



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *LITOPENAEUS*
VANNAMEI DURANTE O AVANÇO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

ANDREZZA MELO COSTA

FLORIANÓPOLIS
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *LITOPENAEUS*
VANNAMEI DURANTE O AVANÇO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Orientadora: Dra Margherita Anna Barracco

ANDREZZA MELO COSTA

FLORIANÓPOLIS

2008

COSTA, Andrezza Melo,

Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). 2008
n. de f. 51: tabs., grafs.

Orientadora: Margherita Anna Antônia Maria Barracco
Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de mestrado em Aqüicultura.
2008.

1. Parâmetros hemato-imunológicos, 2. Hemolinfa, 3. IMNV, 4 *Litopenaeus vannamei*, 5. camarões, 6. crustáceos.

Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV).

Por

ANDREZZA MELO COSTA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco - *Orientadora*

Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes

Dr. Edemar Roberto Andreatta

AGRADECIMENTOS

A professora Margherita Anna Barracco pelos ensinamentos, paciência e atenção durante o processo de definição e orientação;

Aos professores da UFRN, Pedro Carlos Cunha Martins, meu co-orientador, Fabiana Lima Bezerra e Regina de Fátima dos Santos Braz pela colaboração, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho;

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, pelo financiamento desta pesquisa;

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, e os que já passaram por lá, especialmente aos amigos Cristiane Guertler, Liege Cantelli, Mirian Kayser, Delano Schleder, Rafael da Rosa, Paula Bandeira e professora Luciane Perazzolo pelo auxílio e amizade;

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia do LCM/UFSC pela prestatividade e contribuição;

A todos os amigos que fiz desde que me mudei para Florianópolis, pela força e apoio que eu pude compartilhar durante todos os momentos;

Ao meu companheiro Celso Buglione pelo amor, companheirismo, incentivo e ajuda constantes;

Ao meu pai por toda sua dedicação e por acreditar na minha capacidade sempre;

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, e tornar tudo possível.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
IMNV	11
Sistema imune dos crustáceos	13
<i>Hemócitos e reações celulares</i>	14
<i>Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)</i>	15
<i>Mecanismos líticos e microbicidas</i>	16
<i>Produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs)</i>	16
<i>Sistema pró-fenoloxidase (proPO)</i>	17
<i>Proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAMs)</i>	18
<i>Defesas anti-virais</i>	19
Objetivos	22
1. Introdução	26
2. Material e métodos	28
2.1. Animais	28
2.2. Análises de RT-PCR	29
2.3. Coleta da hemolinfa para preparação de soro	29
2.4. Determinação dos hemogramas	29
2.5. Determinação do título aglutinante do soro	29
2.6. Determinação da produção de ânion superóxido (O_2^-) nos hemócitos	30
2.7. Concentração de proteínas totais no soro	30
2.8. Determinação da atividade da fenoloxidase (PO)	30
2.9. Determinação da atividade antimicrobiana	31
2.10. Porcentagem de hemócitos apoptóticos	31
2.11. Análise estatística	31
3. Resultados	32
3.1. Detecção do vírus por RT-PCR	32
3.2. Hemogramas	32
3.3. Título aglutinante (TA) do soro	33
3.4. Produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos hemócitos	34
3.5. Concentração de proteínas (CP) totais no soro	35
3.6. Atividade da fenoloxidase (PO)	35
3.7. Atividade antimicrobiana (AA) do soro	36
3.8. Porcentagem de hemócitos em apoptose	37
4. Discussão	38
5. Conclusão	41
6. Referências	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	45
ANEXO	52

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* infectados pelo do IMNV. 1: camarão na fase inicial da doença, com pequenos focos de mionecrose; 2: camarão na fase avançada, com aparente necrose muscular em vários segmentos abdominais; 3: fase final da doença, com aspecto de “cauda cozida” 12

Artigo Científico

Fig. 1. Contagem total de hemócitos (THC) nos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da doença. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 25 indivíduos em cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos..... 32

Fig. 2. Contagem diferencial de hemócitos (DHC) nos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 10 indivíduos de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos..... 35

Fig. 3. Título aglutinante do soro, contra eritrócitos de cão, dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 pools de 5 animais de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos..... 36

Fig. 4. Produção basal, e após indução com *zymosan*, de ânion superóxido pelos hemócitos dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV, através da redução do NBT: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 pools de 3 animais de cada grupo. Asteriscos representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. 37

Fig. 5. Atividade da enzima PO, após indução com tripsina, no soro dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 6 pools de 5 indivíduos de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. 38

Fig. 6. Atividade antimicrobiana do soro dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 4 pools de 5 animais de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Não houve diferença significativa no caso de *E. Coli*. 39

Fig. 7. Alterações nucleares, sugerindo apoptose, em hemócitos de camarões infectados por IMNV (coloração de Hoechst 33258). A: núcleos de aspecto normal; B: núcleos morfológicamente alterados, sugerindo apoptose celular. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlet
AA – Atividade antimicrobiana
ALF – *Anti-lipopolysaccharide factor*, fator anti-lipopolissacarídeo
ANOVA – Análise de variância
AS – Grupo dos camarões assintomáticos
AV – Grupo dos camarões em estágio avançado da doença
BGBP – β -1,3-*glucan binding protein*, proteínas de reconhecimento de β -1,3 – glucanos
BSA – *Bovine serum albumin*, albumina de soro bovino
CP – Concentração de proteínas
DHC – *Differential haemocytos count*, contagem diferencial de hemócitos
DMSO – Dimetilsulfóxido
DOPA – Dihidroxifenilalanina
dsRNA – *Double-stranded RNA*, RNA dupla fita
GAV – *Gill-associated virus*, vírus associado à brânquia
HG – Hemócitos granulares
HGGs – Hemócitos de grânulos grandes
HGPs – Hemócitos de grânulos pequenos
HH – Hemócitos hialinos
IHHNV – *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*, vírus da necrose hipodermal e hematopoiética infecciosa
IMNV – *Infectious myonecrosis virus*, vírus da mionecrose infecciosa
IN – Grupo de camarões em estágio inicial da doença
INT – p-iodonitrotetrazolium
LB – Luria Bertani
LBP – *LPS-binding protein*, proteínas de reconhecimento de LPS
L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina
LGBP – *Lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan binding protein*, proteínas de reconhecimento de β -glicanas e LPS
LPS – Lipopolissacarídeos
MAS – *Modified Alsever solution*, solução de Alsever modificada
MCF – Microscópio de contraste de fase
MIC – *Minimum inhibitory concentration*, concentração mínima inibitória
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT – *Nitroblue tetrazolium*
 O_2^- – Ânion superóxido
 ^-OH – Ânions hidroxila
 OH^\cdot – Radical hidroxil
PAM – Peptídeos antimicrobianos
PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*, padrões moleculares associados à patógenos
PB – *Poor broth*, caldo simples
PBS – *Phosphate buffer solution*, tampão fosfato salino
PO – Fenoloxidase
proPO – Pró-fenoloxidase
PRPs – *Pattern recognition proteins*, proteínas de reconhecimento de padrão
PWS – *Peptonated water saline*, água salina peptonada
RNAi – RNA de interferência
ROIs – *Reactive oxygen intermediates*, intermediários reativos de oxigênio
RT-PCR – *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SOD – Superóxido dismutase
TA – Título aglutinante
TBS – *Tris buffer solution*
THC – *Total haemocytos count* - contagem total de hemócitos
TSV – *Taura syndrome virus*, vírus da síndrome de Taura
WSSV – *White spot syndrome virus*, vírus da síndrome da mancha branca
YHV – *Yellow head virus*, vírus da cabeça amarela

RESUMO

No Brasil, a produção de camarões crescia vertiginosamente até 2002, quando o surgimento de uma nova doença, causada pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), afetou fazendas de cultivos localizadas na região Nordeste. O objetivo deste trabalho foi avaliar a alteração de alguns parâmetros hemato-imunológicos em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, infectados pelo IMNV. Os animais analisados foram separados em três grupos, de acordo com o grau de severidade da doença: camarões assintomáticos (AS), com sinais iniciais (IN) e sinais avançados (AV) da enfermidade. Os parâmetros analisados foram os hemogramas, porcentagem de hemócitos apoptóticos (coloração de Hoechst), título aglutinante (eritrócitos de cão), produção de ânion superóxido (redução do NBT), atividade da fenoloxidase ou PO (oxidação de L-DOPA) e atividade antimicrobiana da hemolinfa contra bactérias Gram positivas e negativas. Os resultados mostraram uma alteração evidente de vários parâmetros imunológicos apenas em camarões do grupo AV. Neste grupo, houve um aumento significativo da porcentagem de hemócitos apoptóticos (8x), título aglutinante (16x), da produção de ânion superóxido (62%) e da atividade antimicrobiana (21x contra *Micrococcus luteus*) em relação aos camarões dos grupos AS e IN. Por outro lado, houve ainda, no grupo AV, uma redução significativa da contagem total de hemócitos (30%), da porcentagem de hemócitos granulares (6,5%) e da atividade da PO (49%). Estes resultados sugerem que o sistema imune dos camarões infectados pelo IMNV responde apenas em estágios tardios da enfermidade, quando a remissão da infecção não parece ser mais possível. Este é o primeiro estudo a analisar a modulação do sistema imune de camarões durante o avanço da infecção pelo IMNV em fazendas de cultivo brasileiras, onde parece ter se originado a enfermidade.

Palavras chaves: parâmetros hemato-imunológicos; hemolinfa; IMNV; *Litopenaeus vannamei*; camarões; crustáceos.

ABSTRACT

Farm-reared shrimp production in Brazil grew intensively until 2002, when the outbreak of a new disease, caused by the infectious myonecrosis virus (IMNV), disrupted the productions of the Northeast region. The aim of this study was to evaluate the modulation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by IMNV. Affected animals were separated in three groups, according to the severity of the disease: asymptomatic shrimps (AS), animals with initial symptoms (IN) and with advanced symptoms (AD) of the disease. The examined parameters were: hemograms, percentage of apoptotic hemocytes (Hoechst staining), anion superoxide production (NBT reduction); phenoloxidase or PO activity (L-DOPA oxidation), agglutinating titer (dog erythrocytes) and antimicrobial activity of the hemolymph against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Evident changes in the immunological parameters were seen only in animals of group AV, where a significant increase in the percentage of apoptotic hemocytes (8x), agglutinating titer (16x), anion superoxide production (62%) and hemolymph antimicrobial activity (21x against *Micrococcus luteus*) was observed, when compared to groups AS and IN. On the other hand, in the same group AV there was a significant reduction of the total hemocyte count (30%), the percentage of circulating granulocytes (6,5%) and PO activity (49%). These results suggested that the immune system of the IMNV-infected shrimps responded only in a late stage of the disease, when the animal recovery was not virtually possible. This is the first report to examine the immune response, during the progress of the disease caused by the IMNV, in shrimps from Brazilian farms, where the virus first appeared

Key words: hemato-immunological parameters; hemolymph; IMNV; *Litopenaeus vannamei*; shrimp; crustaceans.

INTRODUÇÃO

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

O pescado é uma fonte considerável de proteínas, ácidos graxos e minerais essenciais para uma população global crescente e carente desses nutrientes. A aquicultura tem ganhado cada vez mais importância como uma forma de suprir essa demanda crescente por proteína animal. Além disso, a aquicultura é um importante setor da economia de vários países, tanto como atividade de subsistência e comércio local, como também uma grande fonte de divisas através da exportação dos produtos cultivados. A geração de empregos e renda produzidos por este setor é sentida principalmente pelas comunidades costeiras e ribeirinhas, uma vez que a aquicultura promove o desenvolvimento dessas comunidades pelo aumento dos postos de trabalho e pela implementação da aquicultura familiar. Em muitos casos a atividade tem se tornado uma alternativa para pescadores artesanais, que encontram no cultivo de organismos aquáticos uma forma de complementar sua renda, a qual se encontra cada vez mais comprometida pela diminuição dos estoques pesqueiros naturais.

Dentro da aquicultura, o setor de produção de camarões representou 16,5% do valor total de pescados comercializados em 2004. Esta atividade, conhecida por carcinicultura, vem se expandido vertiginosamente nos últimos 50 anos. No período de 1997 a 2004 houve um crescimento de 165% na produção de camarões em cativeiro, o que representou uma expansão de cerca 15% ao ano. Do total de camarões comercializados em todo o mundo, os camarões de cativeiro já chegam a representar 41% (FAO, 2006).

As espécies de camarão mais cultivadas a nível mundial são o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (61,09%) e o camarão tigre *Penaeus monodon* (26,01%). A maioria dos cultivos é proveniente da Ásia, sobretudo da China, Tailândia, Vietnã e Indonésia (FAO, 2006).

No Brasil, o cultivo de camarões passou a se desenvolver a partir da introdução da espécie exótica *L. vannamei* em meados da década de 1990, acompanhando a tendência mundial de crescimento acelerado desta atividade (ABCC, 2007). Em 2003 a produção de camarão de cultivo chegou a 90.190 toneladas, alcançando seu ápice na história da carcinicultura brasileira (RODRIGUES, 2005). Em 2006, o Nordeste foi responsável por cerca de 98% da produção nacional de camarões, sendo o Rio Grande do Norte o maior produtor nacional, com 41% do total produzido, seguido pelos estados do Ceará e da Bahia, com 34% e 9% da produção nacional, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2007).

Apesar dos aspectos sócio-econômicos positivos da carcinicultura, a intensificação da produção de camarões e o crescimento do número de fazendas tanto no Brasil como a nível mundial vem resultando em uma crescente degradação do meio ambiente (falta de tratamento de efluentes e destruição de manguezais), e principalmente, no surgimento de inúmeras doenças infecciosas, na sua maioria de origem viral, o que vêm limitando o desenvolvimento do setor e causando grande impacto na produção (KAUTSKY, 2000; NUNES *et al.*, 2004).

Dentre as viroses já relatadas em camarões, as que mais afetaram a carcinicultura nas Américas, foram as causadas pelos vírus da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética ou IHHNV (do inglês, *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*), vírus da síndrome de Taura ou TSV (do inglês, *Taura syndrome virus*), e mais recentemente o vírus da mancha branca ou WSSV (do inglês, *white spot syndrome virus*), todos estes já diagnosticados no Brasil (NUNES e MARTINS, 2002; LIGHTNER, 1999; BUCHELI e GARCIA, 2005).

O WSSV, um dos vírus mais dramáticos da história da carcinicultura, foi diagnosticado no Brasil, no estado de Santa Catarina, em janeiro de 2005, afetando substancialmente a produção de camarões naquele estado (MADRI, 2005). Curiosamente, o WSSV não afetou os cultivos do Nordeste, onde está situada a maior parte da produção camaroneira nacional, apesar de também já ter sido detectado naquela região (BUCHELI e GARCIA, 2005; NUNES, 2005).

Outro vírus a causar um impacto considerável na carcinicultura brasileira a partir de 2004 foi o IMNV (do inglês *infectious myonecrosis virus*), que será tratado em maior detalhe abaixo. Após seu surgimento este vírus causou uma queda expressiva da produção de camarões no Nordeste do Brasil que, juntamente com outros fatores, como a queda do preço do camarão no mercado internacional e a baixa do dólar no Brasil, tem provocado graves perdas econômicas a grande maioria dos produtores brasileiros (RODRIGUES, 2005).

