.828	1.649261	.137821

Testes de Duncan de Proteína por Dose e Tempo							
GENERAL MANOVA			p-level para as combinações				
DOSE	TEMPO		{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			308.0645	283.1149	330.9122	338.5135	391.7230
Normal	Antes	{1}	.208360	.571123	.057252	.034555	.000270
Normal	Depois	{2}	.529341	.867404	.197645	.132735	.002126
Normal	3 dias	{3}	.156287	.471518	.039605	.023246	.000158
Normal	7 dias	{4}	.998878	.450363	.450512	.332326	.009156
Normal	14 dias	{5}	.953664	.468547	.446128	.326247	.009667
5 vezes	Antes	{6}	.192475	.545416	.051707	.030970	.000234
5 vezes	Depois	{7}	.400635	.918976	.135340	.087812	.001125
5 vezes	3 dias	{8}	.483825	.167877	.952426	.758577	.046253
5 vezes	7 dias	{9}	.824331	.561132	.365943	.261661	.006643
5 vezes	14 dias	{10}	.687554	.683367	.283975	.197645	.004132
10 vezes	Antes	{11}		.445477	.466438	.343397	.010207
10 vezes	Depois	{12}	.445477		.156174	.102617	.001418
10 vezes	3 dias	{13}	.466438	.156174		.788168	.045394
10 vezes	7 dias	{14}	.343397	.102617	.788168		.064882
10 vezes	14 dias	{15}	.010207	.001418	.045394	.064882	

Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene para PO_TRIPS				
GENERAL MANOVA		Por Dose e Tempo - Variâncias HOMOGENEAS		
		Graus de liberdade para todos F's: 14,45		
variable	MS Effect	MS Error	F	p-level
PO_TRIPS	2.234353	1.486202	1.503397	.148969

ANOVA de PO_TRIPS por Dose e Tempo						
GENERAL MANOVA		Não houve diferenças significativas				
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	2	2.542663	45	5.907265	.430430	.652878
2	4	7.441185	45	5.907265	1.259667	.299828
12	8	5.374100	45	5.907265	.909744	.517092

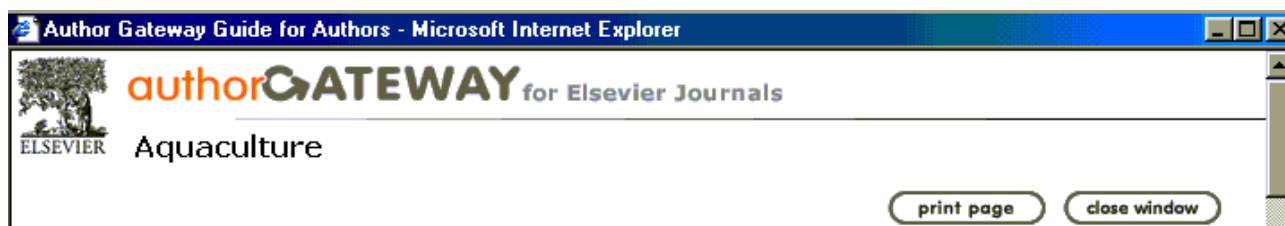
Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene				
		Glicose Por Dose e Tempo - Variâncias HOMOGENEAS		
		Graus de liberdade para todos F's: 8,19		
Variável	QM Efeito	QM Erro	F	p-level
GLICOSE	49.30162	26.13587	1.886359	.122255

ANOVA de Glicose por Dose e Tempo						
Diferenças significativas para os efeitos Dose e Tempo Interação não significativa						
Efeito	gl Efeito	QM Efeito	gl Erro	QM Erro	F	p-level
Dose	2	867.756	19	120.8842	7.17840	.004763
Tempo	2	2119.182	19	120.8842	17.53068	.000048
Interação	4	176.326	19	120.8842	1.45864	.253853

Testes de Tukey - Glicose por Dose e Tempo									
GENERAL MANOVA		Probabilidades para cada combinação							
DOSE	TEMPO	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
		83.00000	70.33334	63.33333	104.2000	73.00000	84.33334	95.33334	54.33333
Normal	Antes	{1}	.9307	.5856	.3861	.9817	1.0000	.9397	.1625
Normal	Depois	{2}	.9307	.9962	.0110	1.0000	.8141	.1838	.6923
Normal	3 dias	{3}	.5856	.9962	.0018	.9710	.3681	.0424	.9810
5 vezes	Antes	{4}	.3861	.0110	.0018	.0220	.3028	.9665	.0003
5 vezes	Depois	{5}	.9817	1.0000	.9710	.0220	.9306	.2967	.5133
5 vezes	3 dias	{6}	1.0000	.8141	.3681	.3028	.9306	.9406	.0660
10 vezes	Antes	{7}	.9397	.1838	.0424	.9665	.2967	.9406	.0053
10 vezes	Depois	{8}	.1625	.6923	.9810	.0003	.5133	.0660	.0053
10 vezes	3 dias	{9}	.3585	.9406	.9999	.0007	.8320	.1838	.0170

Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para Lactato				
Por Dose e Tempo-Variâncias HETEROGÊNEAS Graus de liberdade para todos F's: 8,21				
Variável	QM Efeito	QM Erro	F	p-level
LACTATO	25.30458	5.188882	4.876692	.001668

V – Normas de Publicação



Guide for Authors

Types of contribution

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Technical Papers
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Review Articles* can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential. *Short Communications* are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should *not* be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Book Reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Mrs. A.A.C. de Groot, Brederoodseweg 49, 2082 BS Santpoort-Zuid, The Netherlands.