IMNV

Os primeiros relatos da ocorrência de uma síndrome denominada inicialmente de necrose idiopática muscular - NIM (mais tarde diagnosticada como sendo causada pelo IMNV) se deram em fazendas de camarões *L. vannamei* no estado do Piauí, nordeste do Brasil, em 2002. Esta síndrome caracterizava-se pela presença de lesões esbranquiçadas no músculo caudal dos camarões e por provocar altas mortalidades nos cultivos. Nos meses seguintes a doença se alastrou para outros estados do nordeste do Brasil sem ainda haver uma definição da sua etiologia (NUNES *et al.*, 2004).

O vírus causador desta síndrome foi caracterizado somente em 2004 por Lightner e colaboradores, tendo sido denominado de IMNV. O IMNV é um vírus de RNA dupla fita não-segmentado, esférico, da família Totiviridae, contendo 7.560 pares de bases e de 40 nm de diâmetro (POULOS *et al.*, 2006).

Os camarões acometidos pelo IMNV apresentam como principal sintoma uma perda de transparência no músculo abdominal, conseqüência da necrose do tecido muscular. As lesões causadas por essa doença podem ser classificadas em três fases, com diferentes graus de severidade. Na *fase inicial* (1), a perda de transparência acontece em pequenos focos, podendo ficar restrita à região lateral do abdômen; em uma *fase avançada* (2), as lesões se estendem progressivamente em direção ao telson, abrangendo vários segmentos abdominais; e, na *fase final* (3), as lesões são seguidas de uma liquefação dos músculos fibróticos necrosados, resultando no apodrecimento das áreas afetadas e dando uma aparência de “camarão cozido” (Figura 1). Os animais não precisam atingir o último estágio para que ocorra mortalidade, podendo morrer em qualquer fase da doença, porém as maiores taxas de mortalidade ocorrem na fase avançada. Outros sintomas observados são a redução da atividade alimentar, a diminuição do volume do

hepatopâncreas com redução ou ausência do armazenamento de lipídios, dificuldade de endurecimento da carapaça e natação errática. Alguns animais podem apresentar ainda o intestino deformado (em forma de “S”) e uma curvatura rígida no músculo abdominal (grampo). Os camarões doentes se tornam bastante debilitados, morrendo facilmente durante o manuseio (NUNES *et al.*, 2004).



Figura 1: Camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* infectados pelo IMNV. 1: camarão na fase inicial da doença, com pequenos focos de mionecrose; 2: camarão na fase avançada, com aparente necrose muscular em vários segmentos abdominais; 3: fase final da doença, com aspecto de “cauda cozida”.

Através da técnica de hibridização *in situ* foi verificado que o vírus infecta principalmente o tecido muscular esquelético, além do órgão linfóide e intestino posterior. Em cortes histológicos se observaram lesões no tecido muscular, corpos de inclusão viral no citoplasma das células deste tecido, do tecido conjuntivo e também nos hemócitos. Durante a infecção ocorre ainda uma infiltração de hemócitos no hepatopâncreas e coração dos camarões (TANG *et al.*, 2005). Foi também observada a presença de esferóides ectópicos do órgão linfóide, principalmente próximos ao coração e glândulas antenais (POULOS e LIGHTNER, 2006).

Várias hipóteses foram levantadas a respeito dos fatores desencadeantes desta doença nos cultivos de camarões. Dentre estas, destacam-se a alta densidade de cultivo e, principalmente, as condições ambientais e o estado fisiológico dos animais, como o período de muda. Na estação de chuvas no nordeste do Brasil ocorrem várias alterações no ambiente, como grandes variações de temperatura e salinidade, sendo este o período em que ocorrem as maiores mortalidades pelo IMNV (ROCHA, 2007). No tocante à alta densidade, a infecção se torna naturalmente maior devido à transmissão horizontal e à diminuição da qualidade de água.

Após seu surgimento, o IMNV causou grandes perdas econômicas aos produtores de camarões do nordeste do Brasil, região esta que concentra a maior parte da produção do país. As

sobrevivências variavam de 35% a 55%, sendo que as mortalidades ocorriam mais acentuadamente ao final do ciclo de cultivo, quando os camarões já haviam consumido a maior parte da ração empregada durante a fase de engorda (NUNES *et al.*, 2004). Hoje em dia, no Nordeste, a síndrome causada pelo IMNV passou para um estágio crônico, com taxas de mortalidade baixas e persistentes, devido à melhora das condições de cultivo, como a diminuição da densidade. Porém, mortalidades mais elevadas são ainda passíveis de ocorrer pelo advento de algum estresse ambiental (ROCHA, 2007).

Poulos e colaboradores (2006) demonstraram que o IMNV pode infectar experimentalmente também outras espécies de peneídeos, como *L. stylirostris* e *Penaeus monodon*, além do *L. vannamei*. Contudo a espécie *L. vannamei* mostrou-se a mais susceptível ao vírus dentre as três espécies estudadas.

O genoma completo do IMNV é atualmente conhecido, e já foi desenvolvido um método preciso de diagnóstico através da técnica de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) para a detecção do IMNV (POULOS e LIGHTNER, 2006; POULOS *et al.*, 2006).

Em alguns outros países foram também recentemente observados sinais clínicos semelhantes aos do IMNV em camarões de cultivo. Em 2006, a presença deste vírus foi confirmada pela primeira vez fora do Brasil, em viveiros da Indonésia. Análises posteriores revelaram uma alta identidade (99,6 %) da seqüência gênica do vírus diagnosticado na Indonésia com o IMNV brasileiro (SENAPIN *et al.*, 2007).

Sistema imune dos crustáceos

A deficiência na prevenção e no controle de doenças, especialmente as virais, constitui atualmente o principal fator a limitar a expansão da carcinicultura. Segundo Lightner (1992), há um interesse crescente no conhecimento dos mecanismos de defesa do sistema imune de crustáceos, devido à necessidade de se reduzir o efeito dos patógenos ao hospedeiro e de melhorar o controle e prevenção de enfermidades. Avanços no conhecimento do sistema imune e o estabelecimento de padrões imunológicos de referência podem contribuir sobremaneira para o progresso da carcinicultura, levando a uma melhora da produção através do monitoramento do estado de saúde dos animais e evitando o avanço de doenças no cultivo.

Assim como todos os invertebrados, os crustáceos são dotados apenas de um sistema imune inato, não apresentando o sistema imune adaptativo presente apenas nos vertebrados. Este último caracteriza-se pela presença de uma infinidade de receptores e anticorpos altamente específicos e pela indução de células de memória, que garantem uma resposta de defesa extremamente eficiente e específica contra os mais diversos patógenos. Esta resposta decorre da linhagem celular linfocítica, que ocorre somente nos vertebrados, e em quem se apóiam todos os mecanismos de especificidade e de memória imunológica. A ausência desta linhagem celular em crustáceos inviabiliza o desenvolvimento de vacinas, na concepção clássica da palavra, limitando assim a possibilidade de se prevenir e controlar infecções nestes animais (BARRACCO *et al.*, 2008).

Além da cutícula rígida, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, a integridade corpórea dos crustáceos é mantida por seu sistema imunológico,

o qual está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa. Assim como o sangue nos vertebrados, a hemolinfa é composta por uma fração celular, representada pelas células circulantes ou hemócitos, e por uma fração líquida, constituída pelo plasma, que contém uma variedade de moléculas dissolvidas ou fatores humorais. Os componentes humorais e celulares atuam em conjunto para a detecção e eliminação de agentes estranhos dos tecidos infectados, garantindo a sobrevivência dos crustáceos (BARRACCO, 2004).

Hemócitos e reações celulares

As células circulantes ou hemócitos dos crustáceos são usualmente classificados em duas populações principais: hemócitos hialinos (HHs) e hemócitos granulares (HGs). Estes últimos, podem ser ainda subdivididos em hemócitos semigranulares ou com grânulos pequenos (HGPs) e hemócitos com grânulos grandes (HGGs) (vide revisões de BAUCHAU, 1981; HOSE *et al.*, 1990; JOHANSSON *et al.*, 2000; SÖDERHÄLL, 2003; BARRACCO *et al.*, 2008). A diferença entre eles baseia-se tanto em aspectos morfológicos como tamanho celular, estrutura e granularidade, quanto em aspectos funcionais.

Os HHs são células usualmente pequenas, com uma alta relação núcleo-citoplasmática e com poucos ou nenhum grânulo citoplasmático. A literatura diverge quanto à função destas células. Alguns autores referem que os HHs de crustáceos estejam implicados na coagulação da hemolinfa (HOSE *et al.*, 1990), enquanto outros acreditam que estas células sejam as principais células fagocitárias (JOHANSSON *et al.*, 2000). Os HGPs são células maiores, de formato ovóide ou fusiforme, com uma relação núcleo-citoplasmática menor. Já os HGGs diferem dos HGPs principalmente pelos seus grânulos maiores e mais abundantes, que muitas vezes encobrem o núcleo celular. As células granulares são consideradas as mais imunocompetentes, uma vez que armazenam a maioria das moléculas imunofetoras em seus grânulos, como enzimas degradativas e de coagulação, peptídeos antimicrobianos, fatores opsonizantes e moléculas do sistema pró-fenoloxidase entre outras (HOSE *et al.*, 1990; SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992; VAN DE BRAAK *et al.*, 2002b; BARRACCO *et al.*, 2008).

Após a invasão por patógenos ou microrganismos oportunistas, os hemócitos migram para os sítios de infecção gerando uma resposta inflamatória clássica. Nesses locais ocorrem reações celulares como a fagocitose de microrganismos e/ou a formação de agregados celulares densos em torno das partículas invasoras, denominados de nódulos e cápsulas. Quando a quantidade de microrganismos invasores é muito grande, estes são aprisionados em nódulos celulares, que são formados por várias camadas de hemócitos que aprisionam os microrganismos e impedem sua disseminação. Por outro lado, quando o invasor é de grande tamanho, como no caso de hifas de fungos, nematóides e outros, ocorre uma reação de encapsulamento. As cápsulas assemelham-se aos nódulos, uma vez que várias camadas de hemócitos se aderem em torno do parasito, aprisionando-o e segregando-o dos tecidos do hospedeiro. Em ambas as reações celulares ocorre a liberação de uma variedade de moléculas citotóxicas e microbicidas, com a finalidade de neutralizar e eliminar os patógenos invasores. Nódulos e cápsulas mostram usualmente uma região central caracteristicamente escura ou melanizada, devido à liberação e ativação do sistema pró-fenoloxidase,

que será tratado depois (Vide revisão HOSE *et al.*, 1990; SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006; BARRACCO *et al.*, 2008).

A determinação dos hemogramas em crustáceos, que consiste nas contagens totais e diferenciais dos hemócitos circulantes (THC e DHC, do inglês *total hemocyte count* e *differential hemocyte count*, respectivamente), funciona como um dos principais imunoparâmetros a expressar a condição de saúde destes animais. Assim como em vertebrados, os hemogramas refletem usualmente a presença de infecções, bem como alterações fisiológicas e de origem ambiental (BACHÈRE *et al.*, 1995; BARRACCO, 2004; BARRACCO *et al.*, 2008). Vários estudos demonstram uma redução significativa da THC durante infecções virais em camarões (HENNIG *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2003; YOGANANDHAN *et al.*, 2003; COSTA, 2005). Outros, porém, indicam uma baixa do número de hemócitos no início da infecção, seguida de um aumento significativo destas células algumas horas após a infecção, sugerindo uma resposta imunológica do hospedeiro (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002b; MALDONADO, 2003). Quanto às contagens diferenciais ou DHC, observa-se geralmente uma queda na porcentagem de hemócitos granulares durante as infecções e conseqüentemente um aumento do número de hemócitos hialinos, tanto em animais apresentando altas cargas virais, como em animais resistentes a um vírus específico (HENNIG *et al.*, 1998; MOTESDEOCA *et al.*, 2001; SONNENHOLZNER *et al.*, 2001).

Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)

A ativação do sistema imune inato depende do reconhecimento imediato de padrões moleculares associados à patógenos ou PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*) por proteínas de reconhecimento de padrão molecular ou PRPs (do inglês, *pattern-recognition proteins*). Em crustáceos, estas moléculas podem estar presentes na hemolinfa ou na superfície dos hemócitos. Após reconhecimento, os hemócitos se ativam e desencadeiam uma série de respostas imunológicas como as reações celulares descritas anteriormente, ou a produção e/ou liberação de uma variedade de moléculas imuno-efetoras que levam à neutralização e degradação dos agentes infecciosos (BARRACCO *et al.*, 2008).

Os PAMPs são padrões moleculares característicos de microrganismos e ausentes no hospedeiro, sendo geralmente essenciais para a sobrevivência dos microrganismos. Assim, os PAMPs não podem ser descartados evolutivamente pelos micróbios e funcionam como alvos especiais para o sistema imune. Dentre os principais PAMPs presentes nos microrganismos destacam-se as β -glicanas da superfície de fungos, as peptidoglicanas da superfície de bactérias Gram-positivas, os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas e o RNA dupla fita (do inglês *dsRNA*) dos vírus (LEE e SÖDERHÄLL, 2002).

Dentre as PRPs presentes em crustáceos destacam-se a BGBP (do inglês *β -Glucan binding protein*) que reconhece β -glicanas, a LBP (do inglês *LPS-binding protein*) que reconhece LPS e a LGBP (do inglês *lipopolysaccharide and β -1,3-Glucan binding protein*) que reconhece ambos, β -glicanas e LPS (VAGAS-ALBORES *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2000; LEE e SÖDERHÄLL, 2002; SRITUNYALUCKSANA *et al.*, 2002).

As lectinas também são proteínas envolvidas no reconhecimento do não-próprio, sendo consideradas PRPs. Estas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos presentes na superfície de diferentes tipos celulares, causando sua aglutinação, uma vez que apresentam pelo menos dois sítios de ligação a açúcares. As lectinas podem ainda facilitar o processo de fagocitose, funcionando como opsoninas (LEE e SÖDERHÄLL, 2002).

Nos crustáceos, as lectinas de ocorrência natural na hemolinfa são geralmente específicas para açúcares N-acetil-aminados (ácido siálico e sialoglicoconjugados). A maioria das lectinas envolvidas no sistema imune pertence à superfamília das lectinas do tipo C, cuja atividade biológica é Ca^{2+} -dependente (MARQUES e BARRACCO, 2000).

O título aglutinante da hemolinfa de crustáceos pode ser utilizado como parâmetro imunológico, uma vez que situações de estresse provocadas por alterações ambientais, fisiológicas ou por infecções, podem resultar numa alteração dos níveis destas PRPs. Um estudo feito com camarões da espécie *P. monodon* infectados com GAV (do inglês *gill-associated virus*) revelou um aumento considerável do título aglutinante da hemolinfa (MUNRO e OWENS, 2005). Por outro lado, Espinosa e colaboradores (2002) sugeriram que um estresse gerado pelo aumento de temperatura durante 15 dias em camarões da espécie *L. vannamei* causou uma imunodepressão nesses animais, resultando em uma diminuição dos títulos de aglutinação.

Mecanismos líticos e microbicidas

Produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs)

Algumas reações imune celulares, como a fagocitose, são usualmente acompanhadas pela produção de espécies reativas de oxigênio, as quais têm uma forte atividade microbicida. Neste processo, conhecido como choque respiratório (do inglês, *burst respiratory*), há um aumento do consumo de oxigênio pela enzima NADPH oxidase e a produção de uma série intermediários de oxigênio altamente reativos conhecidos como ROIs (do inglês *reactive oxygen intermediates*). Os ROIs são oxidoradicais que possuem elétrons livres ou não pareados em sua camada orbital mais externa, o que lhes confere uma elevada reatividade contra estruturas e moléculas próximas, tais como membranas celulares, proteínas e ácidos nucléicos (DNA). Sendo assim, funcionam como agentes tóxicos potentes, destruindo ou inibindo o crescimento dos microrganismos invasores (ANDERSON, 1996; BOGDAN *et al.*, 2000).

A NADPH oxidase está presente na membrana celular e na superfície dos grânulos lisossomais e é ativada quando entra em contato com componentes microbianos, tais como LPS, lipoproteínas de bactérias e β -glicanas de fungos. O ânion superóxido (O_2^-) é o primeiro intermediário tóxico a se formar e pode dismutar-se espontaneamente, ou através da enzima intracelular superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, por sua vez, é decomposto pela catalase do peroxissomo. O O_2^- pode ainda ser convertido em outros componentes altamente tóxicos, como no radical hidroxila (OH^\cdot), ânions hidroxila (^-OH), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) e cloraminas (ANDERSON, 1996; ROCH, 1999; BOGDAN *et al.*, 2000; BARRACCO *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que a produção desses compostos altamente tóxicos pode também prejudicar severamente os tecidos do próprio hospedeiro. Para evitar esta auto-agressão, o hospedeiro conta com mecanismos de proteção, como a presença de enzimas antioxidantes (SOD, catalase e glutathione peroxidase) e de enzimas de reparo de DNA e membranas. Além do mais, compostos antioxidantes de origem exógena, como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione e o α -tocoferol (vitamina E) também podem auxiliar no controle da produção de ROIs (WARNER, 1994).

A técnica de redução do composto NBT (do inglês *nitro blue tetrazolium*) é convencionalmente usada para quantificar a produção intracelular de ânion superóxido (O_2^-). Esta técnica permite avaliar a ativação dos hemócitos e o grau de estresse oxidativo produzido em processos infecciosos e determinar assim o potencial de defesa do crustáceo a nível celular (RODRÍGUEZ e LE MOULLAC, 2000). Song e colaboradores (2003) mostraram que em camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com TSV houve um aumento da produção intracelular de O_2^- . Em *P. monodon* tratados com imunostimulantes à base de extratos de plantas medicinais houve um aumento da produção de O_2^- após desafio com WSSV (CITARASU *et al.*, 2006).

Sistema pró-fenoloxidase (proPO)

Um dos sistemas imunofatores mais bem conhecidos em crustáceos é o sistema pró-fenoloxidase ou sistema proPO. Como mencionado anteriormente, este sistema é usualmente ativado durante as reações imune celulares, como a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas. Nestas reações forma-se um precipitado fortemente escuro, denominado de melanização, principalmente na região mais central, próxima aos patógenos aprisionados. A reação de melanização ocorre também durante a cicatrização de ferimentos em crustáceos, quando os hemócitos migram para o epitélio lesado e formam um tampão celular até que uma nova cutícula seja reconstituída (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004; BARRACCO *et al.*, 2008).

A enzima chave que desencadeia a produção de melanina é a fenoloxidase (PO). A PO encontra-se armazenada, sob forma inativa ou pró-fenoloxidase (proPO) nos grânulos dos hemócitos de crustáceos. A proPO é ativada por clivagem proteolítica limitada, mediada por serino proteases, que também se encontram armazenadas nos grânulos dos hemócitos. A degranulação dos hemócitos, com liberação da proPO, serino-proteases e outros efetores imunológicos, é estimulada por padrões moleculares presentes na superfície de microrganismos (PAMPs), como β -glicanas de fungos, LPS de bactérias Gram-negativas e peptidoglicanas de bactérias Gram-positivas. Uma vez liberada e ativada, a PO dá origem a uma cascata complexa de reações químicas, que se inicia com a oxidação de compostos fenólicos como a tirosina e a DOPA e culmina com a produção de melanina. Durante esta cascata, formam-se vários compostos intermediários, como as quinonas e ROIs, que são altamente tóxicos, e que resultam na destruição e neutralização dos microrganismos invasores. A melanina, em si, não é a molécula mais tóxica gerada pelo sistema proPO, apesar de possuir uma atividade fungistática e funcionar ainda como *scavenger* de radicais livres (NAPPI e VASS, 1993; NAPPI e OTTAVIANI, 2000; CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

A regulação do sistema proPO é feita por inibidores de proteases presentes na hemolinfa, como a pacifastina, serpinas e α 2-macroglobulinas, os quais evitam uma super-ativação deste sistema e restringem a reação apenas nos locais infectados (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

A atividade da enzima PO também constitui um parâmetro bastante utilizado em ensaios imunológicos em camarões, funcionando como um importante indicativo da situação do sistema de defesa destes animais frente a diferentes condições ambientais, fisiológicas e de sanidade. Le Moullac e colaboradores (1997) encontraram uma correlação entre a atividade da PO e o ciclo de muda em camarões *Litopenaeus stylirostris*. Camarões no período de pré-muda apresentavam uma baixa na PO e uma maior susceptibilidade a infecção por uma cepa de vibrio (AM23). Em camarões *L. vannamei* infectados com TSV foi referido um grande aumento da atividade da PO em relação a camarões saudáveis (SONG *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram também descritos em *L. vannamei* infectados pelo WSSV (MOTESDEOCA *et al.*, 2001).

Proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Dentre as diferentes moléculas imunofetoras, armazenadas nos grânulos dos hemócitos dos crustáceos, destacam-se as proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs). Estas moléculas funcionam como antibióticos naturais, de amplo espectro e de baixa especificidade, e constituem uma ferramenta imunofetora de particular importância nos crustáceos que não contam com o sistema imune adaptativo dos vertebrados. Os PAMs são moléculas relativamente pequenas (< 150-200 resíduos de aminoácidos) e sua grande maioria possui características anfipáticas, apresentando uma região catiônica e outra hidrofóbica, o que facilita a sua interação e inserção nos fosfolípidios aniônicos presentes na face externa das membranas de muitos microrganismos. O mecanismo de ação dos PAMs manifesta-se, portanto, a nível da membrana do micróbio, provocando sua desestabilização, e conseqüentemente à morte do microorganismo. Apresentam geralmente uma atividade detergente ou formadora de grandes poros, que levam ao desequilíbrio das funções da membrana, ou podem ainda ser interiorizados e interferir com diferentes vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida do microorganismo (BACHÈRE *et al.* 2004; BULET *et al.*, 2004; TOKE, 2005; BARRACCO *et al.*, 2008).

Os três principais tipos de PAMs identificados nos hemócitos de camarões até o momento são as peneidinas, as crustinas e os fatores antilipopolisacarídeos ou ALF (do inglês, *anti-lipopolsaccharide factor*) (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997; BARTLETT *et al.*, 2002; SUPUNGUL *et al.*, 2002).

As peneidinas constituem uma família de peptídeos que abrangem vários subgrupos (peneidinas 2 a 5) e que apresentam uma atividade potente contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997; 1999; 2000; GUEGUEN *et al.*, 2006). As crustinas são também uma família de PAMs que inclui várias isoformas e cuja atividade abrange essencialmente bactérias Gram-positivas (ZHANG *et al.*, 2007), porém uma ação contra vibrios marinhos (Gram-negativos) foi também relatada recentemente para algumas isoformas (AMPARYUP *et al.*, 2007a).

Já os ALFs, os quais também apresentam várias isoformas, constituem, provavelmente, os PAMs de maior interesse do ponto de vista antimicrobiano, uma vez que possuem uma atividade

potente e de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos filamentosos (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005; NAGOSHI *et al.*, 2006).

Recentemente, foi também mostrado que o pigmento respiratório hemocianina, que constitui a proteína majoritária (> 90%) da hemolinfa dos crustáceos, pode ainda ter um papel importante na imunidade destes animais. Em determinadas circunstâncias, a hemocianina pode atuar como PO e sua porção C-terminal como um peptídeo antimicrobiano contra fungos (SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000; DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2001).

A atividade antibacteriana da hemolinfa de crustáceos pode também constituir um parâmetro imunológico importante, uma vez que alterações nesta atividade podem refletir condições de estresse provocadas por alterações ambientais, fisiológicas ou por infecções. Em camarões *P. monodon* infectados com bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* houve um aumento na atividade antibacteriana da hemolinfa (RENGPIPAT *et al.*, 2000). Já em camarões *L. vannamei* infectados com TSV, houve uma redução da atividade antibacteriana da hemolinfa (SONG *et al.*, 2003).

Defesas antivirais

Desde os primórdios do desenvolvimento da carcinicultura, as infecções causadas por vírus são o principal fator limitante a ameaçar o sucesso da atividade. A elucidação de como o sistema imune de crustáceos atua contra vírus esbarra ainda na falta de técnicas apropriadas de cultura celular em crustáceos para que se possam estudar melhor as interações vírus-hospedeiro. Jiang *et al.*, (2006) conseguiram infectar culturas primárias de hemócitos de *Fenneropenaeus chinensis* com WSSV. Estas células permanecem viáveis por 20 dias e, portanto a propagação do vírus para o núcleo celular pôde ser acompanhada. Já na lagosta *Panulirus argus*, houve necessidade de se separar os diferentes tipos de hemócitos, uma vez que os HGGs permaneciam viáveis por apenas 3 dias, enquanto os HHs e HGPs sobreviviam por até 18 dias. A inoculação de PaV1 (*Panulirus argus* virus 1) em cultura de hemócitos de sobrevivência mais longa (HHs e HGPs) mostrou efeitos citopáticos a partir de 12 horas e lise celular após 24 horas de infecção (LI e SHIELDS, 2007).

Um dos principais mecanismos antivirais conhecidos é a apoptose, ou morte celular programada, o qual é um processo de regulação celular em que a célula se “suicida” sem que haja lise ou danos às células vizinhas. A apoptose caracteriza-se pela condensação de cromatina (células apoptóticas), fragmentação de DNA e pela presença de pequenos lóbulos citoplasmáticos (ROULSTON *et al.*, 1999).

Do ponto de vista do sistema imune, a apoptose celular pode limitar e inibir a replicação viral, levando as células infectadas à morte. Por outro lado, há casos onde algumas proteínas virais alteram a fisiologia celular e promovem um retardo do mecanismo apoptótico nas células infectadas, favorecendo o espalhamento dos vírus para células adjacentes. Isto ocorre quando a apoptose ocorre num estágio final de replicação viral, fazendo com que a progênie do vírus fique oculta dentro de corpos apoptóticos, driblando qualquer tipo de resposta imune. Uma vez que os corpos apoptóticos são fagocitados pelas células vizinhas, o vírus consegue propagar-se com sucesso (ROULSTON *et al.*, 1999). Nesse caso, o êxito da replicação viral vai depender da habilidade do vírus em induzir ou

bloquear os processos de apoptose até que uma quantidade suficiente de progênies virais seja produzida (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Enquanto alguns autores consideram a apoptose responsável pela eliminação de material viral do organismo dos hospedeiros, outros sugerem que a ocorrência progressiva de apoptose leva os animais infectados à morte (FLEGEL e PASHARAWIPAS, 1998; ANGGRAENI e OWENS, 2000; KHANOBDEE *et al.*, 2002; FLEGEL, 2007). Em um estudo realizado com camarões *P. monodon* e *Penaeus indicus* infectados por WSSV foi observado um aumento no número de hemócitos apoptóticos durante o curso da infecção (HAMEED *et al.*, 2006). Em camarões moribundos da espécie *Penaeus merguensis* infectados com WSSV foi evidenciada uma maior expressão do gene da enzima caspase que induz a apoptose (PHONGDARA *et al.*, 2006). Já, em camarões *Marsupenaeus japonicus* resistentes ao WSSV e infectados por este vírus foi observada uma menor quantidade de células apoptóticas que em camarões que não haviam tido contato com o vírus, sugerindo que a apoptose *per se* não seria o principal fator de proteção nos camarões resistentes (WU e MURUGA, 2004). Por outro lado, lagostins *P. leniusculus* infectados com WSSV mostraram uma porcentagem muito baixa de células apoptóticas em animais moribundos (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Os autores sugeriram que a baixa prevalência de células apoptóticas nos lagostins infectados era devida a um mecanismo anti-apoptótico induzido pelo vírus. Efetivamente, proteínas inibidoras de apoptose foram recentemente encontradas tanto no WSSV, como em células de camarões da espécie *P. monodon* (WANG *et al.*, 2004; LEU *et al.*, 2008).

Recentemente, evidenciou-se que a presença de RNA de dupla fita ou dsRNA (*do inglês, double-stranded RNA*) produzido durante o ciclo viral é reconhecida pelo sistema imune de camarões como um PAMP e induz uma resposta antiviral mediada pela via do RNA de interferência ou RNAi. Esta via leva ao silenciamento pós-transcricional dos genes virais, após indução por seqüências de dsRNA viral específicas e leva à redução drástica da infecção (ROBALINO *et al.*, 2004). Alguns estudos interessantes demonstram a ocorrência deste tipo de mecanismo em camarões, como em *L. vannamei* e *P. japonicus* (= *Marsupenaeus japonicus*) infectados pelo WSSV e em *P. monodon* infectados pelo YHV (*do inglês, yellow head vírus*) (ROBALINO *et al.*, 2005; TIRASOPHON *et al.*, 2005; YODMUANG *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2007).

Casos de interferência viral também foram relatados em camarões, havendo uma indução de um estado antiviral em camarões pré-infectados por um vírus antes da infecção por um segundo vírus. Tang e colaboradores (2003) realizaram vários ensaios infectando previamente camarões *L. stylirostris* com IHNV e desafiando-os em seguida com WSSV. Em todos os ensaios os camarões mostravam uma maior resistência ao WSSV quando pré-infectados com IHNV. Os autores hipotetizaram que este tipo de interferência poderia resultar da diminuição de receptores celulares disponíveis para a entrada do segundo vírus, uma vez que estes já estariam ocupados pelo primeiro vírus, ou ainda, pela depleção de componentes necessários à replicação viral no hospedeiro, no momento da segunda infecção. Uma outra explicação dada por Flegel (2007) para este tipo de mecanismo é que a presença de um vírus residente durante uma segunda infecção por outro vírus poderia ajudar a driblar a indução viral da apoptose tardia, o que normalmente resultaria numa infecção fatal.

O conceito de acomodação viral proposto por Flegel e Pasharawipas (1998) e recentemente atualizado por Flegel (2007) sugerem que os crustáceos são capazes de adquirir uma tolerância a infecções virais persistentes, podendo se tornar portadores sem manifestar a doença. A própria infecção viral, ocorrendo de forma persistente, resultaria numa espécie de memória específica que protegeria os camarões da doença gerada pelo vírus, mas não da infecção, que se apresentaria de forma inócua. Esta situação contrasta com o conceito de resistência viral dos vertebrados, que implica numa eliminação/depuração do agente causador da infecção pelos sobreviventes que se tornam então resistentes a uma nova re-infecção. A condição de tolerância adquirida pelos camarões sobreviventes permanece por toda sua vida e é transferida em baixa dose para toda sua progênie que também desenvolve infecções virais persistentes sem, contudo, desencadear a doença (FLEGEL, 2007).