Submission of manuscripts

Submission of an article is understood to imply that the article is original and unpublished and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be

asked to transfer the copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Papers for consideration should be submitted in triplicate directly to the appropriate Section Editor as follows:

Nutrition:

R. P. Wilson, Mississippi State University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Box 9650, Mississippi State, MS 39762, USA. Tel.: +1 601 325 2640. Fax: +1 601 325 8644. E-mail: rpwl@Ra.MsState.Edu

Husbandry and Management:

B.Costa-Pierce, Rhode Island Sea Grant College Program, Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, 129 Coastal Institute, Narragansett, RI 02882-1197, USA. E-mail: aquaculture@gso.uri.edu

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson, West Vancouver Laboratory, Department of Fisheries and Oceans, 4160 Marine Drive, West Vancouver, B.C. V7W 1N6, Canada. Tel: +1 604 666 7928. Fax: +1 604 666 3497. E-mail: donaldso@direct.ca

Diseases:

D.J. Alderman, CEFAS, Weymouth Laboratory, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UK. Tel.: +44 1305 206 600. Fax: +44 1305 206 601. E-mail: d.j.alderman@cefas.co.uk

Genetics: G. Hulata, Agricultural Research Organization, Volcani Center, Department of Aquaculture, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; Tel.: +972 3 968 3388; Fax: +972 3 9605667; E-mail: vlaqua@volcani.agri.gov.il

Electronic manuscripts

Some manuscripts are able to be submitted electronically, please check on: <http://www.authorgateway.com/journal/pub/503302>. If electronic submission is possible, authors can upload their article as a LaTeX, Microsoft? (MS) Word?, WordPerfect?, PostScript or Adobe? Acrobat? PDF document via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com>), where you will also find a detailed description on its use. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. It is crucial that all graphical and tabular elements be placed within the text, so that the file is suitable for reviewing. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. Note: compuscripts submitted are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary. See the section on "Electronic format requirements for accepted articles" and the further general instructions on how to prepare your article below.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. To avoid delays in publication, authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. **Authors in Japan please note:** Upon request, Elsevier Science Japan will provide authors with list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Science, 9-15, Higashi-Azabu 1-chome,

Minato-ku, Tokyo 106-0044; Japan; Tel. (+81) 3-5561-5032; Fax: (+81)3-5561-5045; E-mail: info@elsevier.co.jp.

2. The preferred medium of submission is on disk with accompanying manuscript (see 'Electronic manuscripts' above). Submit the original and two copies of your manuscript. Enclose the original illustrations and two sets of photocopies (three prints of any photographs).

3. Manuscripts should be typewritten, typed on one side of the paper (with numbered lines), with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

4. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and concise)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone and fax number and E-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

5. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use bold face, lower-case letter type for titles; use non-bold, italic letter type for sub-titles.

6. SI units should be used.

7. If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled. The typesetter will then know that the enclosed matter is not to be set in type. When a typewritten character may have more than one meaning (e.g. the lower case letter l may be confused with the numeral 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear to the typesetter. If Greek letters or uncommon symbols are used in the manuscript, they should be written very clearly, and if necessary a note such as "*Greek lower-case chi*" should be put in the margin and encircled.

8. Elsevier reserves the privilege of returning the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should provide a very brief introduction to the problem and a statement about the methods used in the study. This should generally be followed by a brief summary of results, including numerical data (means and standard errors, for example). The abstract should end with an indication of the significance of the results.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which prints need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
6. Each table should have a brief and self-explanatory title.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted separately, unmounted and not folded.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Each illustration should be identified on the reverse side (or - in the case of line drawings - on the lower front side) by its number and the name of the author. An indication of the top of the illustrations is required in photographs of profiles, thin sections, and other cases where doubt can arise.
4. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
5. Lettering should be clear and large enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
6. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
7. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
8. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
9. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed

cannot be accepted.

10. Colour illustrations can be included if the cost of their reproduction is paid for by the author. For details of the costs involved, please contact the publisher at: nlinfo-f@elsevier.nl.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "*Since Peterson (1993) has shown that...*" "*This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)*".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "*et al.*". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
 Dame, R., Libes, S., 1993. Oyster reefs and nutrient retention in tidal creeks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 251-258.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
 Benzie, J.A.H., Ballment, E., Frusher, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds.), *Genetics in Aquaculture IV. Proceedings of the Fourth International Symposium, 29 April-3 May 1991, Wuhan, China.* *Aquaculture* 111, 89-93.
 - c. *For books*
 Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials.* Elsevier, Amsterdam, 278 pp.
 - d. *For multi-author books*
 Shigueno, K., 1992. Shrimp culture industry in Japan. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices.* Elsevier, Amsterdam, pp. 641-652.
6. Titles of periodicals mentioned in the list of references should be abbreviated following ISO 4 standard. The ISSN word abbreviations, for example, can be found at <http://www.issn.org/Istwa.html>.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "*(in Russian)*" or "*(in Greek, with English*

abstract)" should be added.

8. Papers accepted for publication but not yet published should be referred to as "*in press*".

9. References concerning unpublished data and "*personal communications*" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Formulae

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and not Ca^{++} .

10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O .

11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P_2O_5).

GenBank/DNA sequence linking

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 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "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 (see Example 2 below).

Example 2: "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)".

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 (see Example 3 below).

Example 3: "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)".

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.
2. Although in general an author may quote from other published works, he should

obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.

3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Offprints

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge.

2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author Services

Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#).

***Aquaculture* has no page charges.**