A hipótese de acomodação viral baseia-se principalmente no histórico de alguns vírus que afetaram a produção de camarões na Tailândia e em várias outras partes do mundo, incluindo a América, como o MBV (*monodon baculovirus*), o YHV, o IHNV, o TSV e o WSSV, os quais causaram grandes mortalidades, mas que após um determinado período não provocavam mais a enfermidade, apesar dos camarões serem portadores dos vírus. O desenvolvimento de uma tolerância à doença seria explicado pela supressão do mecanismo de apoptose, o qual, estando ativo, seria o responsável pelas mortes massivas de camarões infectados. Portanto, o conceito de acomodação viral propõe que os camarões podem coexistir com os vírus sem haver efeitos negativos para estes, através de um processo combinado vírus-hospedeiro, o qual envolve a redução do processo apoptótico no hospedeiro normalmente induzido pelo vírus (FLEGEL, 2007).

Por último, vale ressaltar que vários autores têm usado o termo “vacina” para relatar casos onde a aplicação de partículas virais inativadas com formalina ou ainda de proteínas virais recombinantes, especialmente oriundas do WSSV, induziu um aumento de resistência em camarões desafiados com este vírus, por um determinado período de tempo (NAMIKOSHI *et al.* 2004; WITTEVELDT *et al.*, 2004; MELENA *et al.*, 2006). Em 2007, Rout e colaboradores desenvolveram uma chamada “vacina” de DNA que continha quatro proteínas estruturais do WSSV inseridas, e constataram uma proteção contra o vírus ainda mais eficaz que as relatadas nos trabalhos anteriores, uma vez que o período de proteção contra o vírus se prolongava por até dois meses após a “vacinação”. Contudo, é importante lembrar que o princípio da vacinação envolve dois fatores-chaves: a produção de anticorpos e a memória imunológica permanente, fatores estes ausentes em camarões.

A mionecrose infecciosa, causada pelo IMNV, é uma doença relativamente nova e ainda pouco estudada no Brasil, onde foi primeiramente diagnosticada e aonde vem causando perdas econômicas importantes. Pouco se conhecia até o momento sobre como esta enfermidade afeta o sistema imune dos camarões cultivados e como este sistema reage a este vírus. Este trabalho pretende ampliar o conhecimento sobre o sistema imunológico de camarões cultivados no Brasil, buscando uma maior compreensão da interação IMNV/sistema imune. Este estudo pretende ainda desenvolver técnicas de avaliação e monitoramento do estado de saúde dos camarões, para auxiliar

na prevenção e controle de infecções e na seleção de animais mais resistentes, contribuindo assim para uma maior sustentabilidade dos cultivos.

O artigo resultante deste trabalho será submetido à revista *Aquaculture*.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a alteração de alguns parâmetros hematoimunológicos em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, infectados pelo IMNV, em diferentes graus de severidade da doença (camarões assintomáticos, em estágio inicial da doença e em estágio avançado).

Objetivos Específicos:

1. Determinar os hemogramas em três diferentes grupos de camarões;
2. Quantificar a produção de espécies ativas de oxigênio (ânion superóxido) pelos hemócitos dos três grupos de animais;
3. Quantificar o título aglutinante do soro nos três grupos de camarões;
4. Estimar a concentração de proteínas totais do soro de cada grupo de camarões infectados;
5. Determinar a atividade da enzima fenoloxidase (PO) nos diferentes grupos de animais;
6. Verificar a atividade antimicrobiana do soro nos três grupos de camarões analisados;
7. Estimar a porcentagem de hemócitos apoptóticos nos três grupos de animais.

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *PENAEUS VANNAMEI* DURANTE O AVANÇO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

Andrezza M. Costa ^a, Celso C. Buglione ^b, Fabiana L. Bezerra ^c, Pedro C. C. Martins ^d, Margherita A. Barracco ^{a*}

^a Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 88.040-900, Brasil

^b Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 88062-601, Brasil

^c Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas de Animais Aquáticos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, 59072-970, Brasil

^d Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, 59.014-100, Brasil

(*) As correspondências devem ser endereçadas para:

e-mail: barracco@mbox1.ufsc.br

Fone: 55 48 3331.8951

Fax: 55 48 3331.5148

Resumo

No Brasil, a produção de camarões crescia vertiginosamente até 2002, quando o surgimento de uma nova doença, causada pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), afetou fazendas de cultivo localizadas na região Nordeste. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a alteração de alguns parâmetros hemato-imunológicos em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, infectados pelo IMNV. Os animais analisados foram separados em três grupos, de acordo com o grau de severidade da doença: camarões assintomáticos (AS), com sinais iniciais (IN) e sinais avançados (AV) da enfermidade. Os parâmetros analisados foram os hemogramas, porcentagem de hemócitos apoptóticos (coloração de Hoechst), título aglutinante (eritrócitos de cão), produção de ânion superóxido (redução do NBT), atividade da fenoloxidase ou PO (oxidação de L-DOPA) e atividade antimicrobiana da hemolinfa contra bactérias Gram positivas e negativas. Os resultados mostraram uma alteração evidente de vários parâmetros imunológicos apenas em camarões do grupo AV. Neste grupo, houve um aumento significativo da porcentagem de hemócitos apoptóticos (8x), título aglutinante (16x), da produção de ânion superóxido (62%) e da atividade antimicrobiana (21x contra *Micrococcus luteus*) em relação aos camarões dos grupos AS e IN. Por outro lado, houve ainda, no grupo AV, uma redução significativa da contagem total de hemócitos (30%), da porcentagem de hemócitos granulares (6,5%) e da atividade da PO (49%). Estes resultados sugerem que o sistema imune dos camarões infectados pelo IMNV responde apenas em estágios tardios da enfermidade, quando a remissão da infecção não parece ser mais possível. Este é o primeiro estudo a analisar a modulação do sistema imune de camarões durante o avanço da infecção pelo IMNV em fazendas de cultivo brasileiras, onde parece ter se originado a enfermidade.

Palavras chaves: parâmetros hemato-imunológicos; hemolinfa; IMNV; *Litopenaeus vannamei*; camarões; crustáceos.

Abstract

Farm-reared shrimp production in Brazil grew intensively until 2002, when the outbreak of a new disease, caused by the infectious myonecrosis virus (IMNV), disrupted the productions of the Northeast region. The aim of this study was to evaluate the modulation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by IMNV. Affected animals were separated in three groups, according to the severity of the disease: asymptomatic shrimps (AS), animals with initial symptoms (IN) and with advanced symptoms (AD) of the disease. The examined parameters were: hemograms, percentage of apoptotic hemocytes (Hoechst staining), anion superoxide production (NBT reduction); phenoloxidase or PO activity (L-DOPA oxidation), agglutinating titer (dog erythrocytes) and antimicrobial activity of the hemolymph against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Evident changes in the immunological parameters were seen only in animals of group AV, where a significant increase in the percentage of apoptotic hemocytes (8x), agglutinating titer (16x), anion superoxide production (62%) and hemolymph antimicrobial activity (21x against *Micrococcus luteus*) was observed, when compared to groups AS and IN. On the other hand, in the same group AV, there was a significant reduction of the total hemocyte count (30%), the percentage of circulating granulocytes (6,5%) and PO activity (49%). These results suggested that the immune system of the IMNV-infected shrimps responded only in a late stage of the disease, when the animal recovery was not virtually possible. This is the first report to examine the immune system response during the progress of the disease caused by the IMNV, in shrimps from Brazilian farms, where the virus first appeared.

Key words: hemato-immunological parameters; hemolymph; IMNV; *Litopenaeus vannamei*; shrimp; crustaceans.

1. Introdução

O surgimento de doenças infecciosas, na sua maioria de origem viral, tem limitado o desenvolvimento da carcinicultura e causado grandes prejuízos ao setor em todo o mundo. No Brasil, a produção de camarões cresceu vertiginosamente nos últimos anos, até ser afetada por graves epidemias virais. A primeira foi causada pelo IMNV (do inglês, *infectious myonecrosis virus*), em 2002, na região Nordeste do Brasil, onde se localiza a maior parte da produção nacional. A segunda se deu na região Sul, com a entrada do WSSV (do inglês, *white spot syndrome virus*) em 2004. Ambos os vírus causaram quedas expressivas na produção de camarões e conseqüentemente grandes perdas econômicas aos produtores brasileiros (Nunes *et al.*, 2004; Madri, 2005; Rodrigues, 2005).

O IMNV é um vírus aparentemente originário do Brasil, tendo sido identificado e caracterizado em 2004 por Lightner e colaboradores. (2004). Em 2006, a presença deste vírus foi também confirmada, pela primeira vez fora do Brasil, em viveiros da Indonésia (Senapin *et al.*, 2007). Trata-se de um vírus de RNA dupla fita não-segmentado da família Totiviridae (Poulos *et al.*, 2006). Os camarões acometidos pelo IMNV desenvolvem uma enfermidade, conhecida como mionecrose infecciosa, cujo principal sintoma é a perda de transparência do músculo abdominal, conseqüência da necrose do tecido muscular, podendo se estender até o télson. Em uma fase final da doença ocorre o apodrecimento/necrose das áreas afetadas do abdômen, gerando uma aparência de “camarão cozido” também conhecida por “camarão zumbi” (Nunes *et al.*, 2004).

Após seu surgimento, o IMNV causou graves perdas econômicas aos produtores de camarões do nordeste do Brasil, região esta que concentra a maior parte da produção do país. As sobrevivências variavam de 35% a 55%, sendo que as mortalidades ocorriam mais acentuadamente ao final do ciclo de cultivo, quando os camarões já haviam consumido a maior parte da ração empregada durante a produção (Nunes *et al.*, 2004). Hoje em dia, no Nordeste, a síndrome causada pelo IMNV passou para um estágio crônico, com taxas de mortalidade baixas e persistentes, devido à melhoria das condições de cultivo, como a diminuição da densidade de camarões. Contudo, mortalidades elevadas podem ainda ocorrer, quando ocorre algum estresse ambiental (Rocha, 2007).

Existe, assim, uma crescente necessidade de se desenvolver meios de prevenção e controle de viroses, através do monitoramento das condições sanitárias dos animais e do ambiente de cultivo. Neste contexto, um maior conhecimento do sistema imune dos camarões e o estabelecimento de padrões hemato-imunológicos de referência, podem certamente trazer uma importante contribuição para o monitoramento de seu estado de saúde e conseqüentemente para a prevenção e controle de enfermidades.

Assim como outros invertebrados, os crustáceos são dotados apenas de um sistema imune inato, não possuindo o sistema imune adaptativo presente apenas nos vertebrados. O sistema imune dos crustáceos está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa. Esta consiste de uma fração celular, representada pelas células circulantes ou hemócitos, e de uma fração líquida ou

plasma que compreende diferentes fatores humorais. As reações imunes celulares incluem a fagocitose de microorganismos, a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas e a destruição dos patógenos por diferentes mecanismos microbicidas e degradativos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Já, as reações humorais incluem proteínas capazes de reconhecer padrões moleculares específicos presentes na superfície dos patógenos (PRP, do inglês *pattern recognition proteins*) e uma série de moléculas imunofetoras, que levam a neutralização e destruição dos patógenos invasores (Lee e Söderhäll, 2002). Células e fatores humorais atuam de forma integrada na prevenção e controle de infecções, garantindo a integridade corpórea e sobrevivência dos crustáceos.

Dentre as moléculas de reconhecimento ou PRPs em camarões destacam-se as lectinas. Estas são moléculas capazes de se ligar a carboidratos específicos presentes na superfície de diferentes tipos celulares, causando sua aglutinação e eventualmente sua opsonização. As lectinas da hemolinfa de camarões são de um modo geral do tipo C (cálcio-dependentes) e específicas para sialoconjugados (Marques e Barracco, 2000).

Um dos principais mecanismos microbicidas em camarões é a produção de intermediários reativos de oxigênio ou ROIs (do inglês, *reactive oxygen intermediates*), que ocorre principalmente durante a fagocitose. Durante o processo, conhecido como choque respiratório (do inglês, *burst respiratory*), ocorre um consumo aumentado de oxigênio molecular pela enzima NADPH oxidase, que se ativa em presença de compostos da superfície de microorganismos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas e as β -glicanas de fungos. A NADPH oxidase está presente na membrana celular dos hemócitos e na superfície de seus grânulos lisossomais e quando ativada gera uma cascata de radicais de oxigênio altamente tóxicos que se inicia com a produção do ânion superóxido (O_2^-) (Anderson, 1996; Holmblad e Söderhäll, 1999; Bogdan *et al.*, 2000).

Outro potente mecanismo imunofetor em crustáceos é o sistema de ativação da pró-fenoloxidase ou sistema proPO. Este sistema é usualmente ativado durante a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas, onde se forma um precipitado fortemente escuro ou melanização, principalmente na região mais central, próxima aos patógenos aprisionados. A enzima chave neste processo é a fenoloxidase (PO), que se encontra armazenada, sob forma inativa ou pró-fenoloxidase (proPO), nos grânulos dos hemócitos de crustáceos. A proPO é ativada através de uma clivagem proteolítica limitada por serino-proteases, também armazenadas nos grânulos dos hemócitos. A degranulação dos hemócitos é estimulada pela presença de componentes de microorganismos como LPS e β -glicanas. Uma vez liberada e ativada, a PO dá origem a uma cascata complexa de reações químicas, que se inicia com a oxidação de compostos fenólicos, como a tirosina e a DOPA, e culmina com a produção de melanina. Durante esta cascata, formam-se vários compostos intermediários altamente tóxicos, como as quinonas e os ROIs, que resultam na destruição e neutralização dos microorganismos invasores (Nappi e Ottaviani, 2000; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Além do sistema proPO, os grânulos dos hemócitos contêm ainda outras moléculas imunofetoras, como as proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs). Estas moléculas funcionam como antibióticos naturais, atuando como fatores de defesa de amplo espectro e de baixa especificidade, podendo neutralizar rapidamente uma grande variedade de microorganismos. Os PAMs são moléculas geralmente pequenas (< 150-200 resíduos de aminoácidos) e com características

anfipáticas. Apresentam uma região hidrofóbica e outra catiônica, que auxiliam na interação com as membranas dos microorganismos, causando sua desestabilização e/ou formação de grandes poros (Bachère et al. 2004; Bulet et al., 2004). As três principais famílias de PAMs identificadas nos hemócitos de camarões são: as peneidinas, as crustinas e os fatores antilipopolisacarídeos ou ALF (do inglês, *anti-lipopolysaccharide factor*) (Destoumieux et al., 1997; Bartlett et al., 2002; Supungul et al., 2002).

No que diz respeito às defesas antivirais, a apoptose parece ser um dos principais mecanismos a ser desencadeado durante as infecções virais em camarões (Flegel, 2007). As células apoptóticas caracterizam-se pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de pequenos lóbulos citoplasmáticos que são endocitados pelas células vizinhas. A apoptose celular pode limitar e inibir a replicação viral, levando as células infectadas à morte. Por outro lado, há casos onde algumas proteínas virais alteram a fisiologia da célula infectada, promovendo um retardo do mecanismo apoptótico e favorecendo o espalhamento dos vírus para as células vizinhas (Jiravanichpaisal et al., 2006; Flegel, 2007). Contudo, há divergências quanto ao papel da apoptose na resposta antiviral. Enquanto alguns autores consideram a apoptose responsável pela eliminação de material viral do organismo dos hospedeiros, outros sugerem que a ocorrência progressiva de apoptose leva os animais infectados à morte, devido ao extenso comprometimento de seus tecidos (Anggraeni e Owens, 1998; Khanobdee et al., 2002; Flegel, 2007).

Pelo fato da mionecrose infecciosa ser uma doença relativamente nova, pouco ainda se conhece sobre como este vírus afeta o sistema imune dos camarões infectados. Este é o primeiro estudo a avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Penaeus vannamei* infectados pelo IMNV, durante a evolução da doença.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Os camarões *Penaeus vannamei* utilizados neste estudo foram coletados em uma grande fazenda de cultivo de camarões, localizada na região Nordeste do Brasil, ao sul do município de Natal (07°47'42 S), estado do Rio Grande do Norte. A coleta foi feita no período de chuvas, em abril de 2007. Foi utilizado, nos diferentes ensaios, um total de 228 camarões adultos (10,0 - 13,5 g), de ambos os sexos, provenientes de um mesmo viveiro acometido pelo IMNV. Este possuía área de 7 ha e, durante a coleta, operava com densidade de 25 camarões/m². Os animais foram separados em três diferentes grupos (n=76), de acordo com a severidade dos sintomas da doença: *Grupo AS*: animais assintomáticos, mas infectados; *Grupo IN*: animais manifestando sintomas iniciais e leves da doença, com focos de opacidade caudal, principalmente nas regiões laterais do abdômen, próximas aos pleópodos; *Grupo AV*: animais em estágio avançado da doença, apresentando o abdômen todo opaco e com a maior parte dos segmentos comprometidos pela mionecrose.

Camarões com sinais clínicos de estágio final da doença, ou seja, com apodrecimento/necrose dos últimos segmentos abdominais e urópodos não foram utilizados neste

estudo devido a sua extrema fragilidade, pois animais morriam rapidamente durante a manipulação, o que inviabilizou as análises.

2.2. Análises de RT-PCR

Amostras do tecido de muscular esquelético abdominal dos camarões dos três grupos (n=5) foram utilizadas para detecção do IMNV, através de PCR (reação em cadeia da polimerase) por transcrição reversa. Para tal, utilizou-se o Kit IQ2000 IMNV (Farming IntelliGene Tech. Corp., Taiwan), seguindo as instruções do fabricante. O referido kit inclui iniciadores específicos e controles positivos (plasmídeo P (+) com sequências parciais do IMNV). A detecção do vírus foi confirmada pela análise de bandas de tamanho esperado (entre 284 e 476 pb) em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 0,01%. As amostras foram testadas somente para o IMNV, não tendo se avaliado a presença de outros vírus,

2.3. Coleta da hemolinfa para preparação de soro

A hemolinfa dos camarões (n=30, para cada grupo) foi coletada através de uma seringa de 1 ml, acoplada a uma agulha de 30x8 mm (21G), inserida na região ventral do primeiro segmento abdominal dos camarões. Foram feitos 6 *pools* de 5 animais por grupo analisado. Para a preparação de soro, a hemolinfa foi deixada coagular a 4°C, sendo em seguida congelada (-20° C) por 24h. A hemolinfa foi então centrifugada repetidamente a 2.000 g por 10 min, sendo o coágulo desprezado e o sobrenadante, correspondente ao soro (plasma sem coágulo + produtos da exocitose celular), removido e congelado a -20°C para uso posterior.

2.4. Determinação dos hemogramas

A contagem total dos hemócitos ou THC (do inglês, *total hemocyte count*) foi determinada, individualmente, em câmara de Neubauer. Para tal, a hemolinfa dos animais (n=25, para cada grupo) foi coletada diretamente em uma solução fixadora constituída de 4% de formaldeído em solução de Alsever modificada ou MAS (27mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0), a uma diluição conhecida.

A contagem diferencial dos hemócitos ou DHC (do inglês, *differential hemocytes counts*) foi realizada em microscopia de contraste de fase (MCF), a partir das mesmas amostras utilizadas para THC (n=10, para cada grupo). A porcentagem relativa das populações de hemócitos circulantes (hemócitos granulares e hemócitos hialinos) foi determinada, contando-se um mínimo de 100 células por animal.

2.5 Determinação do título aglutinante do soro

Amostras de 50 µl de soro (6 *pools* de 5 animais por grupo) foram diluídas serialmente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, pH 7,4) em microplacas de 96 poços (fundo em "U") e incubadas com 50 µl de uma suspensão de eritrócitos de cão a 2% em TBS-1 por 2 h a 25°C, em câmara úmida. Nos controles, o soro dos camarões foi substituído por TBS-1. O título

aglutinante natural do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.6. Determinação da produção de ânion superóxido (O_2^-) nos hemócitos

A produção de anion superóxido dos hemócitos (7 *pools* de 3 animais por grupo) foi avaliada colorimetricamente através da técnica da redução do NBT (*nitroblue tetrazolium*, SIGMA) para formazan (adaptada de Barracco *et al.*, 1999). Como ativador celular, foi utilizado o *zymosan* (SIGMA), o qual contém fragmentos ricos em β -1,3 glicanas da parede de leveduras. A hemolinfa foi coletada em MAS (pH 5,5, contendo 26 mM de ácido cítrico) e a quantidade de hemócitos foi ajustada para 3×10^6 células/ml em câmara de Neubauer. As suspensões de hemócitos foram centrifugadas a 500 g por 10 min e o MAS substituído por um volume equivalente de TBS-2 (Tris 50 mM, $CaCl_2$ 3 mM, NaCl 400 mM, pH 7,6). Amostras de 100 μ l da suspensão celular foram adicionadas aos diferentes poços de uma microplaca de 96 poços (fundo chato) e as células foram deixadas aderir por 20 min a 25°C. As monocamadas celulares foram então lavadas com TBS-2 e incubadas com 100 μ l de uma solução indutora (TBS-2 acrescido de 3 mg/ml de NBT e 2,5 mg/ml de *zymosan*) por 15 min, à 25°C, no escuro. Após incubação, o sobrenadante das microplacas foi removido, as monocamadas foram fixadas com metanol absoluto por 10 min, lavadas com metanol 70% e secas a temperatura ambiente. O precipitado de azul de formazan citoplasmático foi solubilizado com KOH (120 μ l, 2M) e DMSO (140 μ l) e quantificado em Leitora de Microplaca (A_{630nm}). Nos controles (produção basal), as monocamadas celulares foram incubadas na ausência de *zymosan*. A produção específica de ânion superóxido foi confirmada pela adição de superóxido dismutase (SOD-600 U. ml^{-1} em 2% NaCl), em algumas repetições. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas.

2.7. Concentração de proteínas totais no soro

A concentração protéica do soro (6 *pools* de 5 animais por grupo) foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina (BSA) como padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.8. Determinação da atividade da fenoloxidase (PO)

A determinação da atividade da PO nas amostras de soro (6 *pools* de 5 animais por grupo) foi realizada colorimetricamente, através da formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-DOPA pela PO do soro. Amostras de 50 μ l de soro, previamente diluído (15x) em TBS-3 (Tris 10 mM, NaCl 336 mM, $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,6), foram pré-incubadas com um volume igual de tripsina (SIGMA) (1mg/ml), indutor da atividade enzimática, durante 5 min a 20°C, em uma microplaca de 96 poços (fundo chato). Nos controles, o indutor ou o soro foram substituídos por um volume equivalente de TBS-3. Após incubação, os poços receberam 50 μ l de L-DOPA (3 mg/ml) e a formação de DOPA-cromo foi quantificada em Leitora de microplacas (A_{490nm}) após 5, 10, 20 e 30 min. A atividade enzimática específica da PO foi expressa

pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteínas. Uma (1) unidade de atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20°C (Söderhall e Häll, 1984). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.9. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do soro (6 pools de 5 animais por grupo) foi determinada contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* A270 e as Gram-negativas *Escherichia coli* D363 e *Vibrio harveyi* ATCC14126. O *V. harveyi* foi cultivado em PWS (do inglês, *peptone water saline*: 1,5 % de peptona, 1,5% de NaCl, pH 7,2) a 25°C e as demais bactérias em LB (Luria Betani: 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,4) a 30°C.. Os ensaios foram realizados diluindo seriadamente 75 µl de soro em PWS no caso de víbrio ou PB (do inglês *poor broth*; 1% peptona, 0,5% NaCl, pH 7,4) para as demais bactérias, em microplacas de 96 poços (fundo chato). Cada poço recebeu então 10 µl de uma suspensão bacteriana em crescimento logarítmico (10^2 UFC/ml). Nos controles, o soro foi substituído por solução salina estéril (NaCl 0,34 M). O crescimento bacteriano foi determinado em leitora da microplaca (DO_{630nm}), determinando-se a concentração mínima inibitória ou MIC (do inglês, *minimum inhibitory concentration*) (adaptado de Destoumieux *et al.*, 1999). A atividade microbicida do soro foi confirmada através de um ensaio colorimétrico, adicionando-se 10 µl do corante violeta de p-iodonitrotetrazolium (INT) nos diferentes poços da microplaca (Eloff, 1998), sendo que apenas bactérias viáveis tinham capacidade de reduzir o INT para um pigmento roxo-avermelhado.

2.10. Porcentagem de hemócitos apoptóticos

A porcentagem de células apoptóticas foi determinada através da coloração de Hoechst 33258 (SIGMA) que permite observar alterações morfológicas nucleares características de células em apoptose. Para tal, foram realizados esfregaços de hemolinfa (n=10, de cada grupo) fixada em formol-MAS. Os esfregaços foram imersos em tampão Mc Ilvane (0,1 M ácido cítrico, 0,4 M Na_2HPO_4 , pH 5,5) por 5 min e incubados com Hoechst em tampão Mc Ilvane (1:1500) por 5 min (adaptado de Jacobson e Raff, 1995). As lâminas foram então montadas com lamínulas e esmalte e observadas ao microscópio de fluorescência (365 nm) (Zeiss – Axiostar Plus). A porcentagem de células apoptóticas foi determinada a partir da análise de 200 células de cada amostra individual de camarão.

2.11. Análise estatística

Para a análise de todos os parâmetros foi utilizado o teste ANOVA ($\alpha < 0,05$), seguido do teste de comparação de médias de Tukey. As porcentagens das populações de hemócitos (DHC) e de hemócitos apoptóticos foram transformadas para arcoseno. Os valores da atividade da PO e a THC foram transformados para log e os da atividade aglutinante e atividade antimicrobiana para \log_2 , por não apresentarem homogeneidade de variância.

3. Resultados

3.1. Detecção do vírus por RT-PCR

O tecido muscular abdominal dos camarões dos três diferentes grupos, analisado por RT-PCR, mostrou resultados 100% positivos para presença de IMNV, mesmo nos animais do grupo assintomático (AS), sugerindo que a infecção encontrava-se alastrada por todo viveiro.

3.2. Hemogramas

A contagem total de hemócitos circulantes (THC) mostrou valores muito variáveis, mesmo dentro um mesmo grupo de camarões (altos desvios da média). Nos camarões em estágio inicial da doença (Grupo IN) houve uma leve tendência de aumento da THC ($29,2 \pm 6,5 \times 10^6$ cél/ml) em relação aos animais assintomáticos (AS) ($28,0 \pm 8,2 \times 10^6$ cél/ml), porém não significativa. Já, nos camarões em estágio avançado da infecção (Grupo AV) houve uma redução significativa de 30% da THC ($20,0 \pm 8,6 \times 10^6$ cél/ml) (Fig. 1). Apesar da infecção avançada, os hemócitos circulantes dos camarões do grupo AV não apresentaram alterações morfológicas evidentes, mostrando-se aparentemente saudáveis.

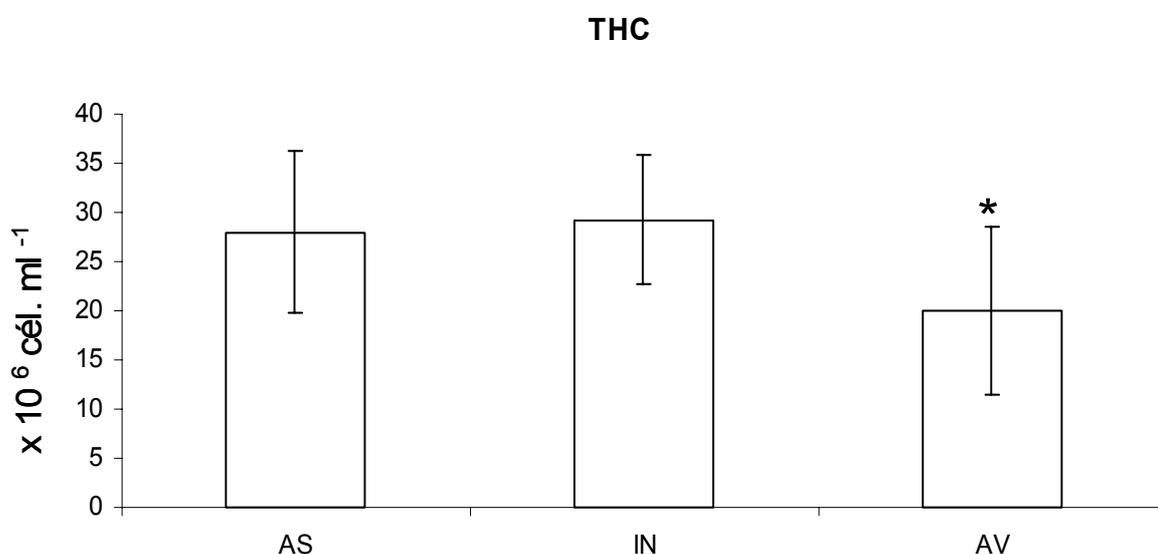


Fig. 1. Contagem total de hemócitos (THC) nos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da doença. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 25 indivíduos em cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Dentre as diferentes populações de hemócitos, os hemócitos granulares ou HGs mostraram-se sempre predominantes, representando ao redor de 70% do total de células circulantes (Fig. 2). Camarões em fase avançada da mionecrose infecciosa mostraram uma redução significativa da

porcentagem de HGs (cerca 7% em relação aos grupos AS e IN) e conseqüentemente um aumento da porcentagem de hemócitos hialinos ou HHs. Não houve diferença significativa entre os grupos AS e IN (Fig. 2).

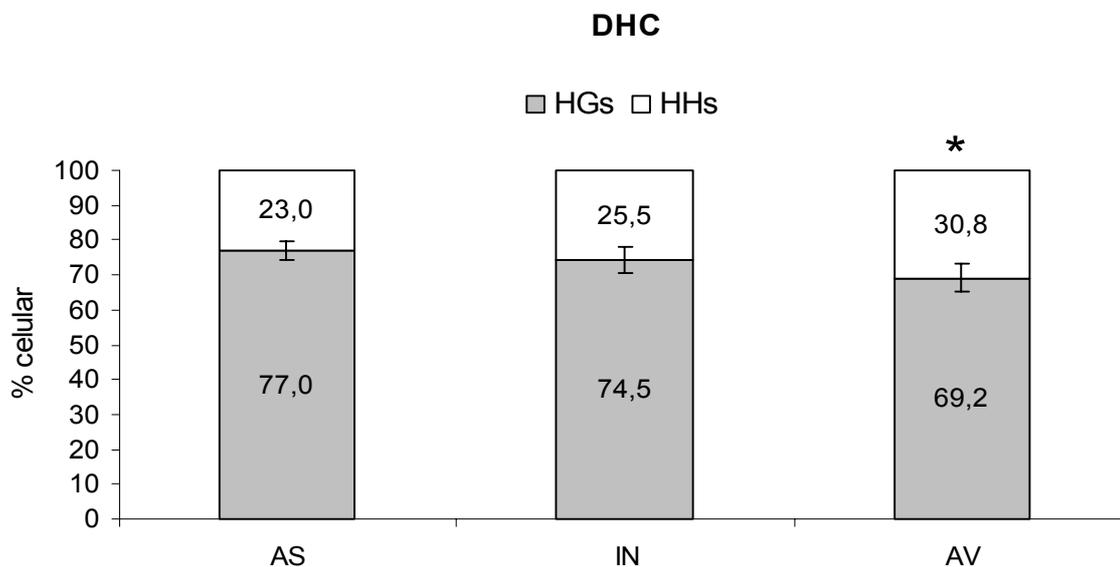


Fig. 2. Contagem diferencial de hemócitos (DHC) nos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 10 indivíduos de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.3. Título aglutinante (TA) do soro

O TA do soro dos camarões contra eritrócitos de cão, mostrou um aumento significativo dos valores dos títulos nos animais em estágio avançado (AV) da infecção (16x, TA médio = 16.384) em relação aos animais dos outros grupos, entre os quais não houve diferenças estatísticas (TA médio = 2.048 e 512 nos grupos AS e IN, respectivamente (Fig. 3).

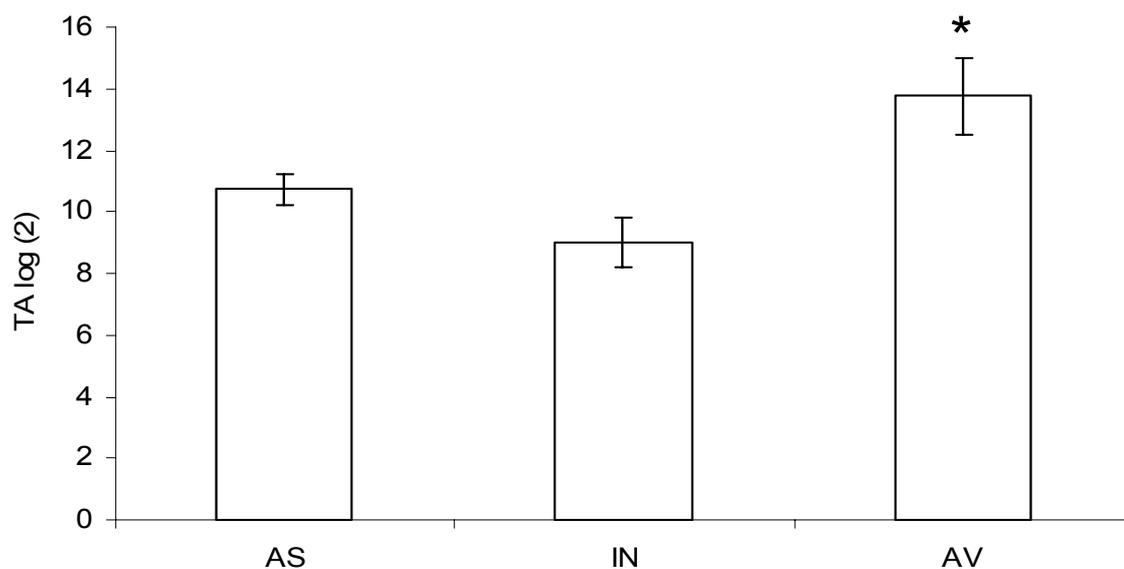


Fig. 3. Título aglutinante do soro, contra eritrócitos de cão, dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 *pools* de 5 animais de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.4. Produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos hemócitos

A produção intracelular de O_2^- nos hemócitos dos diferentes grupos de camarões infectados, avaliada pela redução do NBT, mostrou um perfil de variação semelhante ao do TA. Houve um aumento significativo da produção deste radical nos animais do grupo AV após indução com *zymosan* (62%) (Fig. 4). Interessantemente, a produção basal de O_2^- no grupo AV também mostrou-se significativamente maior (71%) do que nos demais grupos, sugerindo que os hemócitos destes camarões já se encontravam ativados, antes da indução com *zymosan*, provavelmente devido à alta carga viral.

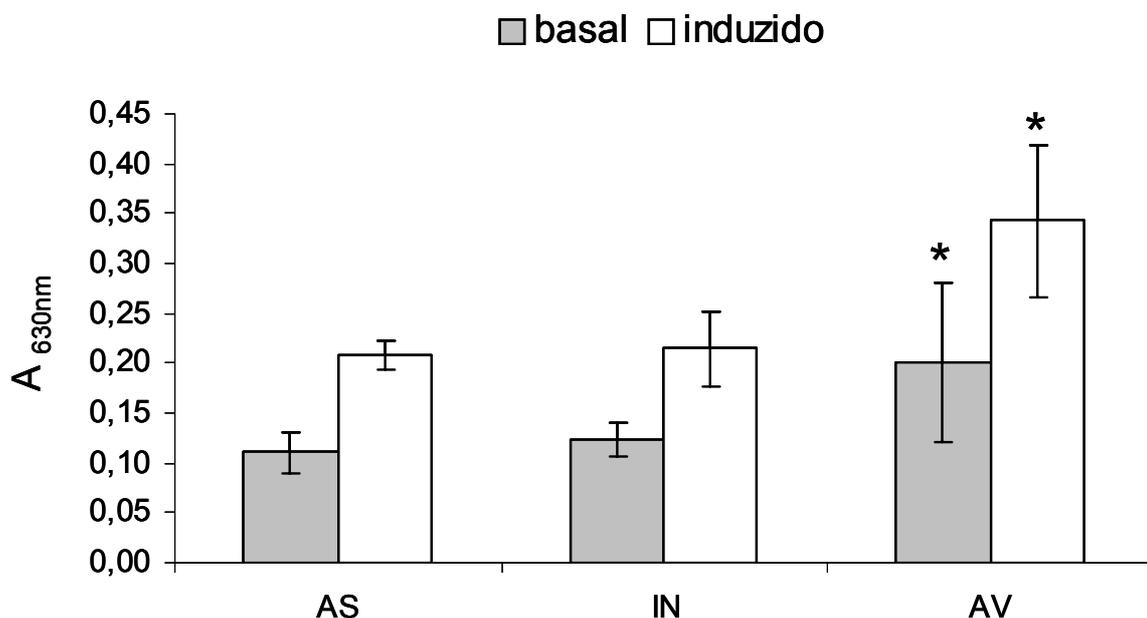


Fig. 4. Produção basal, e após indução com *zymosan*, de ânion superóxido pelos hemócitos dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV, através da redução do NBT: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 pools de 3 animais de cada grupo. Asteriscos representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.5. Concentração de proteínas (CP) totais no soro

A CP do soro dos camarões infectados variou de 105,5 a 141,0 mg/ml, não havendo diferença significativa entre os três diferentes grupos.

3.6. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO, após indução com tripsina, foi semelhante nos grupos AS ($130,4 \pm 50,0$ U/min/mg) e IN ($127,9 \pm 40,1$ U/min/mg), mas mostrou uma redução significativa de 94% nos animais do grupo AV ($66,7 \pm 23,9$ U/min/mg) (Fig. 4).

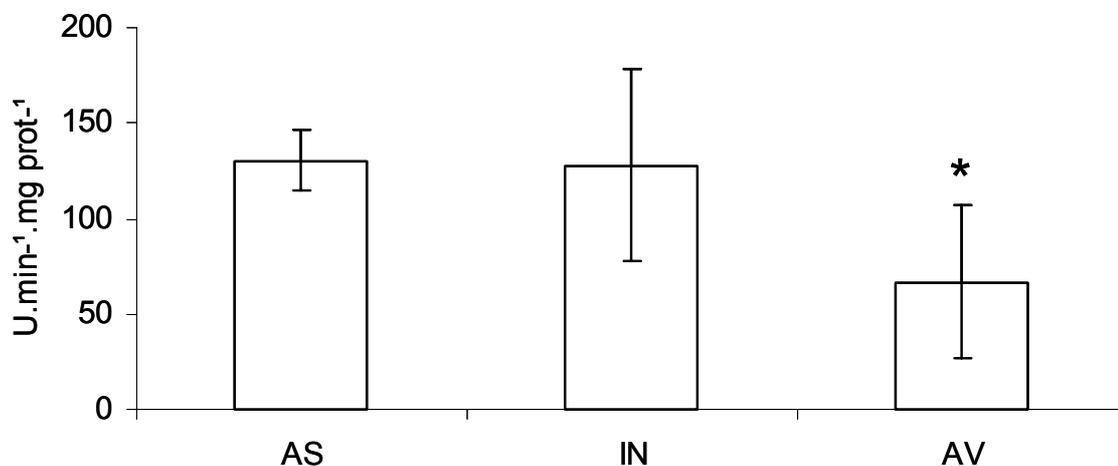


Fig. 5. Atividade da enzima PO, após indução com tripsina, no soro dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam os valores médios \pm desvio padrão de 6 pools de 5 indivíduos de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.7. Atividade antimicrobiana (AA) do soro

O soro dos camarões dos diferentes grupos não mostrou uma atividade antimicrobiana contra a bactéria marinha *V. harveyi*, mas apenas contra as bactérias Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *M. luteus* (Fig. 5). O soro dos camarões do grupo AV (título AA = 1024) mostrou uma AA significativamente maior contra *M. luteus* (21x), do que os outros grupos (título AA = 32 e 64 para os grupos AS e IN, respectivamente). Já no caso de *E. coli*, não houve diferenças significativas entre os três grupos analisados.

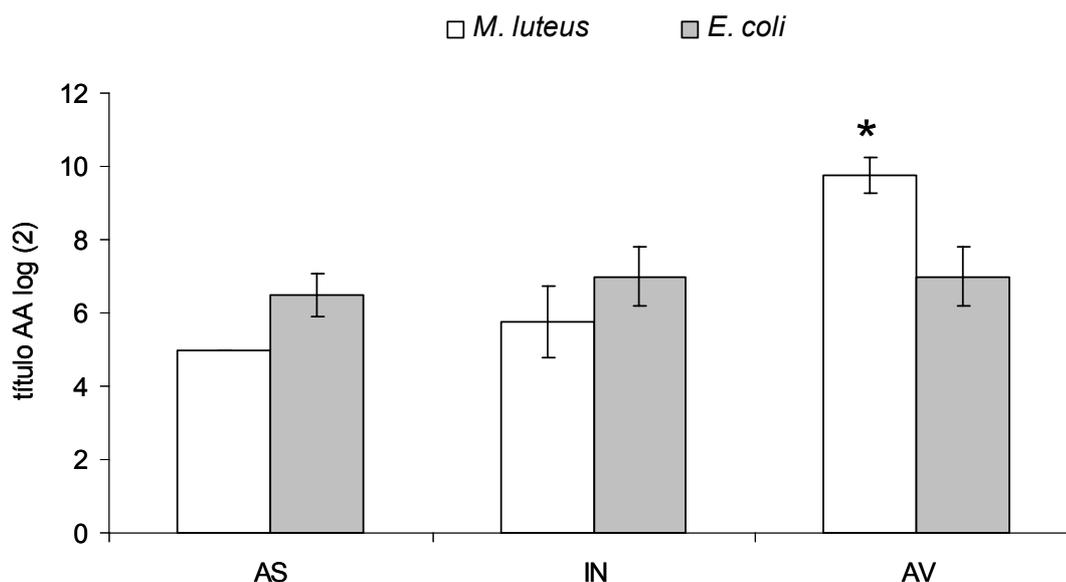


Fig. 6. Atividade antimicrobiana do soro dos diferentes grupos de camarões infectados pelo IMNV: AS, animais assintomáticos; IN, animais em estágio inicial da doença; AV, animais em estágio avançado da infecção. As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 *pools* de 5 animais de cada grupo. O asterisco representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Não houve diferença significativa no caso de *E. Coli*.

3.8. Porcentagem de hemócitos em apoptose

Hemócitos com núcleos morfologicamente alterados (Fig. 7), sugerindo a ocorrência de apoptose, foram observados nos diferentes grupos de camarões infectados, porém em uma porcentagem muito baixa (<5%). Mais uma vez, a porcentagem de núcleos aparentemente apoptóticos foi significativamente maior ($p < 0,05$) em camarões do grupo AV, 4%, do que nos outros grupos, onde esta porcentagem foi de apenas 0,5%.

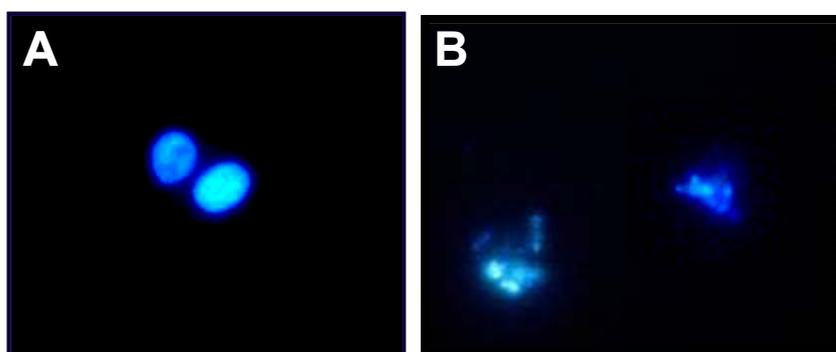


Fig. 7. Alterações nucleares, sugerindo apoptose, em hemócitos de camarões infectados por IMNV (coloração de Hoechst 33258). A: núcleos de aspecto normal; B: núcleos morfologicamente alterados, sugerindo apoptose celular.

4. Discussão

Com o surgimento do IMNV na principal região produtora de camarão do Brasil em 2002 e com os prejuízos econômicos gerados por esta enfermidade, tornou-se imperativo buscar uma maior compreensão dos mecanismos de susceptibilidade/resistência do hospedeiro ao vírus, a fim de permitir um maior controle das infecções. No presente estudo foram selecionados vários parâmetros imunológicos, com o objetivo de acompanhar a resposta imunológica durante o progresso e severidade da enfermidade desencadeada pelo IMNV.

No que concerne os hemogramas, o número de hemócitos circulantes ou THC mostrou-se muito variável dentro de um mesmo grupo de camarões (altos desvios da média), independentemente do grau de severidade da infecção pelo IMNV. Este fenômeno é bastante conhecido em crustáceos, incluindo camarões, onde a THC pode variar grandemente em relação a diversos fatores, como diferentes estados fisiológicos (Le Moullac *et al.*, 1997; Maggioni *et al.*, 2004) ou variantes ambientais (Le Moullac e Haffner, 2000; Perazzolo *et al.*, 2002). Apesar da grande variação encontrada em cada grupo, ainda assim foi possível observar uma diminuição significativa da THC em animais com sintomas avançados da doença (grupo AV). Do mesmo modo, em outras espécies de camarões infectadas por vírus, como *P. japonicus* e *Penaeus indicus* infectados por WSSV e *P. vannamei* infectado por TSV, foi também relatado um decréscimo de suas THCs (Hennig *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2003).

A diminuição do número de hemócitos circulantes pode ser fruto de várias causas, como a infiltração de hemócitos nos tecidos afetados, a baixa reposição das células pelos tecidos hematopoiéticos, ou a morte celular por apoptose. No caso da infecção por IMNV, a infiltração de hemócitos, provocando uma reação inflamatória convencional, foi claramente mostrada nos tecidos musculares de *P. vannamei* (Lightner *et al.*, 2004).

A falta de reposição de hemócitos pelos órgãos hematopoiéticos foi bem estudada em lagostins da espécie *Pacifastacus leniusculus* infectados pelo WSSV, onde se observou que o vírus infecta as células destes órgãos, prejudicando seu funcionamento e conseqüentemente a produção de novos hemócitos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). No caso da infecção pelo IMNV ainda não é sabido se este vírus afeta diretamente as células dos órgãos hematopoiéticos, prejudicando a produção de novos hemócitos.

Quanto a apoptose, nossos resultados mostraram uma taxa apoptótica muito baixa (0,5 a 4%), mesmo nos animais com sintomas severos da doença (grupo AV). Contudo, apesar de baixa, a porcentagem de hemócitos apoptóticos no grupo AV foi significativamente maior (4%) do que nos animais assintomáticos ou com sintomas leves da infecção (0,5%). O baixo índice de células apoptóticas no grupo AV não explica a diminuição de sua THC e sugere que outros mecanismos devam estar também implicados nesta redução. Vale, contudo, salientar que, em nosso estudo, não foram utilizadas técnicas moleculares específicas para detectar apoptose (como o TUNEL), sendo esta reação determinada apenas pela observação direta de alterações nucleares características dos hemócitos circulantes. Desta forma, é possível que tenha havido uma subestimativa dos valores de apoptose neste estudo. Também no lagostim *Pacifastacus leniusculus* infectado pelo WSSV, a porcentagem de hemócitos apoptóticos foi muito baixa (0,4 a 3%), apesar de significativamente maior

do que nos animais não infectados (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Uma outra hipótese para explicar estes valores baixos poderia ser o fato de os hemócitos *circulantes* não serem as principais células a entrar em apoptose nas infecções virais. Em *P. japonicus*, Wu e Muroga (2004) mostraram que o órgão linfóide apresentava uma taxa de apoptose diretamente proporcional à carga viral utilizada em um desafio com WSSV. Em camarões, o órgão linfóide parece ser um tecido crucial no processo de depuração de hemócitos infectados por vírus (Anggraeni e Owens, 1998). É possível pensar que em camarões infectados pelo IMNV haja uma maior concentração de células apoptóticas no órgão linfóide, ou ainda, no tecido muscular, principal tecido afetado pelo IMNV, do que nos hemócitos circulantes.

Com relação à DHC, houve um decréscimo significativo da população de hemócitos granulares (HGs), apenas nos camarões em estado avançado da doença (grupo AV). Os HGs são usualmente considerados as células mais imunocompetentes em crustáceos por conterem uma grande variedade de moléculas imunofetoras armazenadas em seus grânulos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Desta forma, um decréscimo de HGs poderia resultar numa diminuição da resistência dos camarões a infecções. O declínio de HGs já foi relatado em *P. vannamei* com altas cargas virais de WSSV (Motesdeoca *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2003). Nestes animais, deve ocorrer uma infiltração de HGs para os tecidos infectados, o que explicaria, pelo menos em parte, a diminuição deste tipo celular na circulação. Os HGs são também considerados as células responsáveis pela remoção de vírus em camarões (Anggraeni e Owens, 1998). Estes autores encontraram evidências da migração e acúmulo de HGs em esferóides do órgão linfóide em camarões peneídeos infectados por várias viroses, como WSSV e TSV. Isto explicaria a presença das altas cargas virais geralmente observadas neste órgão em camarões infectados. Também em cortes histológicos de *P. vannamei* infectados pelo IMNV foi mostrada a presença de esferóides ectópicos com corpos de inclusão virais em suas células (Lightner *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, as lectinas são consideradas moléculas de reconhecimento de padrão (PRPs) capazes de reconhecer e se ligar especificamente a carboidratos da superfície de diferentes agentes patogênicos, causando sua aglutinação e eventualmente sua opsonização (Marques e Barracco, 2000). Desta forma, a variação na concentração de lectinas plasmáticas em camarões pode indicar uma ativação do sistema imune, resultando numa maior produção de PRPs. Efetivamente, no presente estudo, constatou-se um aumento significativo do título aglutinante (TA) da hemolinfa dos animais com sinais severos da infecção pelo IMNV (grupo AV), embora não houvesse um aumento concomitante da concentração de proteínas totais do soro neste grupo de animais. Estes resultados sugerem um aumento específico da atividade aglutinante da hemolinfa nos camarões com sintomas severos da doença. Também em camarões *P. monodon* infectados com GAV (do inglês, *gill-associated virus*) foi mostrado um aumento do TA associado a uma maior carga viral (Munro e Owens, 2005). Além disso, em *Penaeus chinensis* foi referida uma maior expressão de uma lectina do tipo C (cálcio-dependente), denominada, *Fc-lectin*, nos hemócitos de animais desafiados com WSSV, ou com uma suspensão bacteriana mista, contendo *Vibrio anguillarum* e *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2007). Já, em *P. vannamei* desafiado com WSSV, houve uma diminuição inicial, imediatamente após desafio, na expressão de uma lectina (LvLT), também do tipo C, que aumentou posteriormente

sua expressão com o avanço da infecção (Ma *et al.*, 2007). Em nosso estudo, os maiores níveis do TA foram observados nos camarões do grupo AV, sugerindo uma indução da produção de lectinas nos estágios mais avançados da doença, ou devido a infecções secundárias por bactérias oportunistas, o que é muito comum durante as infecções virais.

A produção de ROIs é um dos mecanismos microbicidas mais eficientes em crustáceos, sendo o ânion superóxido o primeiro radical a se formar durante a ativação da NADPH oxidase. No presente estudo, houve, mais uma vez, um aumento significativo da produção de O_2^- intracelular nos animais com sintomas avançados da doença (grupo AV), tanto a nível basal, quanto após indução com *zymosan*. Estes resultados sugerem que os hemócitos deste grupo de camarões já se encontravam ativos (produção basal alta) por ocasião das análises imunológicas. Contudo, estas células possuíam um potencial de ativação ainda maior do que os outros grupos de camarões, após estimulação com *zymosan*. Interessantemente, embora tenha havido uma diminuição do número de hemócitos nos animais severamente afetados pelo vírus (grupo AV), sua capacidade de produzir ROIs mostrou-se aumentada. Resultados semelhantes foram também referidos em *P. vannamei* infectados pelo TSV (Song *et al.*, 2003) e em *P. monodon* desafiados com WSSV (Joseph e Philip, 2007).

A ativação do sistema proPO, quantificada pela atividade da enzima PO, é também um parâmetro muito utilizado em crustáceos para avaliar seu estado imunológico (Söderhäll e Cerenius, 1998; Perazzolo *et al.*, 2002; Maggioni *et al.*, 2004). Em nosso estudo, foi observada uma redução da atividade da PO nos animais severamente afetados pela doença (grupo AV), quando comparados com camarões assintomáticos ou com sintomas leves da infecção. Estes resultados sugerem uma imunodepleção nos animais do grupo AV, no que diz respeito a este imunoparâmetro. A diminuição da atividade da PO pode decorrer da menor proporção de HGs neste grupo de animais, uma vez que estas células armazenam a pró-enzima proPO e outros fatores de ativação do sistema proPO em seus grânulos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Por outro lado, em outros estudos com camarões infectados por vírus parece haver um aumento da atividade da PO, como em *P. vannamei* infectado tanto pelo WSSV como pelo TSV (Motesdeoca *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2003). Em contraste, um estudo recente com *P. monodon* apontou uma redução drástica da atividade da PO em animais infectados por WSSV, com sintomas severos da doença (Mathew *et al.*, 2007), assim como em nosso estudo.

A atividade antimicrobiana (AA) da hemolinfa constitui, também, um importante parâmetro do sistema imune inato dos camarões. Em nosso estudo, o soro de *L. vannamei* mostrou uma leve AA contra a bactéria Gram positiva *M. luteus* e a Gram negativa *E. coli*, mas não contra a bactéria marinha *V. harveyi*, que pode ser patogênica para camarões. Mais uma vez, houve um aumento significativo da atividade antimicrobiana nos camarões em estado avançado da doença (grupo AV), mas apenas contra *M. luteus*. Estes resultados sugerem, novamente, uma ativação do sistema imune dos camarões do grupo AV, com indução da produção específica de peptídeos antimicrobianos, o que é reforçado pelo fato de não ter havido uma alteração concomitante da concentração de proteínas totais da hemolinfa. Em contrapartida, camarões desta mesma espécie infectados por TSV tiveram um aumento significativo da AA do plasma contra *V. harveyi* e *E. coli* (Song *et al.*, 2003). Um

aumento da AA contra *V. alginolyticus* foi também referido no plasma de *P. vannamei* infectado por WSSV (Rodríguez *et al.*, 2007).

Como pôde ser observado em todos os parâmetros analisados, os resultados para os grupos As e IN se mostraram semelhantes estatisticamente. O fato de o IMNV atacar prioritariamente tecidos, não essencialmente vitais, como o tecido muscular, pode ter corroborado para a falta de ativação do sistema imune nos camarões no estágio inicial da doença, assemelhando-se, dessa forma, aos camarões assintomáticos.

5. Conclusão

Em conclusão, os resultados deste estudo mostram uma evidente alteração de vários parâmetros imunológicos em camarões infectados pelo IMNV. Contudo, esta alteração é observada apenas em camarões com sintomas severos da enfermidade e não nos animais assintomáticos ou com sintomas leves da infecção. Dentre os diferentes parâmetros hemato-imunológicos analisados, alguns foram induzidos/ativados (título aglutinante, produção de ânion superóxido, hemócitos apoptóticos e atividade antimicrobiana), enquanto outros foram depletados (hemogramas, PO) (ANEXO). Aparentemente, a ativação de algumas das vias imunológicas, durante a infecção, ocorre apenas tardiamente nos camarões afetados, tornando pouco provável a remissão da doença. Este é o primeiro estudo a analisar a modulação do sistema imune de camarões durante o avanço da infecção pelo IMNV em fazendas de cultivo brasileiras, onde parece ter se originado a enfermidade. Estes primeiros resultados referem-se basicamente a aspectos funcionais do sistema imune de *L. vannamei*. Análises futuras, envolvendo o uso de técnicas modernas de biologia molecular, poderão basear-se nos resultados aqui obtidos para nortear a seleção de marcadores imunológicos específicos, que auxiliem no monitoramento da infecção pelo IMNV através de técnicas de expressão gênica, por exemplo. Os resultados deste estudo também podem servir como base para avaliar o efeito de imunostimulantes sobre determinados parâmetros imunológicos, com o objetivo de prevenir o avanço da doença em camarões submetidos a infecções experimentais com IMNV. A avaliação detalhada da resposta imune de camarões cultivados em áreas de risco será certamente crucial para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de infecções virais, minimizando assim as perdas da carcinicultura.

6. Referências

- Anderson, R.S., 1996. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: Söderhäll, K., Iwanaga, S.; Vasta, G.R. (Eds), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publication, Fair Haven, pp.109-129.
- Anggraeni, M., Owens, L., 1998. Evidence for the haemocytic origin of lymphoid organ spheroids in *Penaeus monodon*. In: Flegel, T. W. (Ed), *Advances in Shrimp Biotechnology*. Biotec, Bangkok, pp. 137.
- Bachère, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; De Lorgeril, J.; Garnier, J.; Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.

- Barracco, M. A. A. M. ; Medeiros, I. D. ; F. M. Moreira ., 1999. Some hemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellf. Immunol.* 9, 387-404.
- Bartlett, T.C.; Cuthbertson, B.J.; Shepard, E.F.; Chapman, R.W.; Gross, P.S.; Warr, G.W., 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Marine Biotech.* 4, 278-293.
- Bogdan, C.; Röllinghoff, M.; Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 64-76.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarq, J-L.; Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329-344. Bulet, P.; Stöcklin, R.; Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184.
- Destoumieux, D.; Bulet, P.; Loew, D.; Van Dorselaer, A.; Rodriguez, J.; Bachère, E., 1997. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272, 28398-28406.
- Destoumieux, D.; Bulet, P.; Strub, J.M.; Bachère, E., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266, 335-346.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711–713.
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 217-231.
- Hennig, O.; Itami, T.; Maeda, M.; Kondo, M.; Natsukari, Y.; Takahashi, Y., 1998. Analysis of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rodshaped DNA virus. *Fish Pathol.* 33, 389-393.
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111–123.
- Jacobson MD, Raff MC., 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374, 814–816.
- Jiravanichpaisal, P., Sricharoen, S., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2006. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellf. Immunol.* 20, 718-727.
- Joseph, A., Philip, R., 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture* 272, 87–97.
- Khanobdee, K.; Soowannayan, C.; Flegel, T.W.; Ubol, S.; Withyachumnarnkul, B., 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis. Aquat. Org.* 48, 79-90.
- 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.; Frosissard, S.; Levy, P.; AQUACOP., 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellf. Immunol.* 7, 227-234.

- Lee, S.Y.; Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shell. Immunol.* 12, 421-437.
- Lightner, D. V., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Redman, R.M., Pasos-de-Andrade, T., Bonami, J.R., 2004. Infectious Myonecrosis, New disease in pacific white shrimp. *Global Aquac. Adv.* 7, 85.
- Liu, Y.C.; Li, F.H.; Dong, B.; Wang, B.; Luan, W.; Zhang, X.J.; Zhang, L.S.; Xiang, J.H. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 598-607.
- Ma, T. H. T., Tiu, S. H. K., He, J. G., Chan, S. M., 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellf. Immunol.* 23, 430-437.
- Madrid, R.M., 2005. A crise econômica da carcinicultura. *Panorama da Aqüicultura* 90, 30-32.
- Maggioni, D.S.; Andreatta, E.R.; Hermes, E.M.; Barracco, M A., 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture* 241, 501-515.
- Maldonado, M., Rodriguez, J., De Blas, I., Echeverria, F., 2003. Comportamiento hemocitario em familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. *CIVA 2003*, 891-899.
- Marques, M.R.F.; Barracco, M.A., 2000. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191, 23-44.
- Mathew, S., Kumar, K. A., Anandan, R., Viswanathan Nair, P.G., Devadasan, K., 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 315-320.
- Motesdeoca, M., Amano, Y., Echeverria, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., Rodriguez, J., 2001. La respuesta inmunitaria celular del camarón *litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *Mundo Acuic.* 8, 50-55.
- Munro, J., Owens, L., 2005. Haemagglutination as a low-cost detection method for gill-associated virus and by inference, yellowhead virus in *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. *Aquac. Res.* 36, pp. 1369-1373.
- Nappi, A.J.; Ottaviani, E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioassays* 22, 469-480.
- Nunes, A. J. P.; Martins, P. C. C.; Gesteira, T. C. V., 2004. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). *Pan. Aquic* 14, 37-51.
- Perazzolo, L. M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M. A. A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Poulos, B. T.; Tang, K. F. J.; Pantoja, C. R.; Bonami, J. R.; Lightner, D. V., 2006. Purification and characterization of infectius myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.* 87, 987-996.
- Rocha, I. P., 2007. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. *Pan. Aquic.* 17, 26-31.
- Rodrigues, J., 2005. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. *Revista ABCC* 2, 38-44.

Rodríguez, J.; Espinosa, Y.; Echeverría, F.; Cárdenas, G.; Román, R.; Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405-415.

Senapin, S.; Phewsaiya, K.; Briggs, M.; Flegel T. W., 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture* 266, 32-38.

Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta.* 797, 99-104.

Söderhäll, K.; Cerenius, L., 1992. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate Crustacean immunity. *CurrAnn. Opin. Immunol.Rev. Fish Dis.* 10, 2, 3- 23-28.

Song, Y.L.; Yu, C.I.; Lien, T.W.; Huan, C.C.; Lin, M.N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellf. Immunol.* 14, 317-331.

Supungul, P.; Klinbunga, S.; Pichyangkura, R.; Jitrapakdee, S.; Hirono, I.; Aoki, T.; Tassanakajon, A., 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotech.* 4, 487-494.

Wu, J. L., Muroga, K., 2004. Apoptosis does not play an important role in the resistance of 'immune' *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 27, 15-21.

Yoganandhan, K., Thirupathi, S., Hameed A. S. S., 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 221, 1-11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ABCC. Histórico. **Histórico da carcinicultura no Brasil**. Natal, 2007. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/>>. Acesso em 19 de setembro de 2007.
- AMPARYUP, P.; KONDO, H.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 1085-1093, 2007a.
- ANDERSON, R.S. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: SÖDERHÄLL, K., IWANAGA, S.; VASTA, G.R. **New Directions in Invertebrate Immunology**, Fair Haven: SOS Publication, 1996, p.109-129.
- ANGGRAENI, M.S.; OWENS, L. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, v. 40, p. 85– 92, 2000.
- BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.**, v.198, p. 149-168, 2004.
- BACHÈRE, E.; MIALHE E.; RODRIGUEZ, J. Identification of defense effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 5, p. 597-612, 1995.
- BARRACCO, M.A. ; PERAZZOLO, L.M. ; ROSA, R.D. Inmunologia de crustáceos, con énfasis en camarones. In: MORALES V. **Patología e Inmunología del camarón blanco *Penaeus vannamei***, Panamá: CYTED, 2008, (*in press*).
- BARRACCO, M.A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, TAKEMOTO, R., LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**, São Paulo: Ed. Varela, 2004, p. 51-74.
- BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotech.**, v. 4, p. 278-293, 2002.
- BAUCHAU, A.G. Invertebrate Blood Cells. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. **Crustaceans**. v. 2. New York: Academic Press Inc., 1981, p. 385-420.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 64-76, 2000.
- BUCHELI P.; GARCIA, F. O vírus da síndrome da mancha branca. **Pan. Aquic.**, v.15, p. 43-49, 2005.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARQ, J-L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 329-344, 1999.
- CARVALHO, R. A.P.L.F.; RUIVO, U. E.; ROCHA, I. P. Mercado Interno: situação e oportunidades para o camarão brasileiro. **Pan. Aquic.**, v. 17, p. 22-31, 2007.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p. 116-126, 2004.
- CHENG, W.; LIU, C.H.; TSAI, C.H.; CHEN, J.C. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 18, p. 297-310, 2005.

CITARASU, T.; SIVARAM, V.; IMMANUEL, G.; ROUT, N.; MURUGAN, V. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. **Fish Shellf. Immunol.**, v.21, p. 372-384, 2006.

COSTA, A. M. **Avaliação imunológica do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931) em cultivos com ocorrência do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)**. 2006. 24 f. Monografia de graduação, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 28398-28406, 1997.

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

DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **J. Cell Sci.**, 113: 461-469, 2000.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 47070-47077, 2001.

ESPINOSA, G.; RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; MARRERO, J.; RAMOS, L.; BORRELL, Y.; BÉCQUER, U.; NODAS, F.; HERNÁNDEZ, N. D. Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. **CIVA 2002**, p. 756-777, 2002.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em 6 de maio de 2006.

FLEGEL, T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 31, p. 217-231, 2007.

FLEGEL, T.W.; PASHARAWIPAS, T. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: FLEGEL, T.W. **Advances in shrimp biotechnology**. Bangkok: Biotec, 1998, p. 245-250.

GUEGUEN, Y.; GARNIER, J.; ROBERT, L.; LEFRANC, M.P.; MOUGENOT, I.S.; de LORGERIL, J.; JANECH, M.; GROSS, P.S.; WARR, G.W.; CUTHBERTSON, B.J.; BARRACCO, M.A.; BULET, P.; AUMELAS, A.; YANG, Y.; BO, D.; XIANG, J.; TASSANAKAJON, A.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. **Develop.Comp. Immunol.**, v. 30, p. 283-288, 2006.

HAMEED, A. S. S.; SARATHI, M.; SUDHAKARAN, R.; BALASUBRAMANIAN, G.; MUSTHAQ, S. S. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV)-infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. **Aquaculture**, v. 256, p. 111-120, 2006.

HENNIG, O.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; KONDO, M.; NATSUKARI, Y.; TAKAHASHI, Y. Analysis of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rodshaped DNA virus. **Fish Pathol.**, v. 33, p. 389-393, 1998.

HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. **Biol. Bull.**, v. 178, p. 33-45, 1990.

- JIANG, W. S.; ZHAN, W. B.; WANG, S. B.; XING, J. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Aquaculture**, v. 253, p. 114-119, 2006.
- JIRAVANICHPAISAL, P., SRICHAROEN, S., SÖDERHÄLL, I., SÖDERHÄLL, K. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. **Fish Shell. Immunol.**, v. 20, p. 718-727, 2006.
- JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v. 191, p. 45-52, 2000.
- KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives of management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v.191, p. 145-161, 2000.
- KHANOBDDEE, K.; SOOWANNAYAN, C.; FLEGEL, T.W.; UBOL, S.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. **Dis. Aquat. Org.**, v. 48, p.79-90, 2002.
- LE MOULLAC, G.; LE GROUMELLE, M.; ANSQUER, D.; FROSISSARD, S.; LEVY, P.; AQUACOP. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 7, p. 227-234, 1997.
- LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish Shell. Immunol.**, v.12, p. 421-437, 2002.
- LEE, S.Y.; WANG, R.; SÖDERHÄLL, K. A lipopolysaccharide-and- β -1,3-glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 1337-1343, 2000.
- LEU, J. H.; KUO, Y. C.; KOU, G. H.; LO, C. F. Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 32, p. 121-133, 2008.
- LI, C.; SHIELDS, J. D. Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). **J. Invert. Pathol.**, v. 94, p. 48-55, 2007.
- LIGHTNER, D. V. Shrimp virus diseases: Diagnosis, distribution and management. In: WYBAN J. **Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming**, Florida: World Aquaculture Society, 1992, p. 238-253.
- LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; PASOS-DE ANDRADE, T.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis – New Disease in Pacific Shrimp. **Global Aquac. Adv.**, p. 85, 2004.
- LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. **World Aquac.**, p. 1-20, 2004.
- MADRID, R.M. A crise econômica da carcinicultura. **Pan. Aqüic.**, v. 90, p.30-32, 2005.
- MALDONADO, M., RODRIGUEZ, J., DE BLAS, I., ECHEVERRIA, F. Comportamiento hemocitario em familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. **CIVA 2003**, p. 891-899, 2003.
- MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 23-44, 2000.
- MELENA, J.; BAYOT, B.; BETANCOURT, I.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; ALDAY, V.; CALDERON, J.; STERN, S.; ROCH, P. H.; BONAMI, J. R. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. **J. Fish Dis.**, v. 29, p. 589-600, 2006.

MOTESDEOCA, M.; AMANO, Y.; ECHEVERRIA, F.; BETANCOURT, I.; PANCHANA, F.; SOTOMAYOR, M.; RODRIGUEZ, J. La respuesta inmunitaria celular del Camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. **El Mundo Acuicola**, v. 8, p. 38-42, 2001.

MUNRO, J., OWENS, L. Haemagglutination as a low-cost detection method for gill-associated virus and by inference, yellowhead virus in *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. **Aquac. Res.**, v. 36, p. 1369-1373, 2005.

NAGOSHI, H.; INAGAWA, H.; MORII, K.; HARADA, H.; KOHCHI, C.; NISHIZAWA, T.; TANIGUCHI, Y.; UENOBE, M.; HONDA, T.; KONDOH, M.; TAKAHASHI, Y.; SOMA, G. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Mol. Immunol.**, v. 43, p. 2061-2069, 2006.

NAMIKOSHI, A.; WU, J. L.; YAMASHITA, T.; NISHIZAWA, T.; NISHIOKA, T.; ARIMOTO, M.; MUROGA, K. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 229, p. 25-35, 2004.

NAPPI, A.J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioassays**, v. 22, p. 469-480, 2000.

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

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Pan. Aquic.**, v. 12, p. 23-33, 2002.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Pan. Aquic.**, v. 14, p. 37-51, 2004.

NUNES, A. P. J. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. **Pan. Aquic.**, v. 15, p. 26-33, 2005.

OMORI, S. A.; MARTIN, G. G.; HOSE, J. E. Morphology of haemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. **Cell Tissue Res.**, v. 255, p. 117-123, 1989.

PHONGDARA, A.; WANNA, W.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. **Aquaculture**, v. 252, p. 114-120, 2006.

POULOS B. T.; LIGHTNER, D. V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Dis. Aquat. Org.**, v. 73, p. 69-72, 2006.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 987-996, 2006.

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

ROBALINO, J.; BARTLETT, T.; SHEPARD, E.; PRIOR, S.; JARAMILLO, G.; SCURA, E.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; BROWDY, C.L.; WARR, G.W. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? **J. Virol.**, v. 79, p. 13561-13571, 2005.

ROBALINO, J.; BROWDY, C.L.; PRIOR, S.; METZ, A.; PARNELL, P.; GROSS, P.; WARR, G. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. **J. Virol.**, v. 78, p.10442-10448, 2004.

- ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. **Aquaculture**, v. 172, p.125-145, 1999.
- ROCHA, I. P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. **Pan. Aquic.**, v.17, p. 26-31, 2007.
- RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. **Revista ABCC**, v. 2, p. 38-44, 2005.
- RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v. 191, p. 109-119, 2000.
- ROULSTON, A.; MARCELLUS, R.C.; BRANTON, P.E. Viruses and apoptosis. **Annu. Rev. Microb.**, v. 53, p.577-628, 1999.
- ROUT, N.; KUMAR, S.; JAGANMOHAN, S.; MURUGAN, V. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. **Vaccine**, v. 25, p. 2778-2786, 2007.
- SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T. W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, p. 32-38, 2007.
- SÖDERHÄLL, I.; BANGYEEKHUN, E.; MAYO, S.; SÖDERHÄLL, K. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. **Develop. Comp. Immunol.**, v. 27, p. 661-672, 2003.
- SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean Immunity. **Ann. Rev. Fish Dis.**, v. 2, p. 3-23, 1992.
- SOMBOONWIWAT, K.; MARCOS, M.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; AUMELAS, A.; ROMESTAND, B.; GUEGUEN, Y.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Develop. Comp. Immunol.**, v. 29, p. 841-851, 2005.
- SONG, Y.L.; YU, C.I.; LIEN, T.W.; HUAN, C.C.; LIN, M.N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish Shellf. Immunol.** 14, p. 317-331, 2003.
- SONNENHOLZNER, S.; RODRIGUEZ, J.; PÉREZ, F.; BETANCOURT, I.; ECHEVERRIA, F.; CALDERÓN, J. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *L. vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. **Mundo Acuic.**, v. 8, p. 50-55, 2001.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Develop. Comp. Immunol.**, v. 26, p. 237-235, 2002.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 53-69, 2000.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 53-69, 2000.
- SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; JITRAPAKDEE, S.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotech.**, v. 4, p. 487-494, 2002.
- TANG, K. F. J.; DURAND, S. V.; WHITE, B. L.; REDMAN, R. M.; MOHNEY, L. L.; LIGHTNER, D. V. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus—a preliminary study. **Aquaculture**, v. 216, p. 19–29, 2003.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER D. V. *In situ hybridization* demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Dis. Aquat. Org.**, v. 63, p. 262-265, 2005.

TIRASOPHON, W.; ROSHORM, Y.; PANYIM, S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 334, p.102-107, 2005.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, p. 717-735, 2005.

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

VARGAS-ALBORES, F.; JIMÉNEZ-VEGA, F.; SÖDERHÄLL, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Develop. Comp. Immunol.**, v. 20, p. 299-306, 1996.

WANG, Z.; HU, L.; YI, G.; XU, H.; QI, Y.; YAO, L. ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel anti-apoptosis gene. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 325, p. 899–907, 2004.

WARNER, H.R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 3, p. 249-258, 1994.

WITTEVELDT, J.; VLAK, J. M.; VAN HULTEN, M. C. W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 16, p. 571-579, 2004.

WU, J. L., MUROGA, K. Apoptosis does not play an important role in the resistance of 'immune' *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. **J. Fish Dis.**, v. 27, p. 15–21, 2004.

XU, J.; HAN, F; ZHANG, X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Res.**, v. 73, p. 126–131, 2007.

YODMUANG, S; TIRASOPHON, W.; ROSHORM, Y.; CHINNIRUNVONG, W.; PANYIM S. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 341, p. 351–356, 2006.

YOGANANDHAN, K.; THIRUPATHI, S.; HAMEED A. S. S. Biochemical, hysiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 221, p. 1-11, 2003.

ZHANG, J.; LI, F.; WANG, Z.; XIANG, J. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **J. Biotech.**, v. 127, p. 605-614, 2007.

ANEXO

Compilação das alterações dos parâmetros imunológicos analisados em camarões *L. vannamei* durante o progresso da enfermidade causada pelo IMNV.

Parâmetros Imunológicos	Grupos de camarões expressando diferentes graus de severidade da doença (IMNV)		
	AS	IN	AV
THC	NS	NS	↓
HGs	NS	NS	↑
HHs	NS	NS	↓
TA	NS	NS	↑
O ₂ ⁻ basal	NS	NS	↑
O ₂ ⁻ induzido	NS	NS	↑
CP	NS	NS	NS
Atividade PO	NS	NS	↓
AA <i>M. luteus</i>	NS	NS	↑
AA <i>E. coli</i>	NS	NS	NS
Apoptose	NS	NS	↑

AS: camarões assintomáticos; IN: com sintomas iniciais da doença; AV: com sintomas avançados.

NS: diferença não significativo; ↑: aumento significativo; ↓: diminuição significativa.